

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO SISTEMA LINFÓIDE E DA REGENERAÇÃO

Thiago Cantarutti Anselmo

**Efeitos indiretos da tolerância oral a um
componente da dieta (Zeína) no reparo de feridas
na pele de camundongos**

Belo Horizonte
2012

Thiago Cantarutti Anselmo

Efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta
(Zeína) no reparo de feridas na pele de camundongos

Dissertação apresentada ao Departamento
de Morfologia, Instituto de Ciências
Biológicas, UFMG, como requisito para
obtenção de título de Mestre em Biologia
Celular.

Orientadora: Cláudia Rocha Carvalho
Co-Orientadora: Raquel Alves Costa

Colaboradores: Nelson Monteiro Vaz

Belo Horizonte
2012

Dedico este trabalho à minha companheira, à família, e em especial minhas orientadoras À Dr^a Cláudia Rocha Carvalho e a. Raquel Alves Costa por todo aconselhamento, paciência, amizade, calma, ensinamentos, confiança e amizade.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Se, a princípio, a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Aos meus irmãos Luccas, Philippe, á minha querida Mãe pelo vínculo de amor. Obrigada pela paciência e por torcerem por mim em todos os meus projetos.

Á minha companheira e namorada Grazielle Damaceno Costa, pelos conselhos, dicas, conselhos, amizade, sinceridade, ajuda, amor, compreensão e carinho em todos os momentos possíveis.

Ao professor Nelson Monteiro Vaz pelos encontros, discussões, conselhos e contos que me fizeram compreender imunologia e percebê-la de maneira diferente daquela antes vista.

Ao doutorando Geraldo Magela de Azevedo Júnior por toda animação, caronas e companheirismo.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos Especiais

- À Prof^a. Claudia Rocha Carvalho por ter me dado uma oportunidade em seu laboratório no final da minha graduação, pelos conselhos, brincadeiras, ensinamentos, compreensão, ajuda, palavras de conforto e claro enorme paciência.
- À Dr^a. Raquel Alves Costa por ter me ajudado a entrar no laboratório e me apoiado em todas as horas, pelos ensinamentos diversos, caronas, conselhos, amizade, animação e claro me fazer rir pela sua simples presença.
- À família da minha namorada, principalmente minha sogra querida Rosaria, a minha cunhada Lúcelia pelos ensinamentos, minha outra cunhada Elisangela pela ajuda em todos os aspectos e claro minha querida namorada Grazielle Costa.
- A todos os amigos que torceram por mim, principalmente Fernando, Carlos Felipe, David Noronha, que compreenderam muitas vezes o pouco tempo disponível e foram responsáveis por momentos de descontração.
- Aos queridos amigos do grupo: Claudiney, Kênia, Geraldo, Mariana, Daniel pela constante ajuda, companheirismo e luta.
- Aos colegas do laboratório N3140 pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar:
- Aos Professores da Pós-graduação pelas aulas e ensinamentos tão importantes ao aprendizado e compreensão de muitos resultados obtidos.

SUMÁRIO

1.0 - Introdução.....	19
1.1 A dieta e a atividade imunológica.....	19
1.2 Assimilação de antígenos da dieta pela mucosa.....	22
1.3 Tolerância oral.....	23
1.4 Efeitos Indiretos da tolerância oral.....	25
1.5 Adjuvantes.....	27
1.6 Reparo de lesões cutâneas e inflamação.....	30
1.7 Utilização da zeína, uma das proteínas do milho	36
2 - OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Animais	38
3.2 Dieta dos camundongos: ração contendo Zeína.....	38
3.3 Antígenos.....	38
3.4 Adjuvante.....	38
3.5 Efeitos indiretos da tolerância oral com componente da dieta.....	38
3.6 Indução de tolerância oral a OVA pelo tratamento oral com solução de clara de ovo e efeitos indiretos da tolerância oral com OVA.....	39
3.7 Efeitos indiretos da tolerância oral com ou sem adjuvante.....	39
3.8 Modelos Experimentais para estudo do fechamento da lesão cutânea.....	39
3.8.1 - Lesão Incisional no dorso.....	39
3.8.2 - Lesão Excisional no dorso.....	40
3.9 Avaliação do fechamento da lesão excisional no dorso do camundongo.....	41
3.10 Coleta da pele e Processamento Histológico.....	41
3.11 Análises morfológicas dos tecidos.....	42
3.12 Aquisições de imagens.....	42
3.13 Morfometria.....	42
3.14 Análise estatística dos resultados.....	44
4 - RESULTADOS.....	45

4.1 Análise da influência do adjuvante nos efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína tolerada no reparo de lesão incisional na pele de camundongos.....	45
4.2 Efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína da dieta no reparo de lesões incisoriais lineares na pele do dorso de camundongos.....	51
4.3 Efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína da dieta no reparo de lesões excisionais na pele do dorso de camundongos.....	54
4.4 Análise da matriz extracelular após o reparo das lesões incisoriais e excisionais em camundongos que receberam uma imunização com uma proteína componente da dieta.....	57
5 - DISCUSSÃO.....	60
6 - CONCLUSÕES.....	64
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

Lista de Abreviaturas

μM – Micrômetros

μl - Microlitros

OVA – Ovalbumina

$\text{Al}(\text{OH})_3$ – Hidróxido de Alumínio

i.p. – Via intraperitoneal

HE – Coloração de Hematoxilina e Eosina

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

IFN - Interferon

Fig. - Figura

DNP – Dinitrofenil

pH - potencial hidrogeniônico

d – dia (s)

Ig – imunoglobulina

Th - células T helper

HE - Hematoxilina e Eosina

MHC - Major Histocompatibility Complex-Complexo Principal de Histocompatibilidade

NAG e MOP - Indicadores indiretos do influxo de células polimorfonucleares e mononucleares

IEC - Células Epiteliais Intestinais

IEL - Linfócitos Intraepiteliais

FAE - Epitélio Associado ao folículo

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Intestino

DCs – Células Dendríticas

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

TGF- β - Fator de Transformação β

Th1 - Resposta celular do tipo 1

Th2 - Resposta celular do tipo 2

MadCAM - Molécula de adesão celular

IL – interleucina

KLH - Hemocianina

BGG - Gamaglobulina bovina

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

VEGF - Fator Endotelial de Crescimento Vascular

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

MMP – metaloproteinase

MBP - Proteína básica de mielina

TNF - Fator de necrose tumoral

Toll - receptores do tipo *Toll*-like

NKT – linfócito NKT

PMN – Polimorfonucleares

PPAR - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

Lista de Figuras

Fig. 1 – Incisão linear no dorso.....	40
Fig. 2 - Excisão na pele do dorso de camundongos.....	40
Fig. 3 - Coleta e processamento histológico da pele do dorso de camundongos com lesão incisional e excisional.....	42
Fig. 4 - Retículo de 100 μm^2 para uso na análise morfométrica.....	43
Fig. 5 - Posição de campos para análise morfométrica.....	44
Fig. 6 - Protocolo experimental, a influência do adjuvante Hidróxido de Alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral.....	45
Fig. 7 - Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos grupos controle.....	47
Fig. 8 - Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral.....	49
Fig. 9 – Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral nos grupos experimentais.....	50
Fig. 10 A e B – Protocolo experimental, efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (zeína).....	51/54
Fig. 11 - Injeção Intraperitoneal de zeína 30 minutos antes da lesão de pele incisional reduz o número de células inflamatórias e fibroblastos.....	53
Fig. 12 – Injeção Intraperitoneal de zeína 30 minutos antes da lesão de pele excisional reduz o número de fibroblastos e células inflamatórias.....	56
Fig. 13 – Deposição de colágeno foram melhorados por uma injeção i.p. de zeína antes da lesão incisional na pele do dorso de camundongos C57BL/6.....	57

Fig. 14 – Deposição de colágeno foram melhorados por uma injeção i.p. de zeína antes da lesão excisional na pele do dorso de camundongos C57BL/6.....	58
Fig. 15 – Melhora da cicatrização de feridas cutâneas por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína) após 40 dias.....	59

Resumo

No início do século XX observou-se que certos materiais associados ao antígeno, como o hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) atuavam como adjuvantes aumentando muito a produção de anticorpos. Por outro lado, também no início do século XX observou-se que cobaias que haviam se alimentado com ração contendo milho não reagiam imunologicamente às proteínas do milho, como a zeína, como faziam as outras cobaias que não tinham sido alimentadas com milho. Atualmente sabemos que a absorção de proteínas intactas ou parcialmente digeridas através da mucosa intestinal é uma ocorrência comum após as refeições. Estas proteínas interferem na atividade do sistema imune e um resultado usual destas interferências é a tolerância oral, um fenômeno que consiste na diminuição de respostas imunes para proteínas previamente contactadas por via oral. Os primeiros relatos sobre a influência de proteínas da dieta sobre a atividade imunológica foram feitos com proteínas vegetais e animais mas a maioria dos estudos sobre a tolerância oral têm sido feitos usando proteínas derivadas de animais, como ovalbumina (OVA), gamaglobulina bovina (BGG) e hemocianina (KLH). Uma vez que estas proteínas animais não fazem parte da dieta usual dos camundongos, elas são introduzidas na ração ou diluídas na água para a indução de tolerância oral. Desta forma sabemos que os animais que ingerem OVA antes da imunização com OVA+ Al(OH)_3 formam menos anticorpos para OVA do que os que não ingerem OVA. Mas a ingestão de OVA não interfere na imunização com outra proteína, a não ser que durante a imunização com esta segunda proteína seja dada também uma imunização com a proteína tolerada. Esta última observação tem sido objeto de estudo do nosso grupo há alguns anos após mostrarmos que a imunização de animais tolerantes com o antígeno tolerado em adjuvante inibe respostas imunes para antígenos não relacionados e que inibe também reações inflamatórias, como as desencadeadas por carragenina. Este fenômeno desencadeado pela injeção do antígeno tolerado foi denominado "efeitos indiretos da tolerância oral". Mostramos que os efeitos indiretos da injeção de OVA em camundongos tolerantes a OVA inibem a inflamação após lesões na pele de camundongos resultando numa menor

cicatriz. Avaliamos os efeitos indiretos da tolerância oral sobre as lesões cutâneas e elas também ocorrem com uma proteína presente na dieta usual dos camundongos. Usamos a zeína, proteína que faz parte da composição da ração dos camundongos, e os modelos de lesão incisional e excisional na pele. Os efeitos indiretos da imunização parenteral com uma proteína tolerada (Zeína do milho): reduzem o infiltrado inflamatório na área da lesão incisional e excisional nos dias 5, 7 e 40 respectivamente, melhora o reparo e reduz a cicatriz formada pela deposição de uma matriz extracelular de estrutura mais similar à pele normal. A imunização secundária com uma proteína tolerada sem adjuvante e concomitante com a lesão na pele de camundongos, não diminui o infiltrado inflamatório e a área do tecido de granulação, analisando histologicamente a pele no dia 5 após a lesão.

Palavras chave: tolerância oral, efeitos indiretos, adjuvante, zeína, inflamação.

Abstract

Early in the twentieth century it was observed that certain materials associated with the antigen, such as aluminum hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$) served as adjuvant greatly increased the production of antibodies. On the other hand, also in the early twentieth century it was observed that mice that had been fed with feed containing corn not respond immunologically to protein of maize, such as zein, as did other specimens which had not been fed corn. Today we know that the absorption of intact proteins or partially digested by intestinal mucosa is a common occurrence after meals. These proteins interfere with the activity of the immune system and a result of these interferences is usual oral tolerance, a phenomenon consisting in reducing immune responses to proteins previously contacted orally. The first reports on the influence of dietary proteins on the immune activity were made with plant and animal proteins but most studies of oral tolerance have been made using animal-derived proteins such as ovalbumin (OVA), bovine gamma globulin (BGG) and keyhole limpet hemocyanin (KLH). Since these proteins are not part of animals usual diet of mice, they are introduced in the feed or diluted in water for oral tolerance induction. Thus we know that animals ingest OVA before immunization with OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ OVA antibodies to form less than that do not ingest OVA. However the ingestion of OVA immunization does not interfere with other proteins, except that during the immunization with this second protein is also given one immunization with the protein tolerated. This last observation has been studied by our group a few years show that immunization of tolerant animals with antigen in adjuvant tolerated inhibits immune responses to unrelated antigens and also inhibits inflammatory reactions, such as those triggered by carrageenan. This phenomenon triggered by injection of tolerated antigen has been termed "indirect effects of oral tolerance." We show that the indirect effects of injection of OVA in OVA-tolerant mice inhibit inflammation after skin lesions in mice resulting in less scarring. Evaluate the indirect effects Oral tolerance on the cutaneous lesions and they also occur with a protein present in the usual diet of mice. We zein, forming part of protein composition of the feed of the mice and model incision and excision of the skin. The indirect effects of parenteral immunization with a tolerated protein (zein

from corn) reduces the inflammatory infiltrate in the area of incision and excision on days 5, 7 and 40 respectively, improves the repair and reduces the scar formed by deposition of an extracellular matrix structure more similar to normal skin. The secondary immunization with a protein tolerated without adjuvant and concomitant damage to the skin of mice, did not reduce the inflammatory infiltrate and the area of granulation tissue histologically analyzing the skin at days _____ after _____ injury.

Keywords: oral tolerance, indirect effects, adjuvant, zein, inflammation.

1.0 – Introdução

1.1 - A dieta e a atividade imunológica

Os componentes da dieta entram em contato com a maior área que o organismo expõe ao ambiente. No ser humano, além do intestino possuir metros de extensão, a presença de pregas, vilosidades e microvilosidades aumenta de maneira significativa à superfície da mucosa intestinal disponível para a absorção de nutrientes. Calcula-se que as pregas aumentem a superfície intestinal em cerca de 3 vezes, as vilosidades em 10 vezes e as microvilosidades em 20 vezes, sendo, em conjunto, responsáveis por um aumento de 600 vezes na superfície intestinal. A área da mucosa intestinal no ser humano adulto, portanto, atinge aproximadamente 200 a 300 m² (Junqueira & Carneiro, 2004). Somente a mucosa intestinal apresenta uma área 100 vezes maior que a área da pele (Moog, 1981).

Aproximadamente uma tonelada de alimentos passa pelo trato gastrointestinal a cada ano, portanto, o sistema imune intestinal está em constante contato com uma grande quantidade de antígenos diferentes (Seibold, 2005). A variedade de reações imunes que pode ocorrer em seguida à absorção do antígeno pelo epitélio intestinal depende da natureza do antígeno, da via de entrada no organismo e da história imunológica do indivíduo. A mucosa intestinal representa um ecossistema complexo que combina o epitélio, células do sistema imune e a microbiota residente (Mccracken & Lorenz, 2001).

Quando um antígeno proteico é ingerido, o mesmo é clivado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado. Alguns antígenos, no entanto, escapam dessa digestão e podem ser absorvidos intactos ou apenas parcialmente degradados (Wakabayashi, Kumagai, et al, 2006). O epitélio intestinal, portanto, representa uma barreira física e química (Wershil et al., 2008; Lievin-Le Moal & Servin, 2006). O desenvolvimento e a maturação do sistema imune são diretamente influenciados pela dieta e pela colonização

bacteriana. Além de facilitar a digestão de alguns alimentos e resguardar a mucosa intestinal contra micro-organismos patogênicos (Guarner e Malagelada, 2003 / Hooper e Gordon, 2001 / Turnbaugh, Ley, et al, 2007), a microbiota também auxilia no desenvolvimento de estruturas do GALT.

Somado a isso, a mucosa intestinal possui estruturas linfóides que, em conjunto, formam o “Gut Associated Lymphoid Tissue” (GALT). As células do GALT estão localizadas em microambientes especiais, como as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos, ou inseridos entre as células epiteliais da mucosa (linfócitos intraepiteliais). Aí estão linfócitos T e B e células dendríticas com características fenotípicas diferentes. Também são encontrados tipos celulares especiais, incluindo as células M e as células de Paneth, além dos linfócitos intraepiteliais (Mowat et al., 2003).

As células M interagem diretamente com moléculas e partículas do lúmen intestinal e realizam a transcitose destes materiais para seu interior. A membrana da célula M forma muitas pregas ao redor de linfócitos e células apresentadoras de antígeno, sendo estas últimas responsáveis pela captação e processamento do material transportado depois apresentado como peptídeos na ativação de linfócitos. Além do tecido linfóide organizado, muitos linfócitos encontram-se dispersos pela lâmina própria da parede intestinal. Estas células estão entre as efetoras do sistema imune da mucosa intestinal (Neutra et al, 2001; Iwasaki & Kelsall, 2000; Kelsall & Strober, 1996).

Abaixo do epitélio associado aos folículos linfóides (FAE), há uma região difusa chamada de domínio subepitelial e formada principalmente por células dendríticas (DCs), que podem capturar antígenos do lúmen através de extensões da membrana que se projetam entre as células epiteliais (Burks, Laubach, et al, 2008 / Rescigno, Urbano, et al, 2001). Os próprios enterócitos são capazes de capturar antígenos solúveis, processá-los e apresentá-los às células T (Kunisawa e Kiyono, 2005). As placas de Peyer apresentam numerosos folículos compostos de linfócitos B IgM+ que são precursores de plasmócitos secretores, principalmente de IgA.

Linfócitos T, especialmente T helper (Th), DCs e macrófagos estão presentes nas regiões interfoliculares. Diferentemente de outros órgãos linfóides, as placas de Peyer apresentam somente vasos linfáticos eferentes e recebem antígenos através do epitélio e não pela circulação sistêmica (Mowat, 2003).

A população de linfócitos intra-epiteliais (IEL) pode participar de respostas imunes inflamatórias e também no processo de indução de tolerância oral. Através de estímulos, os IELs podem sintetizar citocinas como interleucinas (IL) IL-2, IL-13, IL-6, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), quimiocinas como as linfotaxinas e também fator de crescimento para queratinócitos, importante para a renovação epitelial e reparo a danos teciduais (Kunisawa, Takahashi, et al, 2007 / Cheroutre, 2004).

Os IELs também liberam citocinas anti-inflamatórias e reguladoras como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e IL-10, tendo um papel chave na manutenção da homeostase intestinal (Saurer, Seibold, et al, 2004). Muitas moléculas de interação, tais como α E integrina e E-caderina, são expressas entre IELs e IECs respectivamente. Essas interações cumprem um papel importante na retenção de IELs no epitélio intestinal e na manutenção da integridade da camada epitelial (Cepek, Shaw, et al, 1994).

As duas populações efectoras da mucosa, IELs e linfócitos da lâmina própria estão sobre forte influência das proteínas da dieta e da microbiota (Smith e Nagler-Anderson, 2005). Assim, compartimentos especializados parecem facilitar o contato do sistema imune com esses antígenos exógenos e fornecem um meio favorável para a sinalização e a indução de diferentes mecanismos imunes.

Os linfócitos T e B ativados migram das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos e daí trafegam para o ducto torácico, chegando à circulação sanguínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa intestinal pelas vênulas de endotélio alto e passam a residir na lâmina própria. Esses vasos da mucosa intestinal e de outras mucosas (respiratória,

reprodutiva e mama em lactação) expressam a adressina de mucosa (MadCAM-1) que se liga à integrina $\alpha 4\beta 7$ presente na superfície dos linfócitos. Essa ligação possibilita o retorno dos linfócitos às mucosas. Dessa forma, uma resposta imune iniciada por contato com antígenos em um número limitado de placas de Peyer pode ser disseminada sistemicamente (Sampson, 1999; Eigenmann, 2002).

As placas de Peyer são também o maior sítio de desenvolvimento de células B produtoras de imunoglobulina A (IgA). Isso ocorre devido à influência de sinais provenientes de células dendríticas, células T e da produção local de citocinas incluindo fator de crescimento transformante β (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10) (Fagarasan & Honjo, 2003). Nos seres humanos, pelo menos 80% dos plasmócitos estão localizados na lâmina própria do intestino e juntos produzem 40-60 mg/kg/dia de IgA. Esse número excede várias vezes o número de células secretando imunoglobulinas de todos os outros órgãos linfóides juntos (Van der Heijden et al., 1987). A IgA secretória atua prevenindo a penetração de antígenos luminiais, microorganismos e outras proteínas estranhas presentes na superfície intestinal, neutralizando toxinas e organismos infecciosos (Mesteckey et al., 1999).

Em recém-nascidos, as enzimas digestivas não estão completamente ativas e a formação de IgA secretória não está ainda estabelecida até os quatro anos de idade. Isso leva a uma maior absorção de proteínas não digeridas causando o desencadeamento de uma resposta imune aos componentes da dieta (Mayer, 2003).

1.2 - Assimilação de antígenos da dieta pela mucosa

Diariamente o organismo é exposto uma grande quantidade de antígenos do ambiente no trato gastrointestinal, incluindo proteínas da dieta e micróbios comensais.

O contato com a maior parte de antígenos do ambiente ao corpo ocorre via superfícies mucosas, como a mucosa intestinal, onde a indução da tolerância a bactérias comensais e proteínas da dieta representa o principal evento imunológico em condições fisiológicas (Faria & Weiner, 2005).

1.3 - Tolerância Oral

Estudos que mostram a influência das proteínas da dieta sobre as reações imunológicas, em um sentido além do nutricional, datam do início do século XX. Nesta época foi observado que era possível evitar a sensibilização anafilática em cobaias por injeção de proteínas do leite, do milho ou do ovo, por meio da alimentação prévia com estas proteínas (Besredka, 1909; Wells & Osborne, 1911, Wells, 1911). De acordo com Wells & Osborne (1911), cobaias que receberam uma dieta contendo milho antes de injeções de zeína, uma das proteínas do milho, não sofreram reações anafiláticas, como sofreram as cobaias que não comeram milho. Mesmo antes destes trabalhos, já em 1829, encontram-se relatos sobre índios americanos que ingeriam extratos de uma planta sensibilizante (poison ivy) como forma de impedir a dermatite de contato com esta planta (Dakin, 1829).

Nos anos 1970, a inibição da reatividade imunológica comumente produzida pela ingestão de uma proteína foi chamada de tolerância oral em analogia à tolerância natural que o organismo desenvolve a seus componentes (Thomas and Parrott, 1974; Andre et al, 1975; Vaz et al, 1977).

As consequências imunológicas da exposição oral a proteínas são amplas e podem, inclusive, modificar a organização estrutural da mucosa intestinal e do tecido linfóide associado a esta mucosa (Menezes et al., 2003). Entretanto, as consequências imunológicas da ingestão de proteínas não se restringem à mucosa, pois tem repercussões sistêmicas.

A tolerância oral é classicamente definida como uma diminuição da reatividade imunológica após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (Vaz et al., 1997, Mowat, 1999 / Faria e Weiner, 2005

/Smith e Nagler Anderson, 2005). Contudo, ela também é definida como uma regulação, em que ocorre uma estabilização da reatividade imune específica após imunização com antígeno previamente administrado por via oral (Verdolin et al., 2001; Carvalho et al., 2002). Em animais tolerantes, foram observadas reduções no aparecimento de células formadoras de anticorpos, de imunoglobulinas circulantes e da hipersensibilidade tardia (Strobel and Mowat, 1998, Weiner, 2001).

De maneira ainda não esclarecida, a indução de tolerância aos antígenos da dieta depende da atividade proteolítica de enzimas digestivas, pois sua inibição pode inibir a tolerização (Hanson and Morimoto, 1980; Michael, 1989). As proteínas ingeridas são ativamente processadas e seus peptídeos apresentados pelas células componentes do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Tsuji e Kosaka, 2008). Parte das proteínas ingeridas podem também ser encontradas intactas ou incompletamente degradadas no sangue após as refeições em indivíduos adultos normais (Gardner, 1988).

A indução da tolerância oral é influenciada por vários fatores entre eles, a natureza do antígeno. Todos os antígenos solúveis timo-dependentes são capazes de induzir tolerância oral (Strobel, 1998). A dose do antígeno assim como a repetição da exposição oral é importante nesse processo; a ingestão voluntária de doses diárias do antígeno em dias consecutivos, como ocorre em uma dieta normal, é mais eficaz na tolerização que a aplicação do antígeno por gavagem (intubação gástrica). O fenômeno da tolerância assim induzida é mais persistente e difícil de ser quebrada (Faria, 1999).

A idade dos animais é outro fator relevante: é mais difícil induzir tolerância em animais neonatos ou senis, o que pode ser facilitado se estes animais recebem transferência de linfócitos de animais normais jovem-adultos. Isso indica que a indução de tolerância depende da imunocompetência do organismo (Vaz et al., 1997; Faria, 1999). A microbiota intestinal, o background genético e a facilidade de absorção intestinal do antígeno, são fatores que também afetam a tolerância oral (Faria, 1999; Faria & Weiner, 2005).

Vários mecanismos são propostos para explicar a tolerância oral, tais com o aparecimento de linfócitos supressores-reguladores, deleção clonal de linfócitos ou anergia (Strobel and Mowat, 1998; Faria and Weiner, 2005). A tolerância oral pode ser adotivamente transferida de camundongos tolerantes para camundongos naïve (Richman et al., 1978; Cunha et al., 2009) e isto fala a favor de sua manutenção por um processo ativo.

1.4 - Efeitos Indiretos da tolerância oral

A tolerância oral é um fenômeno imunologicamente específico, por exemplo: a ingestão prévia de OVA previne a formação de anticorpos anti-OVA, mas não interfere na formação de anticorpos para outras proteínas, como hemocianina (KLH) ou gamaglobulina bovina (BGG) (Strobel & Mowat, 1988). No entanto em 1981, Vaz e colaboradores mostraram que em camundongos tolerantes a OVA a injeção concomitante de DNP-OVA + DNP-KLH inibia a formação de anticorpos anti-DNP, que deveria ser iniciada pela DNP-KLH (Vaz et al., 1981). Vários estudos posteriores confirmaram estas observações demonstrando que a injeção parental de animais tolerantes com uma proteína tolerada (em adjuvante) leva a uma diminuição da resposta imune para outras proteínas injetadas concomitantemente, ou pouco tempo depois (Miller et al., 1991, Carvalho et al., 1994, 1997). Esse fenômeno é conhecido como “bystander suppression” (Miller et al., 1991) ou efeito indireto da tolerância oral (Carvalho et al., 1994, 1997).

Miller e colaboradores mostraram que ratos tratados com OVA por via oral e posteriormente imunizados com proteína básica de mielina mais OVA em adjuvante, tinham uma supressão da encefalomielite experimental auto-imune (Miller et al., 1991). Através de experimentos “in vitro” estes autores mostraram que o fenômeno de inibição da proliferação celular se dava pela produção da citocina TGF- β . Propuseram então que a inibição (não específica) da resposta à proteína básica de mielina (MBP) era devida a uma proximidade dos linfócitos tolerantes a OVA a aqueles reativos a MBP (Miller et al., 1991). Por isto eles

nomearam o fenômeno inibitório de “innocent bystander suppression” que significa “supressão do espectador inocente”.

Carvalho e col. (1994, 1996, 1997) mostraram que a inibição de respostas imunes às proteínas não especificamente relacionadas ao antígeno tolerado:

- ocorre mesmo se as duas proteínas forem injetadas por vias diferentes;
- ocorre mesmo se o antígeno tolerado for injetado até 72h antes (mas não depois) do outro antígeno;
- permanece na imunização secundária mesmo sem o antígeno tolerado, se a imunização primária for realizada na presença do antígeno tolerado.

Para Carvalho e colaboradores, estes fenômenos não podem ser explicados pela contiguidade entre linfócitos T tolerantes e não tolerantes e poderão ser mais bem compreendidos em uma visão sistêmica da atividade imunológica, na qual as reações imunológicas são interligadas e não isoladas em linfócitos específicos (Carvalho et al., 1994, Carvalho et al, 1997).

Experimentos realizados em nosso laboratório indicam que os efeitos indiretos da tolerância oral interferem diretamente no processo inflamatório. Rodrigues e colaboradores (2006) mostraram que a injeção de OVA em animais tolerantes orais a OVA bloqueia a migração de células para um local inflamado. Em outros experimentos, Ramos et al. (2009) mostraram que a injeção s.c. concomitante de OVA+hemoglobina em animais tolerantes orais a OVA, impede a peritonite desencadeada pela injeção i.p. de hemoglobina, bem como, inibe a produção de eosinófilos na medula óssea. Além disso, os efeitos indiretos da injeção parenteral do antígeno tolerado bloquearam a inflamação desencadeada pela injeção de carragenina na pata dos camundongos e resultou também na inibição da produção de NAG e MOP (indicadores indiretos do influxo de células polimorfonucleares e mononucleares) (Ramos et al. 2009).

Posteriormente, Costa e colaboradores analisaram a repercussão destes efeitos anti-inflamatórios no reparo de lesões incisionais na pele do dorso de camundongos tolerantes à OVA. Observaram que nos animais tolerantes a OVA a injeção i.p de OVA+Al(OH)₃ concomitantemente com o corte da pele, houve melhor reparo da ferida incisional, na qual o reparo ocorre por primeira intenção. Houve redução do tecido de granulação e de miofibroblastos e as fibras de colágeno I e III estavam dispostas de forma similar à da pele intacta, com espessura próxima à fibra de colágeno normal. Portanto, os efeitos indiretos da tolerância oral melhoraram o reparo de lesões incisionais (Costa et al. 2011).

Em 2011, mostramos que este mesmo processo melhora o reparo de feridas excisionais de animais tolerantes (Matos, 2011; Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, UFMG). Interessantemente, a injeção de OVA por via i.p. em camundongos tolerantes a OVA reduz o tamanho de granulomas pulmonares em torno de ovos de *Schistosoma mansoni* inoculados por via endovenosa em camundongos não infectados (Azevedo-Jr. et al, 2011, Carvalho et al 2002).

Nos estudos de tolerância oral e dos seus efeitos indiretos, a injeção parenteral do antígeno tolerado foi sempre feita com adjuvantes, desde que a tolerância oral é caracterizada por comparação com a imunização de animais não tolerantes, que requerem a presença do adjuvante na imunização primária para que ocorra a formação de anticorpos. Os adjuvantes são tradicionalmente usados nas vacinas para potencializar a imunização embora não sejam ainda claros os seus mecanismos de ação (Exley, et al 2010).

1.5 – Adjuvantes

A imunologia surgiu com a busca por novas vacinas e de aplicações terapêuticas do soro de animais imunes. A busca por formas eficazes de imunização na prevenção de doenças contagiosas ou a obtenção de soros para tratamento, levou também à procura por adjuvantes, substâncias que,

injetadas junto com os antígenos, potencializam a produção de anticorpos. Assim, no início do século XX Glenny e cols. mostraram que certas substâncias, principalmente o hidróxido de alumínio (Al(OH)_3), associado a um antígeno, potenciavam a produção de anticorpos (Glenny et al., 1926). Desde então, substâncias com atividade adjuvante têm sido misturadas a antígenos protéicos para aumentar a sua imunogenicidade (Storni e cols. 2005).

Os compostos de alumínio como hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) são os adjuvantes mais frequentemente utilizados em vacinas tanto para uso veterinário como para humanos. O alumínio entra na composição de 25 vacinas habitualmente utilizadas, incluindo contra a difteria, o tétano, a poliomielite (Salk) e as hepatites A e B (Ministerio da Saúde, 2001).

Embora o uso de adjuvantes seja hoje um evento corriqueiro na imunologia, ainda existem muitas perguntas sobre seus mecanismos de ação. Muitos de seus efeitos parecem depender de células apresentadoras de antígeno, tais como células dendríticas (DCs). Adjuvantes podem afetar a migração e maturação de células apresentadoras de antígenos, ou mesmo sua apresentação e a expressão de moléculas de co-estimulação por células apresentadoras. Esses eventos podem, por sua vez, facilitar a interação das células apresentadoras de antígenos com linfócitos T e aumentar a produção de anticorpos pelos linfócitos B (Mckee et al, 2007).

Os adjuvantes promovem uma inflamação no local onde são injetados que, por sua vez, estimula a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os linfonodos. Outro mecanismo proposto para a ação dos adjuvantes é a formação de “depósitos”, no qual o adjuvante protege o antígeno de diluição e rápida degradação/eliminação pelo organismo. Através da liberação prolongada do antígeno intacto, o adjuvante permitiria uma estimulação lenta e prolongada das células do sistema imune e isto resultaria na produção de altos níveis de anticorpos (Stills Jr, 2005).

É possível que a ação adjuvante do $\text{Al}(\text{OH})_3$ dependa de diferentes mecanismos entre os quais se incluem a formação de “depósitos” por adsorção do antígeno, aumento da apresentação de antígenos a APCs e ativação não específica do sistema imune (Schijns, 2001). A imunogenicidade do antígeno na presença de $\text{Al}(\text{OH})_3$ pode ser dependente do grau de adsorção do antígeno e da dose do adjuvante (Gupta, 1998). Segundo Vaz e cols., a dose do adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ é mais importante do que a dose do antígeno para a indução da resposta imune existindo uma linearidade entre a dose de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e a magnitude da formação de anticorpos. Esse estudo ainda sugere que o efeito do $\text{Al}(\text{OH})_3$ depende do desenvolvimento de células B (Vaz et al., 1981).

Embora muito conhecido por sua capacidade de adsorção e por retardar a eliminação do antígeno, outros mecanismos de ação podem ser também importantes para sua função adjuvante. O $\text{Al}(\text{OH})_3$ pode induzir eosinofilia e ativação de complemento, assim como uma intensa degranulação de mastócitos no local da injeção; quase não restam mastócitos intactos na cavidade peritoneal de camundongos alguns minutos após a injeção de $\text{Al}(\text{OH})_3$. A inflamação local aumenta a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os linfonodos. As células B podem ser o principal alvo do efeito do $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Gupta, 1998; Vaz e cols., 1981).

Villa-Real et al. (2000) mostraram que o tipo de adjuvante, a via de imunização ou o protocolo de imunização usado influenciam significativamente a resposta imunológica. Em geral, o uso de compostos de alumínio como adjuvante com proteínas puras pode resultar no estímulo de células que terão a característica de linfócitos TH2, associadas com a produção de IL-4, IL-5 e anticorpos do isotipo IgG1 e IgE (Mosman et al., 1989).

A inflamação provocada pela injeção do adjuvante, que é um fator relevante no mecanismo que aumenta a produção de anticorpos, torna-se um fator complicador quando nosso objetivo é entender a interferência da atividade imunológica sobre eventos inflamatórios. Em trabalhos anteriores de nosso grupo, mostrou-se que a injeção i.p de OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ minutos antes de uma lesão cutânea em camundongos tolerantes à OVA diminuía o número de

células inflamatórias, o tecido de granulação e o número de miofibroblastos durante o reparo. Um de nossos objetivos neste trabalho é averiguar se é possível separar o efeito do adjuvante do Al(OH)₃ dos efeitos indiretos da tolerância oral e para isto desenvolvemos um protocolo adequado.

Entre os diferentes fenômenos inflamatórios que poderíamos estudar escolhemos o modelo de lesão cutânea, porque durante o reparo a inflamação é apenas uma das fases de um conjunto de elementos que podem ser modificados pelos efeitos indiretos da tolerância oral e as consequências do bloqueio da inflamação neste modelo são extremamente interessantes.

1.6 - Reparo de lesões cutâneas e inflamação

Lesões em tecidos ou órgãos decorrentes de infecções, acidentes ou cirurgias podem ser reparados por processos que reconstituem o tecido natural, ou, por processos que substituem este tecido por uma matriz extracelular desordenada resultando em uma cicatriz (Gurtner et al, 2008). Após lesões de pele em mamíferos adultos o fechamento da lesão normalmente não é regenerativo; a integridade dérmica é restabelecida, mas com substituição por tecido cicatricial. Na área da lesão estão ausentes os folículos pilosos e outros apêndices dérmicos, e a derme passa a ter um padrão desorganizado de deposição de colágeno e uma menor resistência tênsil quando comparada com a pele intacta (Dang e Beanes et al., 2003).

O reparo de lesões de pele é um processo complexo que envolve vários tipos celulares, tanto residentes como de origem hematopoiética que migram para o local da lesão. Didaticamente, o reparo de lesões pode ser dividido em três fases: inflamação, formação do tecido de granulação e maturação (Gurtner et al., 2008, Stramer et al., 2007, Martin et al., 2003, Martin, 1997, Eming et al, 2007). Uma deficiência ou alteração em qualquer uma dessas fases terá consequências no tempo ou qualidade do reparo tecidual (Kinsey et al, 2003).

Uma ferida pode cicatrizar de duas formas, que dependem da quantidade de tecido lesado ou danificado e da presença ou não de infecção: estas formas são conhecidas como primeira e segunda intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre quando as bordas da ferida são apostas ou aproximadas, havendo perda mínima de tecido, ausência de infecção e mínimo edema; as ações de miofibroblastos são minimizadas e o tecido de granulação é pouco extenso. Já a cicatrização por segunda intenção, ocorre uma perda excessiva de tecido com a presença ou não de infecção e a aproximação primária das bordas não é possível; as feridas são deixadas abertas e se fecharão pela contração mediada por miofibroblastos e reepitelização. Neste tipo de cicatrização há uma grande quantidade de tecido de granulação devido à perda tecidual, produzindo uma cicatriz de dimensões significativas (Orgill e Demling, 1988; Swain, et al, 1995; Robbins e Cotran, 2005).

A primeira fase do processo de reparo inicia-se imediatamente após a lesão com a liberação de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e outros produtos derivados das células lesadas, de células residentes, tais como mastócitos e fibroblastos, e de plaquetas ativadas (Eming et al, 2009). A ativação de plaquetas inicia a cascata de coagulação que converte fibrinogênio em fibrina impedindo a perda de sangue no local (Martin & Leibovich, 2005). Contribuem para a hemostasia: a vasoconstrição, agregação plaquetária e deposição de fibrina, resultante da cascata de coagulação. O produto final deste processo é a formação da crosta que é composta primariamente por uma concentração de fibrina e plaquetas agregadas embebidas em células sanguíneas (Martin, 1997 e Eming 2007). Este processo de hemostase (parada do sangramento) previne a ampla perda de fluido e eletrólitos do local da ferida (Monaco e Lawrence, 2003). Os produtos liberados pelas células ativadas pela lesão tecidual atraem leucócitos circulantes, como neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Os mastócitos podem desempenhar um papel chave em todas as fases do reparo pela liberação do conteúdo de seus grânulos (Ng, 2010). Os mastócitos estão presentes no tecido lesado e secretam diversos mediadores químicos como a histamina, heparina, leucotrienos (Rang, 2001). A histamina

liberada aumenta permeabilidade capilar, faz vasodilatação e facilita a passagem do fibrinogênio. Na fase inicial os mastócitos ativam o endotélio aumentando a expressão de moléculas de adesão, ativam macrófagos aumentando a capacidade de fagocitose destas células e estimulam a infiltração de neutrófilos no local da lesão (Egozi et al, 2003).

Os mastócitos desempenham também um papel importante na reconstituição do tecido lesado e sua revascularização inicial através da produção e liberação de uma série de fatores, incluindo TNF α , do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Nienartowicz et al, 2006). Fatores produzidos por mastócitos ativam os fibroblastos promovendo a síntese de colágeno e auxiliando na deposição de uma matriz temporária no ferimento. Os mastócitos também participam na formação de uma matriz permanente na fase de remodelação tecidual (Yamamoto et al, 2000, Iba et al, 2004).

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local lesado enquanto os macrófagos infiltram na ferida após os neutrófilos. Os macrófagos apresentam funções imunológicas como células apresentadoras de antígenos e também removem restos celulares, partículas estranhas, bactérias, bem como os neutrófilos que sofreram apoptose no local da lesão (Brown, 1995; DiPietro, 1995; Martin and Leibovisch, 2005).

Os macrófagos também possuem função essencial no processo cicatricial, por secretarem fatores de crescimento, promovendo não só a proliferação celular e síntese protéica, como também a produção de componentes da matriz extracelular (Iba et al., 2004; Szpaderska; Dipietro, 2005). As citocinas liberadas por estas células: Fator de Crescimento Derivados de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), entre outras, provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células

endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o local da lesão (Riches, 1996; Dantas, 2000; Werner; Grose, 2003).

Sob ação destes fatores mitogênicos e quimiotáticos, as células endoteliais que circundam a lesão migram até esta para formar novos vasos sanguíneos. A interleucina-4 (IL-4), citocina secretada por macrófagos, é também responsável pela formação do tecido conjuntivo (por exemplo, produção de colágeno por fibroblastos) fazendo com que fibroblastos e outras células presentes migrem através das trabéculas de fibrina presentes na lesão (Mutsaers et al., 1997; Branski et al., 2005).

Um estudo recente mostrou que os macrófagos recrutados durante as diversas fases de reparo da pele (ou seja, a inflamatória, formação do tecido de granulação, e as fases de maturação dos tecidos) exercem funções distintas (Lucas et al., 2010). Em particular, os macrófagos parecem desempenhar um papel importante na promoção da fase inicial da angiogênese do tecido de granulação, maturação vascular e uma estabilização da mesma nas fases subsequentes, os macrófagos exercem funções distintas durante as diversas fases de reparação da pele que são complementares para restaurar a integridade da mesma (Lucas et al., 2010).

Na reepitelização há migração de queratinócitos não lesados das margens da ferida os quais proliferam, sendo os fatores de crescimento PPAR α e PPAR β , considerados os responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio. O primeiro está mais envolvido na fase inicial da cicatrização e o segundo PPAR β no controle da proliferação dos queratinócitos desta fase (Hatanaka; Curi, 2007).

A fase de formação do tecido de granulação ou fase proliferativa é uma fase de predominante atividade celular onde ocorre o preenchimento do espaço produzido pela lesão por fibroblastos, matriz extracelular e proliferação de vasos sanguíneos (McCulloth e Kloth, 2002). É denominada fase de formação do tecido de granulação por causa do aspecto granular e com coloração avermelhada produzida pela angiogênese no local da lesão. Nesta fase ocorre

grande proliferação fibroblástica e migração celular para dentro da matriz provisória (O'Leary et al., 2002).

Durante a fase de remodelagem, o tecido de granulação é substituído por tecido cicatricial e a crosta, rica em fibrina, é substituída por tecido cicatricial maduro devido uma deposição ordenada de fibronectina e colágeno tipo III, e finalmente, por colágeno tipo I, ácido hialurônico e proteoglicanas (O'leary et al., 2002). O tamanho da ferida é diminuído substancialmente pela ação de células mediadoras da contração da matriz. Isto é primariamente feito pelos fibroblastos que se encontram no tecido de granulação, muitos dos quais se diferenciam em um fenótipo, no qual são referidos como miofibroblastos (O'Leary et al., 2002). Nessa fase há reorganização de colágeno e aumento da resistência da cicatriz. A remodelagem envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (Hatanaka; Curi, 2007). Apesar de uma longa fase de remodelagem, as fibras colágenas no tecido cicatrizado não se tornarão tão organizadas como na derme intacta, da mesma forma, a resistência tênsil da cicatriz, também não será igual (Monaco e Lawrence, 2003).

Há diferenças significativas no reparo de lesões na pele entre adultos e embriões de mamíferos. Nos adultos, normalmente o reparo termina com a formação de cicatrizes de diferentes graus. Por outro lado, uma lesão na pele do feto pode fechar rapidamente, com reconstituição da estrutura original, sem cicatriz e a reconstituição completa da pele, incluindo a formação de um padrão normal de matriz extracelular, capilares, folículos pilosos, glândulas, vasos e nervos (Ferguson and O'Kane, 2004, Whitby and Ferguson, 1991). Diferenças na pele de embriões e adultos estão relacionadas com o perfil e concentração de fatores de crescimento celular; com a composição de matriz extracelular; com o estado de diferenciação de células como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias (Ferguson et al., 1996, Whitby and Ferguson, 1991). Os embriões possuem baixas taxas de TGF β 1, TGF β 2, PDGF e altos níveis de TGF β 3 e a manipulação de feridas de adultos pela adição de TGF β 3 ou neutralização de PDGF, TGF β 1 e TGF β 2 resulta em

fechamento sem cicatriz (Gawronska-Kozak, 2004, Ferguson and O'Kane, 2004).

Também diferem entre embriões e adultos além dos fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular. Embriões possuem mais tenascina-C e após o reparo das lesões a deposição de colágeno é indistinguível da pele sem lesão (Ferguson et al., 1996, Whitby and Ferguson, 1991). Outro componente da matriz em maior quantidade na pele de fetos é o ácido hialurônico numa forma altamente hidratada onde exerce o papel que permite a resistência à deformação e facilita o movimento celular (Toole, 1997; Clark, 1996) e também estimula a síntese de colágeno por fibroblastos in vitro (Mast et al, 1991; 1993).

Citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), também são produzidas na ferida de pele de fetos, porém, esta produção é mínima quando comparada com a de adultos (Liechty et al, 2000). A baixa produção dessas citocinas na ferida de fetos correlaciona-se com a quase ausência de leucócitos e com a redução da resposta inflamatória. Desta forma, quando IL-6 exógeno é adicionado na ferida de feto, ocorre formação de cicatriz (Liechty et al, 2000; Harty et al, 2003).

Como vimos, uma série de fatores influenciam o processo de reparo, mas uma reação inflamatória mínima tem sido correlacionada com a ausência ou diminuição de cicatrizes após lesões em peles de fetos e também em adultos com alterações na atividade imunológica.

Trabalhos anteriores mostraram que em camundongos tolerantes à OVA a injeção parenteral de OVA minutos antes da lesão inibe a inflamação e diminui a cicatriz (Costa et al, 2011, Matos, 2011).

Os estudos que mostram que os efeitos indiretos da injeção de antígenos tolerados inibem processos inflamatórios, como a redução da inflamação induzida pela injeção de carragenina na pata de camundongos (Ramos et al., 2009), a formação de granulomas em torno de ovos de *S.*

mansoni (Carvalho et al, 2002; Azevedo-Jr, 2012) ou ainda a inflamação após lesões de pele (Costa et al., 2011, Matos, 2011), utilizaram a OVA como antígeno tolerado e o Al(OH)₃ como adjuvante durante a imunização.

1.7 - Utilização da zeína, uma das proteínas do milho

Animais que recebem proteínas do milho em sua dieta não sofrem reações anafiláticas quando imunizados com a zeína (Wells and Osborne, 1911). A adição de zeína à imunização com DNP-OVA impede a formação de anticorpos para DNP, mostrando que em nível de anticorpos os efeitos indiretos da tolerância podem ocorrer com componentes da dieta (Carvalho et al, 1996).

É possível que os efeitos indiretos da tolerância oral aos componentes comuns da dieta possam também alterar o processo de reparo de lesões cutâneas diminuindo a formação de cicatrizes.

Os cereais em grãos constituem a principal fonte alimentar da maior parte das pessoas. Nos países em desenvolvimento a maior parte da produção de milho é destinada ao consumo humano, enquanto que nos países desenvolvidos grande parte da produção é destinada à indústria e produção de ração animal. O milho é, então, uma das principais matérias primas para a indústria de alimentos (Fageer & Tinay, 2004, Gonçalves et al., 2003). Desse cereal, é possível obter óleo, fubá, canjica, farelo, amido, amilose, amilopectina, zeína e fibras. As proteínas do grão de milho podem ser classificadas em seis frações de acordo com Landry & Moureaux (1970), como albumina, globulina, zeína, glutelina 1, glutelina 2 e glutelina 3. A zeína pertence à classe de prolaminas, que ocorre especificamente em cereais, e é a maior classe das proteínas constituintes do milho, aproximadamente 45 – 50 %.

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Verificar se a melhora do reparo de lesões na pele de camundongos produzida pelos efeitos indiretos da tolerância oral pode ser observada com uma proteína diferente da ovalbumina ou na ausência de adjuvante.

2.2 - Objetivos Específicos

1 – Avaliar se os efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (zeína) diminuem o infiltrado inflamatório e a área do tecido de granulação após a lesão, analisando histologicamente a pele nos dias 5 e 7 após a lesão.

2 – Avaliar se os efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (zeína) facilitam a regeneração da pele e reduzem a área da cicatriz, analisando histologicamente a região da lesão 40 dias após a lesão.

3 – Verificar se a imunização secundária com uma proteína tolerada sem adjuvante e concomitante com a lesão na pele de camundongos diminui o infiltrado inflamatório e a área do tecido de granulação, analisando histologicamente a pele no dia 5 após a lesão.

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Animais

Camundongos C57BL/6, machos, com oito semanas de idade, procedentes do Biotério Central da UFMG. Durante todo o experimento os animais permaneceram no Biotério de Animais Experimentais do Departamento de Morfologia (Câmara Climatizada).

3.2 - Dieta dos camundongos: ração contendo Zeína

Os animais receberam ração para **Animais de Laboratório Nuvital/Nuvilab CR-1** como única fonte de alimento. O milho entra na composição desta ração que, portanto, contém zeína.

3.3 – Antígenos

Zeína - A proteína purificada foi obtida da Sigma (Sigma Aldrich St. Louis, MO).

Ovalbumina - obtida da Sigma (Sigma Aldrich St. Louis, MO).

3.4 – Adjuvante

A imunização foi feita com ou sem o adjuvante hidróxido de alumínio - $Al(OH)_3$ (Medicamento Genérico, São Paulo, Brasil).

3.5 - Efeitos indiretos da tolerância oral com componente da dieta

Todos os camundongos foram alimentados com ração comercial para **animais de laboratório (Nuvital/Nuvilab CR-1)** que contém milho na sua composição. Quando os animais chegaram à oitava semana de vida, o grupo experimental recebeu uma injeção i.p. de 10 µg de zeína + 1,6 µg de $Al(OH)_3$ num volume final de 100 µl por via intraperitoneal (i.p.) até 30 minutos antes da

lesão incisional ou excisional na pele do dorso. Os camundongos dos grupos Controle receberam 250 µl de salina i.p. até 30 minutos antes da lesão.

3.6 - Indução de tolerância oral a OVA pelo tratamento oral com solução de clara de ovo e efeitos indiretos da tolerância oral com OVA

Para indução de tolerância oral para OVA os camundongos do grupo experimental receberam um tratamento oral com clara de ovo na concentração 1:5 em água, como única fonte de líquido, durante três dias consecutivos. Este tratamento oral terminou sete dias antes da imunização primária por via i.p. com 10 µg de OVA + 1,6 mg de Al(OH)₃ + salina, num volume final 250 µL. Alguns grupos receberam uma imunização secundária com 10 µg de OVA sem adjuvante 14 dias após a primária. Os grupos controle não tolerantes a OVA não tiveram tratamento oral com clara de ovo e foram mantidos com água *ad libitum*.

3.7 - Efeitos indiretos da tolerância oral com ou sem adjuvante

Para comparar o efeito indireto da injeção do antígeno tolerado com adjuvante ou na ausência de adjuvante os animais receberam a lesão logo após a imunização primária ou secundária com OVA.

3.8 - Modelos Experimentais para estudo do fechamento da lesão cutânea

3.8.1 - Lesão Incisional no dorso

Os animais foram anestesiados pela injeção *i.p.* de 0,10 ml de uma solução de cloridrato de Ketamina (97 mg/Kg) (Dopalen injetável-Vetbrands) e xilazina (16,5 mg/Kg) (Dopaser solução injetável) diluídos 1:3 em salina fisiológica. Após a anestesia foi feita a tricotomia e limpeza da pele com álcool 70%. Uma ferida incisional linear de 1,0 cm de extensão e com profundidade até a camada muscular da pele foi feita com uma lâmina de barbear, em um dos lados paramédio do dorso (Figura 1). Em seguida, a borda da lesão foi aproximada e a ferida protegida com Micropore (3M).



Figura 1 – Incisão linear no dorso. Adaptado de: Reid RR, Said HK, Mogford JE, Mustoe, TA. The future of wound healing: Pursuing surgical models in transgenic and knockout mice. J Am Coll Surg. v. 199, n. 4, p. 578-585, 2004(Reid et al., 2004).

3.8.2 - Lesão Excisional no dorso

Os camundongos foram anestesiados pela injeção i.p. de 0,10 ml de uma solução de cloridrato de Ketamina (97 mg/Kg) (Dopalen injetável-Vetbrands) e Xilazina (16,5 mg/Kg) (Dopaser solução injetável) diluídos 1:3 em salina fisiológica. Após a anestesia, foi feita a tricotomia e limpeza da pele com álcool 70%, e foi feita a ferida no dorso do animal com um *Punch* dermatológico com diâmetro de 6,5mm como mostra figura 2 e as lesões foram deixadas sem curativo e sem reaproximação das bordas, de modo a fechar por segunda intenção.

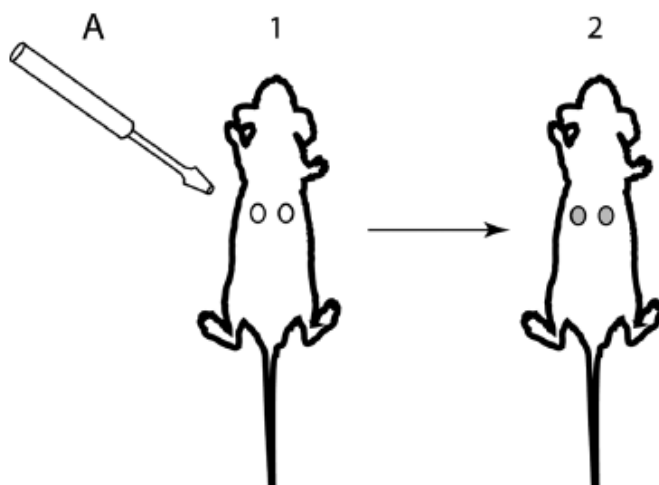


Figura 2 - Excisão na pele do dorso de camundongos. Adaptado de: GALIANO et al. 2004

3.9 - Avaliação do fechamento da lesão excisional no dorso do camundongo

A lesão excisional foi fotografada 40 dias após a lesão. Para tanto, os camundongos foram anestesiados com dose mínima de anestésico e posicionados em decúbito ventral ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram feitas com máquina digital (Sony DSC-F717, Japão) e foram transferidas para o computador para posterior análise com o programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA). Nesse programa a área da lesão foi delimitada e medida em mm².

3.10 - Coleta da pele e Processamento Histológico

Nos dias 5, 7 e 40 após a lesão, os animais foram sacrificados e logo após foram coletados os fragmentos de pele para a avaliação histopatológica da lesão. O fragmento da pele foi cortado em duas partes perpendicular ao eixo maior da lesão, tanto para a lesão incisional quanto para a lesão excisional (Figura 3). O material histológico foi fixado em formalina de Carlson em Tampão Milloning (pH 7.0) por 24h e depois o material foi transferido para álcool 70% e submetido às etapas que se seguem em temperatura ambiente:

Desidratação: série gradual de etanol (70% - 100%) – 30 minutos cada

Diafanização: xilol em temperatura ambiente (3X) – 20 minutos cada

Infiltração: Parafina a 56° C (3X) – 20 minutos cada

Inclusão: em parafina a 56°C.

Posteriormente à inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótopo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Esses cortes foram então corados com HE (Hematoxilina e Eosina) ou TG (tricromático de Gomori).

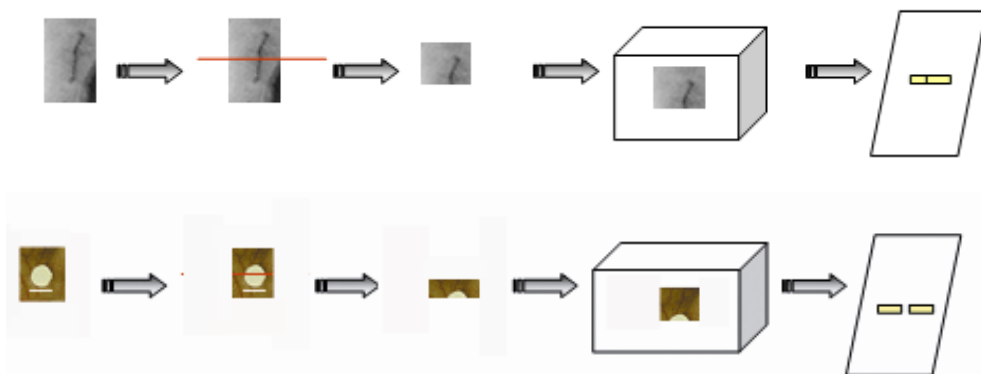


Figura 3 – Coleta e processamento histológico da pele do dorso de camundongos com lesão incisional e excisional.

3.11 - Análises morfológicas dos tecidos

A coloração de Hematoxilina e Eosina foi utilizada para a identificação de estruturas como glândulas sebáceas, folículo piloso, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo, infiltrado inflamatório e tecido de granulação. O tricromático de Gomori foi utilizado para melhor visualização do tecido conjuntivo e das fibras colágenas.

3.12 - Aquisições de imagens

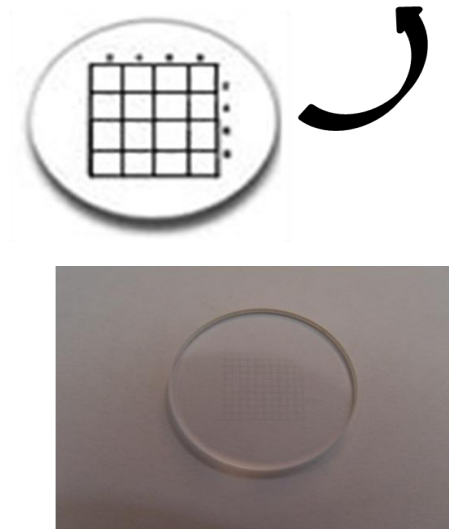
As imagens de microscopia de luz foram adquiridas utilizando uma câmera Olympus Q Colour 3 acoplada ao microscópio Olympus BX50 conectadas ao computador através do programa Q-Capture Pro (QImaging, Canadá).

3.13 – Morfometria

Para quantificar os diferentes tipos celulares presentes na área de reparo foram feitas análises morfométricas dos números de células inflamatórias e fibroblastos contando sete ou dez áreas da lesão de 100 μm^2 cada, usando um retículo de 100 μm^2 colocado na ocular do microscópio (Figura 4).



Figura 4 – Retículo de 100 μm^2 para uso na análise morfométrica.



Para a quantificação de células da lesão incisional foram contadas três áreas na região da lesão e quatro áreas adjacentes à camada muscular da derme próximas da área lesada (Fig. 5 A). Na lesão excisional, foram contadas seis áreas na região da lesão sendo três abaixo do epitélio e três na região da derme e outras quatro na região da camada muscular da pele próximas à região da lesão (Fig. 5 B).

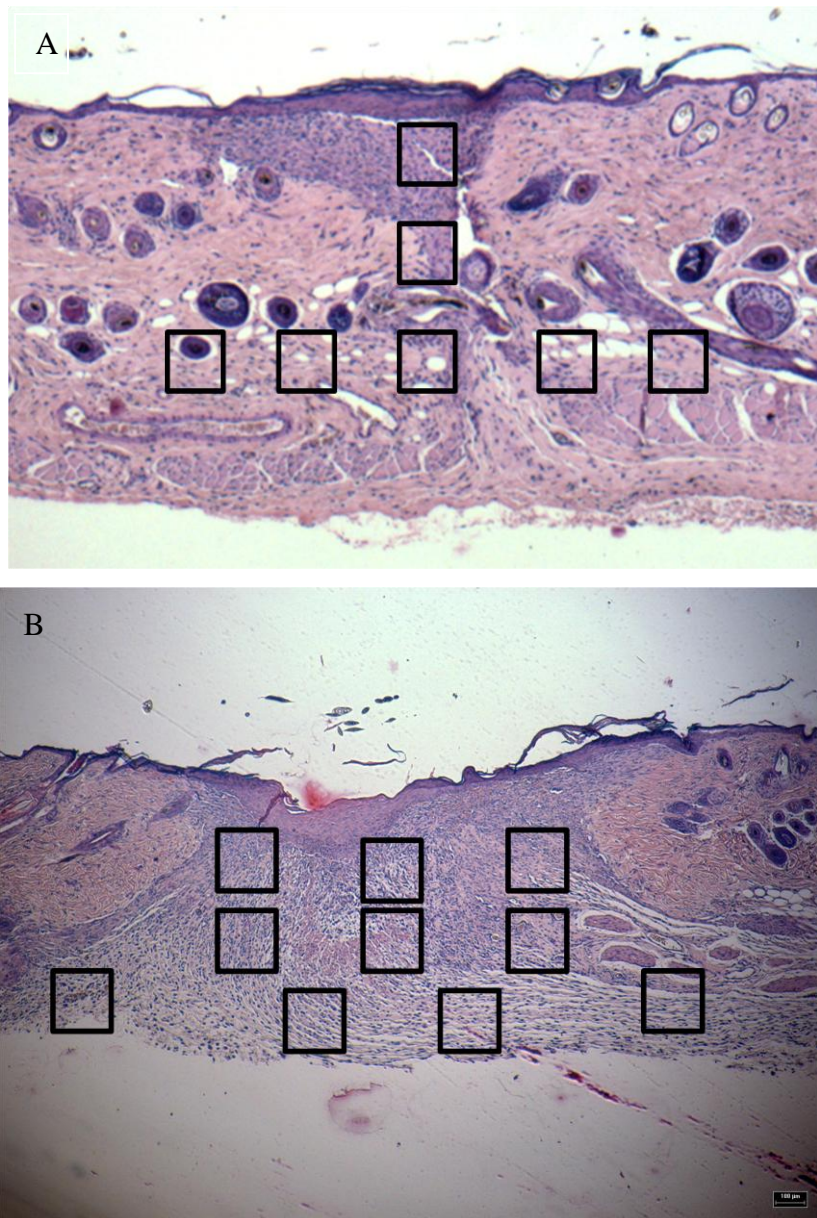


Figura 5 - Posição de campos para análise morfométrica. Em A, para contagem de células na área da lesão Incisional e em B, para contagem na área da lesão Excisional.

3.14 - Análise estatística dos resultados

Para análises estatísticas usou-se o programa Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA) e as diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando ANOVA one-way e teste Student-Newman-Keuls. Valores para $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4 – Resultados

4.1 - Análise da influência do adjuvante nos efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína tolerada no reparo de lesão incisional na pele de camundongos.

Para examinar se a injeção de proteínas toleradas interfere no processo de reparo de lesão de pele mesmo na ausência do adjuvante utilizou-se o modelo de lesão incisional linear. Seis grupos de camundongos foram utilizados, os animais foram tratados como descrito em materiais e métodos e ilustração abaixo (Figura 6):

Influência do Adjuvante Hidróxido de Alumínio nos Efeitos Indiretos da Tolerância Oral

Grupos:










	Dias Consecutivos	0	7 Dias (1ª Primária)	14 Dias (2ª Secundária + lesão)
	(-3-2-1)			
				
Controle N=6	Água 		i.p. Salina	i.p. salina + lesão
Adjuvante N=6	Água 		i.p. Al (OH) ₃	i.p. Al (OH) ₃ + lesão
Imune Controle N=6	Água 		i.p. Al (OH) ₃ + OVA+lesão	
Imune Sem Adj. 2ª N=6	Água 		i.p. Al (OH) ₃ + OVA	i.p. OVA + lesão
Tolerante Controle N=6	Água + Ova 		i.p. Al (OH) ₃ + OVA+lesão	
Tolerante Sem Adj. 2ª N=6	Água + Ova 		i.p. Al (OH) ₃ + OVA	i.p. OVA + lesão

Figura 6 - Protocolo experimental, a influência do adjuvante Hidróxido de Alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral. Os animais tolerantes receberam uma solução de clara de ovo diluída 1:5 em água, como única fonte de líquido, durante três dias consecutivos. Sete dias após o tratamento oral, foi realizada a imunização primária e os camundongos receberam 10 µg de OVA + 1,6 mg de Al (OH)₃ + salina fisiológica por via intraperitoneal (i.p.). A imunização secundária foi realizada vinte dias depois da imunização primária com 10 µg de Ovalbumina sem adjuvante, minutos antes da lesão incisional linear de primeira intenção na pele. O grupo controle foi mantido com água.

Os animais foram sacrificados cinco dias após a lesão e fez-se a análise histopatológica após coloração com HE para avaliar se havia diferença no infiltrado inflamatório, tecido de granulação e re-epitelização, entre os grupos.

No quinto dia após a lesão no grupo controle sem nenhum tratamento adicional pode-se observar uma completa re-epitelização em todos os animais. No entanto, o epitélio encontra-se retraído na área da lesão e mais espesso que na área adjacente, com um acúmulo de células na camada espinhosa. O tecido de granulação engloba uma área extensa e ainda ocorre uma grande quantidade de células inflamatórias além de fibroblastos (Fig. 7 C, E e F). Na derme adjacente à área da lesão e na camada muscular da derme também se encontram muitas células inflamatórias (Fig. 7 C).

Já no grupo Lesão+Adjuvante no quinto dia após a lesão pode-se observar que todos os animais do grupo apresentavam um epitélio retraído na área da lesão, a maioria com uma crosta discreta, epitélio bastante espesso, com um acúmulo de células na camada espinhosa exatamente na área da lesão e também todos os animais reepitelizaram, semelhante ao grupo controle como pode ser visto na figura 7 B e C.

Na análise morfométrica quantificou-se o número de fibroblastos e células inflamatórias no local da lesão e ao redor da mesma como descrito na metodologia (Fig. 5A). A injeção do adjuvante não interferiu no número de células inflamatórias e fibroblastos encontrados no quinto dia após a lesão (Fig. 7).

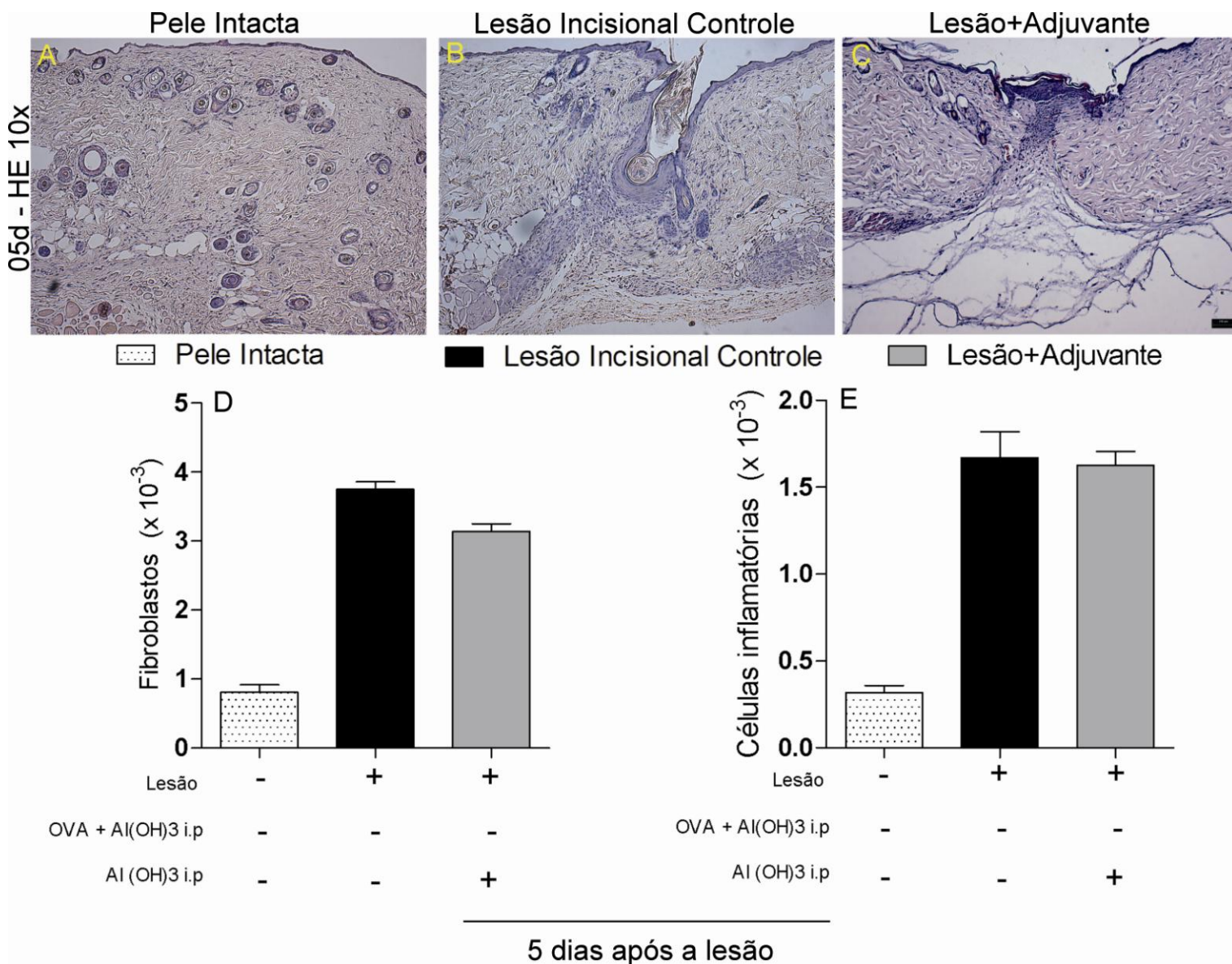


Figura 7 – Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos grupos controle. Em A é possível observar o grupo pele intacta onde o mesmo não sofreu nenhuma alteração, apenas a coleta de sua pele. Com cinco dias após a lesão há completa re-epitelização, com presença de crosta em alguns animais de ambos os grupos. Observa-se um infiltrado inflamatório na área da lesão e sua dispersão na derme ao redor da mesma. O infiltrado inflamatório disperso mais intensamente na camada muscular da derme no grupo que recebeu apenas a lesão quando comparado ao grupo lesão+adjuvante. (A) Células inflamatórias por μm^2 , (?) Fibroblastos por μm^2 . O grupo Lesão+Controle recebeu apenas a lesão e imunização i.p. com salina tanto na primária quanto na secundária, já o grupo Lesão+Adjuvante recebeu apenas 1,6mg Al(OH)₃ i.p. em ambas as imunizações 1^a e 2^a e sempre vinte dias após a primária foi feita a lesão mais a imunização secundária em ambos os grupos. Coloração HE, objetivas de 10x, escala da barra = 100 μm .

Costa e colaboradores mostraram que em camundongos tolerantes a OVA a injeção i.p de OVA mais adjuvante Al(OH)₃ minutos antes de uma lesão incisional na pele diminui o número de células inflamatórias e de fibroblastos e melhora o reparo da pele (Costa et. al., 2011). Em nossos experimentos testamos se o mesmo efeito poderia ser obtido na ausência de adjuvante. Para efeitos de comparação incluímos no protocolo os grupos que receberam a lesão logo após a imunização primária com OVA + Al(OH)₃, tolerantes ou não a OVA. Como podemos ver na figura 1, nos camundongos tolerantes a OVA, a injeção de OVA + Al(OH)₃ reduziu o numero de celulas inflamatorias e de fibroblastos enquanto que nos grupos Imune Controle e Controle isso não ocorreu exatamente como encontrado por Costa e colaboradores (Fig. 8) em 2011 (Costa et al, 2011).

Na análise morfométrica quantificou-se o número de fibroblastos e células inflamatórias no local da lesão e ao redor da mesma como já foi descrito na metodologia (Fig. 5A). Observou-se como mostra a figura 8 que o número de células inflamatórias e fibroblastos (Fig. 8 E e F) são estatisticamente diferente do grupo Lesão+Controle.

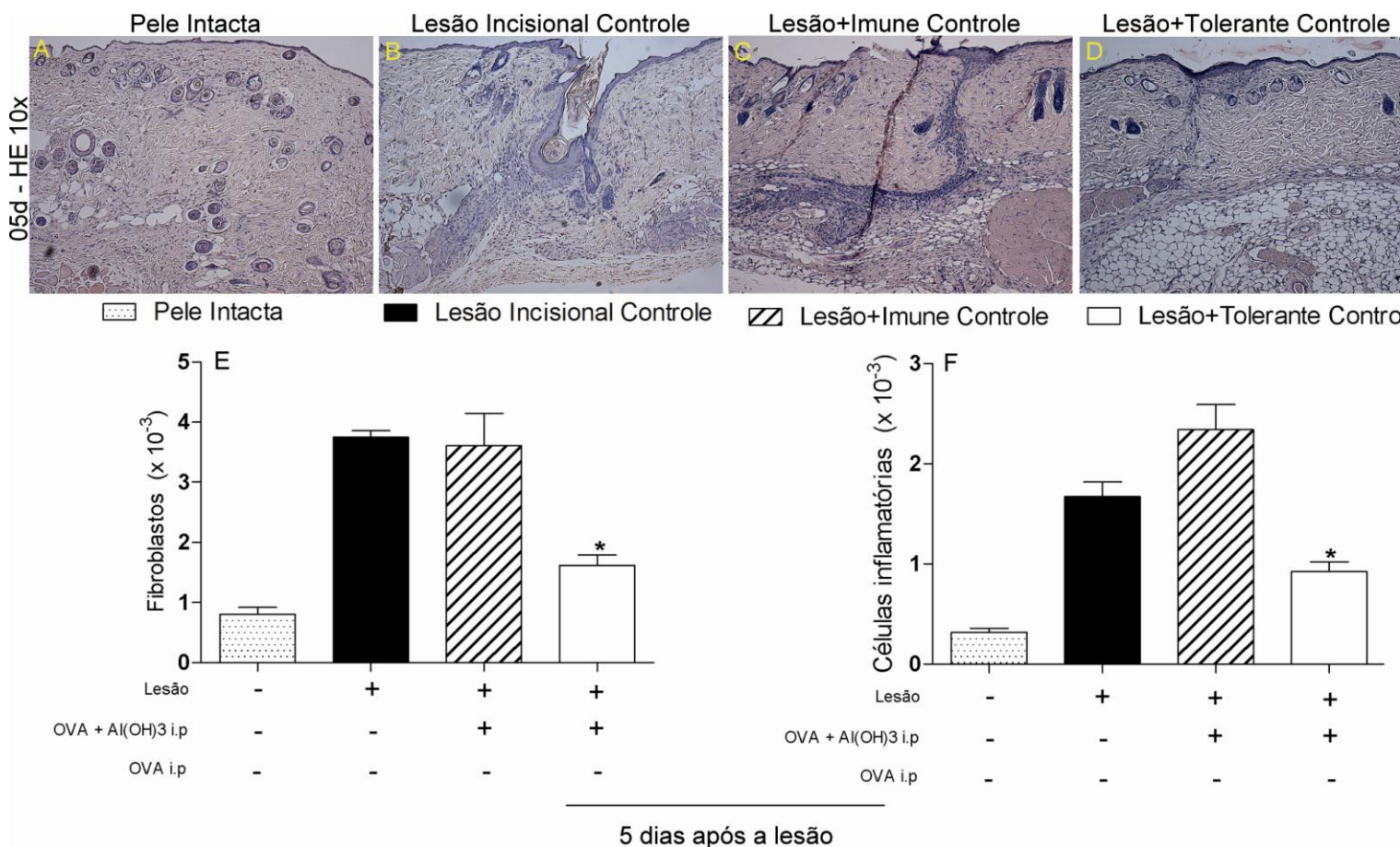


Figura 8 – Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral. Em A é possível observar o grupo pele intacta onde o mesmo não sofreu nenhuma alteração, apenas a coleta de sua pele. Com cinco dias após a lesão há completa re-epitelização. Observa-se um infiltrado inflamatório na área da lesão e sua dispersão na derme ao redor da mesma no grupo lesão+Imune Controle e também O infiltrado inflamatório dispersa mais intensamente na camada muscular da derme. Já o grupo Lesão+Tolerante Controle tem menos células inflamatórias e fibroblastos quando comparado com o grupo Lesão+Controle. (E) Fibroblastos por μm^2 , (F) Células inflamatórias por μm^2 . Barras pontilhadas: pele intacta sem lesão, barras pretas: imunizados com salina, barras listradas: imunizados i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ mais 10 μg OVA (Imunização primária)+lesão incisional. Barras Brancas: previamente tolerizado para OVA e imunizado i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ mais 10 μg OVA e lesão incisional. Coloração HE, objetivas de 10x, escala da barra = 100 μm . * $p < 0,05$ em comparação com o controle imune (ambos imunização primária).

Por outro lado, nos animais tolerantes a OVA a imunização secundária com OVA na ausência de adjuvante não conseguiu reproduzir os efeitos indiretos da tolerância oral como visto por Costa em 2011, onde a imunização secundária com OVA na ausência do hidróxido de alumínio como adjuvante não diminuiu o número de fibroblastos e nem de células inflamatórias como visto no grupo Tolerante Controle (Fig. 9).

Na análise morfométrica quantificou-se o número de fibroblastos e células inflamatórias no local da lesão e ao redor da mesma como já foi descrito na metodologia (Fig. 5A). Observou-se como mostra a figura 9 que o número de células inflamatórias e fibroblastos (Fig. 9 E e F) não são estatisticamente diferente do grupo Lesão+Controle.

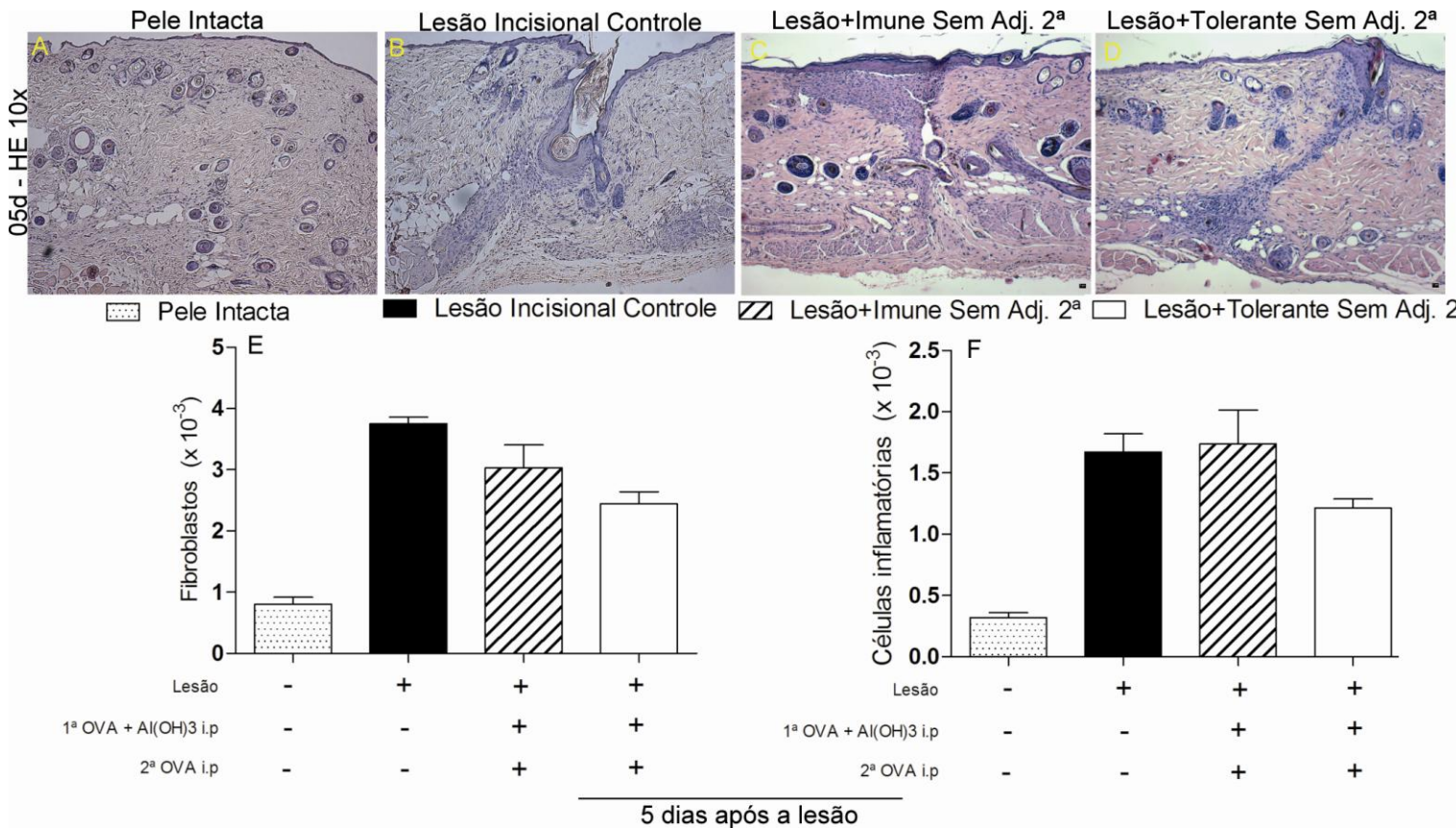


Figura 9 – Avaliação histopatológica e morfométrica do fechamento da ferida incisional linear de primeira intenção no dorso de camundongos C57BL/6 e influência no perfil celular do adjuvante hidróxido de alumínio nos efeitos indiretos da tolerância oral nos grupos experimentais. Em A é possível observar o grupo pele intacta onde o mesmo não sofreu nenhuma alteração, apenas a coleta da pele. Com cinco dias após a lesão há completa re-epitelização em ambos os grupos. Observa-se um infiltrado inflamatório na área da lesão e sua dispersão na derme ao redor da mesma no grupo lesão+Imune sem Adj. Na 2ª e também o infiltrado inflamatório disperso mais intensamente na camada muscular da derme. Já o grupo Lesão+Tolerante sem Adj. Na 2ª tem menos células inflamatórias e fibroblastos quando comparado com o grupo Lesão+Controle, porém não são significativamente diferente do mesmo (E) Fibroblastos por μm^2 , (F) Células inflamatórias por μm^2 . Barras pontilhadas: pele intacta sem lesão, barras pretas: imunizados com salina, barras listradas: imunizados i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ mais 10 μg OVA(Imunização primária)+lesão incisional e imunizados i.p. com 10 μg OVA(Imunização Secundária). Barras Brancas: previamente tolerizado para OVA e imunizado i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ mais 10 μg OVA+lesão incisional e imunizados i.p. com 10 μg

OVA(Imunização Secundária). Coloração HE, objetivas de 10x, escala da barra = 100µm.*
p≤0,05 em comparação com o controle imune (ambos imunização primária).

4.2 - Efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína da dieta no reparo de lesões incisionais lineares na pele do dorso de camundongos.

Inicialmente avaliamos os efeitos indiretos da tolerância oral com uma proteína presente na dieta regular dos camundongos no reparo de lesões incisionais, cuja cicatrização ocorre por primeira intenção. Os camundongos de oito semanas de idade foram divididos em dois grupos conforme protocolo apresentado na figura 10 A. O grupo controle da lesão recebeu uma injeção de 250 µl de salina por via i.p. 30 minutos antes da lesão e o grupo experimental recebeu uma injeção i.p. de 10µg Zeína em 1,6 mg de Al(OH)³, 30 minutos antes da lesão.

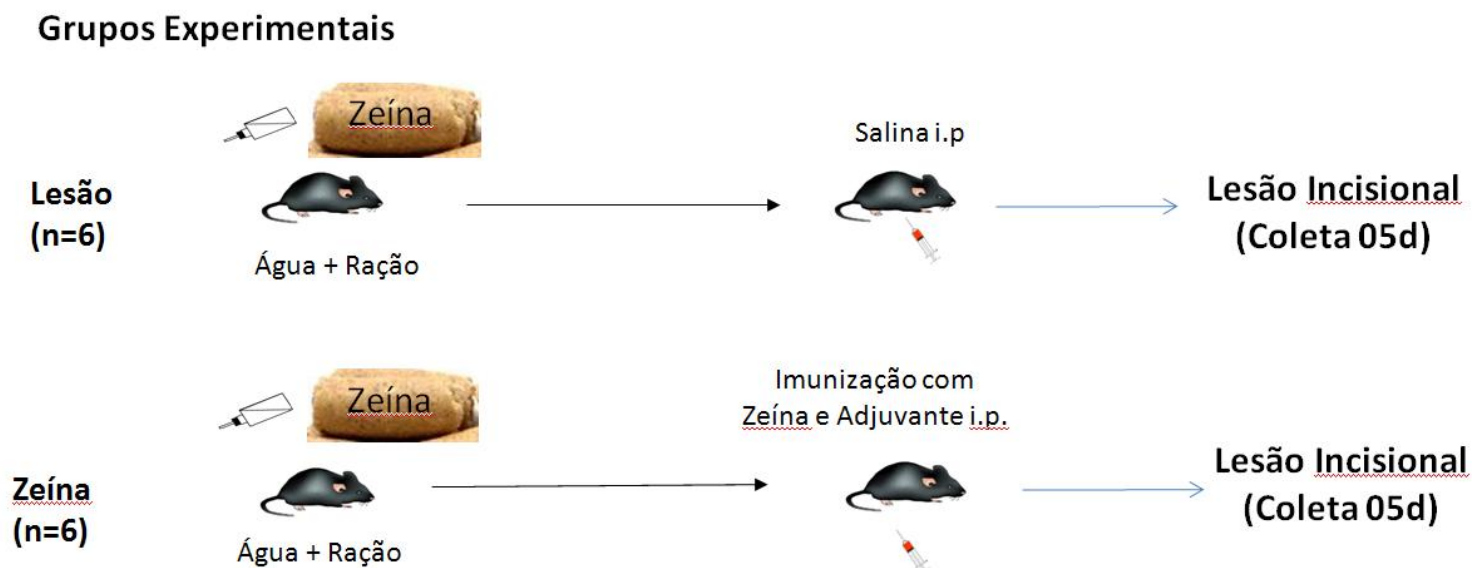


Figura 10 A – Protocolo experimental, efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (zeína).

No dia 05 após a lesão a pele foi coletada para avaliação histológica onde foram analisados os aspectos gerais do tecido, o infiltrado inflamatório e o tecido de granulação (Fig. 3).

No grupo controle Lesão observamos que todos os animais apresentavam uma completa re-epitelização, com o epitélio retraído e mais espesso na área da lesão. Havia um acúmulo de células na camada espinhosa na área da lesão. Neste grupo o tecido de granulação formado estendia-se por uma ampla área. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular da derme apresentavam um grande número de células inflamatórias (Fig. 11 B). Em todos os animais do grupo havia um início de deposição de colágeno na derme.

Por outro lado, no grupo experimental que recebeu uma injeção de Zeína antes da lesão foi possível observar que no quinto dia após a lesão todos os animais do grupo apresentavam um epitélio levemente retraído na área da lesão, menos espesso, com menor número de células na camada espinhosa que o grupo controle. O tecido de granulação estendia-se por uma menor área, a derme adjacente à área da lesão e a camada muscular da derme apresentava uma discreta presença de células inflamatórias (Fig. 11 C). Em todos os animais deste grupo também havia o início da deposição de colágeno.

Fizemos, então, uma análise morfométrica do número de células inflamatórias e fibroblastos contando estas células em sete áreas da lesão, cada uma destas áreas com $100 \mu\text{m}^2$, conforme descrito na metodologia (Fig. 5A).

Tanto o número de células inflamatórias quanto de fibroblastos estava reduzido nos animais do grupo experimental que recebeu a injeção da Zeína antes da lesão, quando comparados aos animais do grupo controle que recebeu injeção de salina antes lesão (Fig. 11 D e E).

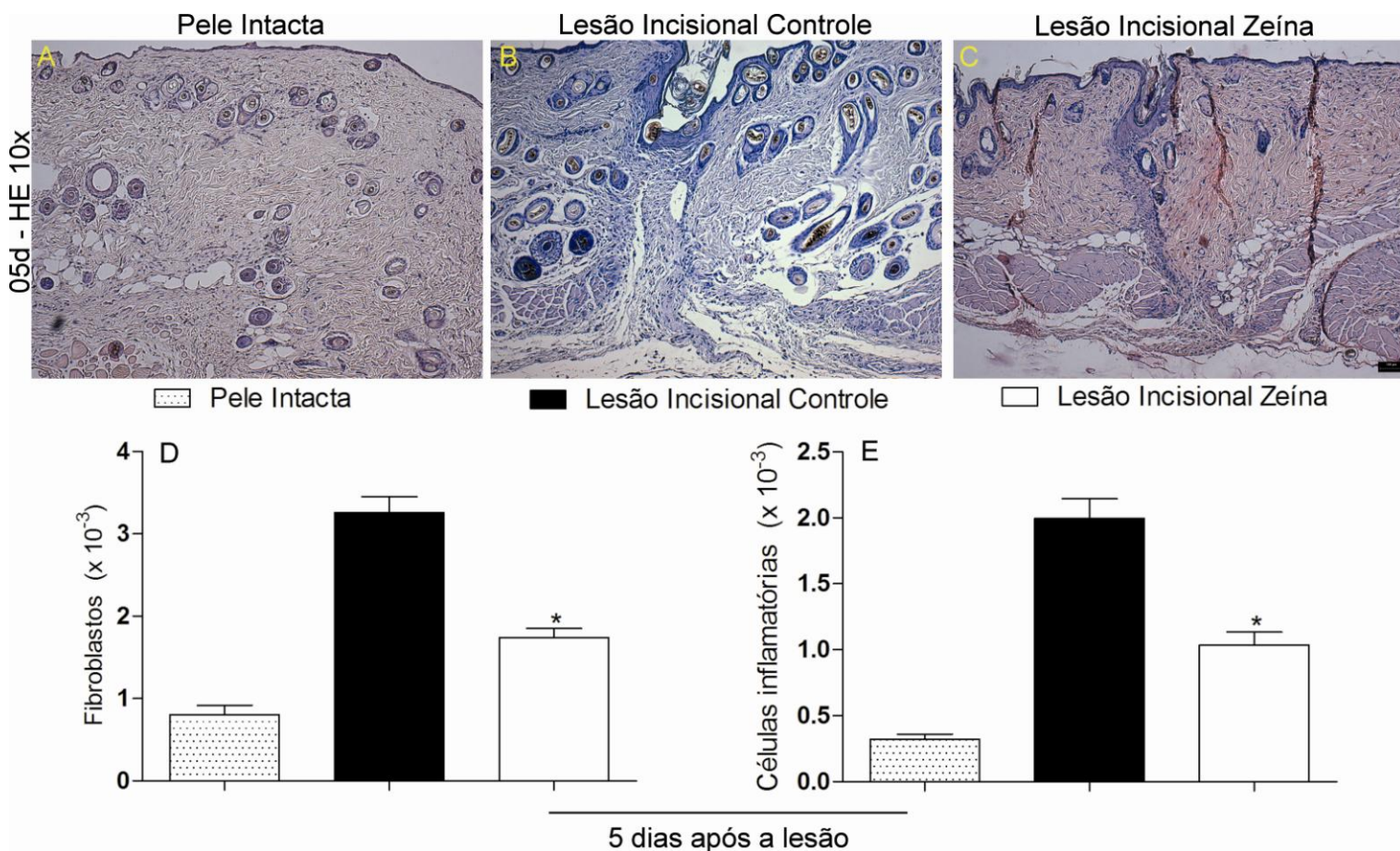


Figura 11 - Injeção Intraperitoneal de zeína 30 minutos antes da lesão de pele incisional reduz o número de células inflamatórias e fibroblastos. Em A, esta representada Pele Intacta onde a mesma não sofreu nenhuma alteração, já em B e C representa o quinto dia após a lesão, onde se vê uma completa re-epitelização, tecido de granulação e início de deposição de matriz extracelular na derme, (D) fibroblastos por $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$, (E) células inflamatórias por $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$. Barras rachuradas: pele intacta, barras sólidas: imunizados com salina, barras abertas: previamente tolerizado para Zeína e imunizados. i.p. com 1,6mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ mais 10 μg Zeína.* $p < 0,05$. estatisticamente diferente do grupo Lesão Incisional Controle e Pele Intacta. Coloração HE, objetivas de 10X; escala da barra = 100 μm .

4.3 - Efeitos indiretos da administração parenteral de uma proteína da dieta no reparo de lesões excisionais na pele do dorso de camundongos.

Em seguida avaliamos os efeitos indiretos da tolerância oral com uma proteína presente na dieta regular dos camundongos no reparo de lesões excisionais, cuja cicatrização ocorre por segunda intenção. Os camundongos de oito semanas de idade foram divididos em dois grupos conforme protocolo apresentado na figura 10 B. O grupo controle da lesão recebeu uma injeção de 250 µl de salina por via i.p. 30 minutos antes da lesão e o grupo experimental recebeu uma injeção i.p. de 10µg Zeína em 1,6 mg de Al(OH)³, 30 minutos antes da lesão.

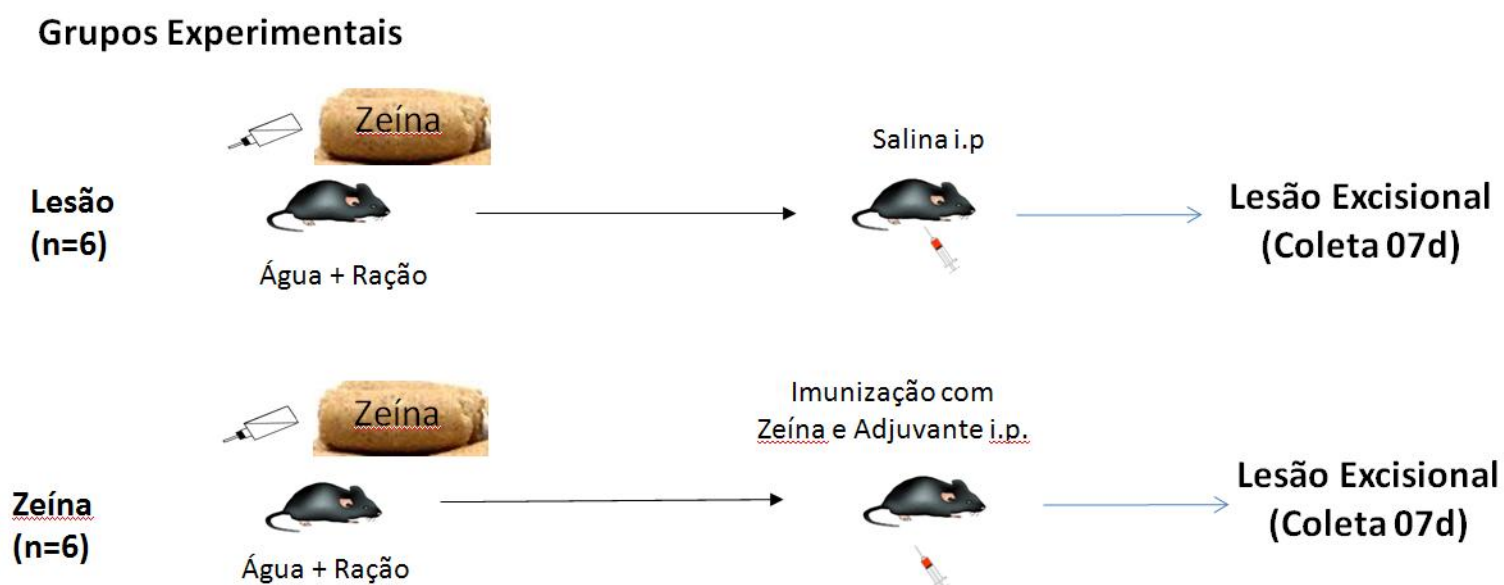


Figura 10 B– Protocolo experimental, efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (zeína).

No dia 07 após a lesão a pele foi coletada para avaliação histológica onde foram analisados os aspectos gerais do tecido, o infiltrado inflamatório e o tecido de granulação (Fig. 3).

No grupo controle Lesão observamos que todos os animais apresentavam uma crosta sobre a área da lesão e a maioria dos animais apresentava uma completa re-epitelização, com o epitélio contraído e mais espesso na área da lesão. Havia um acúmulo de células na camada espinhosa na área da lesão. Neste grupo o tecido de granulação formado estendia-se por uma ampla área onde eventualmente encontravam-se hemácias. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular da derme apresentavam células inflamatórias (Fig. 12 B e E).

Por sua vez, no grupo experimental que recebeu a injeção de Zeína pouco tempo antes da lesão observamos uma crosta menor e re-epitelização completa em todos os animais. Nestes animais também o epitélio encontrava-se contraído na área da lesão, porém menos espesso. O tecido de granulação era menos extenso e com poucas hemácias. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular da derme também apresentavam células inflamatórias, porém em menor quantidade (Fig. 12 C e F). Todos os animais deste grupo apresentavam um pequeno acúmulo de células adiposas na parte inferior da área de cicatrização ou próxima à mesma.

Para a análise morfométrica as células inflamatórias e fibroblastos foram contados em dez áreas da lesão, sendo cada área com $100 \mu\text{m}^2$, conforme especificado na metodologia (Fig. 5B).

Como se vê na figura 12 G e H o número de células inflamatórias e de fibroblastos está reduzido nos animais do grupo experimental que recebeu a injeção de Zeína antes da lesão.

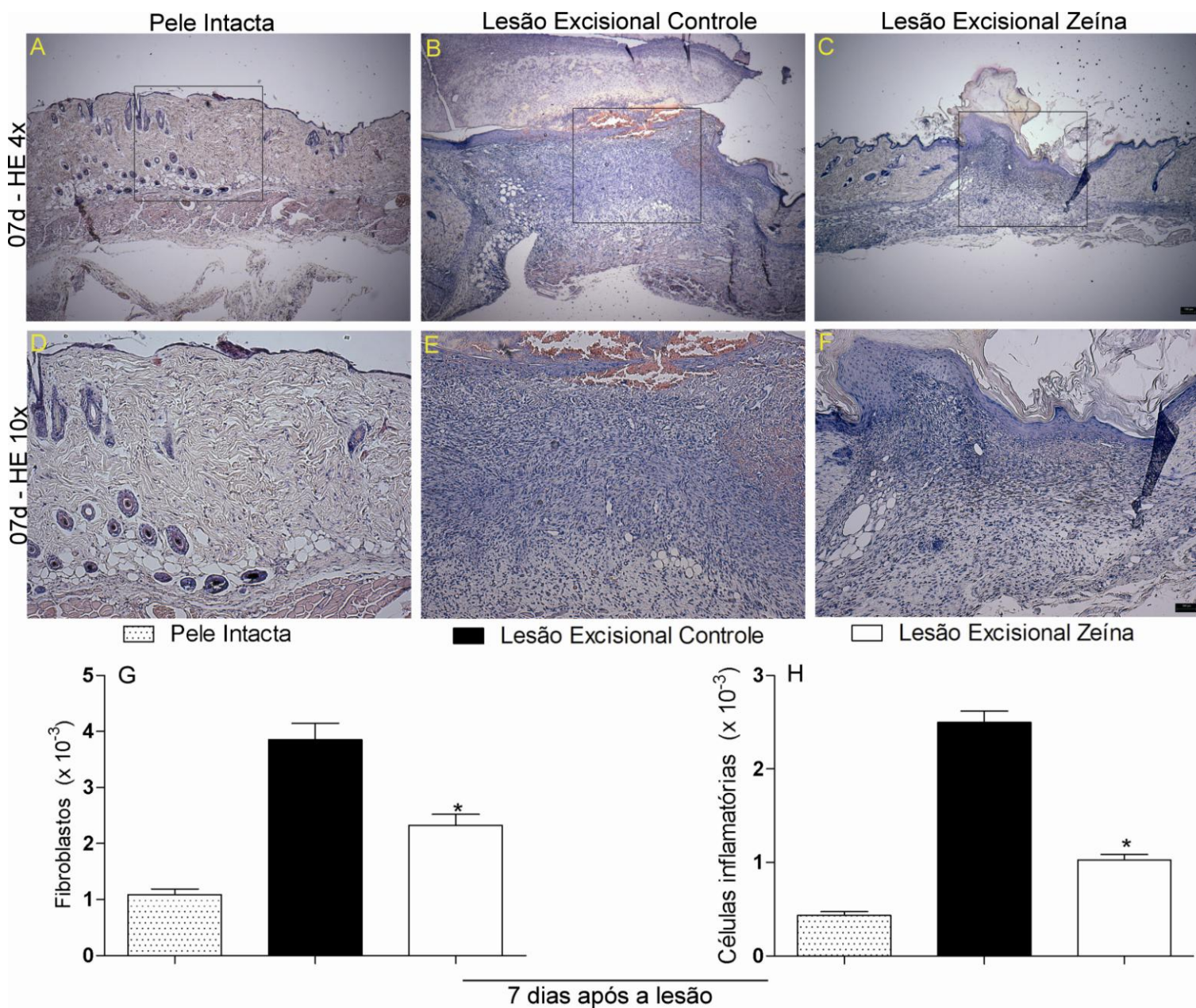


Figura 12 - Injeção Intraperitoneal de zeína 30 minutos antes da lesão de pele excisional reduz o número de fibroblastos e células inflamatórias. Em A e D esta representada a Pele Intacta onde a mesma não sofreu nenhuma alteração, já em B, C, E e F representa sétimo dia após a lesão, onde se vê uma completa re-epitelização, tecido de granulação e início de deposição de matriz extracelular na derme, (G) fibroblastos por $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$, (H) células inflamatórias por $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$. Barras rachuradas: pele intacta, barras sólidas: imunizados com salina, barras abertas: previamente tolerizado para Zeína e imunizados i.p.com 1,6mg Al(OH)₃ mais 10 μg Zeína, objetivas de 4X e 10X. A, B e C fotos em aumento 40X e D, E e F fotos em aumento de 100x, após coloração em HE. * p<0,05. estatisticamente diferente do grupo Lesão Excisional Controle e grupo Pele Intacta; escala da barra = 100 μm (D, E e F) e 40 μm (A, B e C).

4.4 - Análise da matriz extracelular após o reparo das lesões incisionais e excisionais em camundongos que receberam uma imunização com uma proteína componente da dieta.

Para avaliar se a imunização com uma proteína da dieta (Zeína) altera a deposição de colágeno e melhora o processo de reparo da lesão na pele, comparamos os tecidos dos grupos controle Lesão e experimental (Zeína) através de análises histológicas 40 dias após a lesão nos dois modelos de lesão, ou seja, incisional e excisional. Os tecidos foram corados com Tricromático de Gomori para melhor avaliação das fibras colágenas.

Aos 40 dias após a lesão, tanto incisional quanto excisional, o epitélio reconstituído não estava mais espesso e podemos distinguir a área onde ocorreu a lesão pela ausência de folículo piloso, glândulas sebáceas, músculo e tecido adiposo tanto nos grupos controle quanto nos grupos experimentais (Fig. 13 e 14).

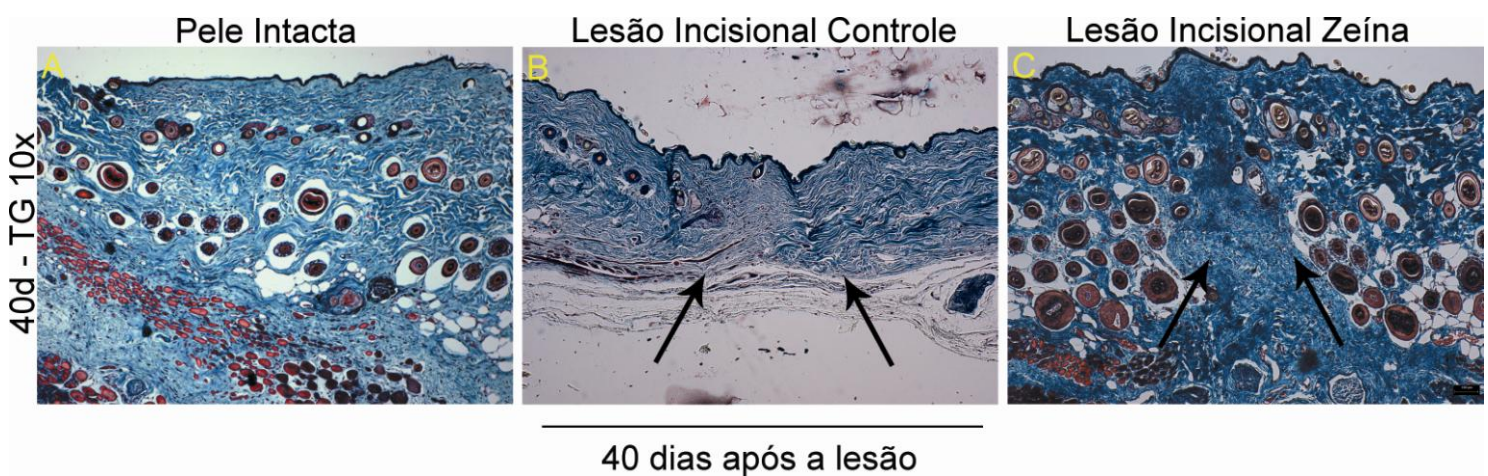


Figura 13 - Deposições de colágeno foram melhoradas por uma injeção i.p. de zeína antes da lesão incisional na pele do dorso de camundongos C57BL/6. Deposição de colágeno e formação de cicatriz 40 dias após a lesão. Setas indicam local de reparo. Coloração de Tricromático de Gomori. Fotos com objetivas de 10X; escala da barra = 100µm.

No entanto, a área da cicatriz dos grupos controle (Fig. 13 B e 14 B) apresentava um aspecto típico com fibras colágenas organizadas em feixes

paralelos, finos e abrangendo uma área mais extensa do que as dos grupos experimentais, tratados com zeína (Fig. 13 C e 14 C). Interessantemente, nos grupos tratados com zeína a área da cicatriz além de ser menor apresentava fibras colágenas com um arranjo semelhante ao encontrado na pele intacta, ou seja, com fibras organizadas em forma de rede de basquete (Fig13 C e 14 C).

Outro aspecto interessante encontrado nos grupos tratados com zeína foi que a matriz extracelular depositada na área da cicatriz encontrava-se mais densa, semelhante à da pele intacta, enquanto a do grupo controle era frouxa e delgada. O tratamento com zeína também resultou num melhor reparo da área da lesão quando se observa que o tecido reconstituído estava no mesmo nível da pele que não sofreu a lesão, ao contrário do grupo controle onde se pode notar uma depressão do tecido reconstituído 40 dias após a lesão (Fig. 13 e 14).

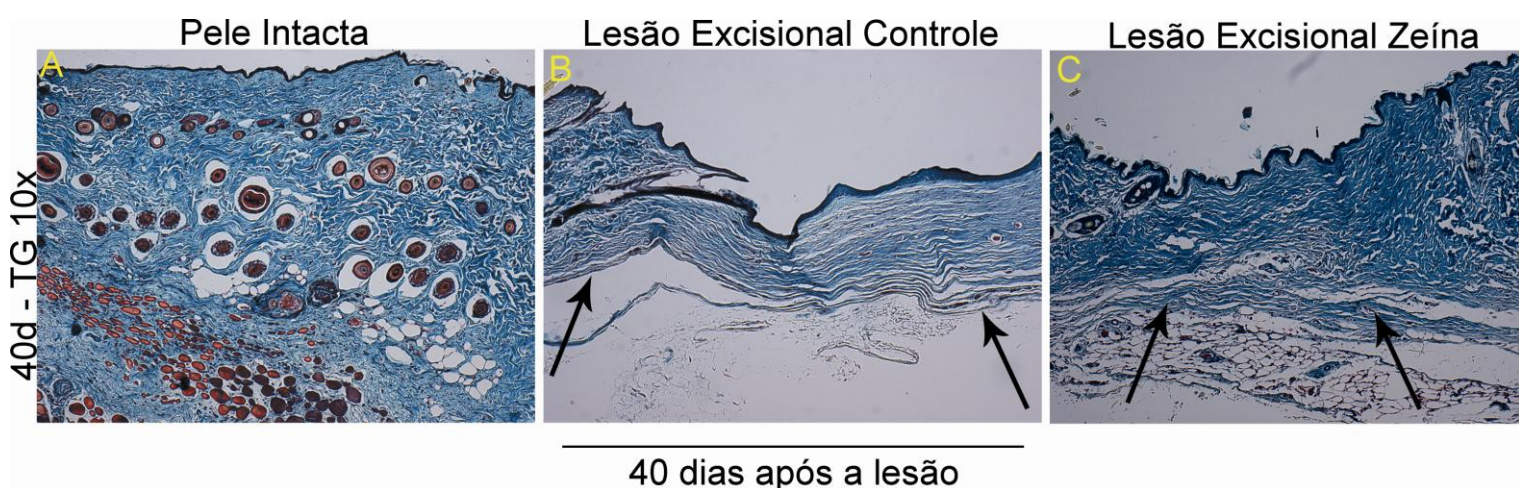


Figura 14 - Deposições de colágeno foram melhoradas por uma injeção i.p. de zeína antes da lesão excisional na pele do dorso de camundongos C57BL/6. Deposição de colágeno e formação de cicatriz 40 dias após a lesão. Setas indicam local de reparo. Coloração de Tricromático de Gomori. Fotos com objetivas de 10X A, B e C; escala da barra = 100µm.

Aos 40 dias após a lesão excisional medimos a área da cicatriz antes de coletar a pele para as análises histológicas. Para a medida, os animais foram levemente anestesiados e a cicatriz foi fotografada. A medida da área foi realizada nas fotografias digitais através do programa UTHSCSA Image Tool version 3.0.

De encontro com o que observamos a nível microscópico, podemos também ver macroscopicamente corroborando os dados histológicos (Fig. 14) que; o reparo da ferida dos animais do grupo experimental tratado com Zeína foi mais regular resultando numa cicatriz menor quando comparados com os animais grupo controle Lesão (Fig. 15).

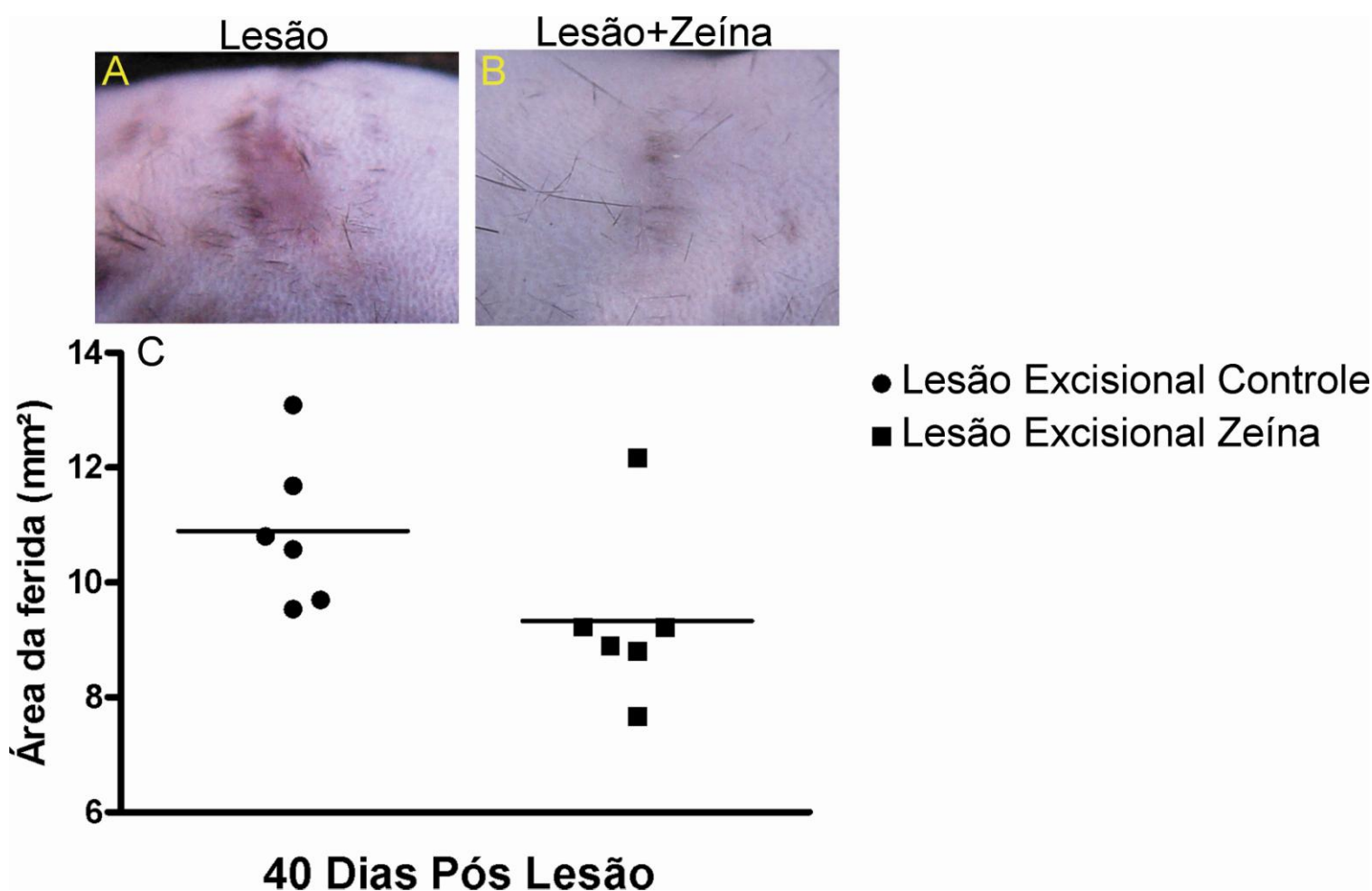


Figura 15 – Melhora da cicatrização de feridas cutâneas por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína) após 40 dias. (A) Prancha representativa dos grupos Controle lesão e Zeína. Este último recebeu a lesão logo após uma imunização i.p. com 10µg de zeína em 1,6mg Al(OH)³. (B) Medida da área da lesão excisional de ambos os grupos após 40 dias, onde os pontos representam os valores obtidos de cada animal e o traço horizontal representa a média do grupo.

5.0 - Discussão

Neste trabalho estudamos a influência da injeção parenteral de antígenos tolerados sobre o reparo de lesões cirúrgicas na pele de camundongos. Trabalhos prévios já haviam demonstrado que a injeção i.p de OVA +Al(OH)₃ antes da lesão cutânea reduz o infiltrado inflamatório, reduz o número de fibroblastos e melhora a cicatrização (Costa et al. 2011; Matos 2011). Estes resultados foram confirmados neste trabalho com os nossos grupos controle (Fig. 8). No entanto, vimos aqui que a injeção secundária de OVA solúvel antes da lesão não reduziu significativamente o infiltrado inflamatório ou o número de fibroblastos (Fig. 9).

A injeção apenas do adjuvante, sem a proteína tolerada, tampouco teve o efeito de alterar o infiltrado inflamatório e o número de fibroblastos (Fig. 7). Estes dados sugerem que o adjuvante ativa componentes adicionais do processo anti-inflamatório provocado pela injeção da proteína tolerada. O adjuvante tem vários efeitos ainda não bem compreendidos que podem potencializar o efeito desencadeado pela proteína tolerada.

Curiosamente, em diferentes grupos de camundongos imunizados com uma dose única de OVA mas com variadas doses do adjuvante Al(OH)₃ ou então uma dose única do adjuvante com variadas doses de OVA verificou-se que a maior produção de anticorpos anti-OVA estava correlacionada com maiores doses do adjuvante e não da OVA (Vaz et al. 1981).

É interessante notar também que os estudos sobre o tempo de persistência da tolerância oral mostram que a imunização parenteral em adjuvante com a proteína dada por via oral relaciona-se com a persistência da tolerância oral por longo tempo (Santiago, 2011).

Assim, o adjuvante parece ser um componente importante nos efeitos da injeção da proteína tolerada tanto para a manutenção da tolerância oral por longos tempos quanto para o estabelecimento dos efeitos indiretos da tolerância oral vistos no reparo de lesões cutâneas em camundongos. As ações do adjuvante podem estar relacionadas com a complexidade de formas e interações dele no local da injeção.

Exley et al, em 2010, mostraram que o adjuvante pode ter inúmeras formas de interação como, por exemplo, partículas de alumínio dissolvido ou conjugado com o antígeno ativam diversas células, entre elas macrófagos que persistem por um longo período no local da injeção possibilitando a apresentação antigênica através da molécula de MHC. Podem também ativar células dendríticas através de seus receptores do tipo Toll ou podem produzir morte celular por necrose ou apoptose em células musculares no local em que é injetado (Exley et al, 2010).

Os resultados aqui apresentados não nos permitem avaliar separadamente os efeitos da injeção da proteína tolerada ou do adjuvante. Infelizmente ainda não foi possível avaliar o efeito da injeção secundária de OVA sem adjuvante na cicatrização, pelo menos aos 40 dias depois da lesão.

Seria importante avaliar o resultado do processo de reparo com 40 dias, por exemplo, para verificarmos se a pequena alteração no número de células inflamatórias e no número de fibroblastos no grupo que recebeu a injeção secundária de OVA sem adjuvante poderia ter consequências na deposição de colágeno. Isto porque às vezes o número de células não teve alteração significativa, mas a ativação destas células ocorreu de maneira diferente.

A análise do papel do adjuvante Al(OH)₃ no desencadeamento dos efeitos inibidores da re-exposição a antígenos tolerados por via parenteral tem importância prática e teórica. Teoricamente, ela é útil para o entendimento da própria natureza de seu mecanismo molecular/celular; na prática, ela é útil porque até o momento só exploramos o efeito de uma única re-exposição ao antígeno tolerado em Al(OH)₃; ignoramos ainda, por exemplo, o efeito de

múltiplas exposições e também qual seja o(s) prazo(s) ideal para que a inibição seja ótima.

Na outra parte deste trabalho verificamos que a injeção i.p de zeína + Al(OH)₃ antes da lesão diminuiu significativamente o número de células inflamatórias e de fibroblastos (Fig. 11 e 12). Além disso, reduziu a área da cicatriz e melhorou a organização das fibras colágenas depositadas nesta área (Fig. 13 e 14). As alterações produzidas pela injeção de zeína ocorreram tanto em modelo de lesão incisional quanto excisional. Nos animais controles a área da cicatriz é maior e com um padrão de deposição de colágeno frouxo com fibras finas e paralelas (Fig. 13 B e 14 B).

Por outro lado, a matriz depositada na área da lesão do grupo Zeína é semelhante à da pele intacta (Fig. 13 C e 14 C). No entanto, não observamos a ocorrência de regeneração de músculo, glândulas e folículos pilosos. Assim como visto em estudos anteriores de nosso grupo os nossos resultados mostram que os efeitos indiretos da tolerância oral podem melhorar a cicatrização. As análises morfológicas sugerem que o processo de reparo modificado pelos efeitos indiretos da tolerância oral tornam-se mais semelhantes ao reparo que ocorre na fase tardia do desenvolvimento fetal, onde a matriz extracelular é depositada de forma semelhante à da pele intacta, mas sem a regeneração completa das estruturas da pele (Mori et al 2008; Cuttle et al 2005).

A ocorrência dos efeitos indiretos da tolerância oral pela injeção de zeína já tinha sido demonstrada pela avaliação da formação de anticorpos (Carvalho, et al 1996). Nestes experimentos publicados em 1996 camundongos que eram alimentados rotineiramente com ração comercial contendo milho foram imunizados com DNP-OVA mais zeína e produziram níveis significativamente reduzidos de anticorpos anti-DNP.

Os resultados do presente trabalho mostram que também é possível a ocorrência dos efeitos indiretos da tolerância oral pela injeção de zeína no reparo de lesões cutâneas. Além do mais, comparações das análises histológicas da pele de camundongos com os efeitos indiretos da tolerância oral produzidos após a injeção de OVA ou de zeína sugerem que a zeína pode ter um efeito mais pronunciado, o que tornaria mais adequado a proposição do uso de zeína para estudos futuros de aplicações clínicas, como em casos de cirurgia plástica.

O número de cirurgias no país cresce a cada dia segundo pesquisa realizada pelo IBOPE. Somente no ano de 2009 foram realizadas 645.464 cirurgias plásticas e o Brasil é o segundo lugar no ranking de cirurgias plásticas no mundo. Os Estados Unidos ocupa o primeiro lugar com 1,5 milhões de cirurgias (2009), segundo dados da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Estética. Um grande problema após as cirurgias é a formação de cicatrizes.

Além do interesse clínico que estes estudos podem despertar temos ainda um grande interesse na continuidade dos estudos científicos que podem revelar aspectos interessantes da interconectividade entre os fenômenos imunológicos e de reparo tecidual. Os aspectos aqui abordados dependem de um condicionamento imunológico sistêmico criado através da mucosa intestinal pela ingestão de uma proteína presente numa dieta regular.

A absorção de proteínas pelo trato digestivo tem amplas consequências imunológicas que vão desde a modificação morfológica em órgãos linfoides associados à mucosa, que pode ser vista em animais alimentados com dietas livre de macromoléculas (Menezes et al.,2003), a alterações significativas em processos inflamatórios produzidos pela injeção parenteral de proteínas previamente administradas por via oral (Ramos et al, 2009 , Azevedo-Jr et al, 2011, Costa et al, 2011).

6.0 – Conclusões

A imunização secundária com uma proteína tolerada sem adjuvante e concomitante com a lesão na pele de camundongos, não diminui o infiltrado inflamatório e a área do tecido de granulação, analisando histologicamente a pele nos dia 5 após a lesão.

Os efeitos indiretos da imunização parenteral com uma proteína tolerada (Zeína do milho):

- Reduzem o infiltrado inflamatório na área da lesão incisional e excisional nos dias 5 e 7 respectivamente;
-
- Melhora o reparo e reduz a cicatriz formada pela deposição de uma matriz extracelular de estrutura mais similar à pele normal;

7.0 - Referências Bibliográficas

ANDRE, C., J. F. HEREMANS, J. P. VAERMAN, and C. L. CAMBIASO. (1975). *A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes*. J. Exp. Med. 142:1509;

AZEVEDO – JR, G.M. *et al*, (2011). *Indirect Effects of Oral Tolerance Inhibit Pulmonary Granulomas to Schistosoma mansoni Eggs*. Clinical and Developmental Immunology, vol. 2012, Article ID 293625, 11 pages, 2012. doi:10.1155/2012/293625

AZEVEDO – JR, G.M. (2012). *Efeitos inibitórios da exposição parenteral a antígenos tolerados sobre a reação granulomatosa a ovos de Schistosoma mansoni*. Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biologia Celular – ICB. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorado.

BESREDKA, A. (1909). *De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique*. Ann. Inst. Pasteur, v.23, p.166-174.

BURKS, A. W., S. LAUBACH, et al. (2008). *"Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment."* J Allergy Clin Immunol 121(6): 1344-1350.

BROWN, E. J.: (1995). Phagocytosis. Bioessays, 17, 109-17

BRANSKI, R. C. et al. *Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model*. Journal of Voice, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

CARVALHO CR, VERDOLIN BA, SOUZA AV AND VAZ NM (1994) *Indirect Effects of Oral Tolerance in Mice*. Scand J Immunol. **39**,533-8.

CARVALHO. C. R. and VAZ, N. M. (1996). *Indirect effects are independent of the way of tolerance induction*. Scand J Immunol, v.43, p.613-8.

CARVALHO. C. R., VERDOLIN, B. A. and VAZ, N. M. (1997). *Indirect effects of tolerance cannot be ascribed to bystander suppression*. Scand J Immunol, v.45, p. 276-81.

CARVALHO, C.R., LENZI, H.L., CORREA-OLIVEIRA, R., and VAZ, N.M. (2002). *Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by Schistosoma mansoni eggs*. Brazilian journal of medical

and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al 35, 1195-1199.

CEPEK, K.L., SHAW, S.K., et al. (1994). "Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin." *Nature* 372 (6502): 190-193

CHEROUTRE, H. (2004). "Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells." *Annu Rev Immunol* 22: 217-246

CLARK, R.A.F: (1996). *Wound repair: Overview and general considerations. In: The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Ed: Clark RAF, Plenum Press, New York Vol xxiii., 3-50.

COSTA, R.A, et al. (2011). *Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. Wound Repair and Regeneration*, 19: 487–497. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00700.x.

CUNHA AP, OLIVEIRA RP, CASTRO JUNIOR AB, VAZ NM AND CARVALHO CR (2009) *Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. Cellular Immunology*, **258**, 152-160.

CUTTLE L, NATAATMADJA M, FRASER JF, KEMPF M, KIMBLE RM, HAYES MT (2005) *Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. Wound Repair Regen*, 13, 198-204.

DANG, C. M; BEANES, S. R; SOO, C; TING, K; BENHAIM, P; HEDRICK, M. H; LORENZ, H. P. *Decreased Expression of Fibroblast and Keratinocyte Growth Factor Isoforms and Receptors During Scarless Repair. Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 111, p. 1969-1979, 2003.

DANTAS, C. J. S. *Reparação tecidual: mecanismos celulares e musculares da inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 197-225.

DAKIN, R. (1829). *Remarks on a cutaneous affection, produced by certain poisonous vegetables. Am. J. Med. Sci.* v. 4, p.98-100.

DIPIETRO, L. A.: (1995). *Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. Shock*, 4, 233-40.

EIGENMANN, P. A. (2002). "T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells." *Pediatr Allergy Immunol* 13(3): 162-71.

EGOZI, E. I., A. M. FERREIRA, A. L. BURNS, R. L. GAMELLI & L. A. DIPIETRO (2003). : *Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds*. *Wound Repair Regen*, 11, 46-54.

EMING, S. A., T. KRIEG, *et al.* (2007). *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. *J Invest Dermatol*, v.127, n.3, Mar, p.514-25.

EMING, SA, HAMMERSCHMIDT, M, KRIEG, T, ROERS, A (2009) Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 517-27.

EXLEY, C.; SIESJO, P.; ERIKSSON, H.(2010) *The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work?*. *Trends in Immunology* - 1 March 2010 (Vol. 31, Issue 3, pp. 103-109)

FAGARASAN, S. and T. HONJO (2003). "*Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences.*" *Nat Rev Immunol* 3(1): 63-72

FAGEER, A.S.M.; TINAY, A.H.E. (2004) *Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn*. *Food Chem.*, v.84, p. 613-619.

FARIA, AM; WEINER, HL. *Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications*. *Adv Immunol*. 1999;73:153-264.

FARIA, AM, WEINER, HL (2005) *Oral tolerance*. *Immunol Rev*, **206**, 232-59.

FERGUSON MW, WHITBY DJ, SHAH M, ARMSTRONG J, SIEBERT JW, LONGAKER MT (1996) *Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair*. *Plast Reconstr Surg*, **97**, 854-60.

FERGUSON MW, O'KANE S (2004) *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 839-50.

GALIANO RD, MICHAELS J, DOBRYANSKY M, LEVINE JP AND GURTNER GC (2004). *Quantitative and reproducible murine modelo of excisional wound healing*. *Wound repair and regeneration*. V. 12 n. 4 p. 485-492

GARDNER, MLG (1988). *Gastrointestinal absorption of intact proteins*. *Ann. Rev. Nutr.* **8**,329-50.

GAWRONSKA-KOZAK, B. (2004). *Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells*. *Tissue Eng*, **10**, 1251-65.

GLENNY, A. T.; POPE, G. C. G.; WANDDINGTON, H.; WALLACE, U. (1926) *The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum*. *Journal of Pathology Bacteriology*, v. 29, p.38-40.

GONÇALVES, R.A.; SANTOS, J.P.; TOMÉ, P.H.F.; PEREIRA, R.G.F.A.; ASCHERI, J.L.R.; ABREU, C.M.P. (2003) *Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de griffts*. *Cienc. Agrotec.*,v 27, p. 643-650.

GUARNER, F. e J. R. MALAGELADA (2003). "Gut flora in health and disease." *Lancet* 361(9356): 512-519.

GURTNER GC, WERNER S, BARRANDON Y, LONGAKER MT (2008) *Wound repair and regeneration*. *Nature*, **453**, 314-21.

GUPTA, R.K. (1998) *Aluminum compounds as vaccine adjuvants*. *Ad. Drug Del. Rev.* 32: 155-172.

HANSON, D.G. and T. MORIMOTO (1980). *A role of digestion in orally induced tolerance to ovalbumin*. *J.Allergy Clin.Immunol.* **65** (3): 227-228.

HATANAKA, E.; CURI, R. *Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão*. *Rev. Bras. Farm.*, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HOOPPER, L. V. e J. I. GORDON (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." *Science* 292(5519): 1115-1118.

HARTY M, NEFF AW, KING MW, MESCHER AL (2003) *Regeneration or scarring: an immunologic perspective*. *Dev Dyn*, **226**, 268-79.

IBA, Y., A. SHIBATA, M. KATO & T. MASUKAWA: (2004). *Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice*. *Int Immunopharmacol*, 4, 1873-80.

IBOPE. *Inteligência sobre o mercado da cirurgia plástica no Brasil para o XI Simpósio Internacional de Cirurgia Plástica* (2009).

IWASAKI, A. e B. L. KELSALL. *Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine.* J Exp Med, v.191, n.8, Apr 17, p.1381-94. 2000.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 540 p.

KELSALL, B. L. e W. STROBER. *Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch.* J Exp Med, v.183, n.1, Jan 1, p.237-47. 1996.

KINSEY GS, PREDERGAST BJ, NELSON RJ (2003) *Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters.* Physiology and Behavior, **78**, 205-211

KUNISAWA, J., I. TAKAHASHI, et al. (2007). *"Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine."* Immunol Rev 215: 136-153.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. (1970). *Heterogeneity of the glutelins of the grain corn: Selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions.* Bull. Soc.Chem. Bio., v. 52, p. 1021-1037.

LIECHTY KW, KIM HB, ADZICK NS, COMBLEHOLME TM (2000) *Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair.* J. of Pediatric Surgery **35**, 866-873

LIEVIN-LE MOAL, V. and A. L. SERVIN (2006). *"The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota."* Clin Microbiol Rev 19(2): 315-37.

LUCAS T, WAISMAN A, RANJAN R, ROES J, KRIEG T, MÜLLER W, ROERS A, EMING SA. (2010) *Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair.* J Immunol. 184:3964-3977

MARTIN P (1997) *Wound healing- aiming for perfect skin regeneration.* Science, **276**, 75-81.

MARTIN P, D'SOUZA D, MARTIN J, et al. (2003) *Wound healing in the PU.1 null mouse—tissue repair is not dependent on inflammatory cells.* Curr Biol, **13**, 1122-8.

MARTIN, P. & S. J. LEIBOVICH: (2005). *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. Trends Cell Biol, 15, 599-607.

MCCULLOTH, M. J; KLOTH, C. L. *Wound Healing Alternatives in Management*. Philadelphia: Davis Company, 3a edição, 2002.

MAST BA, LC FLOOD, JH HAYNES, RL DEPALMA, IK COHEN, RF DIEGELMANN, & TM KRUMMEL: (1991). *Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: Implications for healing by regeneration*. Matrix 11, 63-68.

MAST BA, RF DIEGELMANN, TM KRUMMEL, & IK COHEN: (1993). *Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts*. Matrix 13(6), 441-446.

MATOS – L, B.O. (2010). *Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram o processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biologia Celular – ICB. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Mestrado.

MAYER, L. (2003). "Mucosal immunity." Pediatrics 111(6 Pt 3): 1595-600.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. *Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação*. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001(em construção).

McCRACKEN, V. J. and R. G. LORENZ (2001). "The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota." Cell Microbiol 3(1): 1-11.

MCKEE, A. S., M. W. MUNKS, and P. MARRACK. (2007). *How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants*. Immunity 27: 687–690.

MENEZES JS, MUCIDA DS, CARA DC, ALVAREZ-LEITE JI, RUSSO M, VAZ NM, DE FARIA AM. (2003) *Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system*. Int Immunol. 15(3):447-55.

MILLER, A., LIDER, O., WEINER, H. (1991) *Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens*. J. Exp. Med. 174, 791-798.

MICHAEL, J.G. 1989. *The role of digestive enzymes in orally-induced immunological tolerance.* Immunol.Invest. 18 (9&10): 1049-1054.

MESTECKY, J., M. W. RUSSELL, et al. (1999). *"Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface."* Gut 44(1): 2-5.

MOOG, F. (1981). *"The lining of the small intestine."* Sci Am 245(5): 154-158, 160, 162 et passim.

MONACO, J.L; LAWRENCE, W. T. *Acute Wound Healing – An Overview.* Clin Plastic Surg, v. 30, p. 1-12, 2003.

MOSMAN, T. R.; COFFMAN, R.I. (1989). *Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.* Advances in Immunology, v. 46, p. 111-147.

MORY R, SHAW TJ, MARTIN P (2008) *Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring.* JEM Vol. 205, No.1, 43-51

MOWAT, A. M. (1999). *"Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance."* Curr Opin Gastroenterol 15(6): 546-556.

MOWAT, A. M. (2003). *"Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens."* Nat Rev Immunol 3(4): 331-341.

MUTSAERS, S. E.; BISHOP, J. E.; MSGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. *Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

NEUTRA, M. R. N. J. MANTIS, et al. (2001). *"Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues."* Nat Immunol 2(11): 1004-1009.

NIENARTOWICZ, A., M. E. SOBANIEC-LOTOWSKA, E. JAROCKA-CYRТА & D. LEMANCEWICZ: (2006) *Mast cells in neoangiogenesis.* Med Sci Monit, 12, RA53-6.

NG, MFY. (2010) *The role of mast cells in wound healing.* Int Wound J; 7:55–61.

O'LEARY, R; WOOD, E. J; GUILLOU, P. J. *Pathological Scarring: Strategic Interventions.* Eur J Surg, v. 168, p. 523-534, 2002.

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. *Current concepts and approaches to wound healing*. Critical Care Medicine, Baltimore, v.16, n.9, p.899-908, 1988.

RAMOS, GC, RODRIGUES, CM, AZEVEDO Jr, GM, 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.

RANG, H. P. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REID RR, SAID HK, MOGFORD JE, MUSTOE TA (2004) *The future of wound healing: pursuing surgical models in transgenic and knockout mice*. J Am Coll Surg, **199**, 578-85.

RESCIGNO, M., M. URBANO, et al. (2001). *"Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria."* Nat Immunol 2(4): 361-367.

RICHMAN, L.K., CHILLER, J.M, BROWN, W.R., HANSON, D.G. and VAZ, N.M. (1978) *Enterically induced immunologic Tolerance I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins*. J. Immunol. 121 (6): 2429-2434.

RICHES, D. W. H. Macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum, 1996. p. 95-141.

RODRIGUES, C.M., MARTINS-FILHO, O.A., VAZ, N.M., and CARVALHO, C.R. (2006). *Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis*. Immunology 117, 517-525.

ROBBINS L. S; COTRAN S. R. Patologia. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005
SAMPSON, H. A. (1999). *"Food allergy. Part 2: diagnosis and management."* J Allergy Clin Immunol 103(6): 981-989.

SANTIAGO – A, F. (2011). *Efeitos do envelhecimento na mucosa intestinal: indução e declínio da tolerância oral*. Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Bioquímica e Imunologia– ICB. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorado.

SAURER, L., I. SEIBOLD, et al. (2004). *"Virus-induced activation of self-specific TCR alpha beta CD8 alpha alpha intraepithelial lymphocytes does not abolish their self-tolerance in the intestine."* J Immunol 172(7): 4176-4183.

SEIBOLD, F. *Food-induced immune responses as origin of bowel disease?* Digestion, v.71, n.4, p.251-60. 2005.

SCHIJNS, VE. *Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants.* Crit Rev Immunol. 2001;21(1-3):75-85.

SMITH, D. W. e C. NAGLER-ANDERSON (2005). *"Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa."* J Immunol 174(7): 3851-3857.

STILLS Jr., H.F. (2005) *Adjuvantes and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's Complete and others adjuvants.* ILAR Journal. 46(3): 280-295.

STORNI, T., KUNDING, M., SENTI, G., JOHANSEN, P. (2005) *Immunity in response to particulate antigen-delivery systems.* Ad. Drug Del. Rev.57: 333-255.

STRAMER BM, MORI R, MARTIN P (2007) *The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair.* J Invest Dermatol, **127**, 1009-17.

STROBEL, S., MOWAT, A.M. (1998) *Immune responses to dietary antigens: oral tolerance.* Immunol Today, 19, 173-81.

SWAIM, S.F. *Advances in wound healing in small animal practice. Current status and lines of development.* Vet. Dermatol. V. 8, p.249-257, 1997.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. *Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe?* Surgery, v. 137, p. 571-573, 2005.

TSUJI, N. M. e A. KOSAKA (2008). *"Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells."* Trends Immunol 29(11): 532-540.

THOMAS, H. C., and M. V. PARROTT. 1974. *The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration.* Immunology 27:631;

TOOLE BP (1997) *Hyaluronan in morphogenesis.* J Intern Med, **242**, 35-40.

TURNBAUGH, P. J., R. E. LEY, et al. (2007). *"The human microbiome project."* Nature 449(7164): 804-810.

VAN DER HEIJDEN, P. J., W. STOK, et al. (1987). "Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production." *Immunology* 62(4): 551-5.

VAZ N M; MAIA L C; HANSON D G; LYNCH J M (1981) *Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 76(1):83-91.

VAZ, N. M., L. C. S. MAIA, D. G. HANSON, and J. M. LYNCH. 1977, *Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 60:110).

VAZ N, FARIA AM, VERDOLIN BA, CARVALHO CR (1997) *Immaturity, ageing and oral tolerance. Scand J Immunol*, **46**, 225-9.

VAZ, N. e C. R. CARVALHO. (1993). *Immunological specificity as metaphor.* *Braz J Med Biol Res*, v.26, n.7, Jul, p.665-71.

VERDOLIN BA, FICKER SM, FARIA AM, VAZ NM, CARVALHO CR (2001) *Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction.* *Braz J Med Biol Res*, 34, 211-9.

VILLA-REAL, B.; MANSER, J.M.; COLLINS, R.A.; HOWARD, C.J. (2000). *Cattle immune responses to tetanus toxoid elicited by recombinant S. typhimurium vaccines ortetanus toxoid in alum or Freund's adjuvant Vaccine*, v.18, p.1515-1521.

WAKABAYASHI, A., KUMAGAI, Y., WATARI, E., SHIMIZU, M., UTSUYAMA, M., HIROKAWA, K. and TAKAHASHI, H. (2006). *Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction.* *Immunol.* 119: 167-177.

WEINER, H. L. (2001). *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.* *Immunol Rv*, v.182, p.207-14.

WELLS, H. G., (1911) *Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg.* *J Infect. Dis.*, 8, 147-171.

WELLS, H. G.; OSBORNE, T. B., (1911) *The biological reactions of the vegetable proteins.* *J. inf. Dis.*, v.8 , p. 66 - 69.

WERNER, S.; GROSE, R. *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.* *Physiological Reviews*, v. 83, p. 835-870, 2003.

WERSHIL, B. K. and G. T. FURUTA (2008). "4. *Gastrointestinal mucosal immunity.*" J Allergy Clin Immunol 121(2 Suppl): S380-3; quiz S415.

WHITBY DJ, FERGUSON MW (1991) *The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. Development*, **112**, 651-68.

YAMAMOTO, T., K. HARTMANN, B. ECKES & T. KRIEG (2000). *Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit.* Immunology, 99, 435-9.