

THIAGO CANTARUTI ANSELMO

Efeitos indiretos da tolerância oral a zeína melhoram a cicatrização de pele  
em camundongos diabéticos

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Outubro/2016

THIAGO CANTARUTI ANSELMO

Efeitos indiretos da tolerância oral a zeína melhoram a cicatrização de pele  
em camundongos diabéticos

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Cláudia Rocha Carvalho

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Outubro/2016

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

*Dedico este trabalho a Kênia Soares de Souza  
que foi minha fonte de inspiração nesta vida e creio que em outras também...*

“Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas eles vão sempre mudando”

“Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”

**João Guimarães Rosa**

Grande Sertão: Veredas

eu tenho um caso  
com a ambiguidade  
poética de uma cicatriz,  
que sempre perpassa  
duas mensagens:  
aqui feriu,  
aqui compendiou?!

**Cantarutti 2016**

## **Agradecimentos Especiais**

- À Prof<sup>a</sup>. Cláudia Rocha Carvalho e ao Prof. Nelson Monteiro Vaz por terem me recebido no grupo de pesquisa desde o final da minha graduação até os dias atuais, pelos conselhos, brincadeiras, ensinamentos, compreensão, ajuda, palavras de conforto e claro enorme paciência.
- À Dr<sup>a</sup>. 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 Kênia Soares de Souza pela grande pessoa e ser humano que se mostrou a todos enquanto esteve entre nós...
- A todos os amigos que torceram por mim...
- Aos queridos amigos do grupo: Kênia, Claudiney, Geraldo, Daniel pela constante ajuda, companheirismo e luta.
- Aos Professores da Pós-graduação pelas aulas e ensinamentos tão importantes ao aprendizado e compreensão de muitos resultados obtidos.

## Resumo

No início do século XX observou-se que cobaias que haviam se alimentado com ração contendo milho reagiam menos imunologicamente às proteínas do milho, como a zeína, quando comparadas com cobaias não 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. Desde os primeiros relatos sobre a influência de proteínas da dieta sobre a atividade imunológica várias proteínas vegetais e animais foram utilizadas em estudos sobre a tolerância oral, tais como a ovalbumina de galinha (OVA), a gamaglobulina bovina (BGG) e hemocianina de animais marinhos (KLH). Uma vez que estas proteínas animais não fazem parte da dieta usual dos camundongos, elas são introduzidas na ração ou diluídas em água para a indução de tolerância oral. Animais que ingerem OVA antes da imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> (um adjuvante) formam menos anticorpos para OVA do que os que não ingeriram a mesma; mas a ingestão de OVA não interfere na imunização com outra proteína. Curiosamente, se durante a imunização com esta segunda proteína for realizada também uma imunização com a proteína tolerada, a formação de anticorpos para esta proteína “não-tolerada” é também diminuída. Também, a tentativa de imunização de animais tolerantes com o antígeno tolerado em adjuvante inibe reações inflamatórias, como as desencadeadas por injeção de carragenina no coxim plantar de camundongos. Estes efeitos desencadeados pela injeção do antígeno tolerado são denominados “efeitos indiretos da tolerância oral”. Nosso grupo de pesquisa mostrou que os efeitos indiretos da injeção de OVA em camundongos tolerantes a OVA inibem a inflamação após lesões na pele de camundongos e, como resultado, forma-se uma cicatriz menor. Neste trabalho, mostramos que a injeção i.p. de zeína em adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> diminui o infiltrado inflamatório, reduz a área do tecido de granulação e reduz a cicatriz em lesões na pele de camundongos saudáveis e diabéticos. Os efeitos indiretos modificaram também a cicatrização em curso, quando a proteína tolerada foi injetada 6 horas após a lesão. Além disso, verificamos que os efeitos indiretos da tolerância oral pela injeção de zeína aumentaram a expressão de TGF- $\beta$ 3 no leito da ferida. Estes resultados indicam que a injeção parenteral de proteínas toleradas pode ser explorada como uma possibilidade de tratar lesões cutâneas em condições onde a cicatrização é mais difícil de ocorrer.

Palavras chave: tolerância oral, cicatrização, inflamação, diabetes, zeína, lesões cutâneas.

## Abstract

At the beginning of the twentieth century it was observed that animals that had been fed with animal chow that contained corn proteins did not react immunologically to zein. Today we know that the absorption of intact or partially digested proteins through intestinal mucosa is a common occurrence after meals. These proteins interfere with the activity of the immune system and a common result of these interferences is oral tolerance. The first reports on the influence of dietary proteins on the immune activity were made with plant and animal proteins but most studies on oral tolerance have been made using animal-derived proteins. Animal proteins, such as ovalbumin (OVA) is not a regular diet component of mice and, for oral tolerance induction, it has to be introduced in their drinking water. Mice that drink a solution containing OVA before immunization with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> form less antibodies than those animals that do not receive OVA. However the ingestion of OVA does not interfere with immunization to other proteins, except when during the immunization with the second protein the tolerated protein is also given, a phenomenon named "indirect effects of oral tolerance". Indirect effects of oral tolerance to OVA also inhibit inflammatory reactions, such as those triggered by carrageenan and improves skin wound healing in mice. In here we show that, the indirect effects of oral tolerance triggered by intraperitoneal injection of zein minutes before a skin wound in both health and diabetic mice reduce the inflammatory infiltrate and improve the healing of cutaneous wound. Mice that have received i.p. injection of zein+Al(OH)<sub>3</sub> before cutaneous wound had reduced scar. Moreover, we show that indirect effects of oral tolerance can improve the healing of a lesion already in process or in conditions where the healing process is more difficult to occur as in diabetes. The indirect effects of oral tolerance triggered by i.p. injection of zein increased the level of TGF-β3 in the wound bed. These results indicate that parenteral injection of tolerated proteins may be explored as a possibility to treat skin ulcers in cases where cutaneous wound healing is more difficult to occur.

Keywords: oral tolerance, scar, inflammation, diabetes, zein, cutaneous wound

## Lista de Abreviações

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

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

Arg – 1 - Arginase 1

BGG - Gamaglobulina bovina

BSA - Albumina de soro bovino

CD - Conjunto de diferenciação

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CpG – Oligodesoxinucleótidos

CTS – sublinhagem de camundongo propensa à catarata

d – dia (s)

DCs – Células Dendríticas

DETC - células T epidérmicas dendríticas

DM - Diabetes mellitus

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNP – Dinitrofenil

DSCG - cromoglicato dissódico/estabilizador de mastócitos

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

FAE - Epitélio Associado ao folículo

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

Fig. - Figura

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Intestino

HE - Hematoxilina e Eosina

i.p. – Via intraperitoneal

IBOPE - Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

IEC - Células Epiteliais Intestinais

IEL - Linfócitos Intraepiteliais

IFN - Interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

KLH – Hemocianina

LPS - Lipopolissacarídeo

M1 – Macrófago classicamente ativado

M2 – Macrófago alternativamente ativado

MadCAM - Molécula de adesão celular

MBP - Proteína básica de mielina

MEC – Matriz extracelular

MHC - Major Histocompatibility Complex - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MMP – metaloproteinase

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

NKT – linfócito NKT

NOD - Non-obese diabetic

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVA – Ovalbumina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

pH - potencial hidrogeniônico

PMN – Polimorfonucleares

PPAR – Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma

RELM-alpha - Molécula de resistina

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

STZ - Streptozotocina

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

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

Th - células T helper

TH1 - Resposta celular do tipo 1

TH2 - Resposta celular do tipo 2

TNF - Fator de necrose tumoral

Toll - receptores do tipo Toll-like

Tregs – células T regulatórias

TRIS - trisaminometano

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - Fator Endotelial de Crescimento Vascular

W/W-v – Camundongos deficientes em mastócitos

Ym1 / 2 / AMCase - Moléculas de quitinase

$\alpha$ -SMA – actina alfa de músculo liso

$\mu$ l – Microlitros

$\mu$ M – Micrômetros

## Lista de Figuras

Figura 1 - Monitor Accu-Chek Advantage - Medidor de Glicemia.....	49
Figura 2 - Esquema de realização da ferida excisional na pele do dorso de camundongos.....	51
Figura 3 - Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas sete dias após sua realização.....	54
Figura 4 - Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas 40 dias após sua realização .....	54
Figura 5 - Reticulo utilizado para análises morfométricas. ....	59
Figura 6 - Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo Excisional.....	60
Figura 7 - Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57BL/6.....	63
Figura 8 - Injeção i.p. de zeína antes da lesão de pele reduziu o número de células inflamatórias e de fibroblastos.....	65
Figura 9 - Efeitos indiretos da tolerância oral reduzem o numero de leucócitos sete dias após a lesão.....	66
Figura 10 - Análise de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida.....	68
Figura 11 - Efeitos indiretos da tolerância oral alteram a expressão do fator de crescimento transformante beta do tipo 3 no leito da ferida.....	69
Figura 12 - Cinética de produção de citocinas nas lesões de animais C57/BL6.....	70

Figura 13 - Cicatrização de feridas cutâneas 40 dias após a lesão em animais C57BL/6 por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína). .....	72
Figura 14 - A injeção i.p. de zeína antes da lesão na pele melhora a deposição de colágeno na cicatrização de camundongos C57BL/6.....	73
Figura 15 - Monitoramento de glicemia pós jejum em animais C57BL/6 que receberam injeção de estreptozotocina.....	75
Figura 16 - Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57Bl/6 diabéticos e os efeitos indiretos da tolerância oral.....	76
Figura 17 - Injeção Intraperitoneal de zeína em camundongos diabéticos reduz o número de células inflamatórias e fibroblastos e aumenta a densidade de novos vasos no leito da ferida.....	79
Figura 18 - Efeitos indiretos da tolerância oral reduzem o número de leucócitos no leito da ferida em animais diabéticos.....	80
Figura 19 - Os efeitos indiretos da tolerância oral alteram o número de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos na área da lesão de animais diabéticos.....	82
Figura 20 - Aumento da expressão de TGF-beta 3 pelos efeitos indiretos da tolerância oral nas lesões em animais diabéticos.....	83
Figura 21 - Melhora da cicatrização de feridas cutâneas em animais C57BL/6 diabéticos por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína).....	84
Figura 22 - A injeção i.p. de zeína melhora a deposição de colágeno na cicatrização de camundongos C57BL/6 diabéticos.....	86
Figura 23 - Monitoramento de glicemia após jejum em animais da linhagem NOD.....	87

Figura 24 - Injeção Intraperitoneal de zeína momentos antes ou 6 horas após a lesão reduz o número de leucócitos e fibroblastos em animais da linhagem NOD.....89

Figura 25 - Injeção Intraperitoneal de zeína momentos antes ou 6 horas após a lesão reduz o número de mastócitos na área da lesão em animais da linhagem NOD.....91

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela 1 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele em camundongos da linhagem C57BL/6.....	52
Tabela 2 – Tabela 2 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele em camundongos NOD.....	53
Tabela 3 – Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta.....	57
Tabela 4 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele.....	62
Tabela 5 – Protocolo experimental para estudo dos efeitos indiretos da tolerância oral em camundongos C57BL/6 com diabetes tipo 1, parte II.....	75
Tabela 6 – Protocolo experimental para estudo dos efeitos indiretos da tolerância oral em camundongos NOD com diabetes tipo 1.....	88

## **SUMÁRIO**

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 - O TRATO GASTROINTESTINAL, A DIETA E A ATIVIDADE IMUNOLÓGICA	18
1.2 - ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS E ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE	19
1.3 - ASSIMILAÇÃO DE ANTÍGENOS DA DIETA PELA MUCOSA	21
1.4 - TOLERÂNCIA ORAL	22
1.5 - MECANISMOS DA TOLERÂNCIA ORAL	24
1.6 - EFEITOS INDIRETOS DA TOLERÂNCIA ORAL	25
1.7 - UTILIZAÇÃO DA ZEÍNA, UMA DAS PROTEÍNAS DO MILHO	27
1.8 - ADJUVANTES	28
1.9 - A PELE	30
1.10 - REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS	31
1.11 - REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS E INFLAMAÇÃO	33
1.12 - REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS E FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO	37
1.13 - REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS E LINFÓCITOS T	38
1.14 - REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS – FASE DE REMODELAMENTO	39
1.15 - DIFERENÇAS NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS EM FETOS E ADULTOS (MAMÍFEROS)	40
1.16 - DIABETES E LESÕES CUTÂNEAS	41
1.17 - MODELOS DE ESTUDO DE LESÕES EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS	43
<b>2 - JUSTIFICATIVA</b>	<b>45</b>
<b>3 – OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>4 - MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
4.1 - ANIMAIS	48
4.2 - DIETA DOS CAMUNDONGOS: RAÇÃO CONTENDO ZEÍNA	48
4.3 - MODELO DE DIABETES AUTO-IMUNE INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ)	48
4.4 - MONITORAMENTO DA GLICEMIA	49
4.5 - INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ZEÍNA EM ADJUVANTE	50
4.6 - REALIZAÇÃO DE LESÃO EXCISIONAL NA PELE	50
4.7 - PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO	50
4.8 - ORGANIZAÇÃO E DENOMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	51
4.9 - COLETA DA REGIÃO LESIONADA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	53
4.10 - TÉCNICA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA	56
4.11 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA ÁREA DA LESÃO	57
4.12 - AQUISIÇÃO DE IMAGENS	58
4.13 - MEDIDA DA ÁREA, EM VISTA MACROSCÓPICA, DA FERIDA EXCISIONAL	58
4.14 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ	58
4.15 - ANÁLISE EM MICROSCÓPIO CONFOCAL	60
4.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	61
<b>5 – RESULTADOS - PARTE I</b>	<b>62</b>
5.1 - ANÁLISE DO EFEITO INDIRETO DA TOLERÂNCIA ORAL A UMA PROTEÍNA DA DIETA NA CINÉTICA DE FECHAMENTO DE LESÕES NA PELE DO DORSO DE CAMUNDONGOS	62
5.2 - ANÁLISE DE MASTÓCITOS, MACRÓFAGOS E MIOFIBROBLASTOS NO LEITO DA FERIDA	67

<b>5.3 - ANÁLISE DO PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO EXTRATO DE PELE CONTENDO A LESÃO</b>	<b>69</b>
<b>5.4 - ANÁLISE DA ÁREA DA CICATRIZ E DA MATRIZ EXTRACELULAR AOS 40 DIAS APÓS A LESÃO</b>	<b>70</b>
<b>PARTE II</b>	<b>74</b>
<b>5.5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INJEÇÃO DE ZEÍNA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS COM DIABETES EXPERIMENTAL DO TIPO 1</b>	<b>74</b>
<b>5.6 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</b>	<b>77</b>
<b>5.7 - ANÁLISE DE MASTÓCITOS, MACRÓFAGOS E MIOFIBROBLASTOS NO LEITO DA FERIDA EM ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO 1, NO DIA 7 APÓS A LESÃO</b>	<b>81</b>
<b>5.8 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF-BETA3 NO LEITO DA FERIDA DE ANIMAIS DIABÉTICOS</b>	<b>83</b>
<b>5.9 - ANÁLISE DA ÁREA DA CICATRIZ E DA MATRIZ EXTRACELULAR AOS 40 DIAS APÓS A LESÃO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS</b>	<b>84</b>
<b>5.10 - AVALIAÇÃO DO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS NOD COM DIABETES DO TIPO 1</b>	<b>87</b>
<b>6 - DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>7 - CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>105</b>

## 1 - Introdução

### 1.1 - O Trato gsatrointestinal, a dieta e a atividade imunológica

O intestino e a pele são os maiores órgãos de contato dos vertebrados com o ambiente. No ser humano, o intestino possui metros de extensão e a presença de pregas, vilosidades e microvilosidades aumenta ainda mais a superfície da mucosa intestinal. 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. Assim, a área da mucosa intestinal no ser humano adulto atinge aproximadamente 200 a 300 m<sup>2</sup> (Junqueira & Carneiro, 2004). A mucosa intestinal apresenta uma área 100 vezes maior que a área da pele (Moog, 1981).

A mucosa intestinal possui estruturas linfóides que, em conjunto, formam o tecido linfóide associado às mucosas ou, em inglês, 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 inseridas entre as células epiteliais da mucosa (linfócitos intraepiteliais). Na mucosa intestinal encontram-se linfócitos T, linfócitos B macrófagos e células dendríticas. Também são encontradas células epiteliais com características diferentes, como as células M e as células de Paneth, (Mowat, 2003).

A mucosa intestinal representa um ecossistema complexo que combina o epitélio, células do sistema imune e a microbiota residente (McCracken and Lorenz, 2001). Os componentes da dieta entram em contato com a grande superfície da mucosa intestinal e influenciam a atividade do sistema imune. A microbiota, além de facilitar a digestão de alguns alimentos e resguardar a mucosa intestinal contra micro-organismos patogênicos, também auxilia no desenvolvimento de estruturas do GALT (Guarner and Malagelada, 2003; Hooper and Gordon, 2001; Turnbaugh et al., 2007). O

desenvolvimento e a maturação do sistema imune são diretamente influenciados pela dieta e pela colonização bacteriana.

Aproximadamente uma tonelada de alimentos passa pelo trato gastrointestinal a cada ano, de tal maneira que 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 e da história imunológica do indivíduo.

Quando uma proteína é ingerida, a mesma é clivada por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado. O epitélio intestinal, portanto, representa uma barreira física e química (Lievin-Le Moal and Servin, 2006; Wershil and Furuta, 2008). Alguns antígenos, no entanto, escapam dessa digestão e podem ser absorvidos intactos ou apenas parcialmente degradados (Wakabayashi et al., 2006).

## **1.2 - Absorção de proteínas e ativação do sistema imune**

O intestino delgado, onde ocorre a absorção das proteínas alimentares, possui grande número de linfócitos e órgãos linfóides associados. Os enterócitos podem captar antígenos solúveis, processá-los e apresentá-los às células T (Kunisawa et al., 2007). Mas parte das proteínas ingeridas podem ser captadas pelas células M, que se localizam no epitélio intestinal associado às placas de Peyer no intestino delgado. As células M possuem um glicocalix complexo, são muito permeáveis, interagem diretamente com moléculas e partículas do lúmen intestinal e realizam a transcitose destes materiais para seu interior (Kadaoui and Corthesy, 2007). 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 que depois é apresentado como peptídeos aos linfócitos. O material coletado pelas células M é transferido às células dendríticas que ficam próximas às células M (Neutra et al., 2001) ou, alternativamente, as células dendríticas podem também coletar antígenos

diretamente do lúmen intestinal emitindo projeções membranares por entre as células epiteliais (Rescigno et al., 2001). Essas células dendríticas carregadas com antígenos migram para a área perifolicular das placas de Peyer e apresentam peptídeos às células T CD4+ (Macpherson et al., 2008). 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).

As placas de Peyer apresentam numerosos folículos linfóides compostos de linfócitos B IgM+ que são precursores de plasmócitos secretores, principalmente de IgA. As placas de Peyer são 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  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleucina-10 (IL-10) (Fagarasan and Honjo, 2003).

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 (Eigenmann, 2002; Sampson, 1999).

Muitos linfócitos encontram-se dispersos pela lâmina própria da parede intestinal e entre as células epiteliais (Iwasaki and Kelsall, 2000; Kelsall and Strober, 1996; Neutra et al., 2001). A população de linfócitos intra-epiteliais (IEL) pode participar de respostas imunes inflamatórias e também no processo de indução de tolerância oral. Os IELs podem sintetizar citocinas

como interleucinas (IL) IL-2, IL-13, IL-6, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas como as linfotaxinas e também fator de crescimento para queratinócitos, importante para a renovação epitelial e reparo a danos teciduais (Cheroutre, 2004; Kunisawa et al., 2007). Os IELs também liberam citocinas anti-inflamatórias como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e IL-10, tendo um papel chave na manutenção da homeostase intestinal (Saurer et al., 2004). Muitas moléculas de interação, tais como  $\alpha$ E integrina e E-caderina, são expressas entre IELs e IECs respectivamente. Essas interações permitem a retenção de IELs no epitélio intestinal e a manutenção da integridade da camada epitelial (Cepek et al., 1994). Os linfócitos da lâmina própria e os IELs estão sobre forte influência das proteínas da dieta e da microbiota (Smith and Nagler-Anderson, 2005).

Nos seres humanos, pelo menos 80% dos plasmócitos estão localizados na lâmina própria do intestino delgado 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).

### **1.3 - Assimilação de antígenos da dieta pela mucosa**

Proteínas da dieta intactas ou incompletamente degradadas podem ser encontradas no sangue após as refeições em indivíduos adultos normais e estas interferem na atividade do sistema imune (Gardner, 1988). A indução da tolerância oral a bactérias comensais e proteínas da dieta é considerada o principal evento imunológico em condições fisiológicas (Faria and Weiner, 2005). No entanto, 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). Além do mais, as consequências imunológicas da ingestão de proteínas não se restringem à mucosa intestinal, pois tem repercussões sistêmicas.

#### 1.4 - Tolerância Oral

Estudos que mostram a influência das proteínas da dieta sobre as reações imunológicas datam do início do século XX após observações de que era possível prevenir o choque anafilático em cobaias, às proteínas do leite, do milho ou do ovo, por meio da alimentação prévia com estas proteínas (Besredka, 1909; Wells, 1911; Wells and Osborne, 1911). De acordo com Wells & Osborne (1911), cobaias que receberam na sua dieta proteínas oriundas do milho anteriormente a uma imunização com a zeína não sofreram reações anafiláticas, como sofreram as cobaias que não possuíam milho na dieta. Curiosamente, já em 1829, encontramram relatos de que índios americanos ingeriam extratos de uma planta sensibilizante (Poison ivy) como forma de impedir a dermatite de contato a 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 (Andre et al., 1975; Thomas and Parrott, 1974; Vaz et al., 1977). A tolerância oral foi definida como uma diminuição da reatividade imunológica após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (Faria and Weiner, 2005; Mowat, 1999; Smith and Nagler-Anderson, 2005; Vaz et al., 1997). Desde então, a tolerância imunológica vem sendo mais estudada e considerada um fenômeno a partir do qual o organismo é capaz de conviver harmonicamente com proteínas de sua dieta e, além disso, com uma grande variedade de produtos de bactérias (a microbiota nativa) que colonizam a mucosa intestinal (Castro-Junior et al., 2012; Cummings and Macfarlane, 1997).

A tolerância oral é dependente de linfócitos, pode ser adotivamente transferida (Cunha et al., 2009) e resulta em reduções no aparecimento de células formadoras de anticorpos, de imunoglobulinas circulantes e da hipersensibilidade tardia (Strobel and Mowat, 1998; Weiner, 2001).

Embora a tolerância oral seja tida como a consequência mais comum após contatos com antígenos pela mucosa intestinal, estudos realizados por Verdolin e colaboradores em 2001 mostraram que a redução das respostas imunes não é a consequência mais significativa da ingestão de proteínas: ocorre uma estabilização da formação de anticorpos específicos em resposta a imunizações subsequentes em níveis inversamente proporcionais à dose de antígeno previamente ingerida (Verdolin et al., 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 and Kosaka, 2008).

A indução da tolerância oral é influenciada por vários fatores. Os antígenos solúveis timo-dependentes são capazes de induzir tolerância oral em condições dose-dependentes (Strobel and Mowat, 1998). A ingestão voluntária de doses diárias do antígeno em dias consecutivos, como ocorre em uma dieta normal, é mais eficaz na tolerização que a aplicação do antígeno por gavagem (intubação gástrica) e a tolerância oral induzida por ingestão contínua é mais persistente e difícil de ser quebrada (Faria and Weiner, 1999; Oliveira et al., 2015). A idade dos animais também influencia a indução de tolerância oral: é mais difícil induzir tolerância em animais neonatos ou senis, mas a indução de tolerância oral pode ser facilitada se estes animais recebem transferência de linfócitos de animais normais jovens-adultos. Isso indica que a indução de tolerância depende da imunocompetência do organismo (Faria and Weiner, 1999; Vaz et al., 1997). A microbiota intestinal, o background genético e a facilidade de absorção intestinal do antígeno são outros fatores que também afetam a tolerância oral (Faria and Weiner, 1999, 2005).

A tolerância oral pode prevenir doenças auto-imunes ou alérgicas e inibir a inflamação por alterar o recrutamento e/ou ativação de leucócitos e a produção de citocinas (Faria and Weiner, 2006; Hostmann et al., 2015; Rodrigues et al., 2006). Esse fenômeno também previne o desenvolvimento da dermatite atópica (Baek et al., 2016). O mesmo processo foi demonstrado experimentalmente também em humanos voluntários, mesmo quando estes entraram em contato com a proteína por via oral após terem sido sensibilizados (Hostmann et al., 2015).

### **1.5 - Mecanismos da tolerância oral**

Atualmente a tolerância oral é mais explicada pela ativação de células T regulatórias (Tregs). Alguns trabalhos mostram que as células Tregs suprimem a resposta imune através de citocinas imunossupressoras secretadas ou ligadas a superfície celular ou por meio de receptores inibidores (Faria and Weiner, 2005; Weiner, 2001).

Vários mecanismos são propostos para explicar a tolerância oral, tais com o aparecimento de linfócitos supressores/reguladores, deleção clonal de linfócitos ou anergia (Faria and Weiner, 2005; Strobel and Mowat, 1998).

A tolerância oral pode ser adotivamente transferida de camundongos tolerantes para camundongos naïve (Cunha et al., 2009; Richman et al., 1978) e isto fala a favor de sua manutenção por um processo ativo. Também, observações de que camundongos neonatos não susceptíveis a tolerância oral podem tornar-se susceptíveis se receberem adotivamente linfócitos singênicos de doadores adultos (Hanson and Morimoto, 1980), sugerem que a tolerância oral é um fenômeno que requer algum grau de organização sistêmica e não um fenômeno subtrativo (Vaz et al., 1997).

## 1.6 - 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 and Mowat, 1998). 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 injeção de 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 (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997; Miller et al., 1991). Esse fenômeno é conhecido como “bystander suppression” (Miller et al., 1991) ou efeito indireto da tolerância oral (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997).

Miller e colaboradores (1991) 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. Através de experimentos “in vitro” estes autores mostraram que o fenômeno de inibição da proliferação celular se dava pela produção da citocina TGF- $\beta$ . 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. (Carvalho and Vaz, 1996; Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997) mostraram que a inibição de respostas imunes às proteínas não especificamente relacionadas pela injeção do 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.

Os trabalhos de Carvalho e colaboradores (1994, 1996), mostraram que o fenômeno inibitório resultante da injeção de proteínas toleradas 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.

Os efeitos indiretos da tolerância oral interferem diretamente no processo inflamatório, como demonstrado por Rodrigues e colaboradores (2006) e Ramos e colaboradores (2009). Nestes trabalhos, a injeção de ovalbumina (OVA) em camundongos tolerantes a OVA inibe a peritonite desencadeada por OVA e outra proteína não especificamente relacionada. Além disso, os efeitos indiretos da injeção parenteral do antígeno tolerado bloqueiam a inflamação desencadeada pela injeção de carragenina na pata dos camundongos e inibem a produção de NAG e MOP (indicadores indiretos do influxo de células polimorfonucleares e mononucleares) (Ramos et al., 2009). Além disso, a injeção de OVA por via i.p. em camundongos tolerantes a OVA concomitante com a inoculação por via endovenosa de ovos de *Schistosoma mansoni* reduziu o tamanho dos granulomas (Azevedo et al., 2012; Carvalho et al., 2002).

Costa e colaboradores (2011), analisaram a repercussão dos efeitos anti-inflamatórios da injeção de proteínas toleradas no reparo de lesões incisionais na pele do dorso de camundongos tolerantes a OVA. Estes autores, observaram que nos animais tolerantes a OVA a injeção i.p de OVA+Al(OH)<sub>3</sub> concomitantemente com um corte da pele, diminuiu o número

de leucócitos no leito da ferida e promoveu melhor reparo da ferida. Houve redução do tecido de granulação e de miofibroblastos e organização das fibras de colágeno I e III de forma mais similar à da pele intacta.

Mais recentemente, foi demonstrado que os efeitos indiretos da injeção de OVA em camundongos tolerantes a OVA melhoraram também o reparo de feridas excisionais na pele (Costa et al., 2016).

### **1.7 - Utilização da zeína, uma das proteínas do milho**

Os estudos dos efeitos indiretos da tolerância oral na cicatrização cutânea foram feitos pela injeção i.p. de OVA com adjuvante  $Al(OH)_3$ . 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). A OVA não é uma proteína comum da dieta dos roedores e a indução de tolerância oral para OVA requer a introdução desta proteína, o que comumente é feito pela sua diluição na água. Por outro lado, a zeína é uma proteína comum na dieta de roedores.

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 and 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 and 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 %.

Animais que recebem proteínas do milho em sua dieta não sofrem reações anafiláticas quando imunizados com a zeína (Wells and Osborne, 1911). Além disso, 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 and Vaz, 1996).

## 1.8 - 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. (1926), mostraram que certas substâncias, como o hidróxido de alumínio ( $\text{Al(OH)}_3$ ), associado a um antígeno, potenciavam a produção de anticorpos. Desde então, substâncias com atividade adjuvante têm sido misturadas a antígenos protéicos para aumentar a sua imunogenicidade (Storni et al., 2005).

Os compostos de alumínio como hidróxido de alumínio ( $\text{Al(OH)}_3$ ) 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 (Ministério da Saúde, 2001 (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 da sua 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, 2005).

É possível que a ação do adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  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, 1988). Segundo Vaz e colaboradores (1981), 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.

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, 1988; Vaz et al., 1981).

VillarReal Ramos 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 junto 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 (Mosmann and Coffman, 1989).

## **1.9 - A pele**

A pele representa cerca de 16% de todo peso corporal humano, sendo fisiologicamente destacada pela proteção contra perda de água, contra lesões ou penetração de bactérias. Desempenha um papel importante também na regulação da temperatura corporal, na absorção dos raios ultravioleta do sol e consequente síntese de vitamina D, na excreção por meio de glândulas sudoríparas, bem como de percepção do ambiente ao qual está inserida (Gartner and L., 2007). É importante pensar que a pele também fornece nichos nos quais a microbiota e fungos podem viver (Brodell and K.S., 2008).

A pele é constituída pela epiderme, uma camada mais superficial de origem ectodérmica e composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que pode ser dividido em cinco camadas morfológicamente distintas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. Ao longo destas camadas são encontradas quatro populações distintas de células: os queratinócitos, presentes em todas as camadas, as células de Langerhans, presentes na camada espinhosa, os melanócitos e as células de Merkel, presentes na camada basal (Gartner and L., 2007; Junqueira and Carneiro, 2004; Mcgrath et al., 2008; Pagnano et al., 2009a).

Logo abaixo da epiderme, localiza-se a derme, uma camada de origem mesodérmica e composta por um tecido conjuntivo denso não modelado onde se encontram diferentes populações celulares, tais como fibroblastos, macrófagos e mastócitos, além de vasos sanguíneos e nervos. Em sua

interface com a epiderme, pode-se observar a formação de projeções denominadas cristas ou papilas, motivo pelo qual esta camada é chamada de derme papilar. Na derme papilar, encontra-se tecido conjuntivo frouxo constituído por delgadas fibras de colágeno I, colágeno III e fibras elásticas. Além disso, ligando a epiderme à derme encontram-se fibrilas de ancoragem, constituídas por colágeno do tipo VII. Mais profundamente, abaixo da derme papilar encontra-se a derme reticular formada por espessas fibras de colágeno I e fibras elásticas entrelaçadas, além de proteoglicanos, ricos em dermatan sulfato. Esta região da derme contém estruturas derivadas da epiderme, tais como glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas (Bensouilah et al., 2006; Brodell and K.S., 2008; Gartner and L., 2007; Junqueira and Carneiro, 2004; Mcgrath et al., 2008).

Abaixo da pele, encontra-se a hipoderme ou panículo adiposo, uma camada de tecido conjuntivo frouxo contendo quantidades variáveis de tecido adiposo. Em alguns animais, como camundongos e coelhos, abaixo da hipoderme é possível observar a presença de uma camada vestigial de músculo estriado, denominada panículo carnoso (Gartner and L., 2007; Junqueira and Carneiro, 2004; Mcgrath et al., 2008; Pagnano et al., 2009a).

### **1.10 - Reparo de lesões cutâneas**

Diante das importantes funções desempenhadas pela pele a ocorrência de uma lesão que resulte na ruptura de sua integridade física pode acarretar sérias consequências ao organismo. As lesões na pele decorrentes de acidentes ou cirurgias podem ser reparadas 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).

Em mamíferos, o reparo de pele, bem como de outros órgãos, é um processo fisiológico intrincado e bem orquestrado que envolve a secreção de diferentes fatores de crescimento, citocinas, entre outras substâncias (Pagnano et al., 2009a; Rolfe and Grobbelaar, 2012), bem como a

participação de variados tipos celulares durante uma coordenada e sobreposta cascata de eventos que podem ser separados em três estágios: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelamento (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008; Pagnano et al., 2009b; Schreml et al., 2010). Uma deficiência ou alteração em qualquer uma dessas fases terá consequências no tempo ou qualidade do reparo tecidual (Kinsey et al., 2003).

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 característico de deposição de colágeno e uma menor resistência tênsil quando comparada com a pele intacta (Dang et al., 2003).

Uma ferida pode cicatrizar de duas formas, que dependem da extensão de tecido lesionado 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, geralmente quando há perda mínima de tecido, ausência de infecção e pouco edema; neste caso as ações de miofibroblastos são minimizadas e o tecido de granulação é pouco extenso. Na 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. Na cicatrização por segunda intenção há uma grande quantidade de tecido de granulação devido à perda tecidual, o que geralmente leva a uma cicatriz de dimensões significativas (Orgill and Demling, 1988; Swaim, 1997).

### **1.11 - Reparo de lesões cutâneas e inflamação**

Existem muitas discussões sobre a importância da ocorrência de inflamação após lesões para o fechamento das mesmas. Uma reação inflamatória mínima tem sido correlacionada com a ausência ou diminuição de cicatrizes como acontece, por exemplo, após lesões em peles de fetos e também em adultos com alterações na atividade imunológica (Harty et al., 2003; Liechty et al., 2000).

Imediatamente após a ocorrência de uma ferida inicia-se uma série de eventos que inibem o sangramento e impedem a entrada de microorganismos e o extravasamento de plasma e líquido tissular (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006). Tais eventos englobam a vasoconstrição, ativação da cascata de coagulação, agregação e degranulação de plaquetas e resultam na formação do coágulo de fibrina, o qual, nestes momentos iniciais, atua como uma matriz provisória auxiliando a migração de células inflamatórias (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006; Satish and Kathju, 2010; Schreml et al., 2010; Schultz et al., 2011). Além de participarem ativamente da formação do coágulo de fibrina, as plaquetas são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e citocinas que atuam na atividade de fibroblastos e fornecem estímulos quimiotáticos para neutrófilos, outros fibroblastos e monócitos (Moulin et al., 1998). A ativação do sistema complemento e produtos da degradação bacteriana também atuam no recrutamento de neutrófilos para o local da ferida (Gurtner et al., 2008).

Inicialmente uma resposta inflamatória neutrofilica aguda liquefaz o tecido necrótico (Rubin, 2006) removendo fragmentos bacterianos ou corpos estranhos que se localizem no leito da ferida (Bielefeld et al., 2013). A fibronectina, proveniente do plasma extravasado, se liga a fibrina, a alguns componentes da matriz extracelular (MEC), tal como o colágeno e às membranas celulares facilitando a fagocitose. Além disso, a fibronectina, bem como os restos celulares e produtos bacterianos atuam como quimioatraentes para vários tipos celulares, dentre eles os monócitos (Rubin, 2006).

Durante a fase inflamatória, que ocorre de 2 a 3 dias após o surgimento da lesão, os macrófagos atuam como fagócitos englobando debris celulares, neutrófilos mortos, além de secretarem collagenases, fatores de crescimento e citocinas importantes para o recrutamento de fibroblastos, movimento de células epiteliais e angiogênese (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006; Satish and Kathju, 2010). A ação de neutrófilos ou macrófagos, caso seja muito intensa ou prolongada, pode resultar na formação de uma cicatriz indesejada, hipertrófica (Satish and Kathju, 2010). Por outro lado, a redução do número de macrófagos presentes na área da ferida durante os estágios iniciais do processo de reparo ocasiona uma redução na extensão da cicatriz formada (Lucas et al., 2010).

A diferenciação e a função dos macrófagos são reguladas por muitos fatores celulares e extrínsecos que incluem quimioquinas, citocinas, e ligantes dos receptores do tipo Toll (Gordon and Taylor, 2005). Muitas evidências indicam que os macrófagos podem ser divididos em dois fenótipos distintos: macrófagos ativados (macrófagos classicamente pró-inflamatórios M1) e os macrófagos alternativamente ativados (macrófagos M2 anti-inflamatórios) (Gordon, 2003). Estes macrófagos passam por mudanças dinâmicas durante as diferentes fases de cicatrização de feridas.

Nas fases iniciais da cicatrização de feridas, macrófagos M1-polarizados exercem atividades pró-inflamatórias e medeiam danos adicionais no tecido. Nos estágios mais avançados, os macrófagos M2-polarizados estão envolvidos na reparação de tecidos e regeneração (Lucas et al., 2010).

Os macrófagos ativados classicamente diferenciam em resposta às citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , e estímulos microbianos, incluindo LPS e CpG. A produção de mediadores pró-inflamatórios e compostos microbicidas, tais como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, é essencial para a eliminação de agentes patogênicos intracelulares, incluindo *Leishmania* e *Salmonella* (MacMicking et al., 1997).

Em contraste, a exposição às citocinas IL-4 e IL-13 promove a diferenciação de macrófagos do tipo M2 que são definidos pela expressão de um painel de genes incluindo arginase 1 (Arg-1), as moléculas de quitinase (Ym1 / 2 e AMCase), e a molécula de resistina (RELM- $\alpha$ ) (Gordon, 2003; Raes et al., 2002). Embora o recrutamento de M2 seja um aspecto característico de uma vasta gama de condições inflamatórias associadas com infecção por parasitas, alergias, diabetes e câncer, seus papéis para influenciar o desenvolvimento, gravidade ou resolução de respostas inflamatórias têm permanecido controverso (Anthony et al., 2006; Kim et al., 2008; Zhu et al., 2004). Por exemplo, várias funções benéficas para M2 têm sido propostas, que incluem a melhora de infecção por parasitas (Anthony et al., 2006; Herbert et al., 2004), a melhora da diabetes através da regulação da homeostase de nutrientes (Odegaard et al., 2007), e promoção de reparo tecidual após uma lesão (Gordon, 2003; Loke et al., 2007; Wynn, 2004).

Os macrófagos 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 and DiPietro, 2005). As citocinas liberadas por estas células: Fator de Crescimento Derivados de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 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 (Dantas, 2000; Riches, 1996; Werner and Grose, 2003).

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). Sob ação de fatores mitogênicos e quimiotáticos, as células endoteliais que circundam a lesão migram até esta para formar novos vasos sanguíneos. 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 subseqüentes (Lucas et al., 2010). Além disso, 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 (Branski et al., 2005; Mutsaers et al., 1997).

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 largamente distribuídos no organismo, e são proeminentes perto de superfícies expostas ao meio ambiente, incluindo a pele. Assim, os mastócitos são uma das primeiras células a responder perante lesões e estimulam uma resposta imune através da liberação de mediadores biológicos pré-formados. Em resposta a ferimentos, mastócitos desgranulam e o conteúdo dos grânulos estimulam a ativação e proliferação de células endoteliais dentro do tecido (Artuc et al., 1999; Persinger et al., 1983; Steinhoff et al., 1999).

Adicionalmente, estas células, secretam diversos mediadores químicos como a histamina, heparina, leucotrienos (da Silva et al., 2014). A histamina liberada aumenta a permeabilidade capilar e promove vasodilatação. Na fase inicial do reparo tecidual, 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 lesionado e sua revascularização inicial através da produção e liberação de uma série de fatores, incluindo TNF $\alpha$ , 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 (Iba et al., 2004; Yamamoto et al., 2000).

Wulff e colaboradores (2012), demonstraram que feridas de embriões de camundongos que se encontram em estágio do desenvolvimento no qual não há formação de cicatriz apresentam um menor número de mastócitos, quando comparados a feridas de embriões que reparam com a formação de cicatriz, por volta do 18º dia do desenvolvimento. Além disso, a extensão da cicatriz formada em fetos de camundongos Kit W/W-v, deficientes em mastócitos, é significativamente menor quando comparados a fetos do tipo selvagens, Kit +/+. Portanto, o número de mastócitos na área lesionada pode influenciar o decorrer do reparo tecidual.

### **1.12 - Reparo de lesões cutâneas e formação do tecido de granulação**

Por volta do segundo dia após o surgimento da ferida, inicia-se a fase proliferativa que é caracterizada pela re-epitelização da epiderme e reconstituição da derme juntamente com a angiogênese. Os novos brotos de capilares associados com fibroblastos e macrófagos dão origem ao tecido de granulação, que atua como um substrato para a migração dos queratinócitos, os quais proliferam, diferenciam e recompõem a barreira funcional do epitélio (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008).

Os fibroblastos recrutados para o leito da ferida proliferam e secretam proteínas (Bielefeld et al., 2013). O coágulo de fibrina começa então a ser destruído por ação das metaloproteinases e da fagocitose. À medida que a fibrina vai sendo removida, ocorre a deposição de uma matriz temporária formada por variantes imaturas ou embrionárias da MEC, tais como a fibronectina e colágeno do tipo III, além de proteoglicanos e colágeno do tipo I (Bielefeld et al., 2013; Clark, 1990; French-Constant et al., 1989; Rubin, 2006).

Alguns fibroblastos aumentam os níveis de expressão de moléculas de adesão e diferenciam-se em miofibroblastos, células contráteis com altos níveis de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), contribuem para a aproximação das bordas da ferida e, juntamente com os fibroblastos, atuam na síntese e alinhamento das fibras de colágeno (Gurtner et al., 2008; Hinz, 2007; Satish and Kathju, 2010).

Na reepitelização, há proliferação e migração de queratinócitos das margens da ferida, sendo os fatores de crescimento PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$ , 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 $\beta$ , no controle da proliferação dos queratinócitos desta fase (Hatanaka and Curi, 2007).

### **1.13 - Reparo de lesões cutâneas e linfócitos T**

O papel dos subtipos de células T durante o reparo ainda é incerto. Células Th1 caracterizam-se pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\beta$ , enquanto que as células Th2 liberam interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13. É provável que células Th1 e Th2 regulem diferencialmente o microambiente da ferida através da secreção de citocinas diferentes (Azouz et al., 2004; Park and Barbul, 2004).

Os perfis de expressão de citocinas por linfócitos T têm sido associados com diversos estados de ativação de macrófagos e processos de remodelamento de tecido. As células T também podem influenciar a cicatrização por interações diretas célula-célula com células residentes ou não no local da ferida como, por exemplo, a ligação da glicoproteína CD40L expressa nas células T pode interagir com CD40 expressa em queratinócitos, fibroblastos, plaquetas e macrófagos, e assim alterar o seu perfil de expressão de mediadores inflamatórios, e conseqüentemente, funções de reparo tecidual (Eming et al., 2009; Kaufman et al., 2001; Park and Barbul, 2004).

Vários estudos sugerem que a infiltração de células T no local da ferida está associada com prejuízos à cicatrização de feridas, enquanto outros relatam que células CD4<sup>+</sup> (células T auxiliares) têm um papel positivo na cicatrização de feridas e as células CD8<sup>+</sup> (células T supressoras citotóxicas) desempenham um papel inibitório na cicatrização de feridas (Park and Barbul, 2004).

Na pele, as células T  $\gamma\delta$ , também chamadas células T epidérmicas dendríticas (DETC), que são restritas à epiderme, são importantes na manutenção da integridade do tecido e estão ativadas na cicatrização de feridas. As DETC são consideradas fontes importantes de fatores de crescimento que resultam na proliferação e diferenciação de queratinócitos (Eming et al., 2007; Jameson et al., 2002; Sharp et al., 2005).

#### **1.14 - Reparo de lesões cutâneas – fase de remodelamento**

Por volta de duas a três semanas após a ferida inicia-se a fase de remodelamento, que pode durar indefinidamente sem que a região ferida alcance a força da pele intacta, não lesionada (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008; Pagnano et al., 2009b). Neste período, os processos ativados logo após a lesão começam a cessar. A maioria das células encontradas no leito da ferida sofre apoptose (Desmouliere et al., 1995) e esta região passa a se constituir principalmente por colágeno e outras proteínas de matriz. Na verdade, a reorganização desta matriz envolve a degradação e substituição da MEC imatura, rica em fibronectina e colágeno tipo III, por colágeno tipo I, cujas fibras apresentam uma organização em bandas (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008). Juntos, estes eventos são responsáveis pelo aumento da força de tensão, diminuição do tamanho da cicatriz e redução dos sinais inflamatórios resultando na formação de um tecido cicatricial acelular que é bem diferente da pele intacta (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008; Pagnano et al., 2009b; Satish and Kathju, 2010).

### **1.15 - Diferenças no reparo de lesões cutâneas em fetos e adultos (mamíferos)**

Usualmente em humanos adultos, o reparo resulta na formação de uma cicatriz que frequentemente se torna contraída e menos resistente à tensão. Este novo tecido é, em sua maioria, formado por fibroblastos que depositam uma MEC desorganizada e rica em colágeno. Em alguns casos, a partir de uma hiperproliferação de fibroblastos, há uma deposição excessiva de colágeno que pode resultar na formação de cicatrizes hipertróficas ou quelóides. Embora ambos apresentem-se elevados, a cicatriz hipertrófica se restringe às margens da lesão inicial, enquanto os quelóides apresentam margens que ultrapassam a lesão inicial (Gauglitz et al., 2011). 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 (Bielefeld et al., 2013; Ferguson and O'Kane, 2004; Gurtner et al., 2008; Whitby and Ferguson, 1991a).

Diferenças na pele de fetos e adultos estão relacionadas com o perfil e concentração de fatores de crescimento celular; a composição de matriz extracelular; o estado de diferenciação de células como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias (Ferguson et al., 1996; Whitby et al., 1991). Os fetos possuem baixas taxas de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, PDGF e altos níveis de TGF $\beta$ 3. É interessante notar que, a manipulação de feridas de adultos pela adição de TGF $\beta$ 3 ou neutralização de PDGF, TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 resulta em fechamento sem cicatriz (Ferguson and O'Kane, 2004; Gawronska-Kozak, 2004).

Os fetos 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, 1991b). Outro componente da matriz em maior quantidade na pele de fetos é o ácido hialurônico numa forma altamente hidratada que permite a resistência à deformação e facilita o movimento celular (Clark, 1996; Toole, 1997) e também estimula a síntese de colágeno

por fibroblastos in vitro (Mast et al., 1993; Mast et al., 1991).

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 (Harty et al., 2003; Liechty et al., 2000).

Uma das hipóteses para explicar como o resultado final do processo de reparo é determinado de form distinta durante a ontogênese envolve o sistema imune, uma vez que nos fetos o sistema imune ainda encontra-se imaturo (Bielefeld et al., 2013; Galkowska et al., 2006; Gurtner et al., 2008) e durante o reparo de feridas fetais os leucócitos encontram-se reduzidos e menos ativados (Cowin et al., 1998; Hopkinson-Woolley et al., 1994; Wulff et al., 2012).

### **1.16 - Diabetes e lesões cutâneas**

*Diabetes mellitus* (DM) envolve alterações metabólicas com ampla repercussão no organismo inteiro cujos mecanismos ainda estão longe de ser compreendidos (Peppia et al., 2009). A alta incidência de lesões cutâneas crônicas contribui para a alta morbidade dos pacientes diabéticos. Todas as fases do processo de reparo de lesões de pele podem estar alteradas nos diabéticos. O paciente diabético apresenta alteração da inflamação (Brem and Tomic-Canic, 2007), falha na contração da ferida (Sivan-Loukianova et al., 2003), falha na epitelização (Greenhalgh, 2003), falha na produção e interligação do colágeno (Komesu et al., 2004) e na neovascularização (Kirchner et al., 2003).

No início do processo de reparo em diabéticos, há um retardo na formação do coágulo de fibrina provavelmente relacionada com a não ativação dos queratinócitos e plaquetas, alteração na produção de citocinas e quimiocinas com consequente alteração da ativação e migração dos demais elementos celulares importantes na fase inicial do reparo. Observa-se comumente uma resposta inflamatória prolongada que terá repercussões no decorrer do processo. Avaliações histopatológicas mostram diminuição na re-epitelização, angiogênese e na formação do tecido de granulação. O retardo na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos resulta numa diminuição na contração da lesão e no remodelamento da matriz extracelular e consequentemente falha no fechamento da lesão (Peppia et al., 2009).

A diabetes não controlada diminui a síntese de colágeno, a fagocitose e aumenta o risco de infecção. Outro fator importante da doença é a neuropatia diabética, aumentando a suscetibilidade de lesão em membro inferior e perda da sensibilidade. A diabetes também pode causar aterosclerose, resultando em insuficiência circulatória (Holst and Deacon, 2007).

Alguns estudos feitos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estimam que até 2030, o número de pacientes diabéticos será de aproximadamente 366 milhões (Brem and Tomic-Canic, 2007; Wu and Huan, 2007). No Brasil, a prevalência de DM em pacientes entre 30 e 69 anos é de 7,6%, valores esses próximos da prevalência mundial que é cerca de 8%. O Sistema Único de Saúde do Brasil aponta que o DM é a quinta maior causa de internações e uma das maiores causas de mortalidade no país (SBD., 2016).

Portanto, é de suma importância a busca de métodos terapêuticos que possam solucionar ou minimizar as falhas no processo de cicatrização associadas ao diabetes (Almeida et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Meireles et al., 2009).

### 1.17 - Modelos de estudo de lesões em camundongos diabéticos

O diabetes é definido como uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante do déficit de produção de insulina pancreática e/ou da presença de fatores que se oponham à ação desse hormônio. Considerando-se as características etiológicas do DM e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em quatro tipos: a) Diabetes mellitus tipo 1; b) Diabetes mellitus tipo 2; c) outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes secundário ou associado a outras patologias; e d) diabetes mellitus gestacional (Wasserfall and Atkinson, 2006).

O *Diabetes Mellitus* tipo 1 é o tipo mais agressivo, causa emagrecimento rápido, ocorre na infância e adolescência e correlaciona-se com a destruição das células  $\beta$  das Ilhotas de Langerhans associada a insulite e infiltração de linfócitos T no pâncreas. Anticorpos contra as células  $\beta$  pancreáticas, contra insulina e contra as enzimas glutâmico-descarboxilase e tirosina-fosfatase também se encontram associados à diabetes tipo 1. O indivíduo acometido por diabetes tipo 1 não tem produção de insulina, a glicose não entra nas células e o nível de glicose no sangue fica aumentado (Smeltzer and Bare, 2002).

O DM tipo 1 pode ser induzido experimentalmente em camundongos por meio de drogas diabetogênicas tais como estreptozotocina (Al-Watban and Andres, 2006), aloxana (Dall Agnol et al., 2009), dentre outras (Zimmet et al., 2003). Os estudos de cicatrização em camundongos diabéticos apoiam as evidências de disfunção dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, associados com uma fase inflamatória prolongada, decréscimo na biossíntese de colágeno e glicosaminoglicanas e retardo da formação do tecido de granulação como fatores primordiais das falhas de cicatrização (Almeida et al., 2002). As falhas mais importantes do reparo ocorrem em estágios iniciais de cicatrização, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno.

Por outro lado, os camundongos NOD desenvolvem espontaneamente a DM tipo 1 e representam outro modelo experimental para estudo de cicatrização em diabéticos (Makino et al., 1980). A linhagem de camundongos NOD foi desenvolvida no Japão, após o cruzamento de sublinhagem CTS (propensa à catarata) com uma linhagem não consanguínea. O primeiro relato de diabetes tipo 1 espontâneo foi observado em apenas um camundongo fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no Laboratório SHIONOGI ABURAH. O desenvolvimento da DM tipo I no camundongo NOD é precedida pela insulite que pode ser considerada como estado de pré-diabetes. A insulite é primeiramente notada em camundongos com 3-4 semanas de idade e potencialmente todas as fêmeas NOD com 3 meses de idade apresentam insulite (Fujita et al., 1982). As mudanças que ocorrem no modelo NOD também acontecem no homem como a peri-insulite que progride para a infiltração das ilhotas e destruição das células beta pancreáticas (Gepts and In't Veld, 1987).

## 2 - Justificativa

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica complexa que predispõe a várias complicações como, por exemplo, aquelas relacionadas a ocorrências de úlceras crônicas na pele. O alto índice de ocorrência de lesões que não cicatrizam em pacientes diabéticos contribui para o aumento da morbidade destes pacientes. Em 2014, estimou-se que existiriam 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, com diabetes no Brasil, podendo alcançar 19,2 milhões em 2035. Com relação à ocorrência de feridas crônicas associadas à diabetes no Brasil, extrapolando os dados encontrados na Inglaterra, estima-se que cerca de 570 mil brasileiros apresentem novas feridas crônicas a cada ano. O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM (Sociedade Brasileira de Diabetes, SBD, 2016).

A capacidade diminuída para cicatrização de feridas em pacientes com diabetes associada à ulceração e infecções recorrentes contribui para a diminuição da produtividade no local de trabalho, aumento das taxas de hospitalização e aumento dos custos de cuidados da saúde. Os mecanismos envolvidos nas alterações cutâneas relacionadas ao diabetes ainda não estão bem esclarecidos embora os estudos mostrem que alterações vasculares e neurogênicas estão correlacionadas com a dificuldade de fechamento de lesões (Peppia et al., 2009).

Uma injeção intraperitoneal de 10 µg de ovalbumina em camundongos tolerantes a esta proteína, minutos antes de uma lesão na pele, inibi a inflamação, reduzindo a cicatriz sem retardar o processo de fechamento da lesão (Costa et al., 2016; Costa et al., 2011). Isto mostra que é possível modificar o processo inflamatório e o fechamento de lesões por meio de imunizações com pequenas doses de uma proteína previamente dada por via oral. A tolerância oral ocorre também com proteínas normalmente presentes na dieta e animais que recebem proteínas do milho em sua dieta não sofrem

reações anafiláticas quando imunizados com a zeína (Wells and Osborne, 1911). Os efeitos indiretos da tolerância oral, produzidos pela injeção parenteral de proteínas toleradas, também ocorrem com os componentes comuns da dieta e a injeção i.p. de zeína minutos antes de uma lesão cutânea em camundongos C57BL/6 não diabéticos diminuiu a formação de cicatrizes (Cantaruti, 2012).

Neste trabalho foram estudados os efeitos indiretos da tolerância oral, produzidos por meio de injeção i.p. de zeína, sobre o processo de reparo de lesões cutâneas em camundongos diabéticos. Além disso, investigamos se estes efeitos indiretos da tolerância oral a zeína poderiam ocorrer quando a proteína tolerada fosse injetada após a lesão cutânea, visando a aplicação terapêutica.

## **3 – Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar se os efeitos indiretos da tolerância oral, desencadeados pela injeção intraperitoneal de Zeína, melhoram o reparo de lesões na pele de camundongos saudáveis e com diabetes do tipo 1, avaliando a possibilidade de interferir na cicatrização de lesões de forma preventiva ou como tratamento.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar se a injeção i.p. de zeína minutos antes ou horas após uma lesão na pele de camundongos saudáveis ou com diabetes do tipo I, altera:

- A cinética de fechamento da lesão.
- A área da cicatriz.
- Os tipos de leucócitos e fibrobrastos na área da lesão.
- Os tipos de citocinas na área da lesão.

## **4 - Materias e Métodos**

### **4.1 - Animais**

Camundongos C57BL/6 machos com 3 semanas de idade foram obtidos do Biotério CEBIO da UFMG. Os animais permaneceram no biotério de animais experimentais do Departamento de Morfologia alojados em um ambiente com ar refrigerado para temperatura máxima de 25°C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os camundongos C57BL/6 foram alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*. A lesão foi feita em camundongos C57BL/6 com 8 semanas de idade.

Camundongos NOD fêmeas foram fornecidos pela Profa. Ana Maria Caetano de Faria da UFMG e mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia. Para assegurar a incidência de diabetes, visto que apenas cerca de 70% dos camundongos NOD fêmeas desenvolvem a doença espontaneamente, os animais foram mantidos em microisoladores esterilizados dispostos em estantes ventiladas com controle do fluxo de ar. Essa condição é essencial para o acometimento pela doença nos NOD. Os camundongos NOD foram alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*, ambas autoclavadas. A lesão foi feita em camundongos NOD com 18 a 19 semanas de idade.

Experimentos aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolos 148/2011 e 129/2016).

### **4.2 - 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.

### **4.3 - Modelo de diabetes auto-imune induzido por estreptozotocina (STZ)**

Para indução de diabetes, camundongos C57BL/6 com 3 semanas de idade foram submetidos a jejum de 8 horas antes da administração i.p. de

120 mg/kg de estreptozotocina - STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio a 0,05 M gelado (pH 4,0–4,5) e usada dentro de 15 minutos. Se uma semana após a primeira injeção de STZ, a taxa de glicose não atingisse 250 mg/dl os camundongos recebiam outra injeção de STZ na mesma concentração da primeira dose.

#### 4.4 - Monitoramento da glicemia

A verificação do nível sérico de glicose nos camundongos C57Bl/6 tratados com STZ e camundongos da linhagem NOD foi feita semanalmente pela tarde após jejum de 8 horas. Uma gota de sangue foi obtida através de uma pequena incisão na ponta da cauda com um bisturi-lanceta. A aferição foi feita por meio de fitas reagentes para mensuração de glicemia, acopladas ao glicosímetro (medidor Accu-Check Advantage®, Figura 1). Os animais foram considerados diabéticos após confirmação de hiperglicemia por, pelo menos, três semanas consecutivas, com valores de glicemia superiores a 250 mg/dL. Segundo as informações do fabricante, o aparelho não quantifica glicemias maiores que 600 mg/dL, sendo esses valores registrados como “HI” e nestes casos os animais foram também incluídos no grupo diabético. Para realização de cálculos estatísticos, representamos esses valores de glicemia em 601 mg/dl.



Figura 1 - Monitor Accu-Chek Advantage - Medidor de Glicemia

#### **4.5 - Injeção intraperitoneal de Zeína em adjuvante**

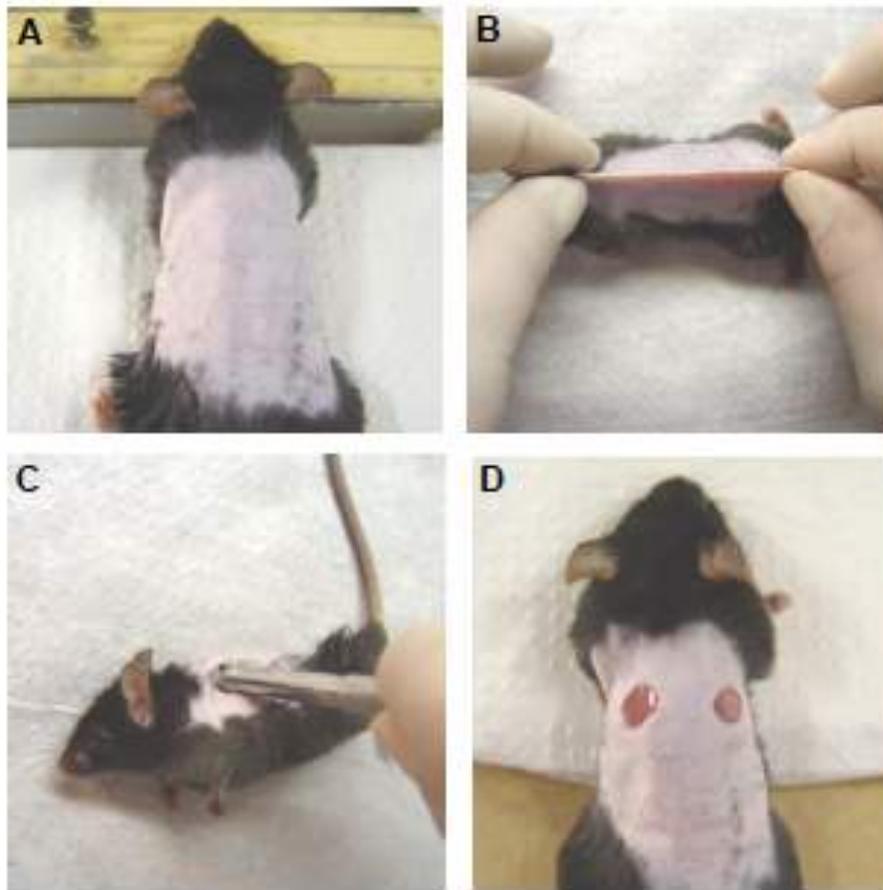
Para indução dos efeitos indiretos da tolerância oral, cada camundongo recebeu uma injeção *i.p.* de 10 µg de zeína e 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub>. No dia da injeção, a zeína purificada obtida da Sigma (Sigma Aldrich St. Louis, MO) foi dissolvida em 700 µL de álcool absoluto + 300 µL de água destilada para se obter uma concentração de 5 mg/mL. Desta solução inicial de zeína, preparou-se uma solução final contendo 50 µg de zeína, 8 mg de Al(OH)<sub>3</sub> num volume final de 1 mL de salina fisiológica e cada camundongo recebeu uma injeção de 0,2 mL da solução final. Utilizou-se o adjuvante hidróxido de alumínio - Al(OH)<sub>3</sub> (Medicamento Genérico, São Paulo, Brasil). Os grupos controle receberam injeção de salina ou adjuvante.

#### **4.6 - Realização de lesão excisional na pele**

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 em salina fisiológica. Após a anestesia, foi feita a tricotomia na região dorsal dos camundongos, a limpeza da pele com álcool 70% e realizada a ferida com o auxílio de um *punch* dermatológico de 6,5mm de diâmetro (Figura 2).

#### **4.7 - Período pós-operatório**

Logo após realização das lesões na pele, enquanto estavam sob o efeito da anestesia, os animais tiveram os olhos cobertos com algodão embebido em salina 0,9% para evitar que os mesmos pudessem sofrer um ressecamento, que poderia resultar em cegueira. Neste período, os animais foram acondicionados no interior de uma estufa, mantida com a porta semi-aberta, com a temperatura de 37°C, até que apresentassem mobilidade suficiente para serem acondicionados individualmente em suas gaiolas.



**Figura 2 – Esquema de realização da ferida excisional na pele do dorso de camundongos.** Em 2A o animal encontra-se em decúbito ventral, anestesiado, com o pêlo da região dorsal raspado (tricotomia). Em seguida a pele da região dorsal é alinhada com o plano mediano do corpo do animal, Figura 2B. Posteriormente, em decúbito lateral, Figura 2C, com o auxílio de um *punch* dermatológico de 6,5 mm de diâmetro, são realizadas 2 lesões excisionais na pele do dorso, Figura 2D. Com este procedimento são retiradas a epiderme, derme, hipoderme e panículo carnoso.

#### **4.8 - Organização e denominação dos grupos experimentais**

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos de 5 a 8 indivíduos, dependendo da linhagem, conforme indicado na legenda das figuras. Após a realização da lesão, os camundongos foram acomodados individualmente em gaiolas para evitar interferências de um animal na ferida de outro.

Conforme a Tabela 1, os animais da linhagem C57BL/6 foram divididos nos grupos: O grupo denominado **Salina**, onde os animais não receberam streptozotocina e receberam uma injeção de salina via *i.p.*, pouco antes da lesão. O grupo denominado **Adjuvante**, onde os animais não receberam streptozotocina e receberam 1,6 µg de Al(OH)<sub>3</sub> por via *i.p.*, momentos antes da lesão. O grupo denominado **Zeína**, onde os animais não receberam streptozotocina e receberam 10 µg de zeína + 1,6 µg de Al(OH)<sub>3</sub> por via *i.p.*, momentos antes da lesão. O grupo denominado **Diabético Salina**, recebeu uma injeção de via *i.p.* momentos antes da lesão. O grupo chamado **Diabético Zeína**, recebeu 10 µg de Zeína + 1,6 µg de Al (OH)<sub>3</sub> por via *i.p.* momentos antes da lesão. O grupo chamado **Diabético Zeína 6 horas**, recebeu uma injeção de 10 µg de Zeína + 1,6 µg de Al (OH)<sub>3</sub>, 6 horas após a lesão. O n de cada grupo experimental foi de 6 animais.

**Influência da proteína tolerada no reparo de feridas de camundongos:**

C57/BL6 Grupos:			Indução Diabetes Experimental 3 semanas 	Lesão/Imunização:  	Coletas:
Salina/Lesão n=7			Salina via i.p.	Salina via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Adjuvante n=7			Salina via i.p.	Al(OH) <sub>3</sub> via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Zeína n=7			Salina via i.p.	Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético n=7			Estreptozotocina via i.p. 120 mg/kg	Salina via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína n=7			Estreptozotocina via i.p. 120 mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína 6hs n=7			Estreptozotocina via i.p. 120 mg/kg	Lesão Ex.+ Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína via i.p 6hs pós lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional

**Tabela 1 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele em camundongos da linhagem C57BL/6.**

Conforme Tabela 2, os animais da linhagem NOD foram divididos nos grupos: o grupo denominado **NOD diabético Salina**, onde os animais com glicemia maior que 250 mg/dl receberam uma injeção de salina via *i.p.* momentos antes da lesão. O grupo denominado **NOD Diabético Zeína**, onde os animais com glicemia maior que 250 mg/dl, receberam uma injeção i.p. de 10 µg de Zeína + 1,6 µg de Al (OH)<sub>3</sub>, momentos antes da lesão excisional. O

grupo chamado **NOD Diabético Zeína 6 horas**, onde os animais com glicemia maior que 250 mg/dl, receberam uma injeção i.p. de 10 µg de Zeína + 1,6 µg de Al (OH)<sub>3</sub>, 6 horas após a lesão.

#### Influência da proteína tolerada no reparo de feridas de camundongos

Grupos:

NOD	Tratamento:	Lesão/Imunização:	Coletas
 NOD Diabético Salina n=8		 Salina via i.p. + lesão	Dias
NOD D. Zeína n=8		Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína via i.p. + lesão	7
NOD D. Zeína 6 horas n=8		Lesão + Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. 6 horas depois	

Tabela 2 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele em camundongos NOD.

#### 4.9 - Coleta da região lesionada e processamento histológico

Os animais foram mantidos individualmente por 7 ou 40 dias com água e ração comercial NUVILAB *ad libitum* até o momento da eutanásia para coleta da pele com a região lesionada.

Nos dias 7 ou 40 após a realização das feridas, os animais foram anestesiados, a região contendo a lesão foi fotografada e coletada para análise histopatológica. Em todos os experimentos, as feridas do lado esquerdo dos animais foram colocadas em papel filtro, fixadas em Formalina de Carson em Tampão Milloning (pH 7.0) por 24h e em seguida transferidas para um recipiente contendo álcool 70%. As feridas do lado direito dos animais foram colocadas em papel filtro, fixadas em DMSO 20% + Metanol 80% à -80°C e criosubstituídas por seis dias.

Após a fixação cada ferida foi cortada ao meio, perpendicularmente ao plano crânio-posterior do animal, como mostram a Figuras 3 e 4.

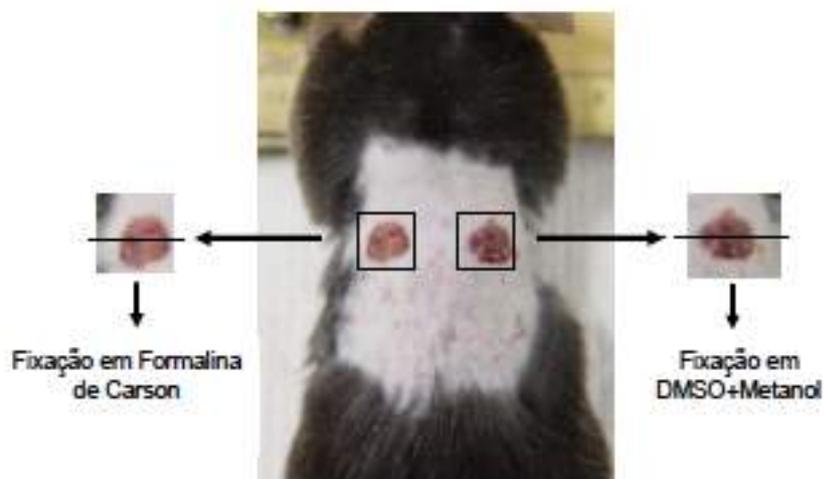


Figura 3 - Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas sete dias após sua realização.

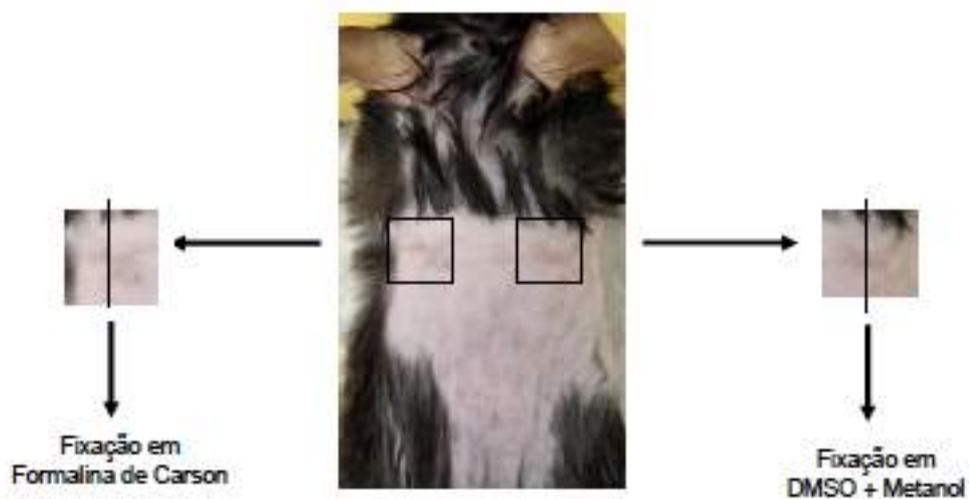


Figura 4 - Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas 40 dias após sua realização.

Para realização de análise histológica, uma das metades da cada ferida fixada em Formalina de Carson foi submetida aos seguintes procedimentos:

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

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

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

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

Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Esses cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Tricromático de Gomori ou Azul de Toluidina para avaliação histopatológica.

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

Posteriormente foram submetidos às seguintes etapas:

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

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

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

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

Posteriormente à inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Na sequência, os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência para análise dos anticorpos propostos, conforme Tabela 3.

#### 4.10 - Técnica de imunofluorescência indireta

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

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

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

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

**4ª) Incubação:** anticorpo primário: a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo os anticorpos primários (Tabela 3) diluídos em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionada e os mesmos acondicionados a 4°C overnight.

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

**6ª) Incubação:** anticorpo secundário: a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo os anticorpos secundários (Tabela 3) diluídos em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionada e permaneceu sobre os mesmos por 60 minutos.

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

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

Anticorpos	Especificação	Diluição	Fonte
Primários	Policlonal, mouse anti $\alpha$ -SMA	1:100	Sigma - Aldrich
	APC rat anti-CD45	1:50	BD Biosciences
	AlexaFluor®647 anti-mouse F4/80	1:50	Invitrogen Carlsbad
	Rabbit anti-RELM-alpha	1:30	Abcam
	Rabbit anti - TGF $\beta$ 3 polyclonal IgG	1:25	Santa Cruz, INC.
Secundários	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:100	Thermo Fisher Scientific Inc.
	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:100	Thermo Fisher Scientific Inc.
	DAPI	1:300	Thermo Fisher Scientific Inc.

**Tabela 3 - Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta**

Uma lâmina de um corte de pele de grupo controle, no qual não foi utilizado nenhum anticorpo, primário ou secundário, permitiu verificar se o tecido, por si só, possuía autofluorescência. Outra lâmina contendo um corte de pele do grupo controle no qual foi utilizado somente o anticorpo secundário, permitiu verificar se o mesmo era capaz de se ligar a outra molécula, que não o anticorpo primário.

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

Através da coloração de H&E, foi possível realizar uma descrição qualitativa do reparo de pele, bem como quantificar o infiltrado de leucócitos e fibroblastos presentes nas lesões e a verificação da presença ou não de estruturas como glândulas sebáceas, folículo piloso, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo, infiltrado inflamatório e tecido de granulação. A coloração de Azul de Toluidina permitiu a quantificação de mastócitos presentes na área estudada. O Tricromático de Gomori possibilitou a visualização do tecido conjuntivo e uma análise qualitativa da disposição das fibras colágenas depositadas na área de reparo da lesão.

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal Zeiss 510 Meta do Centro de Aquisição e Processamento de Imagem do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A partir da técnica de imunofluorescência indireta, foi possível analisar a disposição bem como quantificar os leucócitos, miofibroblastos e TGF beta

na área da lesão. Para estas análises foram determinadas as diluições ideais dos anticorpos primários e secundário, que são apresentadas na Tabela 3.

#### **4.12 - Aquisição de imagens**

As imagens dos cortes submetidos às colorações de HE, Azul de Toluidina ou Tricromático de Gomori foram analisadas com uma câmera Olympus Q Colour 3 acoplada ao microscópio Olympus BX50 conectadas ao computador através do programa Q-Capture Pro (QImaging, Canadá). Para montagem das figuras algumas imagens foram adquiridas utilizando um SKANNER Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). As imagens dos cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram adquiridos com a utilização do microscópio confocal Zeiss 510 Meta.

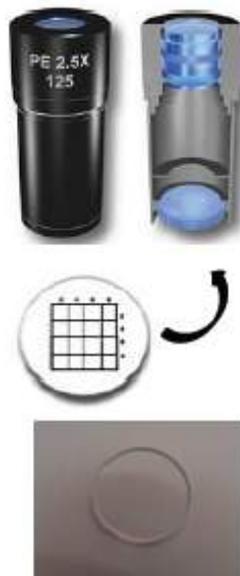
#### **4.13 - Medida da área, em vista macroscópica, da ferida excisional**

Fotografias das lesões foram feitas em animais anestesiados logo após a realização das lesões nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 40, conforme indicado nas figuras. Para isso os animais foram anestesiados e posicionados ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram feitas com máquina digital Sony DSC-F717, mantida todo tempo a uma distância constante da região fotografada, por intermédio de um tripé, sendo as imagens posteriormente analisadas com o programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA), através do qual a área da lesão foi determinada em mm<sup>2</sup>.

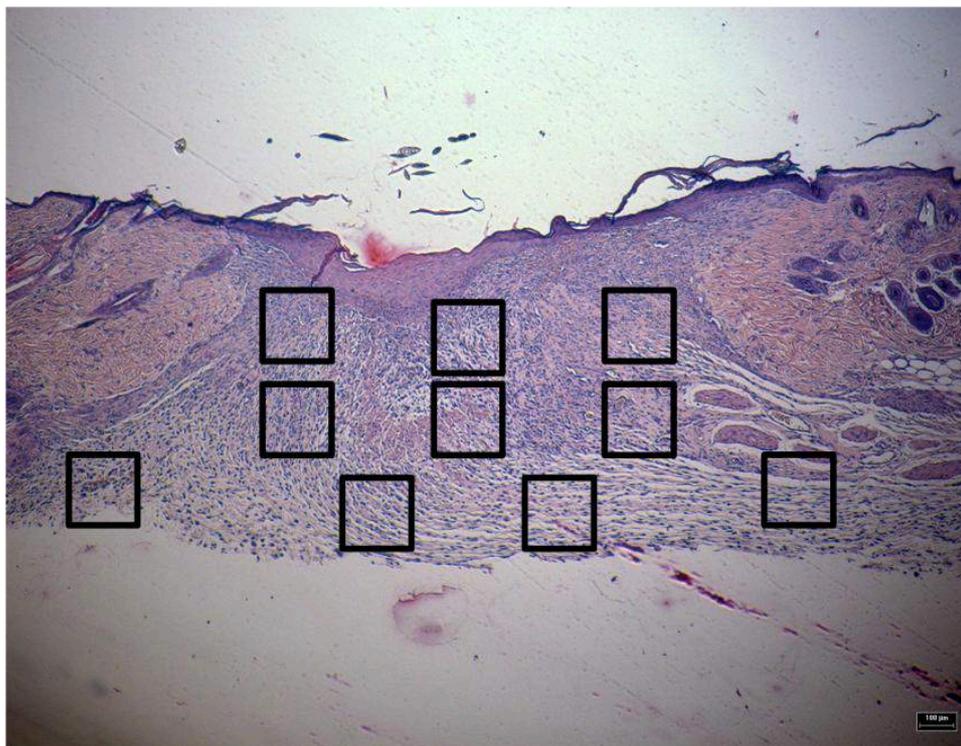
#### **4.14 - Análise morfométrica em microscopia de luz**

O número de leucócitos, mastócitos, fibroblastos, novos vasos e capilares foram determinados na área lesionada 7 dias após realização da ferida. Para isso, foi utilizada a objetiva de 100x e contadas dez áreas de 100 μm<sup>2</sup> cada dentro da região lesionada, com auxílio de um retículo acoplado à ocular do microscópio (Figura 5). As áreas analisadas foram determinadas seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido,

com espaçamento de 100 a 300  $\mu\text{m}$  entre duas regiões analisadas a depender da característica da região de reparo, mantendo cinco áreas logo abaixo da epiderme lesionada e cinco em uma região mais inferior, como ilustrado na figura 6.



**Figura 5 – Retículo utilizado para análises morfométricas. O retículo apresenta uma área de 100  $\mu\text{m}^2$  e é acoplado à ocular do microscópio.**



**Figura 6 - Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo Excisional.**

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

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal (Zeiss 510META; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Foram capturadas de 3 a 5 imagens em diferentes áreas da região de cicatriz. A escolha das áreas foi feita seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido. A intensidade de fluorescência foi analisada com auxílio do programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA) e do programa Zeiss LSM ImageExaminer.

A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade “Nível de Cinza”, que varia do valor zero (preto) ao valor 255 (branco). Quanto mais próximo ao valor 255, maior a intensidade fluorescência. Para a análise quantitativa todos os parâmetros de configuração do microscópio obtidos no início da aquisição dos dados foram mantidos para cada anticorpo usado

para as amostras de todos os grupos experimentais e controle do anticorpo secundário, tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e possível de comparação.

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

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graphpad Prism5 (GraphPad Software, CA, USA). Uma vez que os dados apresentaram uma distribuição normal (paramétricos), a significância das diferenças entre os grupos foi determinada através de análise de variância utilizando os testes One-way ANOVA, para análises de três grupos ou Teste T de Student não pareado para análise de dois grupos. Foi aplicado o pós-teste Newman-Keuls. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM.

## 5 – Resultados – Parte I

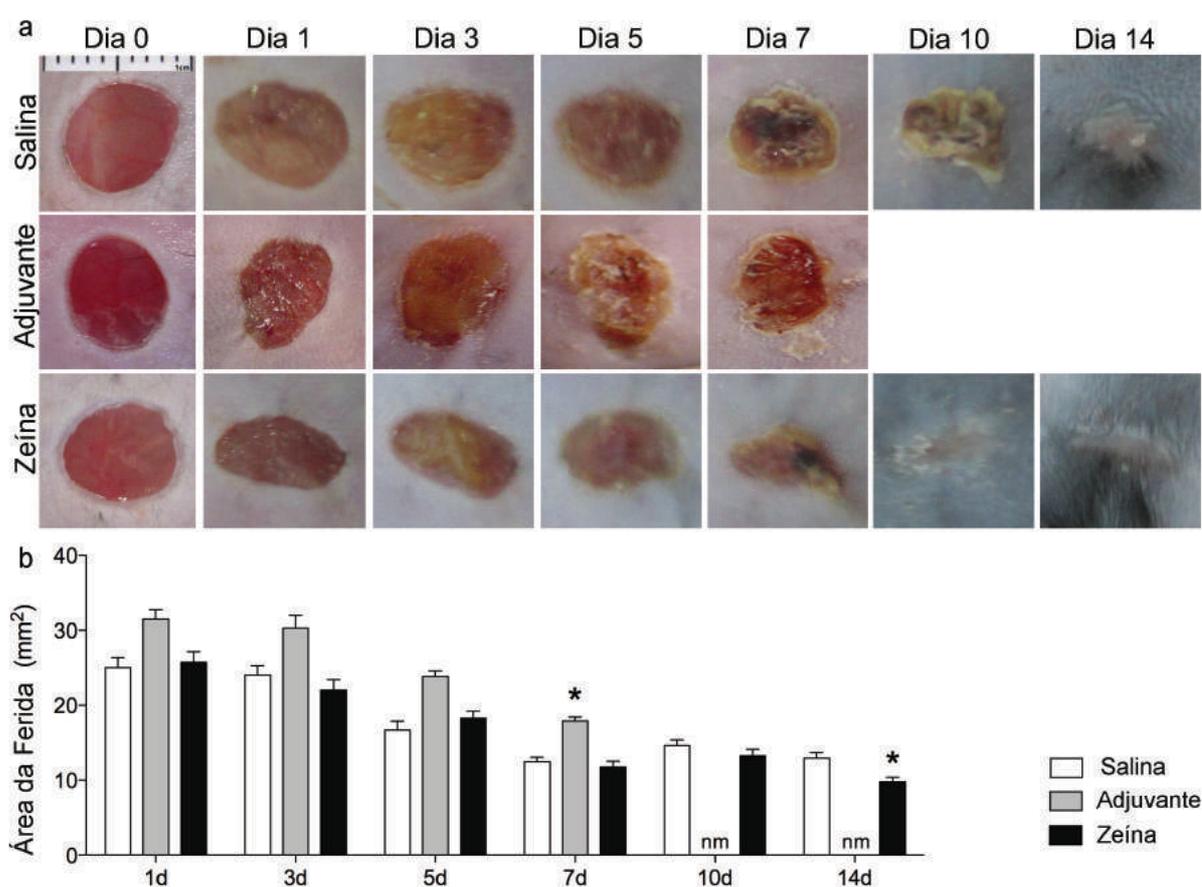
### 5.1 - Análise do efeito indireto da tolerância oral a uma proteína da dieta na cinética de fechamento de lesões na pele do dorso de camundongos

Para examinar o efeito da injeção i.p. de proteínas da dieta na cinética do reparo de lesões de pele, camundongos C57BL/6 foram divididos em três grupos (Tabela 4). O grupo experimental (zeína) recebeu uma injeção i.p. de 10 µg de zeína em adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> imediatamente antes da realização da lesão na pele e foi comparado com o grupo controle que recebeu injeção i.p. de adjuvante e com o grupo controle da lesão que recebeu salina por via i.p. logo antes da realização da lesão na pele.

C57/BL6 Grupos:			Lesão/Imunização:	Coletas:
Salina/Lesão n=7			Salina via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Adjuvante n=7			Al(OH) <sub>3</sub> via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Zeína n=7			Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético n=7			Salina via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína n=7			Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína 6hs n=7			Lesão Ex.+ Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína via i.p. 6hs pós lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional

**Tabela 4 – Protocolo experimental para estudo da influência da injeção intraperitoneal (i.p.) de zeína no reparo de lesões na pele.** Todos os animais receberam ração contendo zeína e água ad libitum, desde o desmame e durante todo o período experimental. O grupo controle salina, recebeu salina fisiológica por via intraperitoneal (i.p.) logo antes da realização da ferida excisional na pele e o grupo controle adjuvante recebeu 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> por via i.p. logo antes da realização da lesão na pele. O grupo experimental recebeu uma injeção de 10 µg de zeína em 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> por via i.p. logo antes da realização da ferida. Para a medida macroscópica da área da lesão, os animais foram levemente anestesiados e fotografados nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 40 após a lesão. Para análise microscópica, os animais foram eutanaziados e a pele foi coletada nos dias 7 e 40 após a lesão. N=7 animais por grupo/por tempo.

A área inicial da lesão excisional (dia zero) é de 33,27 mm<sup>2</sup> e não houve diferença significativa desta área até cinco dias após a lesão, mas no dia 7 o grupo zeína teve área menor do que o grupo adjuvante (Fig. 7 b). Durante estes primeiros dias, no grupo zeína as lesões apresentaram-se menos edemaciadas, menos vermelhas e com a formação de um filme inicial de fibrina mais delicado do que nos outros grupos. Além disso, no grupo zeína, a borda das lesões apresentou-se mais regular. No dia 14, a cicatriz do grupo zeína estava menor do que a do grupo salina (Fig. 7 a).



**Figura 7 - Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57Bl/6.** Em a, é apresentado a evolução do processo cicatricial das feridas feitas com punch dermatológico de 6,5 mm de diâmetro (33,27 mm<sup>2</sup>), nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14. Em b, o gráfico mostra a área das lesões dos dias 1 a 14 nos grupos salina (barra branca), adjuvante (barra cinza) e zeína (barra preta). Asterisco para análise no mesmo dia representa diferença significativa (p ≤ 0,05) em comparação com os demais grupos. nm = não mensurado.

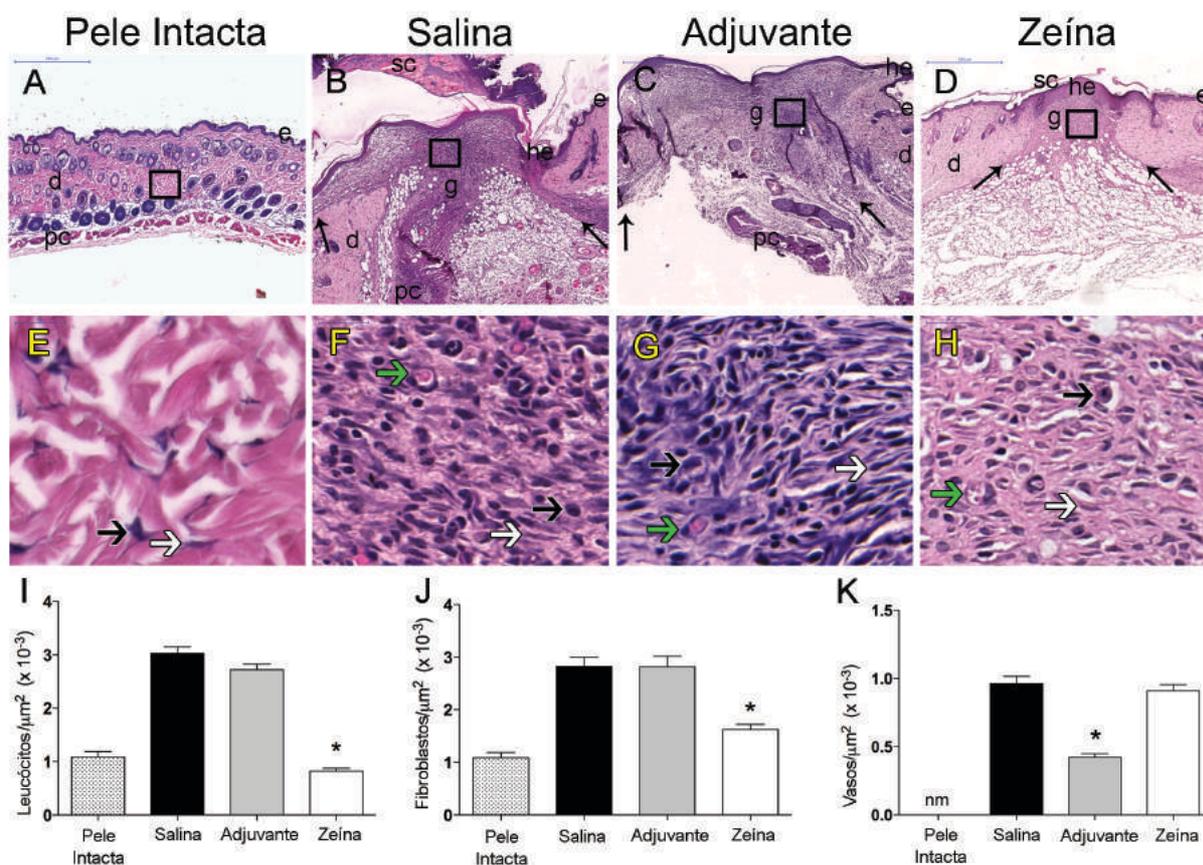
Após coloração com H&E, foi realizada análise histopatológica qualitativa da pele com as lesões coletadas no sétimo dia. Foram analisados os aspectos gerais do tecido, o infiltrado inflamatório e o tecido de granulação (Fig. 8).

No grupo controle Salina, os animais apresentavam uma crosta sobre a área da lesão, o epitélio neoformado hiperplásico e acima da linha normal ao epitélio adjacente e a maioria dos animais apresentava uma completa re-epitelização. A área da lesão estava preenchida com tecido conjuntivo cicatricial com pequena deposição de colágeno, de grande extensão e congesto (Figura 8 letras b e f). Esta região cicatricial, denominada tecido de granulação, continha uma alta celularidade de leucócitos e fibroblastos. A derme adjacente à lesão e a camada muscular da derme também tinham leucócitos, mostrando que a inflamação não se limitava apenas à área da lesão, mas se espalhava um pouco ao redor do foco da lesão inicial.

No grupo Adjuvante, observou-se que os animais apresentavam crosta acima da área lesionada e com epitélio neoformado hiperplásico, onde quase todos os animais apresentavam completa re-epitelização, assim como o grupo Salina, porém, todos os animais continham tecido de granulação imaturo, com grande extensão da área de reparo e mais congesto. A área do tecido de granulação encontrava-se extensa e com alta celularidade de leucócitos e grande número de fibroblastos (Fig. 8 c e g). Assim como no grupo Salina, a derme adjacente à lesão e a camada muscular da derme, tinham leucócitos espalhados. Todos os animais do grupo Adjuvante, tinham pouca deposição de colágeno no tecido cicatricial e muito pouco tecido adiposo na região cicatricial. Os aspectos qualitativos analisados sugerem que este grupo Adjuvante em geral apresentou mais inflamação, com mais células inflamatórias e com menor número de fibroblastos quando comparado com o grupo Salina.

Por sua vez, no dia 7 após a lesão, as feridas de todos os animais do grupo experimental Zeína estavam sem crosta, com o epitélio neoformado pouco hiperplásico e basicamente na linha normal da linha do epitélio adjacente. O tecido de granulação era mais contido à área da lesão e, pelas

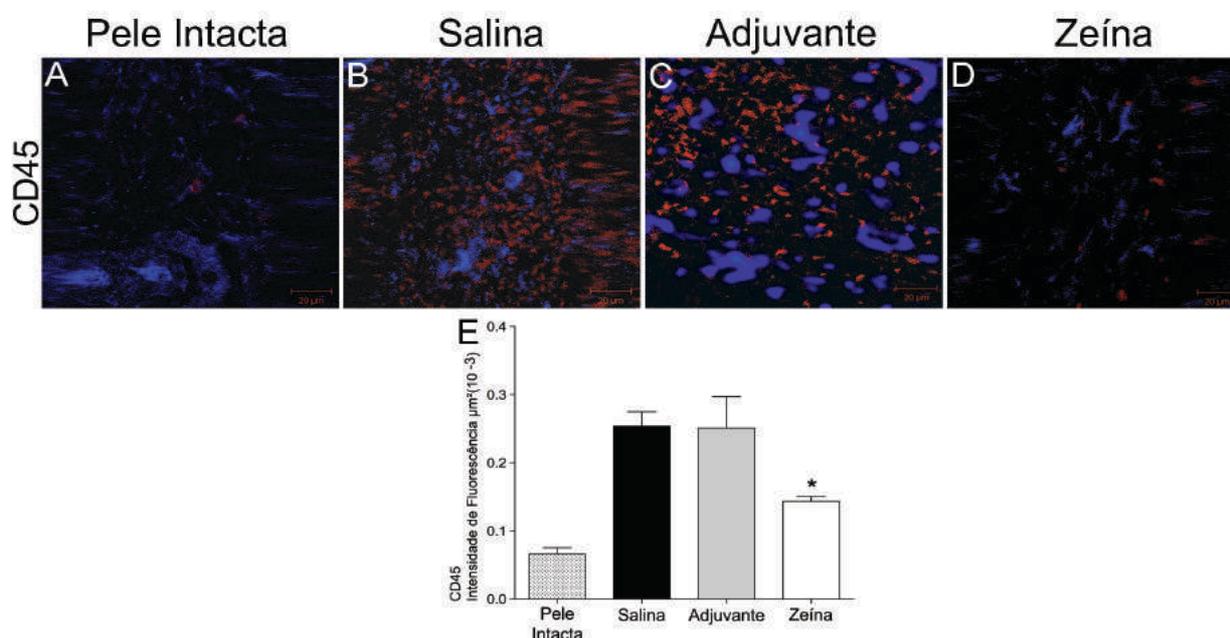
características de deposição de colágeno estava mais maduro. No tecido de granulação encontravam-se leucócitos e fibroblastos concentrados na área da lesão e em menor número quando comparado com os grupos Controle Salina e Adjuvante. Na derme adjacente à lesão e na camada muscular da derme encontravam-se poucas células inflamatórias espalhadas. No grupo Zeína, os animais tinham maior presença de células adiposas na parte inferior da área de cicatrização ou próxima à mesma (Fig. 8 d e h).



**Figura 8 – Injeção i.p. de zeína antes da lesão de pele reduziu o número de células inflamatórias e de fibroblastos.** Fotomicrografias de pele corada com H&E (A-H) e morfometria de leucócitos (setas pretas) (I), fibroblastos (setas brancas) (J) e vasos (setas verdes) (K), no sétimo dia após a lesão. Letras nas imagens: d, derme; e, epiderme; he, epiderme hipertrófica; g, tecido de granulação; pc, panículo carnososo; sc, casca da ferida. Os valores foram expressos em  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ . Asterisco em I e J, estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos grupos Salina e Adjuvante e em K estatisticamente diferente dos grupos Salina e Zeína. Aumento de 7.5X e escala da barra = 200  $\mu\text{m}$  (A-D) e 20X e escala da barra = 100  $\mu\text{m}$  (E-H). n=6 animais por grupo.

Nos cortes histológicos corados em H&E, no dia 7 após a lesão, foi feita também análise morfométrica de leucócitos, fibroblastos e angiogênese (Fig. 8 i, j e k). Tanto o número de leucócitos quanto de fibroblastos estavam significativamente reduzidos no grupo Zeína em comparação com os grupos controle Salina e Adjuvante. A formação de novos vasos, ou angiogênese, foi analisada através da quantificação de capilares e vasos e notou-se uma redução significativa no grupo adjuvante quando comparado aos grupos Salina e Zeína (Fig. 8 k).

Através de imunofluorescência, utilizando-se anticorpo anti-CD45, foi realizada análise do número de leucócitos presentes na área da lesão (Fig. 9). O grupo Salina e o grupo Adjuvante apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparados ao grupo Zeína, corroborando a análise histopatológica e morfométrica realizada em H&E. Também medimos a intensidade de fluorescência na pele intacta, de animais sem lesão, como controle (Fig. 9 a).

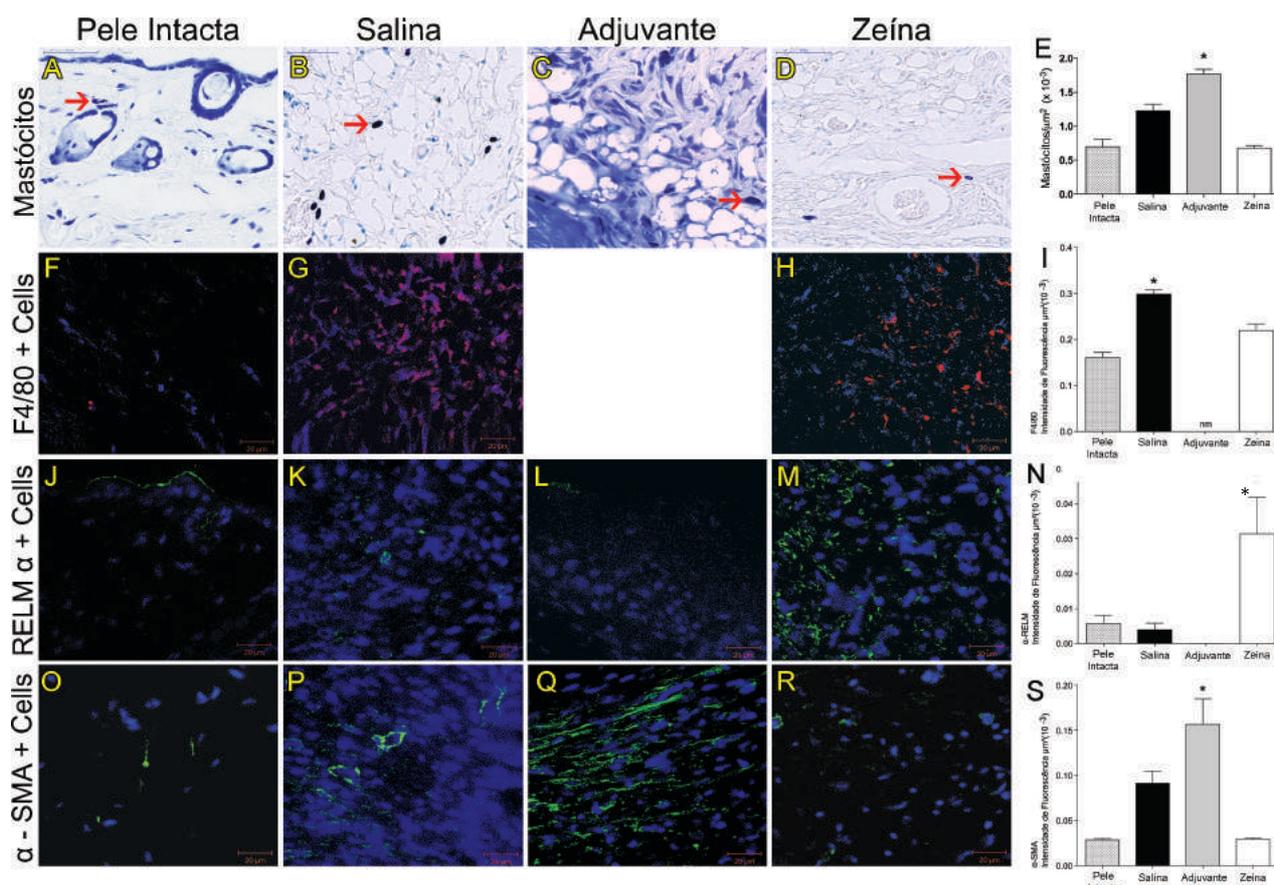


**Figura 9 – Efeitos indiretos da tolerância oral a zeína reduzem o número de leucócitos sete dias após a lesão.** (A-D) Fotomicrografias representativas das lesões após imunofluorescência com anticorpos anti-CD45 e (E) intensidade de fluorescência ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-6}$ ) nos diferentes grupos. Barra rachurada, pele intacta; barra preta, salina; barra cinza, Adjuvante e barra branca, Zeína. \*  $p < 0,05$ , em relação a Pele Intacta, Salina e Adjuvante. Aumento de 63X; escala da barra = 20µm.

## 5.2 - Análise de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida

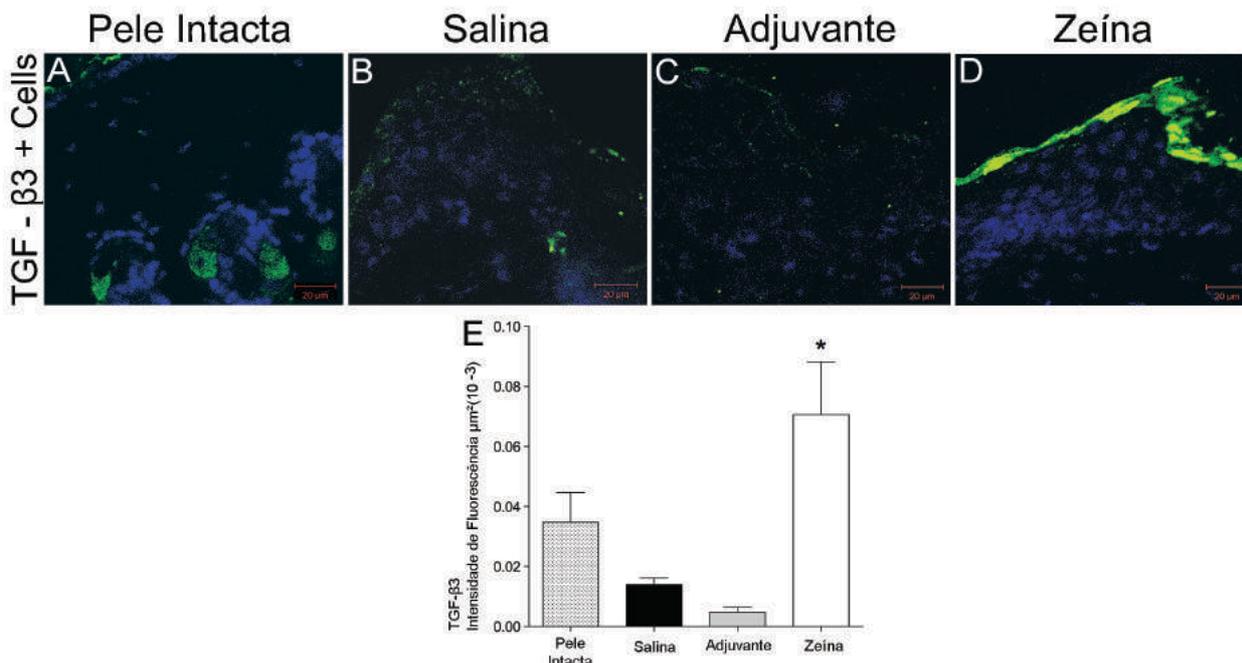
A coloração com azul de toluidina foi utilizada para comparar o número de mastócitos (Fig 10). Os grupos Salina e Adjuvante apresentaram um número maior de mastócitos na área da lesão quando comparados com o grupo Zeína (Fig. 10 e).

Os macrófagos (F4/80+), macrófagos alternativamente ativados, também conhecidos como macrófagos do tipo M2 (RELM- $\alpha$ +) e miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA+) foram avaliados usando imunofluorescência (Fig. 10). O grupo Salina apresentou maior intensidade de fluorescência para F4/80 quando comparado com o grupo Zeína, porém menor intensidade de fluorescência para RELM- $\alpha$  (Fig. 10 i). A intensidade de fluorescência para  $\alpha$ -SMA (miofibroblastos) no grupo Adjuvante foi maior quando comparado com os demais grupos (Fig, 10 s). Como controle, também medimos a intensidade de fluorescência na pele intacta de animais sem nenhum tipo de lesão (Fig. 10 a, f, j, o).



**Figura 10 - Análise de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida.** Os mastócitos identificados após coloração com Azul de Toluidina (A-D) foram quantificados através da contagem de 6 a 8 áreas de 100 μm<sup>2</sup> cada (E). Imunofluorescência com anticorpos anti-F4/80 (F-H), anti-Relm-alpha (J-M), anti-alpha-SMA (O-R) foi utilizada para quantificar respectivamente os macrófagos (I), macrófagos M2 (N) e miofibroblastos (S), cujos resultados nos gráficos mostram a intensidades de fluorescência (μm<sup>2</sup> × 10<sup>-6</sup>). Barra rachurada, pele intacta; barra preta, salina; barra cinza, Adjuvante; barra branca, Zeína. (A-D) aumento de 40X; escala da barra = 50μm. (F-R) aumento de 63X; escala da barra = 20μm. \* p<0,05 estatisticamente diferente dos grupos adjacentes.

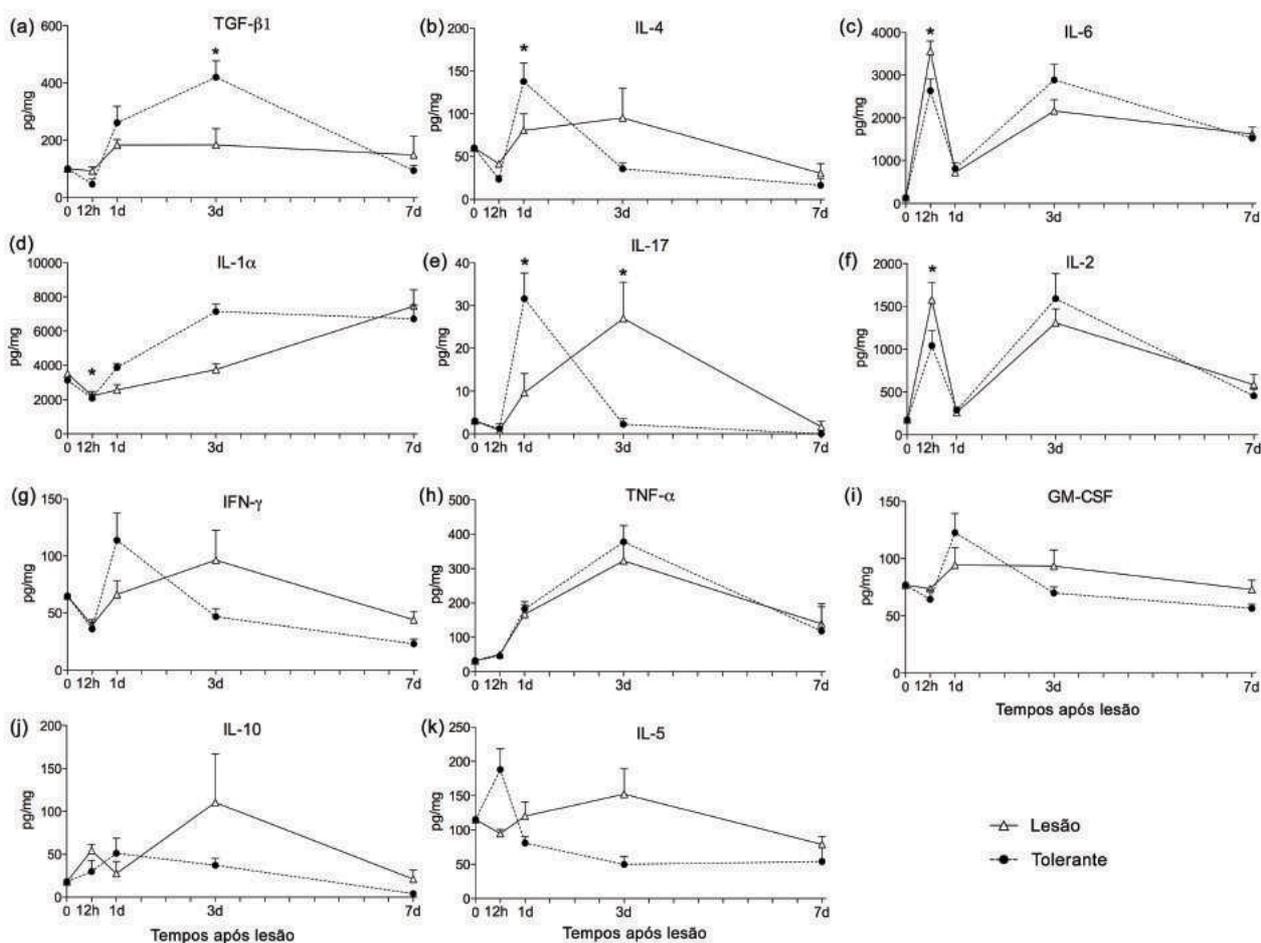
Foi realizada também análise por imunofluorescência da citocina TGFβ3 no leito da ferida, onde a intensidade de fluorescência/μm<sup>2</sup> foi comparada entre os grupos (Fig. 11). O grupo Zeína apresentou maior intensidade de fluorescência quando comparado com os demais grupos e a expressão ocorre principalmente na epiderme neoformada (Fig. 11d). Observa-se também expressão de TGFβ3 na pele intacta, principalmente nas glândulas sebáceas (Fig. 11a).



**Figura 11 – Efeitos indiretos da tolerância oral alteram a expressão do fator de crescimento transformante beta do tipo 3 no leito da ferida.** (A-D), imunofluorescência com anticorpos anti-TGF β3 em animais representativos de cada um dos grupos. (E) Intensidade de fluorescência ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ ). Barras rachuradas, pele intacta; barras pretas, salina; barras cinza, Adjuvante; barras brancas, Zeína. \*  $p < 0,05$ , estatisticamente diferente dos grupos Pele Intacta, Salina e Adjuvante. Aumento de 63X; escala da barra = 20 $\mu\text{m}$ .

### 5.3 - Análise do perfil da produção de citocinas no extrato de pele contendo a lesão

Na Figura 12, podemos observar as concentrações das citocinas no extrato de pele às 12 horas, 1 dia, 3 dias e 7 dias após a lesão. Não há diferença significativa nos níveis de IFN-Gama, TNF-alfa, GM-CSF, IL-10 e IL-5 entre o grupo de camundongos C57BL/6 que recebeu uma injeção de zeína antes da lesão (grupo Zeína) comparado com o grupo controle da lesão (grupo Salina). Os animais do grupo experimental que receberam a injeção de Zeína apresentaram um aumento mais rápido das citocinas TGF-beta e IL-4, consideradas anti-inflamatórias, mas também das citocinas IL-1alfa e IL-17. Estes resultados da cinética de produção de citocinas junto com resultados prévios de análise microscópica da lesão indicam que a injeção da proteína tolerada pode acelerar o processo de cicatrização das lesões em camundongos.



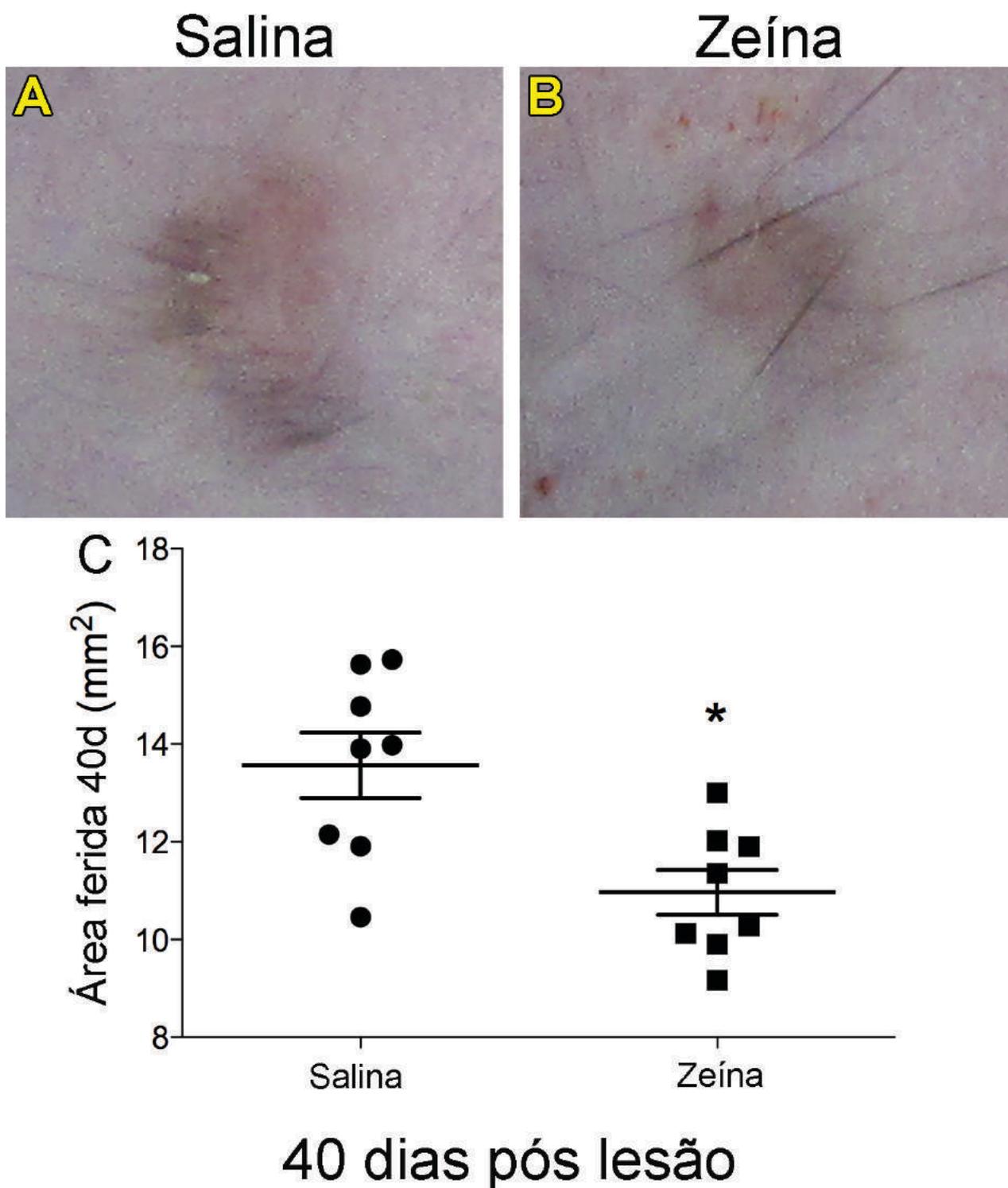
**Figura 12 – Cinética de produção de citocinas nas lesões de animais C57/BL6.** Citocinas foram quantificadas em extratos de pele contendo a lesão, obtidos 12h, 1dia, 3 dias e 7 dias após a lesão. A dosagem de TGF-beta foi feita por ELISA e as demais com um kit de citocinas TH1/TH2/TH17 da eBiosciences. Triângulo branco, grupo controle Salina e círculo preto, grupo experimental Zeína, média±SEM. \* p<0,05 Zeína estatisticamente diferente do grupo Lesão Salina. Dia 0 representa o nível de citocinas na pele intacta (sem ferimento).

#### 5.4 - Análise da área da cicatriz e da matriz extracelular aos 40 dias após a lesão

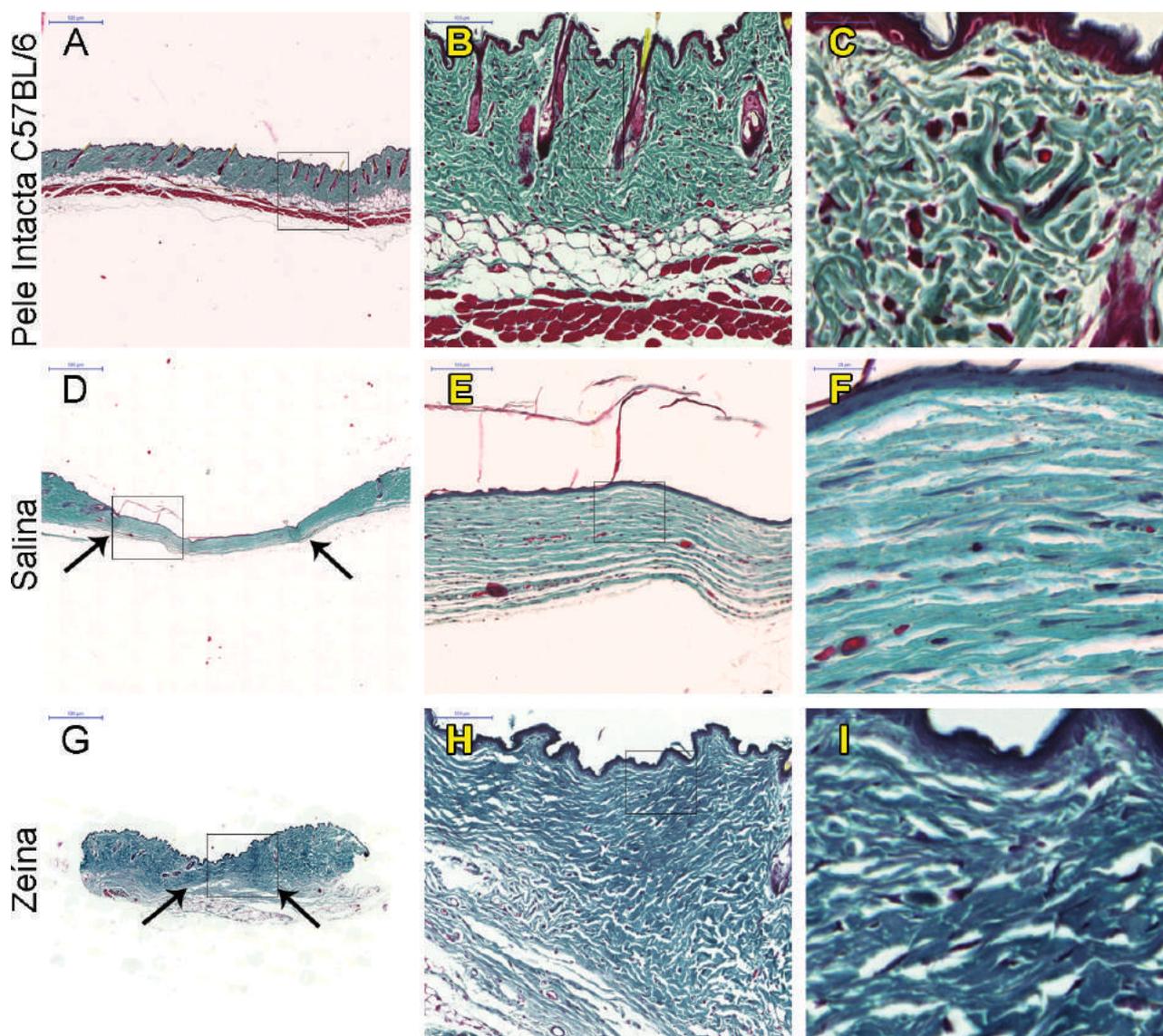
Aos 40 dias após a lesão excisional, foi fotografada a área da cicatriz antes de coletar a pele lesionada para as análises histopatológicas. A medida da área de cicatriz foi realizada nas fotografias digitais com o programa Image Tool version 3.0.

De encontro com o que observamos a nível microscópico, podemos também ver macroscopicamente que o reparo da ferida do grupo experimental tratado com Zeína foi mais regular resultando numa cicatriz mais normotrófica e menor quando comparado com o grupo Salina (Fig. 13).

Para avaliar se a injeção i.p. de uma proteína da dieta (Zeína) altera a deposição de colágeno comparamos a cicatriz 40 dias após a lesão excisional. Os tecidos foram corados com Tricromático de Gomori para avaliação das fibras colágenas. Na Figura 14, percebe-se que o epitélio reconstituído não estava mais espesso, podendo ser observada a área onde ocorreu a lesão pela ausência de folículo piloso, glândulas sebáceas, músculo e tecido adiposo tanto no grupo controle quanto no grupo experimental. No entanto, a área da cicatriz do grupo controle Salina apresentava um aspecto típico com fibras colágenas organizadas em feixes paralelos e abrangendo uma área mais extensa do que a do grupo experimental que recebeu a injeção da proteína tolerada zeína (Fig. 14 d, e, f). Interessantemente, no grupo tratado com zeína, a área da cicatriz, além de ser menor, apresentava fibras colágenas com um arranjo mais semelhante ao encontrado na pele intacta, ou seja, com fibras organizadas em forma de rede (Fig. 14 g, h, i).



**Figura 13 - Cicatrização de feridas cutâneas 40 dias após a lesão em animais C57BL/6 por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína). Em A e B, apresentam imagens representativas da pele dos grupos Salina e Zeína 40 dias após a lesão. (C) Medida da área da cicatriz, onde os pontos representam os valores obtidos de cada animal e o traço horizontal representa a média do grupo. Bolas, salina; quadrados, Zeína. \*  $p < 0,05$ . estatisticamente diferente do grupo Salina.**



**Figura 14 – A injeção i.p. de zeína antes da lesão na pele melhora a deposição de colágeno na cicatrização de camundongos C57BL/6.** Fotomicrografias representativas da cicatriz 40 dias após a lesão no grupo controle Salina (D-F) e no grupo que recebeu Zeína (G-I) em comparação com a pele intacta (A-C). Setas indicam local de reparo. Coloração de Tricromático de Gomori. Fotos com aumentos de 3.5X (A, D e G), 20X (B, E e H) e 100X (C, F e I); escala da barra = 500, 100 e 20  $\mu$ m.

Outro aspecto interessante encontrado no grupo tratado 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 Salina era frouxa e delgada. Também foi possível observar que o tecido cicatricial reconstituído

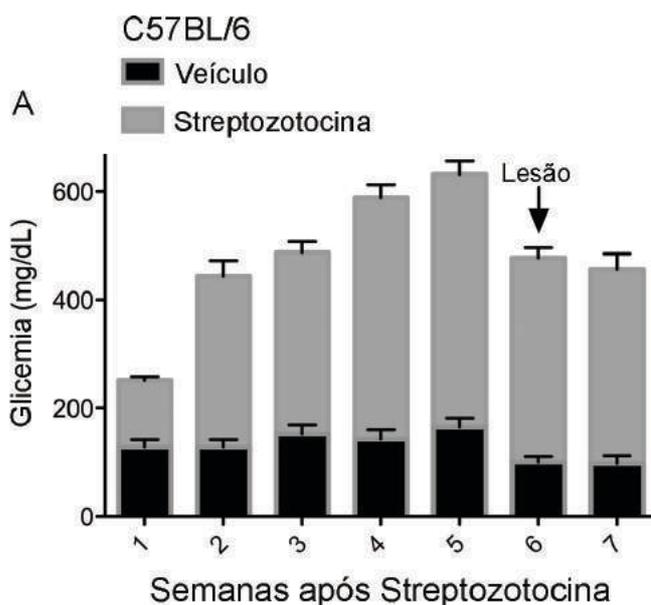
estava praticamente no mesmo nível da pele que não sofreu a lesão, ao contrário do grupo Salina, onde se pode notar uma depressão na pele onde o tecido foi reconstituído (Fig. 14).

## **Resultados - Parte II**

### **5.5 - Avaliação do efeito da injeção de zeína na cicatrização de feridas em camundongos com diabetes experimental do tipo 1**

Utilizamos dois modelos experimentais de diabetes do tipo 1: induzida pela injeção de estreptozotocina em camundongos C57BL/6 e espontânea em camundongos Non Obese Diabetic (NOD). Falaremos inicialmente dos resultados em C57BL/6 diabéticos.

Os camundongos C57BL/6 receberam injeção de estreptozotocina (STZ) e para verificação do nível de glicose, uma gota de sangue foi obtida por meio de uma pequena incisão na ponta da cauda. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia maior ou igual a 250mg/dL. As taxas glicêmicas dos camundongos injetados com STZ foram monitorados semanalmente após jejum de 8 horas. Apenas os animais que apresentaram hiperglicemia durante pelo menos 4 semanas consecutivas foram incluídos nos experimentos. A Figura 15 mostra que, na segunda semana após o tratamento com estreptozotocina, animais C57BL/6 apresentaram uma hiperglicemia que permaneceu em níveis elevados durante todo período experimental.



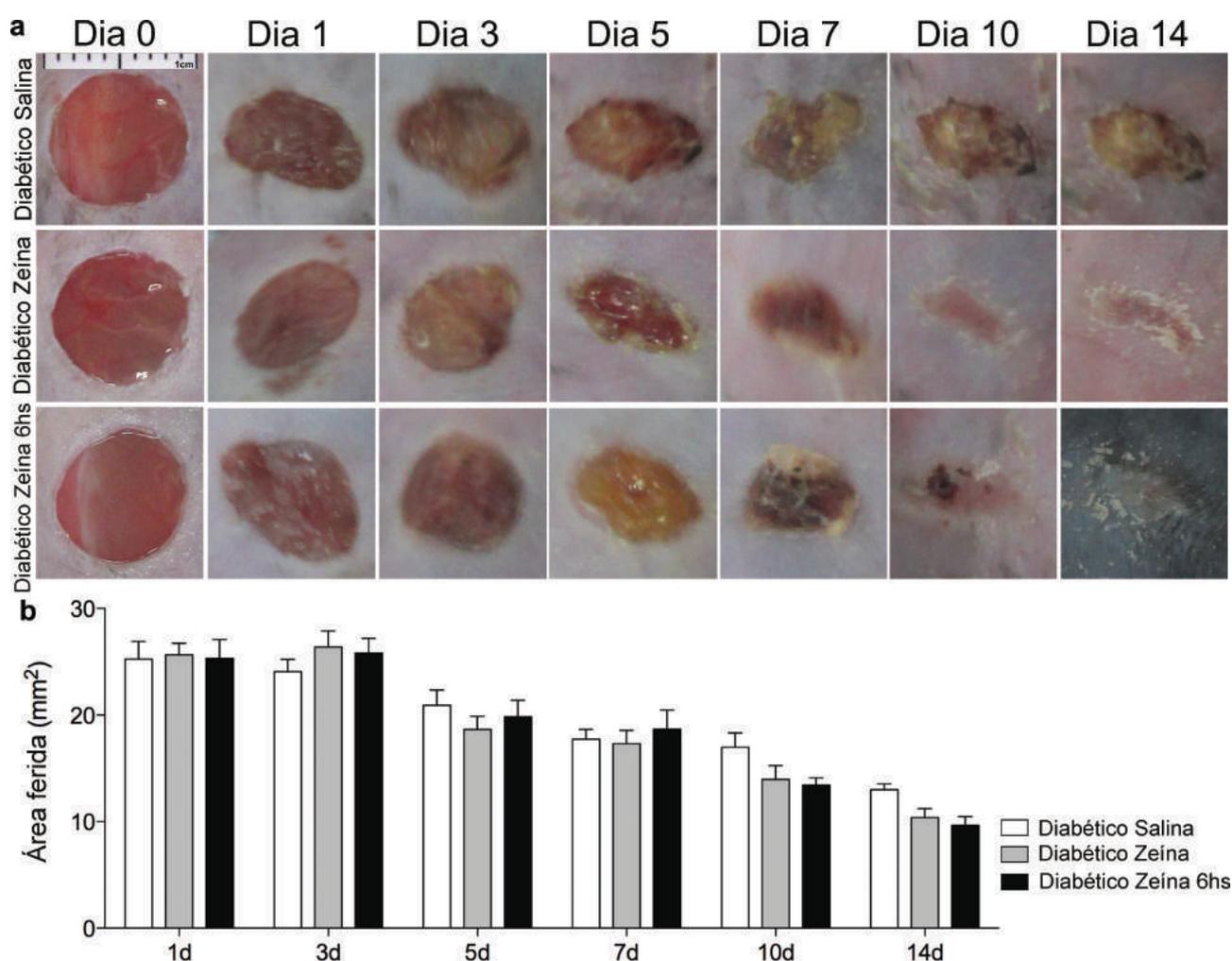
**Figura 15 - Monitoramento de glicemia após jejum em animais C57BL/6 que receberam injeção de estreptozotocina.** Níveis de glicose no sangue de animais C57BL/6 que não receberam estreptozotocina em jejum de 8 horas (barra preta) e níveis de glicose em animais C57BL/6 várias semanas após a injeção via i.p. de estreptozotocina (barra cinza). Os dados representam a média  $\pm$  SEM.

Para avaliar se os efeitos indiretos da injeção de proteínas toleradas interfere na cinética do reparo de lesões de pele em camundongos C57/BL6 diabéticos, os animais injetados com estreptozotocina (STZ) foram divididos em três grupos (Tabela 5).

C57/BL6 Grupos:		Indução Diabetes Experimental 3 semanas	Lesão/Imunização:	Coletas:
Diabético Salina n=7			Salina via i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína n=7	 	Estreptozotocina via i.p. 120 mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína i.p. + lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional
Diabético Zeína 6hs n=7	 	Estreptozotocina via i.p. 120 mg/kg	Lesão Ex.+ Al(OH) <sub>3</sub> + Zeína via i.p. 6hs pós lesão ex.	Dias 7 e 40 pós lesão excisional

**Tabela 5 – Protocolo experimental para estudo dos efeitos indiretos da tolerância oral em camundongos C57BL/6 com diabetes tipo 1, parte II.** Todos os três grupos foram alimentados com ração contendo zeína, receberam injeção de estreptozotocina e tiveram alta taxa de glicemia por pelo menos quatro semanas consecutivas antes da lesão. Um grupo recebeu salina por via i.p. minutos antes da lesão, outro recebeu injeção i.p. de zeína em adjuvante minutos antes da lesão e outro recebeu injeção de zeína mais adjuvante 6 horas após a lesão. A pele foi coletada para análise nos dias 7 e 40 após a lesão.

Nos dias 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a lesão os animais foram levemente anestesiados e fotografados para medida das áreas das lesões. Assim sendo, foi possível analisar macroscopicamente a cinética do fechamento da lesão excisional. Vimos que o processo de reparo tecidual foi similar entre os grupos experimentais mas que, no entanto, as feridas dos animais do grupo Diabético Zeína e Diabético Zeína 6 horas fechavam de maneira mais regular, com a formação de um filme inicial de fibrina mais delicada e pouco edemaciada ao redor da lesão quando comparadas com as feridas do grupo controle Diabético Salina (Fig. 16a).



**Figura 16 - Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57Bl/6 diabéticos e os efeitos indiretos da tolerância oral.** Em A, a figura mostra imagens representativas de feridas na pele do dorso dos camundongos diabéticos. As fotos foram feitas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14. Em B, o gráfico mostra a área da lesão. Barra branca, injeção de salina i.p; barra cinza, injeção de Zeína no momento da lesão; barra preta, injeção de Zeína 6 horas depois da realização da lesão.

A área de fechamento das feridas foi similar entre os grupos até o dia 14 após a lesão, (Fig 16b), embora no dia 14 nos grupos que receberam a proteína tolerada a cicatriz, vista de forma macroscópica, mostrava um melhor aspecto, com menos crosta (Fig. 16a).

## **5.6 - Avaliação histopatológica**

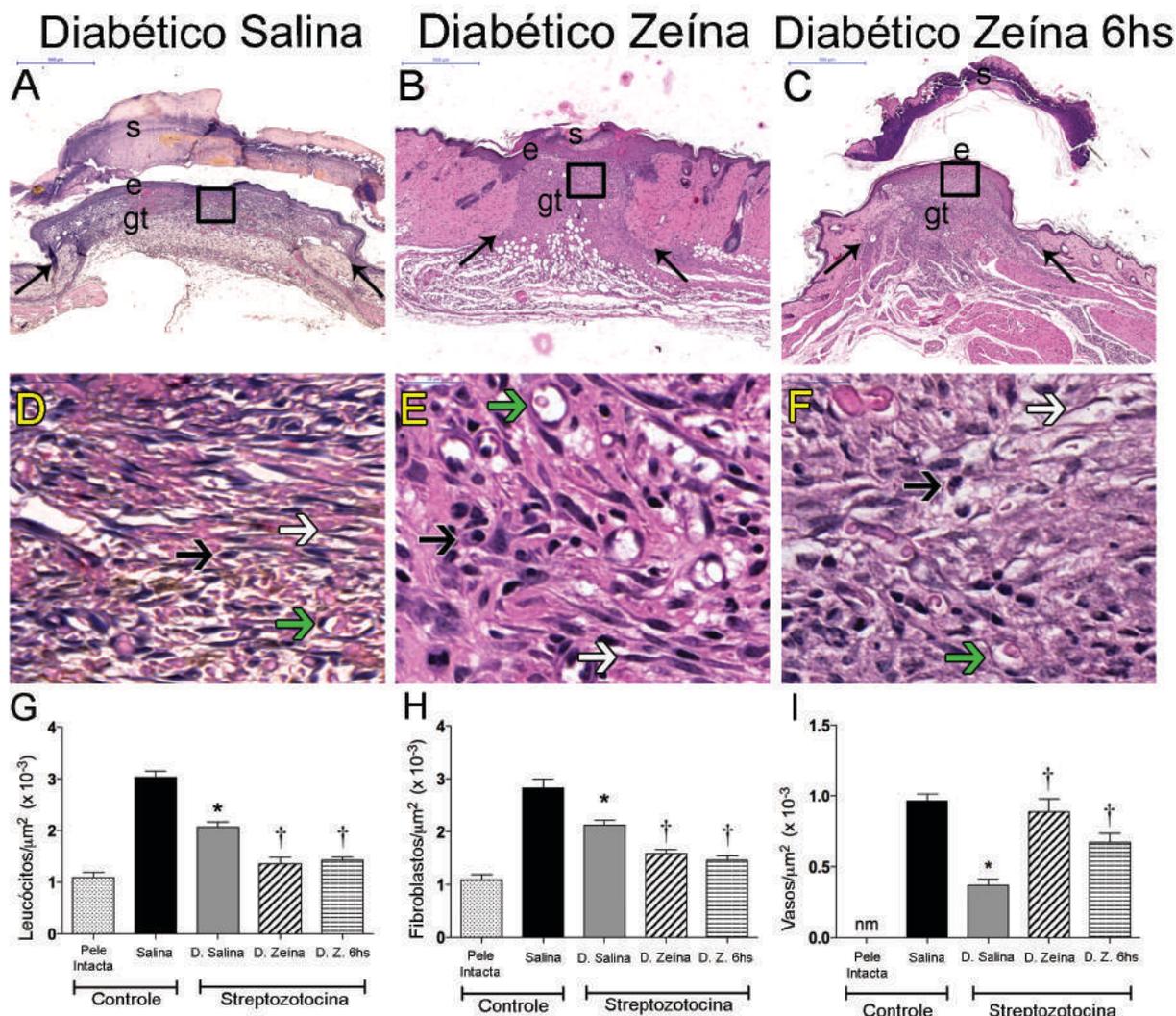
A análise histopatológica da pele coletada no dia 7 após a lesão e corada com H&E foi realizada para avaliar os aspectos gerais do tecido, o infiltrado inflamatório e o tecido de granulação (Fig. 17).

No grupo Diabético Salina, observamos que todos os animais apresentavam uma crosta acima da área lesionada e com epitélio neoformado hiperplásico, onde quase todos os animais apresentavam re-epitelização (Fig. 17 a, d). Em comparação com animais não diabéticos, porém, todos os animais diabéticos tinham tecido de granulação em grande extensão da área da ferida e congesto. A extensa área do tecido de granulação tinha alta celularidade de leucócitos infiltrados e grande número de fibroblastos. Na derme adjacente à lesão e na camada muscular da derme, notou-se uma presença de leucócitos espalhados. Todos os animais do grupo Diabético Salina tinham pouca deposição de colágeno no tecido cicatricial e muito pouco ou praticamente nenhum tecido adiposo na região de reparo.

No grupo experimental Diabético Zeina (Fig. 17 b, e), vimos que os animais possuíam pouca crosta ou ausência da mesma, o epitélio neoformado pouco hiperplásico, encontrava-se mais alinhado ao epitélio normal adjacente. Todos os animais com tecido de granulação maduro, poucas hemácias visíveis e muito pouco congesto. O tecido conjuntivo cicatricial encontrava-se mais restrito à área da lesão e com menos células inflamatórias e fibroblastos. Já na derme adjacente à lesão e na região da camada muscular da derme verificou-se pouca presença de leucócitos. No

grupo Diabético Zeína, todos os animais possuíam uma deposição inicial de colágeno no tecido cicatricial.

No grupo Diabético Zeína 6 horas (Fig. 17 c, f), observou-se que os animais possuíam uma pequena crosta de fibrina, epitélio neoformado hiperplásico e um pouco acima da linha normal da pele adjacente. Todos os animais apresentavam tecido de granulação em amadurecimento, com pouca congestão e uma menor celularidade de células inflamatórias e fibroblastos. Na derme adjacente à lesão e na camada muscular da derme, observou-se um número mediano de leucócitos espalhados. O tecido cicatricial com deposição do colágeno e em alguns animais havia pouco tecido adiposo na parte inferior da área de cicatrização ou próxima à mesma.

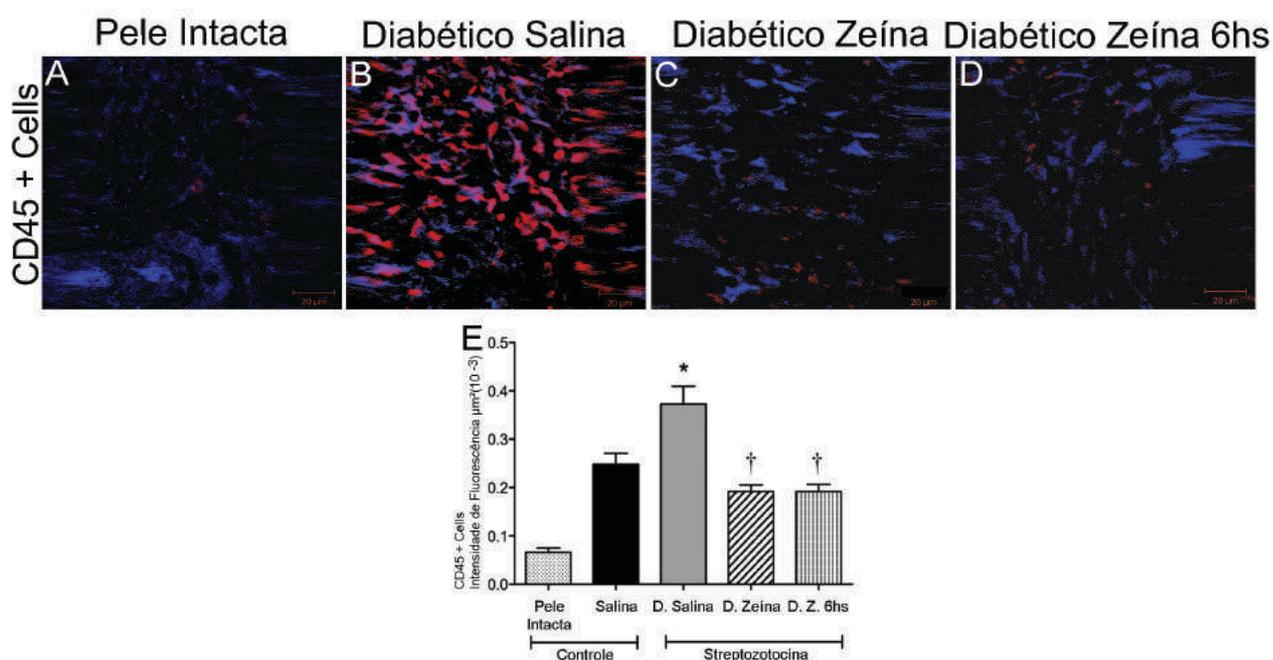


**Figura 17 – Injeção Intraperitoneal de zeína em camundongos diabéticos reduz o número de células inflamatórias e fibroblastos e aumenta a densidade de novos vasos no leito da ferida.** (A-F) fotomicrografias representativas de pele corada com H&E, 7 dias após a lesão. (G) número de leucócitos (setas pretas) por  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ , (H) número de fibroblastos (setas brancas) por  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ , (I) número de vasos e capilares sanguíneos (setas verdes) por  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ . Barra rachurada, pele intacta; barra preta, não diabéticos injetados com salina; barra cinza, diabéticos salina; barra com listras diagonais, diabéticos Zeína no momento da lesão excisional; barras listras verticais, diabéticos Zeína 6 horas depois da lesão excisional. \*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do grupo não diabético e † (cruz)  $p < 0,05$  estatisticamente diferentes do grupo Diabético Salina. Coloração H&E, aumentos de 7.5X e 20X; escala da barra = 200 e 100 $\mu\text{m}$ .

A angiogênese na ferida dos animais foi analisada através da avaliação da densidade de capilares e notou-se nos animais diabéticos controle (que receberam injeção de salina) uma diminuição significativa

quando comparados aos animais não diabéticos. Interessantemente, nos grupos diabéticos que receberam injeção de Zeína, seja minutos antes ou 6 horas após a lesão, a angiogênese ocorreu em níveis iguais aos de animais não diabéticos (Fig. 17i).

Utilizando imunofluorescência com anticorpo anti-CD45 foi realizada análise do infiltrado inflamatório presente na área da lesão excisional. A intensidade de fluorescência foi medida na área da lesão, sete dias após a ferida. Também medimos a intensidade de fluorescência na pele intacta de animais sem lesão, como controle basal. O grupo Diabético Salina, apresentou maior intensidade de fluorescência quando comparado com os demais grupos, corroborando a análise histopatológica (Fig. 18e).



**Figura 18 – Efeitos indiretos da tolerância oral reduzem o número de leucócitos no leito da ferida em animais diabéticos.** (A-D), imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti-CD45 (vermelho) em animais dos grupos experimentais. (E) Intensidade de fluorescência ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ ). Barras rachuradas, pele intacta; barras pretas, não diabéticos injetados com salina; barra cinza, diabéticos injetados com salina no momento da lesão; barra hachurada, diabéticos injetados com Zeína no momento da lesão; barra listrada vertical, diabéticos injetados com Zeína 6 horas depois da lesão. \*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do grupo não diabético salina e † (cruz)  $p < 0,05$  estatisticamente diferentes do grupo Diabético Salina. Coloração H&E, objetivas de 63X; escala da barra = 20 $\mu\text{m}$ .

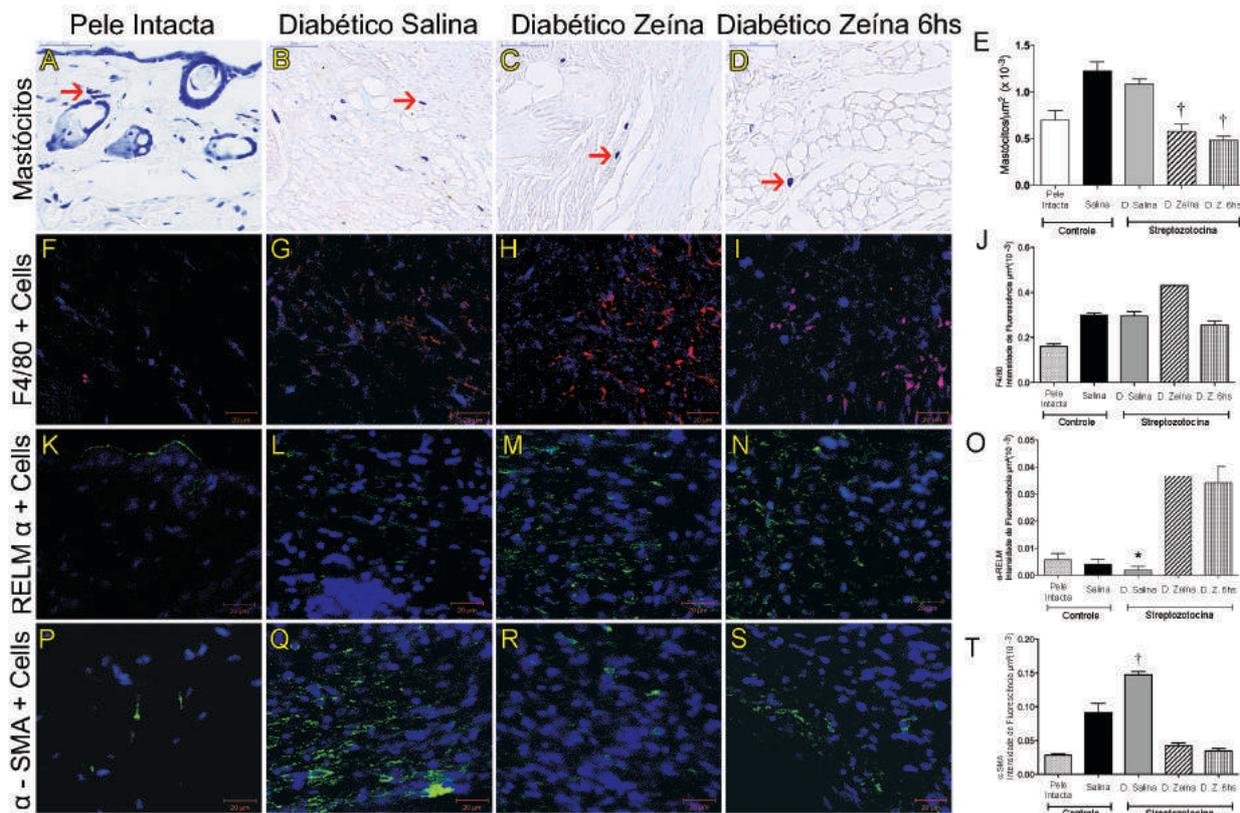
### **5.7 - Análise de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida em animais diabéticos tipo 1, no dia 7 após a lesão**

A coloração com azul de toluidina foi utilizada para identificar os mastócitos cuja contagem mostrou que o grupo Diabético Salina tem um número maior de mastócitos na área da lesão, quando comparado aos grupos Diabético Zeína e Diabético Zeína 6 horas (Fig. 19 a-e).

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência para indentificar macrófagos (F4/80+), macrófagos alternativamente ativados-M2 (RELM-alpha+) e miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA+) (Fig. 19 f ao t).

O grupo Diabetico Zeína apresentou maior intensidade de fluorescência para F4/80 quando comparado com os grupos Diabético Salina e Diabético Zeína 6 horas (Fig. 19 j). Por outro lado, a intensidade de fluorescência para os macrófagos M2 (RELM-alpha) foi maior nos grupos diabetes Zeína e diabetes Zeína 6 horas quando comparado com os demais grupos (Fig. 19 o).

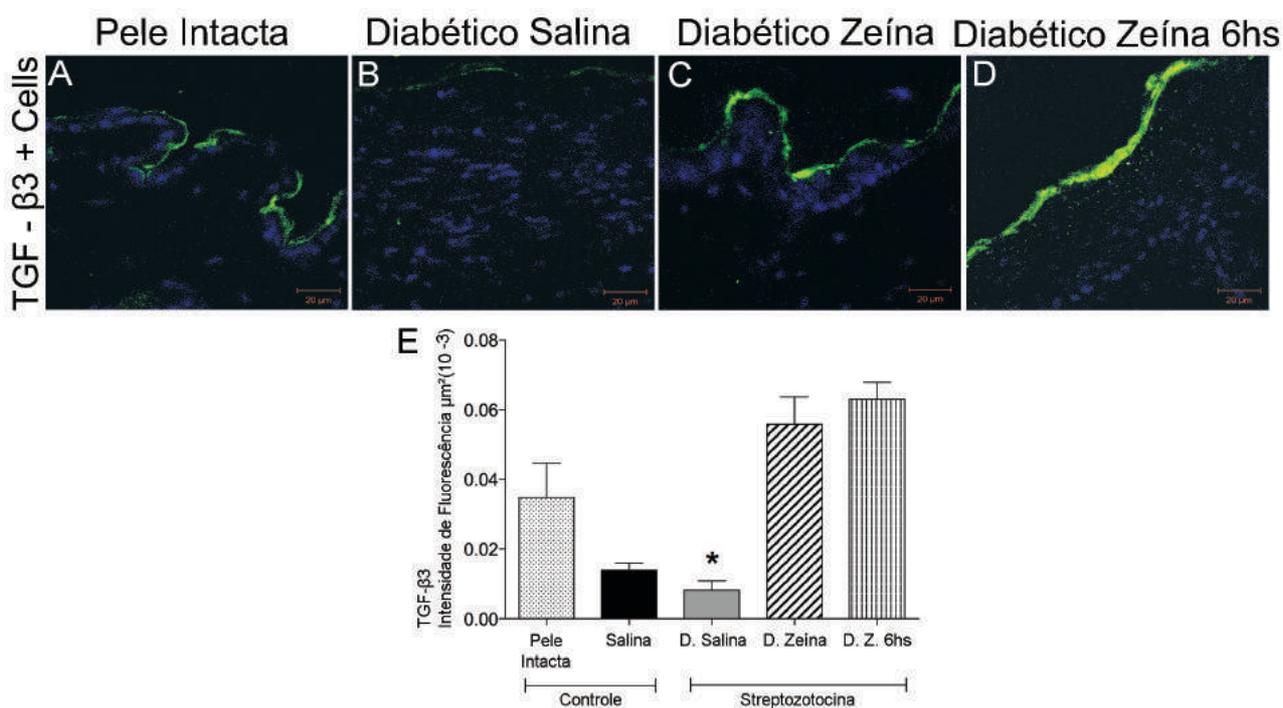
Além disso, a intensidade de fluorescência para  $\alpha$ -SMA (miofibroblastos) foi maior no grupo Diabético Salina, quando comparado com os demais grupos (Fig. 19 t).



**Figura 19** - Os efeitos indiretos da tolerância oral altera o número de mastócitos, macrófagos e miofibroblastos na área da lesão de animais diabéticos. (A-D), mastócitos foram corados com azul de toluidina e (E) quantificados; as setas vermelhas apontam em célula corada com Azul de Toluidina. (F-J) imunofluorescência com anticorpos anti-F4/80; (K-O) anti-Relm-alpha; (P-T) anti- alpha SMA em cada um dos grupos indicados na figura. A intensidades de fluorescência foi representada em  $(\mu\text{m}^2 \times 10^{-6})$ . Barra rachurada, pele intacta; barra preta, não diabético salina; barra cinza, diabéticos injetados com salina no momento da lesão; barra hachurada, diabéticos injetados com Zeína no momento da lesão; barra listrada vertical, diabéticos injetados com Zeína 6 horas depois da lesão. \*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do grupo não diabético salina e  $\gamma$  (cruz)  $p < 0,05$  estatisticamente diferentes do grupo Diabético Salina. Coloração Azul de Toluidina, aumento de 40X; escala da barra = 50 $\mu\text{m}$ . Imunofluorescência, aumento de 63X; escala da barra = 20 $\mu\text{m}$ . \*  $p < 0,05$ . estatisticamente diferente dos grupos adjacentes e  $\gamma$  (cruz)  $p < 0,05$  estatisticamente diferentes do grupo Diabético Salina.

### 5.8 - Análise da expressão de TGF-beta3 no leito da ferida de animais diabéticos

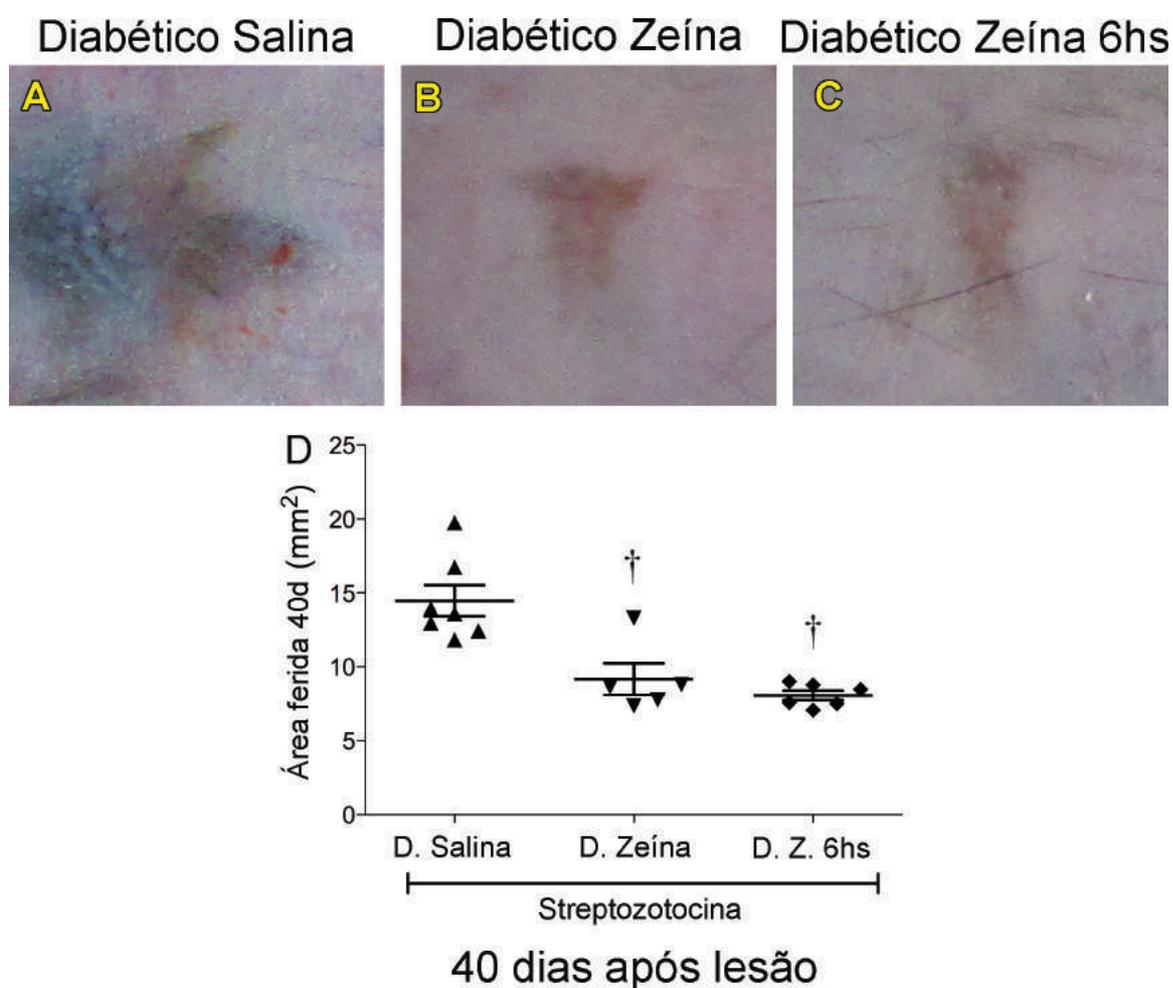
No dia sete após a lesão, foi realizada também análise por imunofluorescência da citocina TGF $\beta$ 3 no leito da ferida (Fig. 20). Os grupos Diabético Zeína e Diabético Zeína 6 horas apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparados com os demais grupos (Fig. 20d).



**Figura 20 – Aumento da expressão de TGF-beta3 pelos efeitos indiretos da tolerância oral nas lesões em animais diabéticos.** (A-D), imagens representativas de lesões vistas após imunofluorescência com anticorpos anti-TGF- $\beta$ 3, sete dias após a lesão em animais de cada um dos grupos indicados na figura. (E) Intensidade de fluorescência ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ ). Barras pontilhada, pele intacta; barras pretas, não diabético salina; barra cinza, diabéticos injetados com salina no momento da lesão; barra hachurada, diabéticos injetados com Zeína no momento da lesão; barra listrada vertical, diabéticos injetados com Zeína 6 horas depois da lesão. \*  $p < 0,05$ , estatisticamente diferente dos grupos Diabético Zeína e Diabético Zeína 6 horas. Aumento de 63X; escala da barra = 20 $\mu\text{m}$ .

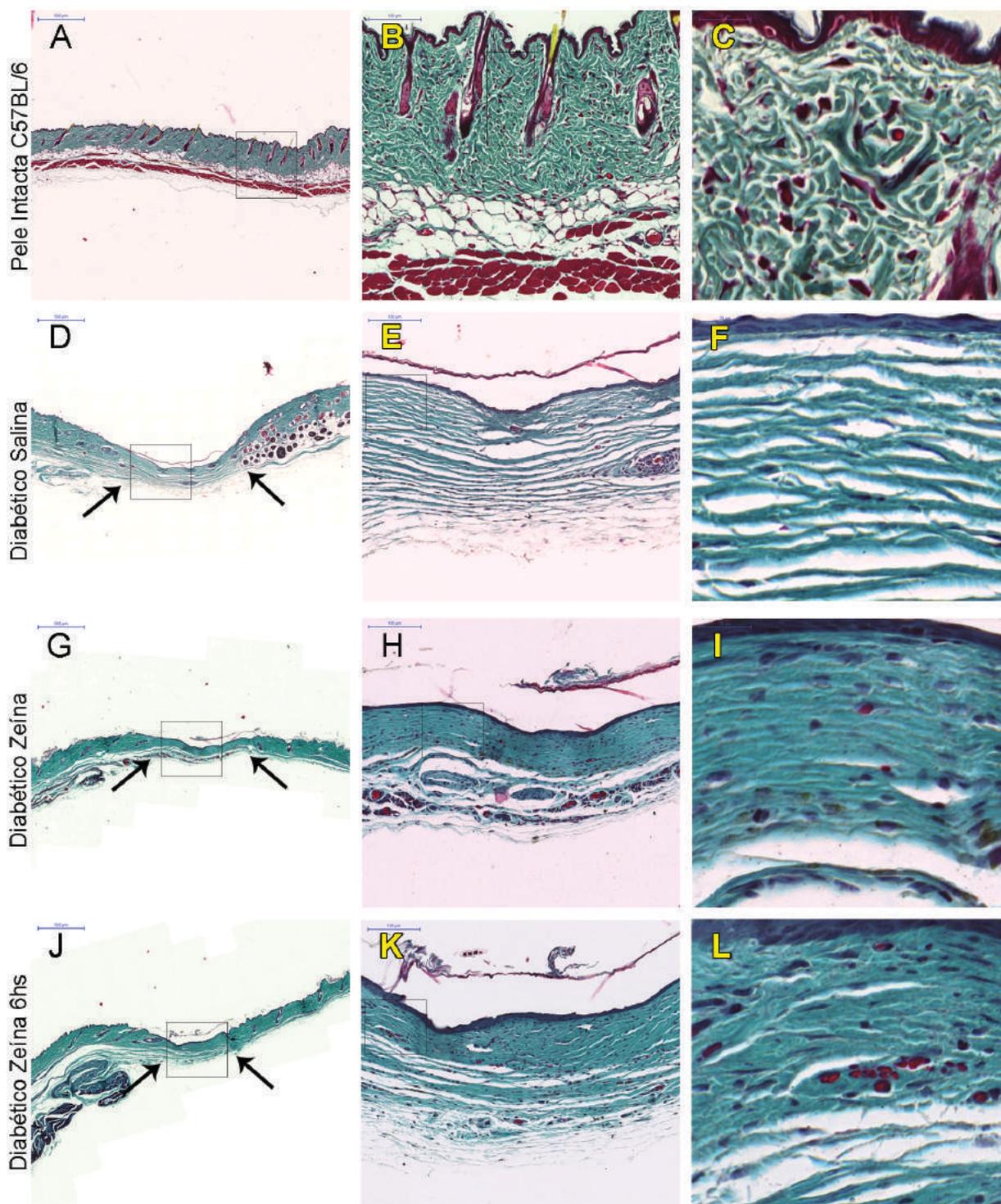
### 5.9 - Análise da área da cicatriz e da matriz extracelular aos 40 dias após a lesão em camundongos diabéticos

Aos 40 dias após a lesão excisional fotografamos a área da cicatriz para a medida da área. As imagens representativas de cada grupo mostra que o reparo nos animais dos grupos tratado com Zeína foi mais regular (Fig. 21 b, c). A área das feridas também foi menor nos grupos diabéticos que receberam injeção de Zeína (Fig. 21d).



**Figura 21 - Melhora da cicatrização de feridas cutâneas em animais C57BL/6 diabéticos por injeção parenteral de um componente da dieta regular (zeína).** (A-C) imagens representativas dos grupos indicados na figura. (D) Medida da área da cicatriz, onde os pontos representam os valores obtidos de cada animal e o traço horizontal representa a média do grupo. triangulo em pé, diabético salina; triangulo invertido, Diabético Zeína; losango, Diabético Zeína 6 horas. † (cruz)  $p < 0,05$ . estatisticamente diferente do grupo Diabético Salina.

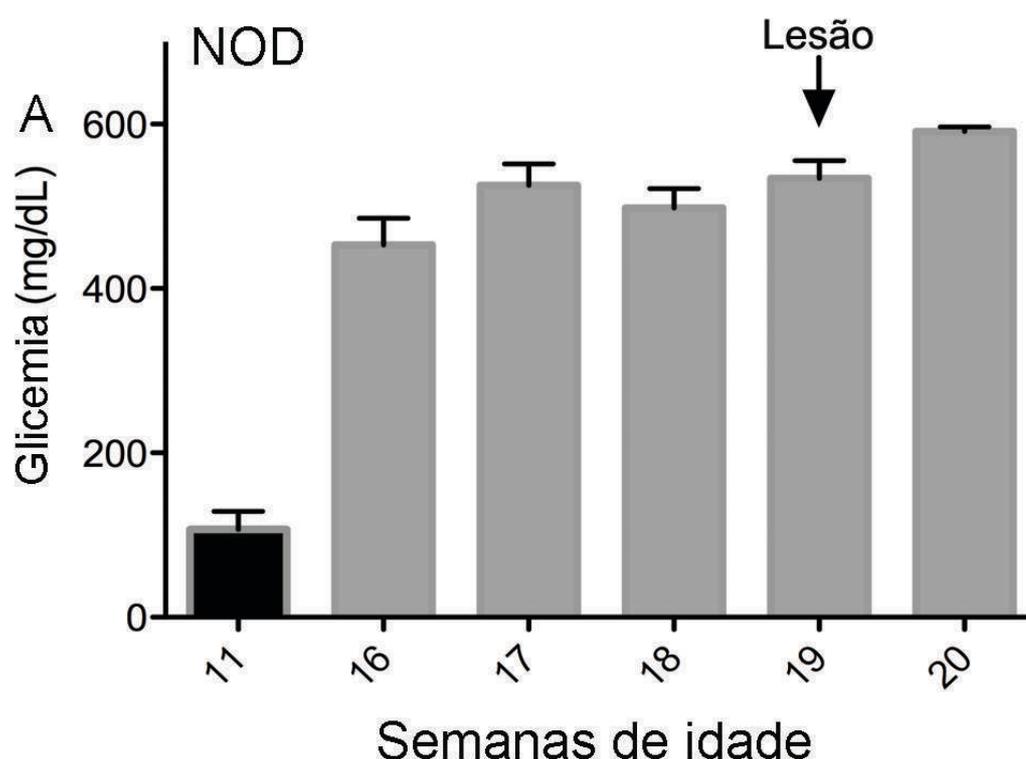
Para avaliar se a injeção i.p. de uma proteína da dieta (Zeína) altera a deposição de colágeno na cicatrização em camundongos C57/BL6 com diabetes comparamos a pele com a cicatriz 40 dias após a lesão excisional. Os tecidos foram corados com Tricromático de Gomori para avaliação das fibras colágenas. Aos 40 dias após a ferida, o epitélio reconstituído não estava mais espesso e foi possível distinguir a área onde ocorreu a lesão pela ausência de folículo piloso, glândulas sebáceas, músculo e tecido adiposo em todos os grupos (Fig. 22). A cicatriz do grupo Diabético Salina apresentou fibras colágenas organizadas em feixes paralelos, finos e abrangendo uma área mais extensa do que as dos grupos Diabético Zeína e Diabético Zeína 6 horas (Fig. 22 d, e, f). Nos grupos diabéticos que receberam a injeção de zeína, a área da cicatriz era menor e apresentava fibras colágenas mais compactadas (Fig. 22 h, i, k, l). Nos animais diabéticos que receberam injeção de Zeína pouco antes da lesão, a cicatriz estava praticamente no mesmo nível da pele adjacente enquanto no controle diabético pôde-se notar uma depressão do tecido reconstituído 40 dias após a lesão (Fig. 22d).



**Figura 22 – A injeção i.p. de zeína melhora a deposição de colágeno na cicatrização de camundongos C57BL/6 diabéticos.** Fotomicrografia representativas da cicatriz 40 dias após a lesão no grupo controle Diabético Salina (D-F); no grupo Diabético Zeína (G-I); grupo Diabético Zeína 6 horas e na pele intacta (A-C). Setas indicam local de reparo. Coloração de Tricromático de Gomori. Fotos com aumentos de 3.5X (A, D, G e J), 20X (B, E, H e K) e 100X (C, F, I e L) ; escala da barra = 500, 100 e 20  $\mu$ m.

### 5.10 - Avaliação do reparo de feridas cutâneas em camundongos NOD com diabetes do tipo 1

A taxa glicêmica dos camundongos NOD foi monitorada semanalmente após jejum de 8 horas. Apenas os animais que apresentaram hiperglicemia durante pelo menos 4 semanas consecutivas foram incluídos nos experimentos. Com 16 semanas de idade, os camundongos NOD apresentaram hiperglicemia que se manteve durante o experimento (Fig. 23).



**Figura 23 - Monitoramento de glicemia após jejum em animais da linhagem NOD.** Níveis de glicose no sangue de animais NOD com diferentes semanas de idade, como indicado na figura. Nível de glicose em animais com 11 semanas de idade (barra preta) e altos níveis de glicose a partir de 16 semanas 16 de idade (barras cinzas). A lesão foi feita em animais com 19 semanas de idade. Os dados representam a média  $\pm$  SEM.

Com 19 semanas de idade os camundongos NOD foram divididos em três grupos submetidos a lesão na pele (Tabela 6). Um grupo controle recebeu injeção i.p. de salina, um grupo experimental recebeu injeção de Zeína em  $\text{Al}(\text{OH})_3$  no momento da lesão e outro grupo experimental recebeu injeção de Zeína em  $\text{Al}(\text{OH})_3$  6 horas após a lesão. Sete dias após a lesão, a pele foi coletada para análise histopatológica.

**Influência da proteína tolerada no reparo de feridas de camundongos**

**Grupos:**

NOD	Tratamento:	Lesão/Imunização:	Coletas
 NOD Diabético Salina n=8		 Salina via i.p. + lesão	Dias
NOD D. Zeína n=8		$\text{Al}(\text{OH})_3$ + Zeína via i.p. + lesão	7
NOD D. Zeína 6 horas n=8		Lesão + $\text{Al}(\text{OH})_3$ + Zeína i.p. 6 horas depois	

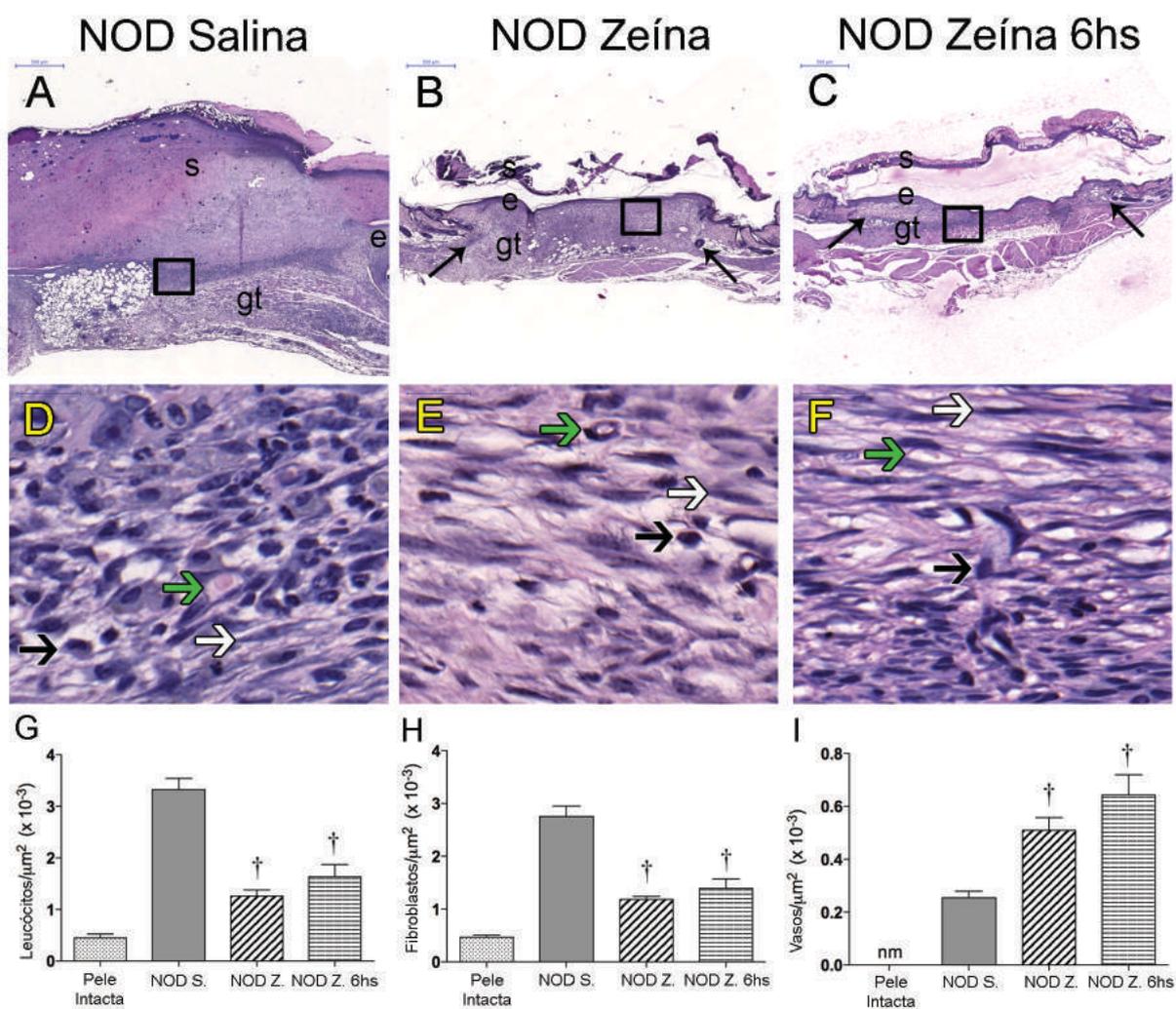
**Tabela 6 – Protocolo experimental para estudo dos efeitos indiretos da tolerância oral em camundongos NOD com diabetes tipo 1.**

Na pele corada com H&E, foi feita análise histopatológica qualitativa e morfometria de leucócitos, fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 24).

No grupo NOD Salina, foi observado que os animais apresentavam uma crosta de fibrina acima da área lesionada. Nem todos os animais apresentavam completa re-epitelização. O tecido de granulação em formação tinha grande extensão e estava congesto. Havia alta celularidade de leucócitos no tecido de granulação e muitos fibroblastos (Fig. 24 a, d). Assim, como nos animais C57Bl/6 diabéticos, na derme adjacente á lesão e na camada muscular da derme também havia leucócitos espalhados. Em todos os animais do grupo NOD Salina, pouca deposição de colágeno no tecido cicatricial foi observada.

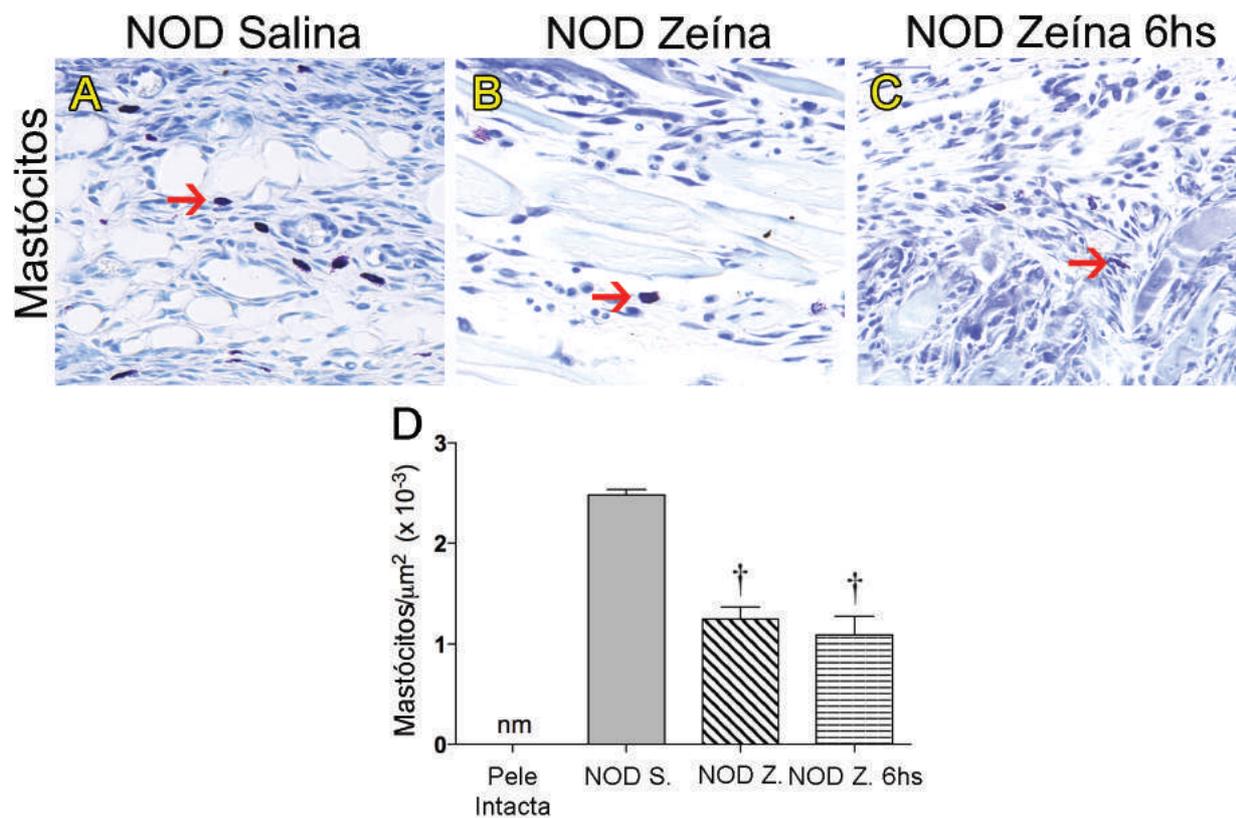
Os grupos NOD que receberam injeção de Zeína, seja no momento da lesão ou 6 horas depois, apresentaram completa re-epitelização e menor infiltrado inflamatório no leito da ferida e nas regiões adjacentes à lesão. Em todos os animais NOD tratados com Zeína já havia significativa deposição de colágeno na região em cicatrização. As análises morfométricas de leucócitos e fibroblastos corroboram as análises qualitativas (Fig. 24 b, c, e, f).

A contagem dos capilares na região das feridas mostra que a injeção de Zeína, tanto no momento da lesão quanto 6 horas depois da lesão, aumentou a angiogênese na ferida dos animais NOD diabéticos (Fig. 24 i).



**Figura 24 – Injeção Intraperitoneal de zeína momentos antes ou 6 horas após a lesão reduz o número de leucócitos e fibroblastos em animais da linhagem NOD.** (A-F) Fotomicrografias da pele com a lesão em camundongos NOD, 7 dias após lesão. No dia 7, a re-epitelização (e) ainda é parcial, ocorrendo apenas em alguns animais que receberam a proteína tolerada, o tecido de granulação (gt) está bem evidente com presença de fibroblastos e leucócitos e há início de deposição de matriz extracelular em animais do grupo que recebeu a proteína da dieta. O número de leucócitos (setas pretas), fibroblastos (setas brancas), e vasos (setas verdes) identificados pela suas características morfológicas, foi comparado entre os grupos experimentais e os resultados apresentados em G, H e I, respectivamente. Barra pontilhada: pele intacta; barra cinza e imagens A-D: grupo que recebeu injeção i.p. de salina logo antes da lesão; barra hachurada e imagens B-E: camundongos que receberam injeção i.p. de 10 $\mu$ g zeína em 1,6mg Al(OH)<sup>3</sup> logo antes da lesão; barra listrada e imagens C-F: camundongos que receberam injeção i.p. de 10 $\mu$ g zeína em 1,6mg Al(OH)<sup>3</sup> 6 horas após a lesão. (cruz) p<0,05, estatisticamente diferentes do grupo NOD Salina. Coloração H&E, aumentos de 7.5X e 20X; escala da barra = 200 e 100 $\mu$ m.

A análise do número de mastócitos foi feita após coloração com azul de toluidina (Fig. 25). De maneira semelhante ao que foi observado em camundongos C57BL/6 diabéticos, os grupos diabéticos da linhagem NOD que receberam Zeína apresentaram redução do número de mastócitos em comparação com o controle NOD diabético que não recebeu Zeína. E a injeção de zeína até 6 horas após a lesão ainda foi capaz de reduzir o número destas células na área lesionada.



**Figura 25 – Injeção Intraperitoneal de zeína momentos antes ou 6 horas após a lesão reduz o número de mastócitos na área da lesão em animais da linhagem NOD. (A-C)** Fotomicrografias representativas da pele corada com Azul de Toluidina para evidenciar a presença de mastócitos apontados na figura com setas vermelhas. O número de mastócitos, identificados pela suas características morfológicas, foi comparado entre os grupos e os resultados apresentados em D. Barra cinza e imagem A: grupo que recebeu injeção i.p. de salina logo antes da lesão; barra hachurada e imagem B: camundongos que no momento da lesão recebeu injeção i.p. de 10 $\mu\text{g}$  zeína em 1,6mg Al(OH)<sub>3</sub>; barra listrada e imagem C: camundongos que receberam injeção i.p. de 10 $\mu\text{g}$  zeína em 1,6mg Al(OH)<sub>3</sub> 6 horas após a lesão.  $\gamma$  (cruz)  $p < 0,05$ , estatisticamente diferentes do grupo NOD Salina. Coloração Azul de toluidina, aumento de 40X; escala da barra = 50 $\mu\text{m}$ .

## 6 - Discussão

A mucosa intestinal tem a maior superfície de contato do corpo com o ambiente e sendo aí encontrados microbiota intestinal e proteínas da dieta que, em condições fisiológicas, induzem tolerância oral (Faria and Weiner, 2005). No entanto, 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). Ademais, as consequências imunológicas da ingestão de proteínas não se restringem à mucosa, pois têm repercussões sistêmicas.

A tolerância oral é específica e a ingestão de uma proteína não inibe a resposta imune para outra proteína. Mas, a injeção parental de uma proteína tolerada (em adjuvante) leva a uma diminuição da resposta imune para outras proteínas injetadas concomitantemente, ou pouco tempo depois (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997; Miller et al., 1991). Esse fenômeno da injeção parenteral de proteínas toleradas é o que chamamos de efeito indireto da tolerância oral (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997). Os efeitos indiretos da tolerância oral pela injeção de zeína inibem o aumento de anticorpos anti-DNP-OVA em camundongos (Carvalho and Vaz, 1996). Ou seja, camundongos que são alimentados rotineiramente com ração comercial contendo milho e imunizados com DNP-OVA mais zeína e produzem níveis significativamente reduzidos de anticorpos anti-DNP-OVA.

Em nosso laboratório, demonstrou-se anteriormente que a exposição parenteral a antígenos aos quais se induziu previamente a tolerância oral interferiu no reparo de lesões na pele de camundongos saudáveis (Costa et al., 2016; Costa et al., 2011). Costa e colaboradores (2011, 2016), mostraram que os efeitos indiretos da injeção de OVA em camundongos tolerantes a esta proteína melhoram o reparo de lesões incisionais e excisionais, com redução da cicatriz. Nestes trabalhos anteriores a tolerância oral a OVA foi induzida por meio da administração de uma solução de clara de ovo durante três dias consecutivos.

No presente trabalho, mostramos que a injeção de zeína, uma proteína usual da dieta de camundongos, diminuiu a inflamação e melhorou o reparo de feridas na pele de camundongos saudáveis ou com diabetes experimental. A derme de uma região sem cicatriz é composta por fibras colágenas mais espessas organizadas em forma de cesta e a neoderme das cicatrizes é composta por fibras colágenas curtas, mais finas e organizadas em paralelo (Cuttle et al., 2005; Whitby and Ferguson, 1991a). A análise histológica de 40 dias após a lesão mostrou que a área cicatrizada nos grupos que receberam injeção de zeína apresentou organização de fibras colágenas mais semelhante à pele intacta, mas sem haver regeneração dos anexos da pele.

Ressaltamos que ao utilizarmos zeína evitamos o caráter episódico da indução de tolerância oral pela ingestão de proteínas que ainda não tinham sido previamente ingeridas, como ocorre com OVA em camundongos. Além disso, mostramos que a injeção da proteína tolerada até 6 horas depois da lesão reduz o número de leucócitos no leito da ferida. No entanto, a injeção de zeína 24 horas depois da lesão não mais reduziu um processo inflamatório em curso (**resultados não apresentados**). Portanto, há um intervalo de tempo entre a lesão e o desencadeamento dos efeitos indiretos da tolerância oral em que é possível interferir no reparo das lesões na pele. Estudos anteriores sobre a tolerância oral mostraram que é mais difícil reduzir os níveis de anticorpos anti-OVA em animais imunizados antes da exposição oral ao antígeno (Cara et al., 1994, 1997; Conde et al., 1998). No entanto, em humanos voluntários, a ingestão de uma proteína reduziu a ativação de linfócitos e a hipersensibilidade retardada previamente induzida para esta proteína (Hostmann et al., 2015). Então, mais estudos serão importantes para entender melhor porque a injeção de zeína 24 horas após a lesão na pele não inibiu a inflamação produzida por esta lesão.

Estudos sobre o tempo de persistência da tolerância oral mostram que a injeção parenteral em adjuvante de uma proteína dada previamente por via oral, aumenta o tempo de persistência da tolerância oral (Santiago 2011). Os adjuvantes têm vários efeitos ainda não bem compreendidos que podem

potenciar o efeito desencadeado pela proteína tolerada. A injeção apenas do adjuvante, sem a proteína tolerada, não bloqueia o infiltrado inflamatório nem o aumento do número de fibroblastos no leito da ferida. É possível que os adjuvantes ativem componentes adicionais do processo anti-inflamatório provocado pela injeção da proteína tolerada.

Exley et al (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.

Assim, o adjuvante é 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 feridas crônicas em pacientes com diabetes apresentam características de inflamação crônica e o reparo não progride para as próximas fases de cicatrização (Falanga, 2005; Galkowska et al., 2006). Todos os autores então sugerem que a inflamação crônica na pele de pacientes com diabetes ou em modelos experimentais de diabetes prejudicam o processo de cicatrização (Dinh et al., 2012; Leal et al., 2015; Tellechea et al., 2013). Outros trabalhos também mostram uma relação inversa entre uma maior capacidade para a regeneração de tecidos e a reação inflamatória (Ferguson and O'Kane, 2004; Harty et al., 2003; Mescher and Neff, 2005). Uma das consequências da resposta inflamatória persistente no local da ferida é o desequilíbrio da atividade proteolítica que sobrecarrega os mecanismos protetores do tecido (Eming et al., 2007). Outros trabalhos enfatizam que a redução de células inflamatórias no início do processo inflamatório reduz a área da ferida (Clark et al., 1998; Gawronska-Kozak,

2004; Heber-Katz, 1999; Rajnoch et al., 2003). Um estudo com camundongos PU.1 nocaute, que não possuem macrófagos, mostra regeneração de ferida incisional no dorso da pata (Martin et al., 2003). Quando, durante a cicatrização, a resposta inflamatória resolve rapidamente a arquitetura tecidual é restaurada de maneira mais organizada. No entanto, se a inflamação prolonga-se ou torna-se desregulada pode levar a uma ferida crônica que não fecha ou a uma cicatriz hipertrófica. Em ambos os casos há prejuízo à função do tecido (Wynn and Ramalingam, 2012). Todos esses estudos têm sido importantes para entender como a redução de eventos inflamatórios e de atividades imunológicas afetam o fechamento de feridas levando à regeneração, em vez de cicatrização.

Nossos resultados mostram que as lesões na pele de camundongos diabéticos resultam em inflamação exacerbada sendo que em camundongos NOD diabéticos a inflamação é maior do que em camundongos C57BL/6 com diabetes induzida pela injeção de estreptozotocina. Dados da literatura mostram que, em camundongos diabéticos, o processo prejudicado de cicatrização caracteriza-se por persistência do infiltrado inflamatório, atraso na formação do tecido de granulação, redução da angiogênese e redução na deposição de fibras colágeno (Galeano et al., 2001). Algumas destas características também foram observadas em nossos experimentos com camundongos diabéticos.

Entretanto, mesmo nas condições de maior inflamação, como ocorre nos camundongos diabéticos, mostramos que a injeção de zeína diminuiu o infiltrado inflamatório no leito da ferida, nos dois modelos experimentais de diabetes que utilizamos. Estes resultados são importantes porque as complicações decorrentes de úlceras de 'pé diabético' são as maiores causas de amputações e hospitalizações de pacientes diabéticos, sendo que cerca de 20 a 40% dos recursos públicos gastos com o diabetes são relacionados às ulcerações e amputações diabéticas (Lepantalo et al., 2011). Então, estudos sobre a possibilidade dos efeitos indiretos da tolerância oral melhorarem o reparo tecidual em pacientes diabéticos precisam ser mais incentivados.

O processo de angiogênese é importante para a cicatrização de feridas. Os vasos neoformados participam da formação do tecido cicatricial provisório, fornecendo nutrientes e oxigênio para o crescimento tecidual. Além disso, as células inflamatórias requerem interação e transmigração com vaso sanguíneo neoformado para chegar ao local lesionado (Li et al., 2007). O déficit da formação de novos vasos após lesões em diabéticos é uma característica descrita na literatura e, essa baixa taxa de angiogênese compromete a chegada de nutrientes na região da ferida e de células para promover o reparo da lesão (Costa and Soares, 2013). Nossos resultados mostraram que a injeção de zeína em camundongos diabéticos modificou a angiogênese de tal forma que eles apresentaram mais vasos no leito da ferida do que os diabéticos que não receberam zeína.

Os efeitos indiretos da tolerância oral modificam diversos elementos do reparo tecidual que tem a participação de diferentes células e um grande número de fatores de crescimento e citocinas (Rolfe and Grobbelaar, 2012). Assim, procuramos elucidar como os efeitos indiretos da tolerância oral modificam os elementos do reparo tecidual. Então, vimos que a injeção de zeína em animais saudáveis e diabéticos produziu alterações em diversos tipos celulares.

A análise quantitativa de leucócitos (CD45+) mostrou que os todos os grupos que receberam injeção de Zeína sejam eles saudáveis ou diabéticos ou injetados com zeína 6 horas depois da realização da lesão, apresentavam menor número de leucócitos na área da lesão.

Outro dado importante visto neste trabalho foi um menor número de fibroblastos e uma menor intensidade de fluorescência para alfa-SMA (miofibroblastos) nos animais que receberam a injeção da zeína. O menor número de fibroblastos e miofibroblastos pode explicar uma menor área de tecido de granulação e conseqüentemente uma menor área de cicatriz, uma vez que o aumento de miofibroblastos e sua persistência na lesão estão

relacionados com uma piora no processo de reparo, formando cicatrizes hipertróficas (Desmouliere et al., 1995; Hinz, 2007; Wynn, 2008).

Knipper e colaboradores (2015), mostraram que a montagem das fibrilas de colágeno após a lesão é altamente dependente de macrófagos M2 que dependem da citocina IL-4. Aqui mostramos que a injeção de uma proteína tolerada, presente na dieta em camundongos saudáveis ou diabéticos produz um remodelamento de fibras colágenas de maneira diferente que nos grupos controle.

Os fibroblastos são ativados para a diferenciação em miofibroblastos principalmente por fatores produzidos por macrófagos (Desmouliere et al., 1995). O papel dos macrófagos durante a cicatrização de feridas da pele pode variar de acordo com a sua ativação funcional e com a fase do processo de reparo (Willenborg and Eming, 2014). Por exemplo, a depleção de macrófagos na fase inicial do reparo (fase inflamatória) reduz a cicatriz cutânea (Lucas et al., 2010). Além do número, a ativação dos macrófagos altera a cicatrização. Os macrófagos M2 ativados pela via alternativa em presença de IL-4 e IL-13 podem produzir efeitos diferentes de macrófagos M1 ativados em presença de INF-gama. Os macrófagos M1 secretam citocinas pró-inflamatórias durante a fase inflamatória inicial e estão associados com a eliminação de detritos da região ferida. Os macrófagos M2 estariam envolvidos na resolução da inflamação (Gordon, 2003) e também são importantes durante a angiogênese e a fase de remodelamento do reparo (Gordon, 2003). Estudos em humanos mostraram que na fase inicial do reparo da ferida cutânea há mais expressão de genes relacionados com o aumento de M1, enquanto os genes relacionados ao M2 se expressam mais tarde, ou seja, também em humanos o aumento de M2 ocorre depois de M1 (Deonarine et al., 2007; Seno et al., 2009).

Maior número de macrófagos M2 têm sido associado com uma melhor cicatrização (Mahdavian Delavary et al., 2011; Okizaki et al., 2015). Dados da

literatura mostram que animais diabéticos tem menor número de macrófagos M2 (Mirza and Koh, 2011; Okizaki et al., 2015). Nos animais diabéticos, os macrófagos M2 tendem a aumentar devagar e seu número se torna elevado somente nas fases posteriores do reparo, em comparação com animais não diabéticos (Miao et al., 2012).

Em nosso estudo, os animais que receberam a injeção de zeína, sejam diabéticos ou não, apresentaram maior número de macrófagos M2. Os macrófagos M2 foram identificados pela expressão da molécula de resistina-like (RELM- $\alpha$ , também chamada de Fizz1) (Raes et al., 2002). A expressão RELM- $\alpha$  é fortemente regulada por IL-13 e IL-4 (Stutz et al., 2003).

Diversas evidências indicam que RELM- $\alpha$  está envolvido na angiogênese e induz a remodelação vascular (Angelini et al., 2010), o que pode explicar o aumento da angiogênese nos diabéticos que receberam injeção de zeína, pois nestes não houve redução do número de vasos. Assim, o maior número de macrófagos M2 nos animais diabéticos que receberam zeína pode estar relacionado com a maior densidade dos vasos que estes animais apresentaram.

A maior ativação M2 durante a fase proliferativa além de promover a angiogênese ativa a produção de colágeno (Novak and Koh, 2013). Visto que macrófagos M1 podem aumentar os danos no tecido por terem efeitos pró-inflamatórios e que macrófagos M2 estão envolvidos na resolução da inflamação, na indução de angiogênese e remodelação tecidual (Lucas et al., 2010; Mantovani et al., 2013), o maior número de M2 pode ter sido um fator chave na melhor cicatrização em animais diabéticos injetados com a proteína tolerada no momento da lesão ou 6 horas após o início da mesma.

A análise quantitativa de mastócitos na área da lesão mostrou que os animais do grupo Zeína, sejam eles saudáveis ou diabéticos ou injetados

com zeína 6 horas depois da realização da lesão, apresentavam menor número destas células.

Os mastócitos estão entre as primeiras células a se aproximar da área da lesão uma vez que já estão presentes na derme e, possivelmente, interferem no reparo da lesão pela ativação de células endoteliais pela liberação de VEGF, ativação dos fibroblastos e consequente deposição e remodelamento do colágeno (Ng, 2010; Nishikori et al., 1998). Em experimentos com feridas na pele em camundongos deficientes de mastócitos, (Egozi et al., 2003) mostraram que a ausência de mastócitos interfere na migração de neutrófilos para o local da lesão nos primeiros dias de lesão. De acordo com (Ng, 2010), a maior presença de mastócitos na área de lesão tem sido relacionada com formação de cicatrizes hipertróficas.

Wulff e colaboradores (2012), demonstraram que em animais deficientes para mastócitos (Kit w/w-v) há uma redução na formação de cicatriz, 7 e 10 dias após a realização da lesão. Além disso, estes mesmos autores mostraram que a pele de embriões de camundongos, no 15º dia de desenvolvimento, período no qual ocorre reparo sem a formação de cicatriz, contém um menor número de mastócitos do que a pele de embriões no 18º dia de desenvolvimento, onde ocorre o reparo com cicatrização. Uma vez que o reparo de feridas cutâneas em camundongos deficientes em mastócitos resultou em menor cicatriz é provável que a redução do número de mastócitos encontrada nos grupos que receberam a zeína contribuiu diretamente para a redução da área de cicatriz observada 40 dias após a realização da lesão.

De acordo com Ng (2010), a presença de mastócitos na área de lesão pode estar relacionada com a formação de cicatrizes hipertróficas. Em nossos experimentos, os animais dos grupos controle que não receberam injeção i.p de zeína apresentaram um maior número de mastócitos no sétimo dia após a lesão, o que poderia estar relacionado com deposição de colágeno mais característico de cicatriz.

O baixo número de mastócitos em animais que receberam injeção i.p de zeína pode ser importante nas cicatrizes reduzidas também por interferir na angiogênese. Estudos recentes mostram que tratamento de animais diabéticos com DSCG (cromoglicato dissódico, estabilizador de mastócitos) que reduz o número de mastócitos na ferida, impede que o número de vasos destes animais diminua (Tellechea et al., 2016), assim como vimos em animais diabéticos que receberam injeção i.p de zeína.

Analizamos também os níveis de citocinas nas feridas excisionais de camundongos injetados com zeína e detectamos algumas diferenças significativas. Interleucina - 4 ativa fortemente macrófagos M2 (Novak and Koh, 2013). Em modelos de lesão de fígado a IL-4 e IL-10, tem papéis críticos na conversão de macrófagos inflamatórios em M2 (Dal-Secco et al., 2015; Ramachandran et al., 2012). Em animais injetados com zeína, IL-4 aumentou na área da ferida no primeiro dia.

Os principais produtores de IL-17 na pele são células T gama-delta (O'Brien and Born, 2015), que também secretam fatores de crescimento de queratinócitos que aumenta a proliferação de queratinócitos após a lesão (Havran and Jameson, 2010). Observamos que a IL-17 é também aumentada no primeiro dia. O aumento nos níveis de IL-17 pode estar envolvido na cicatrização mais acelerada das feridas em animais que receberam uma injeção de zeína.

TGF-  $\beta$  ocorre em diferentes isoformas e são proteínas amplamente expressas e reguladores críticos do desenvolvimento embrionário e manutenção normal do tecido adulto (Massague, 2012). Durante o reparo da ferida, O TGF- $\beta$  possui múltiplos efeitos, como por exemplo: regulando a proliferação celular, migração, formação de capilares e deposição de matriz extracelular (Li et al., 2007). As diferentes isoformas de TGF-  $\beta$  têm ação diferente na cicatrização de feridas na pele. Por exemplo, as feridas em embriões de mamíferos que curam sem cicatriz apresentam níveis elevados de TGF- $\beta$ 3 e baixos níveis de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. Em contraste, as feridas em pele de mamíferos adultos apresentam níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 e de TGF-

$\beta 2$  e menores níveis de de TGF- $\beta 3$  (Ferguson and O'Kane, 2004; Whitby and Ferguson, 1991a, b).

No terceiro dia após a lesão, houve mais TGF- $\beta 1$  nos animais tratados com zeína. Este dado pode estar relacionada com a acelerada re-epitelização da lesão destes animais, uma vez que o TGF- $\beta 1$  desencadeia a expressão das integrinas necessários para a migração de queratinócitos através da matriz temporária rica em fibronectina (Gailit et al., 1994; Zambruno et al., 1995).

No dia sete após a lesão vimos que o TGF- $\beta 3$  esta aumentado em animais tolerantes a zeína sejam eles saudáveis ou diabéticos. No tecido linfóide, o TGF- $\beta 3$  é expresso em células T CD4 +, células T CD8 +, células T  $\gamma \delta$  e células B (Lee et al., 2012). Estes tipos celulares participam dos eventos quanto da tolerância oral (Castro-Junior et al., 2012). Também é sabido que uma das mais importantes funções do TGF-  $\beta$  é a sua capacidade quimiotática, permitindo recrutamento de células tronco mesenquimais, fibroblastos e células do sistema imunológico, tais como os macrófagos, monócitos e células T (Hughes et al., 1992; Narine et al., 2006).

No geral, este estudo indica que as diferenças morfológicas em camundongos saudáveis ou diabéticos que receberam uma injeção i.p. de zeína, são devido à ativação alterada de muitos elementos que estão envolvidas no processo de reparo.

Conclusivamente, este estudo mostra que a injeção i.p de zeína em adjuvante tem consequências imunológicas sistêmicas que diminuem significativamente o número de células inflamatórias no leito da ferida. Além

disso, reduziu a área da cicatriz e melhorou a organização das fibras colágenas depositadas nas cicatrizes. Atualmente, não existem medicamentos eficazes para melhorar a cicatrização cutânea, mas intervenções feitas nas primeiras fases de cicatrização de feridas, especialmente aquelas que alteram a fase inflamatória, podem evitar cicatrizes excessivas (Eming et al., 2007; Ferguson and O'Kane, 2004; Harty et al., 2003). Estudos em outros modelos experimentais são necessários para expandir nossas observações, mas nossos achados indicam que os efeitos indiretos da tolerância oral podem ser uma forma alternativa para reduzir a inflamação e evitar a cicatrização excessiva, sem retardar o fechamento da lesão.

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 ocupam o primeiro lugar com 1,5 milhões de cirurgias (2009) (Ibope, 2009), segundo dados da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Estética. Um grande problema após as cirurgias é a formação de cicatrizes.

O que se passa nos animais expostos à proteína tolerada da dieta?

A tolerância é um fenômeno ativo e correlacionado a altos níveis de ativação de linfócitos, e não apenas em sua inibição (Bandeira et al., 1989) . Vaz e colaboradores (2003) e Castro Junior e colaboradores (2012) propõem que na tolerância oral ocorre ativação de muitos linfócitos que, ao se encontrarem interconectados, impedem que a injeção da proteína tolerada desencadeie fortes expansões clonais (respostas imunes), como ocorre nos animais imunizados. Ou seja, nos animais imunizados por uma via parenteral, sem estarem tolerantes, ocorre expansão de linfócitos com uma diversidade clonal mais restrita (oligoclonal) e menos interconectada internamente, o que permite respostas específicas muito mais intensas que as respostas vistas nos animais tolerantes. Por outro lado, a policlonalidade de células T prevalece no estado fisiológico. Assim, a distribuição da atividade

imunológica observada em animais tolerantes poderia derivar de uma maior diversidade de clones de linfócitos sendo ativados. Nessa forma de ver, a tolerância oral seria não apenas a regulação ou supressão da resposta imune específica, mas sim uma manifestação de um fenômeno imunológico sistêmico mais abrangente e distribuído (Castro-Junior et al., 2012). A proposta de que o sistema imune tem uma interconectividade baseia-se na teoria da rede idiotípica de Jerne (Jerne, 1974), em outros trabalhos da literatura (Coutinho et al., 1985; Pereira et al., 1986) e também em outras considerações (Vaz and Carvalho, 2015; Vaz et al., 2003).

Além do interesse clínico que estes estudos podem despertar temos ainda um grande interesse na continuidade dos estudos que podem revelar aspectos interessantes da interconectividade entre os fenômenos imunológicos e de reparo tecidual.

## 7 - Conclusões

A injeção parenteral de zeína diminui o infiltrado inflamatório durante a cicatrização de lesões na pele de camundongos saudáveis e diabéticos. Este estudo é o primeiro a demonstrar que a injeção parenteral de uma proteína presente na dieta natural dos roedores pode modificar o reparo de lesões no dorso de camundongos com diabetes experimental. Também é o primeiro a demonstrar que os efeitos indiretos da tolerância oral aumentam a expressão de TGF-  $\beta$ 3 no leito da ferida.

## 8 – Referências Bibliográficas

- Al-Watban, F.A., and Andres, B.L. (2006). Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Photomedicine and laser surgery* 24, 10-16.
- Almeida, S.M., Ferreira, R.I., and Boscolo, F.N. (2002). Influência da irradiação sobre o conteúdo de colágeno, durante a cicatrização, em ratos diabéticos. . *Pesquisa Odontológica Brasileira* 16(4), 293-298.
- Andre, C., Heremans, J.F., Vaerman, J.P., and Cambiaso, C.L. (1975). A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. *The Journal of experimental medicine* 142, 1509-1519.
- Angelini, D.J., Su, Q., Kolosova, I.A., Fan, C., Skinner, J.T., Yamaji-Kegan, K., Collector, M., Sharkis, S.J., and Johns, R.A. (2010). Hypoxia-induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1/RELM alpha) recruits bone marrow-derived cells to the murine pulmonary vasculature. *PloS one* 5, e11251.
- Anthony, R.M., Urban, J.F., Jr., Alem, F., Hamed, H.A., Rozo, C.T., Boucher, J.L., Van Rooijen, N., and Gause, W.C. (2006). Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine* 12, 955-960.
- Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grutzkau, A., and Henz, B.M. (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Experimental dermatology* 8, 1-16.
- Azevedo, G.M., Jr., Costa, R.A., Resende, M.A., Rodrigues, C.M., Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (2012). Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. *Clinical & developmental immunology* 2012, 293625.
- Azouz, A., Razzaque, M.S., El-Hallak, M., and Taguchi, T. (2004). Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* 37, 141-148.
- Baek, J.O., Roh, J.Y., and Jung, Y. (2016). Oral tolerance inhibits atopic dermatitis-like type 2 inflammation in mice by modulating immune microenvironments. *Allergy*.

- Bandeira, A., Coutinho, A., Carnaud, C., Jacquemart, F., and Forni, L. (1989). Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 272-276.
- Bensouilah, J., BUCK, P., TISSERAND, R., and AVIS, A. (2006). *Aromadermatology: Aromatherapy in the Treatment and Care of Common Skin Conditions*. Radcliffe Publishing Ltd 249.
- Besredka, A. (1909). De l'anaphylaxie. Sixième memorie de l'anaphylaxie lactique. *Ann Inst Pasteur* *23*, 166-174.
- Bielefeld, K.A., Amini-Nik, S., and Alman, B.A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *70*, 2059-2081.
- Branski, R.C., Rosen, C.A., Verdolini, K., and Hebda, P.A. (2005). Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation* *19*, 283-289.
- Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1219-1222.
- Brodell, L.A.a.R., and K.S. (2008). *Skin Structure and Function The Body's Primary Defense Against Infection*. . *Infectious Diseases in Clinical Practice* *16*, 113-117.
- Cantaruti, T.A. (2012). Efeitos indiretos da tolerância oral a um componente da dieta (Zeína) no reparo de feridas na pele de camundongos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biologia Celular – ICB Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais Mestrado.
- Cara, D.C., Conde, A.A., and Vaz, N.M. (1994). Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* *27*, 1331-1341.
- Cara, D.C., Conde, A.A., and Vaz, N.M. (1997). Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scandinavian journal of immunology* *45*, 16-20.
- 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.

Carvalho, C.R., and Vaz, N.M. (1996). Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. Scandinavian journal of immunology 43, 613-618.

Carvalho, C.R., Verdolin, B.A., de Souza, A.V., and Vaz, N.M. (1994). Indirect effects of oral tolerance in mice. Scandinavian journal of immunology 39, 533-538.

Carvalho, C.R., Verdolin, B.A., and Vaz, N.M. (1997). Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. Scandinavian journal of immunology 45, 276-281.

Carvalho, P.T.C., Siqueira, J.F.R., Ferreira, J.V.L., and Silva, I.S. (2003). Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. Fisioterapia Brasil 4, 253-258.

Castro-Junior, A.B., Horta, B.C., Gomes-Santos, A.C., Cunha, A.P., Silva Steinberg, R., Nascimento, D.S., Faria, A.M., and Vaz, N.M. (2012). Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. Cellular immunology 280, 171-181.

Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. Nature 372, 190-193.

Cheroutre, H. (2004). Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. Annual review of immunology 22, 217-246.

Clark, L.D., Clark, R.K., and Heber-Katz, E. (1998). A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. Clin Immunol Immunopathol 88, 35-45.

Clark, R.A. (1990). Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. The Journal of investigative dermatology 94, 128S-134S.

Clark, R.A.F. (1996). Wound repair: Overview and general considerations. . The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair 23, 3-50.

- Conde, A.A., Stransky, B., Faria, A.M., and Vaz, N.M. (1998). Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 31, 377-380.
- Costa, P.Z., and Soares, R. (2013). Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life sciences* 92, 1037-1045.
- Costa, R.A., Matos, L.B., Cantaruti, T.A., de Souza, K.S., Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (2016). Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. *Immunobiology* 221, 475-485.
- Costa, R.A., Ruiz-de-Souza, V., Azevedo, G.M., Jr., Gava, E., Kitten, G.T., Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (2011). Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 19, 487-497.
- Coutinho, A., Holmberg, D., Martinez, C., de Freitas, A., Larsson, E.L., Pereira, P., and Bandeira, A. (1985). Internal activity of the immune system and its physiologic significance. *Haematology and blood transfusion* 29, 477-480.
- Cowin, A.J., Brosnan, M.P., Holmes, T.M., and Ferguson, M.W. (1998). Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 212, 385-393.
- Cummings, J.H., and Macfarlane, G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 21, 357-365.
- Cunha, A.P., Oliveira, R.P., Junior, A.B., Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (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, J.F., Kempf, M., Kimble, R.M., and Hayes, M.T. (2005). Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound repair and regeneration : official publication of*

the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 13, 198-204.

da Silva, E.Z., Jamur, M.C., and Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 62, 698-738.

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

Dal-Secco, D., Wang, J., Zeng, Z., Kolaczowska, E., Wong, C.H., Petri, B., Ransohoff, R.M., Charo, I.F., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2015). A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *The Journal of experimental medicine* 212, 447-456.

Dall Agnol, M.A., Nicolau, R.A., de Lima, C.J., and Munin, E. (2009). Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers in medical science* 24, 909-916.

Dang, C.M., Beanes, S.R., Soo, C., Ting, K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., and Lorenz, H.P. (2003). Decreased expression of fibroblast and keratinocyte growth factor isoforms and receptors during scarless repair. *Plastic and reconstructive surgery* 111, 1969-1979.

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

Deonarine, K., Panelli, M.C., Stashower, M.E., Jin, P., Smith, K., Slade, H.B., Norwood, C., Wang, E., Marincola, F.M., and Stroncek, D.F. (2007). Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *Journal of translational medicine* 5, 11.

Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* 146, 56-66.

Dinh, T., Tecilazich, F., Kafanas, A., Doupis, J., Gnardellis, C., Leal, E., Tellechea, A., Pradhan, L., Lyons, T.E., Giurini, J.M., *et al.* (2012). Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* 61, 2937-2947.

Egozi, E.I., Ferreira, A.M., Burns, A.L., Gamelli, R.L., and Dipietro, L.A. (2003). Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 11, 46-54.

Eigenmann, P.A. (2002). T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 13, 162-171.

Eming, S.A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., and Roers, A. (2009). Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 517-527.

Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology* 127, 514-525.

Exley, C., Siesjo, P., and Eriksson, H. (2010). The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends in immunology* 31, 103-109.

Fagarasan, S., and Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature reviews Immunology* 3, 63-72.

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

Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736-1743.

Faria, A.M., and Weiner, H.L. (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Advances in immunology* 73, 153-264.

Faria, A.M., and Weiner, H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunological reviews* 206, 232-259.

Faria, A.M., and Weiner, H.L. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology* 13, 143-157.

Ferguson, M.W., and O'Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 359, 839-850.

Ferguson, M.W., Whitby, D.J., Shah, M., Armstrong, J., Siebert, J.W., and Longaker, M.T. (1996). Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plastic and reconstructive surgery* 97, 854-860.

Ffrench-Constant, C., Van de Water, L., Dvorak, H.F., and Hynes, R.O. (1989). Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *The Journal of cell biology* 109, 903-914.

Fujita, T., Yui, R., Kusumoto, Y., Serizawa, Y., Machino, S., and Tochino, Y. (1982). Lymphocytic insulinitis in a non obese diabetic (NOD) strain of mice: an immunohistochemical and electron microscope investigation. *Boimed Res* 3, 429- 443.

Gailit, J., Welch, M.P., and Clark, R.A. (1994). TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *The Journal of investigative dermatology* 103, 221-227.

Galeano, M., Torre, V., Deodato, B., Campo, G.M., Colonna, M., Sturiale, A., Squadrito, F., Cavallari, V., Cucinotta, D., Buemi, M., *et al.* (2001). Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Surgery* 129, 467-477.

Galkowska, H., Olszewski, W.L., Wojewodzka, U., Rosinski, G., and Karnafel, W. (2006). Neurogenic factors in the impaired healing of diabetic foot ulcers. *The Journal of surgical research* 134, 252-258.

Gardner, M.L. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual review of nutrition* 8, 329-350.

Gartner, L.P.H., and L., J. (2007). *Tratado de Histologia em Cores*. Elsevier, Rio de Janeiro, 576.

Gauglitz, G.G., Korting, H.C., Pavicic, T., Ruzicka, T., and Jeschke, M.G. (2011). Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Molecular medicine* 17, 113-125.

Gawronska-Kozak, B. (2004). Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering* 10, 1251-1265.

Gepts, W., and In't Veld, P.A. (1987). Islet morphologic changes. *Diabetes/metabolism reviews* 3, 859-872.

- Glenny, A.T., Pope, G.C.G., Wanddington, H., and Wallace, U. (1926). The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. . *Journal of Pathology Bacteriology* 29, 38-40.
- Gonçalves, R.A., Santos, J.P., Tomé, P.H.F., Pereira, R.G.F.A., Ascheri, J.L.R., and Abreu, C.M.P. (2003). Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de griffts. *Cienc Agrotec* 27, 643-650.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3, 23-35.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 5, 953-964.
- Greenhalgh, D.G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in plastic surgery* 30, 37-45.
- Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.
- Gupta, R.K. (1988). Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Ad Drug Del Rev* 32, 155-172.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Hanson, D.G., and Morimoto, T. (1980). A role of digestion in orally induced tolerance to ovalbumin. *JAllergy ClinImmunol* 65 (3): 227-228 65 (3), 227-228.
- Harty, M., Neff, A.W., King, M.W., and Mescher, A.L. (2003). Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 226, 268-279.
- Hatanaka, E., and Curi, R. (2007). Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *88, n.2*, 53-58.
- Havran, W.L., and Jameson, J.M. (2010). Epidermal T cells and wound healing. *Journal of immunology* 184, 5423-5428.
- Heber-Katz, E. (1999). The regenerating mouse ear. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 415-419.
- Herbert, D.R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., *et al.* (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during

schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20, 623-635.

Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of investigative dermatology* 127, 526-537.

Holst, J.J., and Deacon, C. (2007). New horizons in Diabetes therapy. *Immun, Endoc & Metab Agents in Med Chem*.

Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292, 1115-1118.

Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S., and Martin, P. (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *Journal of cell science* 107 ( Pt 5), 1159-1167.

Hostmann, A., Meyer, T., Maul, J., Preiss, J., Boortz, B., Thiel, A., Duchmann, R., and Ullrich, R. (2015). Preexisting antigen-specific immune responses are modulated by oral KLH feeding in humans. *European journal of immunology* 45, 1991-1996.

Hughes, F.J., Aubin, J.E., and Heersche, J.N. (1992). Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone and mineral* 19, 63-74.

Iba, Y., Shibata, A., Kato, M., and Masukawa, T. (2004). Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *International immunopharmacology* 4, 1873-1880.

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

Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (2000). 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. *The Journal of experimental medicine* 191, 1381-1394.

Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., and Havran, W.L. (2002). A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296, 747-749.

Jerne, N.K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Annales d'immunologie* 125C, 373-389.

- Junqueira, L.C., and Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan 10ed.
- Kadaoui, K.A., and Corthesy, B. (2007). Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *Journal of immunology* 179, 7751-7757.
- Kaufman, J., Graf, B.A., Leung, E.C., Pollock, S.J., Koumas, L., Reddy, S.Y., Blieden, T.M., Smith, T.J., and Phipps, R.P. (2001). Fibroblasts as sentinel cells: role of the CDcd40-CDcd40 ligand system in fibroblast activation and lung inflammation and fibrosis. *Chest* 120, 53S-55S.
- Kelsall, B.L., and Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *The Journal of experimental medicine* 183, 237-247.
- Kim, E.Y., Battaile, J.T., Patel, A.C., You, Y., Agapov, E., Grayson, M.H., Benoit, L.A., Byers, D.E., Alevy, Y., Tucker, J., *et al.* (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nature medicine* 14, 633-640.
- Kinsey, S.G., Prendergast, B.J., and Nelson, R.J. (2003). Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters. *Physiology & behavior* 78, 205-211.
- Kirchner, L.M., Meerbaum, S.O., Gruber, B.S., Knoll, A.K., Bulgrin, J., Taylor, R.A., and Schmidt, S.P. (2003). Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 11, 127-131.
- Knipper, J.A., Willenborg, S., Brinckmann, J., Bloch, W., Maass, T., Wagener, R., Krieg, T., Sutherland, T., Munitz, A., Rothenberg, M.E., *et al.* (2015). Interleukin-4 Receptor alpha Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair. *Immunity* 43, 803-816.
- Komesu, M.C., Tanga, M.B., Buttros, K.R., and Nakao, C. (2004). Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 11, 63-67.
- Kunisawa, J., Takahashi, I., and Kiyono, H. (2007). Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunological reviews* 215, 136-153.

Landry, J., and 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* 52.

Leal, E.C., Carvalho, E., Tellechea, A., Kafanas, A., Tecilazich, F., Kearney, C., Kuchibhotla, S., Auster, M.E., Kokkotou, E., Mooney, D.J., *et al.* (2015). Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype. *The American journal of pathology* 185, 1638-1648.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *et al.* (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 13, 991-999.

Lepantalo, M., Apelqvist, J., Setacci, C., Ricco, J.B., de Donato, G., Becker, F., Robert-Ebadi, H., Cao, P., Eckstein, H.H., De Rango, P., *et al.* (2011). Chapter V: Diabetic foot. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 42 *Suppl 2*, S60-74.

Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 25, 9-18.

Liechty, K.W., Kim, H.B., Adzick, N.S., and Crombleholme, T.M. (2000). Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *Journal of pediatric surgery* 35, 866-872; discussion 872-863.

Lievin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews* 19, 315-337.

Loke, P., Gallagher, I., Nair, M.G., Zang, X., Brombacher, F., Mohrs, M., Allison, J.P., and Allen, J.E. (2007). Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *Journal of immunology* 179, 3926-3936.

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Roers, A., and Eming, S.A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of immunology* 184, 3964-3977.

- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15, 323-350.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology* 1, 11-22.
- Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., and Beelen, R.H. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216, 753-762.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu Experimental animals* 29, 1-13.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229, 176-185.
- Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., and McKercher, S.R. (2003). Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Current biology : CB* 13, 1122-1128.
- Massague, J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 616-630.
- Mast, B.A., Diegelmann, R.F., Krummel, T.M., and Cohen, I.K. (1993). Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix* 13, 441-446.
- Mast, B.A., Flood, L.C., Haynes, J.H., DePalma, R.L., Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., and Krummel, T.M. (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.
- McCracken, V.J., and Lorenz, R.G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular microbiology* 3, 1-11.
- Mcgrath, J.A., EADY, R.A.J., and POPE, F.M. (2008). "Anatomy and Organization of Human Skin.". *Rook's Textbook of Dermatology*, 45-128.
- McKee, A.S., Munks, M.W., and Marrack, P. (2007). How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* 27, 687-690.

Meireles, G.C.S., Oliveira, P.C., Moura, A.P., Santos, J.N., and Pinheiro, A.L.B. (2009). A influência do diabetes mellitus tipo 1 na cronologia do reparo de queimaduras. *Revista Eletrônica da Fainor* 2(1), 77-86.

Menezes, J.S., Mucida, D.S., Cara, D.C., Alvarez-Leite, J.I., Russo, M., Vaz, N.M., and de Faria, A.M. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *International immunology* 15, 447-455.

Mescher, A.L., and Neff, A.W. (2005). Regenerative capacity and the developing immune system. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 93, 39-66.

Miao, M., Niu, Y., Xie, T., Yuan, B., Qing, C., and Lu, S. (2012). Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 20, 203-213.

Michael, J.G. (1989). The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Immunological investigations* 18, 1049-1054.

Miller, A., Lider, O., and Weiner, H.L. (1991). Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *The Journal of experimental medicine* 174, 791-798.

Mirza, R., and Koh, T.J. (2011). Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 56, 256-264.

Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Scientific American* 245, 154-158, 160, 162 et passiom.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in immunology* 46, 111-147.

Moulin, V., Lawny, F., Barritault, D., and Caruelle, J.P. (1998). Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion. *Cellular and molecular biology* 44, 961-971.

Mowat, A.M. (1999). Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance. *Current opinion in gastroenterology* 15, 546-556.

- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews Immunology* 3, 331-341.
- Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., McGrouther, G., and Laurent, G.J. (1997). Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 5-17.
- Narine, K., De Wever, O., Van Valckenborgh, D., Francois, K., Bracke, M., DeSmet, S., Mareel, M., and Van Nooten, G. (2006). Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue engineering* 12, 2707-2716.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., and Kraehenbuhl, J.P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature immunology* 2, 1004-1009.
- Ng, M.F. (2010). The role of mast cells in wound healing. *International wound journal* 7, 55-61.
- Nishikori, Y., Kakizoe, E., Kobayashi, Y., Shimoura, K., Okunishi, H., and Dekio, S. (1998). Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Archives of dermatological research* 290, 553-560.
- Novak, M.L., and Koh, T.J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of leukocyte biology* 93, 875-881.
- O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2015). Dermal gammadelta T cells--What have we learned? *Cellular immunology* 296, 62-69.
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., *et al.* (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116-1120.
- Okizaki, S., Ito, Y., Hosono, K., Oba, K., Ohkubo, H., Amano, H., Shichiri, M., and Majima, M. (2015). Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF-beta1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 70, 317-325.
- Oliveira, R.P., Santiago, A.F., Ficker, S.M., Gomes-Santos, A.C., and Faria, A.M. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral

tolerance and leads to long-lasting effects. *Journal of immunological methods* 421, 36-43.

Orgill, D., and Demling, R.H. (1988). Current concepts and approaches to wound healing. *Critical care medicine* 16, 899-908.

Pagnano, L.d.O.B.-A., Silvana Martinez, P.M.R., and OLIVEIRA, D. (2009a). BASICS ASPECTS OF WOUND HEALING AND GENERAL FACTORS RELATED TO TISSUE REPAIR. . *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*.

Pagnano, L.O., BARALDI-ARTONI, S.M., PACHECO, M.R., and OLIVERIA, D. (2009b). "Aspectos básicos do processo cicatricial e fatores gerais relacionados com a reparação tecidual.". *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* 12, 1-18.

Park, J.E., and Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery* 187, 11S-16S.

Peppas, M., Stavroulakis, P., and Raptis, S.A. (2009). Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17, 461-472.

Pereira, P., Forni, L., Larsson, E.L., Cooper, M., Heusser, C., and Coutinho, A. (1986). Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *European journal of immunology* 16, 685-688.

Persinger, M.A., Lepage, P., Simard, J.P., and Parker, G.H. (1983). Mast cell numbers in incisional wounds in rat skin as a function of distance, time and treatment. *The British journal of dermatology* 108, 179-187.

Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 71, 597-602.

Rajnoch, C., Ferguson, S., Metcalfe, A.D., Herrick, S.E., Willis, H.S., and Ferguson, M.W. (2003). Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 226, 388-397.

Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowden, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., *et al.* (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E3186-3195.

Ramos, G.C., Rodrigues, C.M., Azevedo, G.M., Jr., Pinho, V., Carvalho, C.R., and Vaz, N.M. (2009). Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology* 126, 354-362.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* 2, 361-367.

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

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. *Journal of immunology* 121, 2429-2434.

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.

Rolfe, K.J., and Grobbelaar, A.O. (2012). A review of fetal scarless healing. *ISRN dermatology* 2012, 698034.

Rubin, E.G. (2006). *Patologia: bases clinicopatológicas da medicina*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

S., R.L., and R., C.S. (2005). *Patologia*. Elsevier, Rio de Janeiro 7.

Sampson, H.A. (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology* 103, 717-728.

Santiago, A.F. (2011). Efeitos do envelhecimento na mucosa intestinal: indução e declínio da tolerância oral. . Programa de Pós – Graduação em

Bioquímica e Imunologia– ICB Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais Doutorado.

Satish, L., and Kathju, S. (2010). Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing. *Dermatology research and practice* 2010, 790234.

SAÚDE., M.D. (2001). Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. . Manual de Procedimentos para Vacinação 4<sup>a</sup> ed. .

Saurer, L., Seibold, I., Rihs, S., Vallan, C., Dumrese, T., and Mueller, C. (2004). Virus-induced activation of self-specific TCR alpha beta CD8 alpha alpha intraepithelial lymphocytes does not abolish their self-tolerance in the intestine. *Journal of immunology* 172, 4176-4183.

SBD. (2016). Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Schijns, V.E. (2001). Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical reviews in immunology* 21, 75-85.

Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Landthaler, M., and Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63, 866-881.

Schultz, G.S., Davidson, J.M., Kirsner, R.S., Bornstein, P., and Herman, I.M. (2011). Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 19, 134-148.

Seibold, F. (2005). Food-induced immune responses as origin of bowel disease? *Digestion* 71, 251-260.

Seno, H., Miyoshi, H., Brown, S.L., Geske, M.J., Colonna, M., and Stappenbeck, T.S. (2009). Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 256-261.

Sharp, L.L., Jameson, J.M., Cauvi, G., and Havran, W.L. (2005). Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nature immunology* 6, 73-79.

Sivan-Loukianova, E., Awad, O.A., Stepanovic, V., Bickenbach, J., and Schatteman, G.C. (2003). CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *Journal of vascular research* 40, 368-377.

Smeltzer, S.C., and Bare, B.G. (2002). Histórico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus. *Tratado de enfermagem médico-cirúrgica*.

Smith, D.W., and Nagler-Anderson, C. (2005). Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *Journal of immunology* 174, 3851-3857.

Steinhoff, M., Corvera, C.U., Thoma, M.S., Kong, W., McAlpine, B.E., Caughey, G.H., Ansel, J.C., and Bunnett, N.W. (1999). Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Experimental dermatology* 8, 282-294.

Stills, H.F., Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46, 280-293.

Storni, T., Kundig, T.M., Senti, G., and Johansen, P. (2005). Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 57, 333-355.

Strobel, S., and Mowat, A.M. (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunology today* 19, 173-181.

Stutz, A.M., Pickart, L.A., Trifilieff, A., Baumruker, T., Prieschl-Strassmayr, E., and Woisetschlager, M. (2003). The Th2 cell cytokines IL-4 and IL-13 regulate found in inflammatory zone 1/resistin-like molecule alpha gene expression by a STAT6 and CCAAT/enhancer-binding protein-dependent mechanism. *Journal of immunology* 170, 1789-1796.

Swaim, S.F. (1997). Advances in wound healing in small animal practice. *Vet Dermatol* 8, p.249-257.

Szpaderska, A.M., and DiPietro, L.A. (2005). Inflammation in surgical wound healing: friend or foe? *Surgery* 137, 571-573.

Tellechea, A., Kafanas, A., Leal, E.C., Tecilazich, F., Kuchibhotla, S., Auster, M.E., Kontoes, I., Paolino, J., Carvalho, E., Nabzdyk, L.P., *et al.* (2013). Increased skin inflammation and blood vessel density in human and

experimental diabetes. *The international journal of lower extremity wounds* 12, 4-11.

Tellechea, A., Leal, E.C., Kafanas, A., Auster, M.E., Kuchibhotla, S., Ostrovsky, Y., Tecilazich, F., Baltzis, D., Zheng, Y., Carvalho, E., *et al.* (2016). Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. *Diabetes* 65, 2006-2019.

Thomas, H.C., and Parrott, M.V. (1974). The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology* 27, 631-639.

Toole, B.P. (1997). Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of internal medicine* 242, 35-40.

Tsuji, N.M., and Kosaka, A. (2008). Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends in immunology* 29, 532-540.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.

van der Heijden, P.J., Stok, W., and Bianchi, A.T. (1987). Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology* 62, 551-555.

Vaz, N., Faria, A.M., Verdolin, B.A., and Carvalho, C.R. (1997). Immaturity, ageing and oral tolerance. *Scandinavian journal of immunology* 46, 225-229.

Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (2015). On the origin of immunopathology. *Journal of theoretical biology* 375, 61-70.

Vaz, N.M., de Faria, A.M., Verdolin, B.A., Silva Neto, A.F., Menezes, J.S., and Carvalho, C.R. (2003). The conservative physiology of the immune system. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 36, 13-22.

Vaz, N.M., Maia, L.C., Hanson, D.G., and Lynch, J.M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 60, 110-115.

Vaz, N.M., Maia, L.C., Hanson, D.G., and Lynch, J.M. (1981). Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 76, 83-91.

Verdolin, B.A., Ficker, S.M., Faria, A.M., Vaz, N.M., and Carvalho, C.R. (2001). Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal

- contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 34, 211-219.
- Villarreal-Ramos, B., Manser, J.M., Collins, R.A., Dougan, G., and Howard, C.J. (2000). Cattle immune responses to tetanus toxoid elicited by recombinant *S. typhimurium* vaccines or tetanus toxoid in alum or Freund's adjuvant. *Vaccine* 18, 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. *Immunology* 119, 167-177.
- Wasserfall, C.H., and Atkinson, M.A. (2006). Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmunity reviews* 5, 424-428.
- Weiner, H.L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182, 207-214.
- 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., and Osborne, T.B. (1911). The biological reactions of the vegetable proteins. *J inf Dis* 8, 66 - 69.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83, 835-870.
- Wershil, B.K., and Furuta, G.T. (2008). 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, S380-383; quiz S415.
- Whitby, D.J., and Ferguson, M.W. (1991a). The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development* 112, 651-668.
- Whitby, D.J., and Ferguson, M.W. (1991b). Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Developmental biology* 147, 207-215.
- Whitby, D.J., Longaker, M.T., Harrison, M.R., Adzick, N.S., and Ferguson, M.W. (1991). Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *Journal of cell science* 99 ( Pt 3), 583-586.
- Willenborg, S., and Eming, S.A. (2014). Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *Journal der Deutschen*

Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG 12, 214-221, 214-223.

Wu, K.K., and Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 191, 241-249.

Wulff, B.C., Parent, A.E., Meleski, M.A., DiPietro, L.A., Schrementi, M.E., and Wilgus, T.A. (2012). Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 132, 458-465.

Wynn, T.A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews Immunology* 4, 583-594.

Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214, 199-210.

Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 18, 1028-1040.

Yamamoto, T., Hartmann, K., Eckes, B., and Krieg, T. (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, 435-439.

Zambruno, G., Marchisio, P.C., Marconi, A., Vaschieri, C., Melchiori, A., Giannetti, A., and De Luca, M. (1995). Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *The Journal of cell biology* 129, 853-865.

Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R.J., Kim, Y.K., Chen, N.Y., Cohn, L., Hamid, Q., and Elias, J.A. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304, 1678-1682.

Zimmet, P., Shaw, J., and Alberti, K.G. (2003). Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 20, 693-702.