

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

Keylla Ribeiro De Almeida

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR VIA PARENTERAL A PROTEÍNAS DA DIETA
SOBRE O REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS NUDE
(FOXN1^{-/-})**

Belo Horizonte

2022

Keylla Ribeiro De Almeida

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR VIA PARENTERAL A PROTEÍNAS DA DIETA
SOBRE O REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS NUDE
(FOXN1^{-/-})**

Versão final

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho

Colaboradora:

Prof^a. Dr^a. Gleide Fernandes Avelar

Belo Horizonte

2022

043

Almeida, Keylla Ribeiro de.

Efeitos da exposição por via parenteral a proteínas da dieta sobre o reparo de feridas cutâneas em camundongos nude (FOXN1^{-/-}) [manuscrito] / Keylla Ribeiro de Almeida. – 2022.

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

Orientadora: Profa . Dra . Cláudia Rocha Carvalho. Colaboradora: Profa . Dra Gleide Fernandes Avelar.

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

1. Biologia Celular. 2. Pele. 3. Cicatrização. 4. Tolerância Imunológica. 5. Camundongos Nus. I. Carvalho, Cláudia Rocha. II. Avelar, Gleide Fernandes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



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

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KEYLLA RIBEIRO DE ALMEIDA

354/2022 _ ENTRADA 2º/2019 _ 2019721168

Às **quinze horas** do dia **31 de março de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR VIA PARENTERAL A PROTEÍNAS DA DIETA SOBRE O REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS NUDE (FOXN1^{-/-})**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cláudia Rocha Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	Aprovada
Dra. Karen Franco Valencia	Universidad Simón Bolívar, Colombia	Aprovada
Dra. Raquel Alves Costa	UFSJ	Aprovada

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

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de março de 2022.**

Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho

Dr^a. Karen Franco Valencia

Dr^a. Raquel Alves Costa

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



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 01/04/2022, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Franco Valencia, Usuário Externo**, em 01/04/2022, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Rocha Carvalho, Professora do Magistério Superior**, em 04/04/2022, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Alves Costa, Usuário Externo**, em 04/04/2022, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1352675** e o código CRC **75CBB394**.

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

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha luz e meu caminho, e por me direcionar aos lugares e pessoas certos, na hora certa. Creio que vivi exatamente o que eu precisava, durante todo o mestrado, para continuar me transformando na pessoa e na profissional que eu preciso ser.

À Prof^a. Cláudia Rocha Carvalho, por ter me recebido no grupo de pesquisa, e pela enorme disposição, paciência e excelência ao me orientar. Eu aprendi muito com a forma de pensar e de trabalhar do grupo, e certamente serei uma cientista melhor ao continuar desenvolvendo o que vi e aprendi aqui.

Ao Dr. Geraldo Magela de Azevedo Júnior, pela ajuda sempre presente nas análises e procedimentos diversos de rotina, que me ensinaram muitíssimo, e por compartilhar seus preciosos livros. E também pela paciência e disposição gigantes, além das conversas sempre divertidas, que deixam tudo mais leve.

Ao Dr. Thiago Cantaruti e à doutoranda Isabela Nóbrega, por toda a imensa ajuda, disposição e paciência para me ensinar e aconselhar. Muito obrigada pela amizade, e pelas várias conversas que me ajudaram muito, de várias formas. Muito do que fiz e aprendi devo a vocês, e eu espero um dia poder retribuí-los a altura.

À Dra. Karen Franco Valência e à doutoranda Monique Macedo Coelho, por todo o suporte, acolhimento e conversas preciosas durante esse processo. Muito obrigada pela ajuda e conversas estratégicas, que fizeram diferença em momentos específicos, e pela companhia divertida.

A minha família e amigos, por todo o suporte e acolhimento durante o período deste trabalho. Vocês fizeram toda a diferença no meu crescimento e aprendizado durante o mestrado.

Aos professores, funcionários e colegas de pós-graduação do ICB, pelos ensinamentos e por toda a ajuda que recebi em diversos momentos ao longo da execução deste trabalho.

Resumo

O reparo de feridas cutâneas é um processo biológico caracterizado por uma sequência estereotipada de eventos, que se sobrepõem de forma contínua e temporal e envolvem interações entre vários tipos celulares. Dentre tais eventos está a fase inflamatória, caracterizada por um proeminente infiltrado de diferentes tipos de leucócitos, dentre eles os linfócitos. Estas células, além de pouco estudadas no reparo comparadas a neutrófilos e macrófagos, participam de um fenômeno imunológico chamado tolerância oral, o qual é desencadeado pela ingestão de proteínas durante a alimentação. Nosso grupo de pesquisa mostrou que a reexposição parenteral a proteínas da dieta (tolerógenos), concomitante a lesões cutâneas em camundongos, reduz o infiltrado inflamatório no leito das feridas e melhora a cicatrização. Sabe-se pouco ainda sobre os mecanismos desencadeados por essa reexposição, mas há indícios do envolvimento de linfócitos T. Para entender um pouco mais sobre este envolvimento, neste trabalho analisou-se o efeito da reexposição parenteral a tolerógenos da dieta sobre o reparo de lesões cutâneas em camundongos nude, os quais apresentam deficiência de linfócitos T, e em camundongos heterozigotos. Observou-se que a administração parenteral de proteínas toleradas promoveu modificações em aspectos inflamatórios e na deposição de matriz ao 7º dia pós-lesão, e no tecido cicatricial ao 40º dia pós-lesão. Essas modificações ocorreram tanto em camundongos nude quanto em heterozigotos, mas de forma mais branda do que se observa normalmente em animais WT. Estes resultados indicam que os efeitos da reexposição parenteral a tolerógenos sobre o reparo cutâneo ocorrem em camundongos deficientes em linfócitos T, ainda que de forma mais branda e com um perfil inflamatório diferente do usualmente observado.

Palavras chave: cicatrização, pele, nude, gene *FOXN1*, tolerância oral.

Abstract

Skin wound healing is a biological process characterized by a stereotyped sequence of events, which overlap each other in a continuous temporal manner and involve interactions between several cellular types. The inflammatory phase is among these events, and it is marked by an intense infiltrate of different types of leukocytes, including lymphocytes. These cells have a less studied role at wound healing, compared to macrophages and neutrophils, but they are known to be involved at oral tolerance, an immunological event triggered by protein intake at feeding. Our research group showed that parenteral re-exposure to dietary proteins (tolerogens), concomitant to skin wounding at mice, reduces the inflammatory infiltrate at the wound bed and improves the wound repair. Little is known about the mechanisms triggered by this parenteral re-exposure, but it is known that T lymphocytes are involved. In order to understand a little more about T cell role, in this study the effects of tolerogen parenteral re-exposure over skin wound repair were analysed at nude mouse (FoxN1^{-/-}), which presents a T cell deficiency, and at heterozygous (FoxN1^{+/-}) mouse. It was observed that parenteral administration of tolerated proteins promoted modifications in inflammatory aspects and matrix deposition at the 7th day post-injury, and in tissue repair at the 40th day post-injury. These modifications occurred at both nude and heterozygous mouse, but at a smaller degree than it is normally observed at WT mouse. These results indicate that the effects of parenteral reexposure to tolerogens over skin repair occurs in T lymphocyte deficient mice, although in a milder way and with a different inflammatory profile than usually observed.

Keywords: wound repair, skin, nude, FOXN1 gene, oral tolerance.

Lista de Figuras

Figura 1. Protocolo experimental para comparação histológica de pele intacta e lesionada dos camundongos heterozigoto e nude.....	28
Figura 2. Procedimento de confecção de feridas excisionais no dorso tricotomizado dos camundongos.....	30
Figura 3. Esquema base do procedimento de avaliação quantitativa ao microscópio de luz.....	32
Figura 4. Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por HE.....	35
Figura 5. Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por Masson.....	36
Figura 6. Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por Alcian Blue/Safranina.....	37
Figura 7. Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Hematoxilina/Eosina.....	39
Figura 8. Fotomicrografias de fibroblastos em lesões de 7 dias a partir da coloração por Hematoxilina/Eosina.....	40
Figura 9. Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Alcian Blue/Safranina.....	41
Figura 10. Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Tricrômico de Masson.....	43
Figura 11. Análise histopatológica de lesões de 40 dias a partir da coloração por Tricrômico de Masson.....	46

Lista de Abreviações

- AIES – Anti-inflamatório esteroidal
- AINES – Anti-inflamatório não-esteroidal
- Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio
- AS – Alcian Blue/Safranina
- CD – Cluster de diferenciação
- CEBIO (UFMG) – Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- COX - Cicloxigenase
- d - Dia
- DMSO – Dimetil Sulfóxido
- FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)
- Foxn1 – regulador transcricional *Forkhead box protein N1*
- HE – Hematoxilina/Eosina
- H₂O – Água
- IEL – Linfócitos intraepiteliais
- i.p. – Via intraperitoneal
- IL – Interleucina
- LB – Linfócito B
- LT – Linfócito T
- MEC – Matrix extracelular
- mg – Miligrama(s)
- mL – Mililitro(s)
- µg – Micrograma(s)
- µL – Microlitro(s)
- µm – Micrômetro(s)
- NKT – Linfócito NK
- OVA – Ovoalbumina
- PI – Pele intacta
- SEM – Desvio padrão da média (*Standard Error Mean*)
- TCR – receptor de célula T (*T Cell Receptor*)
- TGF-β – Fator de Crescimento Transformante Beta (*Tissue Growth Factor β*)

Thy-1 – Proteína CD90 (*Thymocyte differentiation antigen 1*)

Whn – Regulador transcricional *Winged-helix nude* (outro nome para Foxn1)

WT – *Wild Type* (linhagem selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Reparo de lesões	12
1.2	Pele	13
1.3	Reparo de lesões cutâneas	15
1.4	Estratégias de otimização do reparo	18
1.5	Tolerância oral	20
1.6	Camundongos Nude	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Animais experimentais	27
4.2	Indução de tolerância oral	27
4.3	Imunização parenteral com a proteína da dieta	27
4.4	Delineamento experimental	28
4.5	Lesão excisional e período pós-operatório	29
4.6	Coleta da região lesionada e processamento histológico	29
4.7	Análise histológica e morfométrica	31
4.8	Aquisição de imagens	32
4.9	Análise estatística	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Análise morfológica de pele intacta	34
5.2	Análise histológica da região lesional aos 7 dias	38
5.3	Análise histológica da região lesional aos 40 dias	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reparo de lesões

Lesão é o conjunto de alterações moleculares, morfológicas e/ou funcionais que surgem em células e tecidos após agressões, que podem ser causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Após uma lesão inicia-se uma série de eventos que fazem parte do processo de reparo tecidual, o qual visa neutralizar os agentes agressores, remover o parênquima danificado e promover o reparo do tecido lesado. Esse processo pode ter dois desfechos: a regeneração, no qual há restauração completa do parênquima inicial, ou a cicatrização, no qual o tecido final não é o mesmo que o inicial. Dependendo do grau de extensão da lesão, a cicatrização pode comprometer a funcionalidade do tecido – por exemplo, um fígado cirrótico apresenta muitas cicatrizes, de forma a comprometer a função do órgão (BRASILEIRO FILHO, 2013; ROBBINS *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2019).

A capacidade de reparo de lesões varia bastante entre os metazoários, dependendo do táxon e inclusive do local lesionado. Enquanto alguns animais apresentam regeneração de órgãos ou membros inteiros (como adultos da ordem Urodelos), outros apresentam cicatrização ou regeneração dependendo de algumas características das lesões, como localização, tipo e extensão do dano. Em humanos, lesões na mucosa oral são completamente regeneradas; já lesões cutâneas usualmente geram tecido cicatricial em adultos e regeneração rápida e completa em fetos (BROCKES & KUMAR, 2002; FERGUSON & O'KANE, 2004).

Uma das hipóteses formuladas para explicar os diferentes desfechos de reparo durante a ontogênese envolve o sistema imune, considerando-se a correlação observada entre a perda da capacidade regenerativa e o grau de desenvolvimento do sistema imune adaptativo (FLAJNIK & KASAHARA, 2009). Retomando os exemplos anteriores, animais que apresentam regeneração de membros possuem sistema imune predominantemente inato, enquanto a queda do perfil regenerativo em animais apresenta correlação com o aumento de características do sistema imune adaptativo (presença de VLR, MHC, RAG, etc). E

em humanos, durante a fase fetal em que se observa regeneração cutânea, os leucócitos estão em menor número e menos ativados em relação às fases em que não se observa mais regeneração (COWIN *et al.*, 1998; FERGUSON & O'KANE, 2004; JULIER *et al.*, 2017). Outro fator que pode estar envolvido na diferença de desfechos é a linhagem de células envolvidas no reparo tecidual. No caso de lesões cutâneas e mucosas, por exemplo, os fibroblastos podem ser linhagens fibrogênicas, relacionadas a um desfecho reparativo, ou não-fibrogênicas, relacionadas a um desfecho regenerativo. De forma geral, apesar dos avanços importantes na compreensão de fenômenos de reparo, o tema é bastante diverso e complexo, e há bastante espaço para a realização de investigações mais aprofundadas (JIANG & RINKEVICH, 2020).

1.2 Pele

A pele é um órgão de revestimento externo, mais suscetível a lesões em relação a outros órgãos - apesar de sua elevada resistência a traumas mecânicos, agentes químicos e agentes biológicos. A capacidade e a velocidade de reparo cutâneo são fatores essenciais para garantir a homeostase do organismo, uma vez que a ruptura da integridade da barreira cutânea pode levar a consequências prejudiciais, como infecções, perda de líquidos e perda de calor.

A pele é formada por epiderme, derme e anexos cutâneos. A epiderme é a camada mais externa, de origem ectodérmica, composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Ela é subdividida em 5 camadas de queratinócitos: camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. As células da camada basal são menos diferenciadas e formam uma monocamada mitoticamente ativa, bem separada da derme subjacente por uma membrana basal bem desenvolvida. A camada espinhosa é a mais espessa, e suas células possuem vários prolongamentos celulares contendo desmossomos (os “espinhos”), além de teor crescente de citoesqueleto queratinoso. A camada granulosa possui células com grandes grânulos grosseiros de querato-hialina, por entre os quais passam os feixes de citoqueratina, e grânulos lamelares, os quais serão excitados para formar a barreira lipídica. A camada lúcida só é visível em pele espessa, e

suas células achatadas já não possuem núcleo ou organelas – apenas citoqueratina e querato-hialina transformada. E a camada córnea possui várias camadas de queratinócitos bem compactados e mortos, cuja perda de desmossomos leva-os a se descamarem. À medida que os queratinócitos vão se aproximando da superfície, eles vão se diferenciando e ganhando diferenças morfológicas e funcionais que caracterizam a função barreira do órgão - gerando uma estrutura muito coesa, mecanicamente resistente e impermeável (GARTNER & HIATT, 2007; LOSQUADRO, 2017).

A derme é a camada subjacente, de origem mesodérmica, composta por um tecido conjuntivo denso não modelado que abriga diferentes populações celulares, além de vasos sanguíneos e nervos. Ela se subdivide em camada papilar e camada reticular. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo e faz interface com a epiderme/membrana basal, formando ondulações e abrigando estruturas de ancoragem epidérmica. As ondulações da interface aumentam a área de contato epiderme/derme, o que favorece o aporte nutricional à epiderme avascular e a coesão das camadas, e podem ser mais pronunciadas ou não, dependendo do grau de estresse friccional da região. Elas podem acompanhar o contorno da epiderme sobrejacente, formando cristas, ou formar invaginações secundárias – as invaginações epidérmicas são chamadas de pregas interpapilares, e as invaginações dérmicas são chamadas de papilas dérmicas (KIERSZENBAUM & TRES, 2014; SUNDBERG *et al.*, 2012). Já a camada reticular é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, contendo principalmente espessas fibras de colágeno tipo I e redes de fibras elásticas, as quais conferem resistência mecânica e elasticidade ao tecido. A derme abriga os anexos cutâneos - folículo piloso, glândula sebácea e glândula sudorípara - estruturas derivadas da epiderme, mas que se projetam para derme e hipoderme (GARTNER & HIATT, 2007; LOSQUADRO, 2017).

A hipoderme é uma camada de tecido adiposo formada por lóbulos gordurosos entremeados por septos fibrosos, sendo que estes apresentam estrutura semelhante a favos de mel e formam compartimentos bem vascularizados por capilares. Ela também é chamada de tecido adiposo dérmico ou superficial, e está bastante integrada a ela em termos estruturais e funcionais. Ela é

estruturalmente diferente do tecido adiposo subcutâneo ou profundo, que apresenta lóbulos gordurosos maiores e menos definidos, septos fibrosos menos evidentes e com menor vascularização, e propriedades mecânicas diferentes, como menor resistência à compressão e ao estiramento (CUNHA *et al.*, 2014). As diferenças também ocorrem na distribuição anatômica e em aspectos fisiológicos e metabólicos desses depósitos adiposos, e eles normalmente são separados por uma camada muscular ou fibrosa, dependendo da espécie. Por muito tempo, a diferenciação entre tecido adiposo dérmico e subcutâneo era confusa ou inexistente na literatura, mas trabalhos mais recentes têm demonstrado a importância dela, principalmente por causa das implicações em termos fisiopatológicos e terapêuticos. Por exemplo, vários estudos experimentais demonstraram o uso terapêutico potencial de *stem cells* adiposas, mas a confusão na nomenclatura dos depósitos adiposos dificulta a escolha do local de coleta de amostras (CUNHA *et al.*, 2014; DRISKELL *et al.*, 2014; CHUN, 2021).

1.3 Reparo de lesões cutâneas

O reparo de lesões cutâneas é um processo complexo, que envolve uma sequência coordenada de etapas e variados tipos celulares, citocinas e fatores de crescimento. Ele pode ser dividido em quatro fases sequenciais e superponíveis: a) hemostasia; b) fase inflamatória; c) fase proliferativa e; d) remodelamento (BIELEFELD *et al.*, 2012; ELLIS *et al.*, 2018).

A hemostasia começa logo após a ocorrência da lesão, e tem por objetivo o estancamento da perda de sangue e líquidos e a impermeabilização da ferida, além de formar uma matriz temporária que permite a migração celular ao longo da região danificada. Observa-se vasoconstrição inicial dos vasos lesados, agregação plaquetária e formação de um coágulo de fibrina, plaquetas e hemácias que bloqueia o sangramento. Observa-se também vasodilatação e aumento da permeabilidade em capilares locais intactos, que culmina em redução local do fluxo sanguíneo, exsudação de plasma (saída de anticorpos, proteínas do complemento, fibrinogênio, etc) e favorece a migração de leucócitos rumo à lesão (BIELEFELD *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Tais eventos dão início à fase inflamatória, que consiste no recrutamento de leucócitos para o local da lesão que promovem a remoção de corpos estranhos e células mortas. Diversos fatores produzidos na área da lesão, como quimiocinas e citocinas, e a ativação de células nos locais da lesão levam à ativação endotelial e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos locais com consequente influxo de leucócitos. Os neutrófilos predominam no exsudato nas primeiras 24h e possuem ação imediata na eliminação de tecido necrótico e patógenos, tanto pelos compostos secretados (como espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas, peptídeos antimicrobianos) quanto por fagocitose. Enquanto isso, monócitos migram para o tecido e são ativados para macrófagos M1 (perfil inflamatório), os quais expressam citocinas inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , IL-1 e fatores de crescimento, tais como VEGF e PDGF e se tornam o tipo celular predominante no local da lesão após 48h. Eles também realizam fagocitose de patógenos, debris celulares e matriz extracelular (MEC) degradada. A redução progressiva de fatores inflamatórios na lesão faz a população de macrófagos transicionar de M1 para M2 (perfil proliferativo), sendo esta população responsável pela produção de várias citocinas e fatores de crescimento, tais como IL-10, IL-13, FGF7 que promovem ativação, migração e proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; WILKINSON & HARDMAN, 2020).

O início da fase proliferativa é caracterizado pela re-epitelização e pela migração/proliferação de fibroblastos e células do endotélio vascular, que começam nas primeiras 24 a 72h pós-lesão. Essa fase é caracterizada pela formação do tecido de granulação, constituído por uma MEC provisória (colágeno III, colágeno I e fibronectina) edema local, angiogênese e proliferação de fibroblastos. À medida que o coágulo é degradado e fagocitado, a MEC provisória é depositada, das bordas para o meio da lesão. A re-epitelização também ocorre de forma centrípeta, ou seja, queratinócitos ativados se desprendem da borda da lesão e se movem em direção ao centro da lesão depositando componentes de membrana basal ao longo do caminho. Então, tanto a re-epitelização quanto a formação do tecido de granulação ocorrem das bordas para o meio da lesão, até que o leito da lesão seja completamente ocupado entre 5 e 7 dias pós-lesão (RODRIGUES *et al.*, 2019; CHIA, 2018).

A fase de remodelamento é caracterizada pela substituição do tecido de granulação pela MEC definitiva, regressão da neovascularização e do edema, contração da ferida e reorganização das fibras de colágeno. A população de células da região sofre queda, e observa-se o predomínio de miofibroblastos, que são fibroblastos diferenciados responsáveis pela contração do tecido de granulação e pela nova deposição de colágeno. A MEC passa a ter predomínio de colágeno I, cujas fibras são depositadas paralelamente à epiderme - diferentemente da pele intacta, cujas fibras possuem padrão de deposição em rede. O arranjo em paralelo apresenta menor resistência mecânica que o arranjo em rede, e maior resistência mecânica que o tecido de granulação (RODRIGUES *et al.*, 2019). Normalmente não há regeneração de apêndices cutâneos em lesões de maior profundidade e, enquanto a porção epidérmica é regenerada, a porção dérmica abriga um tecido cicatricial (JIANG & RINKEVICH, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Células imunes, como mastócitos e linfócitos T, estão presentes na pele intacta e durante o processo de reparo da pele, mas suas funções ainda não são bem compreendidas. Os mastócitos podem produzir diversos fatores de crescimento que contribuem para a formação e estabilização do coágulo, ativação e migração de outras células inflamatórias. Já a função dos linfócitos T no reparo é ainda menos conhecida; as funções desses linfócitos são mais estudadas na Imunologia em geral, onde propõe-se que eles coordenam a resposta imune específica, ativando fagócitos e linfócitos B (CODEN & BERDNIKOV, 2020; KOMI *et al.*, 2020).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na substituição da matriz provisória, rica em fibrina, para o tecido de granulação, rico em colágeno tipo I e tipo III (WILKINSON & HARDMAN, 2020). Eles orientam a organização da estrutura reticular da matriz extracelular - tanto a deposição de material quanto o rearranjo dele - que pode ser correspondente ou não à arquitetura original do tecido. O desfecho do reparo de lesões está bastante relacionado às subpopulações de fibroblastos envolvidas no processo, as quais podem ser linhagens fibrogênicas (*Engrailed-1* positivas) ou não-fibrogênicas (*Engrailed-1* negativas). Durante o reparo, é difícil definir com precisão se um fibroblasto é de linhagem fibrogênica ou

não-fibrogênica, devido às limitações relativas à expressão dos marcadores até então descritos e à possibilidade de mudança fenotípica das células durante o processo de reparo que pode envolver transdiferenciação/de-diferenciação celular (JIANG & RINKEVICH, 2020). Além da existência de linhagens fibrogênicas, o desfecho do reparo e o perfil de cicatrização também estão bastante relacionados às interações célula/MEC e célula/célula envolvendo os fibroblastos e as outras células na área da lesão. No entanto, ainda existem dúvidas importantes sobre como os fibroblastos interferem no reparo, dentre elas, como a interação entre fibroblastos e tecido de granulação contribui para gerar um processo regenerativo, como ocorre na cavidade oral, ou para gerar um processo cicatricial, como ocorre na pele do dorso (JIANG & RINKEVICH, 2020).

1.4 Estratégias de otimização do reparo

Há várias evidências que demonstram a associação entre inflamação exacerbada e problemas no reparo de feridas, dentre estes, lesões crônicas e cicatrizes patológicas. Lesões crônicas são um problema relevante e crescente, com sérias implicações econômicas, sociais e de saúde pública. Elas são comuns em pacientes com comorbidades crônicas (como insuficiência arterial ou venosa, hipertensão e diabetes), nos quais o microambiente lesional é desfavorável para o reparo e aprisiona a lesão em um estado inflamatório contínuo, que não progride para as etapas seguintes. Ainda, é comum que lesões crônicas sejam complicadas por infecções bacterianas recorrentes (LANDÉN *et al.*, 2016; SEN *et al.*, 2009). Já cicatrizes patológicas, como contraturas - típicas de pacientes que tiveram queimaduras graves - podem levar a perda de mobilidade funcional e desfiguração, dependendo da região anatômica e da extensão do tecido cicatricial, além das consequências psicossociais negativas (HERSON *et al.*, 2009). A partir disso, a transição da fase inflamatória para a proliferativa se torna um alvo para o desenvolvimento de propostas terapêuticas resolutivas (LANDÉN *et al.*, 2016; LAROUCHE *et al.*, 2018).

Muitas estratégias tem sido estudadas para otimizar o processo de reparo cutâneo, desde o uso de ativos, como anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) e

esteroides (AIES), ao emprego de intervenções tópicas especiais, como curativos e biomateriais com propriedades terapêuticas otimizadas. De forma geral, observa-se três tipos de estratégias: a) estratégias de desbridamento e controle de infecções, nos quais o objetivo é remover ou reduzir ao máximo o material inflamatório no leito da lesão; b) estratégias de otimização da região lesional, nos quais emprega-se ativos, enxertos teciduais ou curativos/biomateriais (contendo ou não ativos anti-inflamatórios) para tentar conduzir a lesão para a fase proliferativa; c) estratégias para otimizar a perfusão de sangue ou de oxigênio, como oxigênio hiperbárico ou pressão negativa (ZHAO-FLEMING *et al.*, 2018; RAINA *et al.*, 2020).

Muitos estudos têm sido realizados em relação ao emprego de curativos e biomateriais especiais, os quais podem ou não carregar ativos – normalmente fatores de crescimento envolvidos no reparo tecidual, ou substâncias que apresentam atividade biológica relevante. Eles são uma alternativa interessante, uma vez que podem ser multifuncionais, apresentando propriedades antimicrobianas, antioxidantes, umidificantes, biocompatibilidade, flexibilidade morfológica, etc. Por exemplo, observou-se que curativos de hidrogel contendo curcumina nanoencapsulada, L-carnosina e proteínas da seda biocompatíveis reduziram a atividade de MMP-9 e a proliferação de bactérias patogênicas *in vitro*, e otimizaram o processo de cicatrização de animais diabéticos *in vivo* (SONAMUTHU *et al.*, 2020). Ainda assim, o ambiente lesional pode apresentar desafios a serem superados. O emprego tópico de anti-inflamatórios AINES ou AIES apresenta limitações clínicas importantes – por exemplo, o uso prolongado de AIES compromete a produção de fatores proliferativos e tecido cicatricial. Feridas crônicas são um ambiente rico em proteases, as quais podem degradar certos fatores de crescimento, como VEGF - nesse caso, o estudo de isoformas bioativas e resistentes a proteases seria interessante (MINEUR *et al.*, 2007; SEVILLA & PÉREZ, 2018).

Uma estratégia que tem apresentado resultados interessantes é o emprego da tolerância oral no controle do estado inflamatório da lesão. Esse fenômeno imunológico tem sido estudado por nosso grupo de pesquisa em diferentes condições inflamatórias, dentre elas a cicatrização de lesões cutâneas.

1.5 Tolerância oral

A absorção intestinal de proteínas intactas ou parcialmente digeridas, fenômeno comum no trato intestinal, comumente não resulta em reações inflamatórias ou anafiláticas. O que normalmente se observa após contato do sistema imune com proteínas da dieta ou com a microbiota intestinal é uma convivência harmônica entre os componentes da dieta ou da microbiota intestinal e os componentes do sistema imune (VAZ & CARVALHO, 1994). As influências de proteínas da dieta em reações imunológicas vêm sendo observadas ao longo do tempo. Assim, em relatos do séc. XIX, índios americanos ingeriam extratos de uma planta sensibilizante (*Poison Ivy*) para impedir uma dermatite de contato no manejo da mesma (DAKIN, 1829). No início do séc. XX observou-se que, ao imunizar-se cobaias com proteínas do leite, milho ou ovo, era possível prevenir o choque anafilático com a introdução prévia dessas proteínas na dieta (WELLS & OSBORNE, 1911). A inibição da reatividade imunológica produzida pela ingestão de uma proteína ganhou o nome de tolerância oral nos anos 1970, por analogia à tolerância imunológica desenvolvida para componentes do próprio corpo (*self tolerance*). A tolerância oral foi definida como a redução da reatividade imunológica frente a uma imunização com antígenos previamente ingeridos (THOMAS & PARROTT, 1974; VAZ *et al.*, 1977; FARIA & WEINER, 2005; CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2012).

Vários mecanismos são propostos para explicar a tolerância oral, dentre os quais sugere-se que linfócitos T reguladores estejam envolvidos na indução desse processo. A tolerância pode ser transferida adotivamente de camundongos tolerantes para camundongos não tolerizados, através da injeção de células do baço contendo linfócitos (RICHMAN *et al.*, 1978; CUNHA *et al.*, 2009). Além do mais, a injeção de células de baço de camundongos adultos, que são susceptíveis à tolerância oral, para camundongos neonatos, não susceptíveis à tolerância oral, pode transferir a susceptibilidade à tolerância oral – o que sugere que a tolerância oral requer algum grau de organização sistêmica (LAHMANN *et al.*, 1992). Dentre as características observadas nos animais tolerantes estão: menor número de células formadoras de anticorpos específicos, menor nível de anticorpos específicos circulantes e menor hipersensibilidade tardia ao antígeno tolerado

(STROBEL & MOWAT, 1998; WEINER, 2001). Entretanto, a consequência mais significativa da ingestão de proteínas não é a diminuição da resposta imune, mas sim a estabilização da formação de anticorpos específicos, em imunizações subsequentes (VERDOLIN *et al.*, 2001). Assim, nos animais tolerantes, a estabilização da reatividade imunológica específica pode ocorrer com níveis altos de anticorpos de tal maneira que a formação de anticorpos específicos é inversamente proporcional à dose ingerida de antígeno. Mas observa-se altos níveis de atividade linfocitária T e B, com aumento numérico e em variedade tanto de subtipos celulares ativadas quanto de anticorpos inespecíficos (BANDEIRA *et al.*, 1989; VERDOLIN *et al.*, 2001; CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2015).

A indução de tolerância oral depende da atividade proteolítica de enzimas digestivas e da imunocompetência do organismo, e se torna mais firmemente estabelecida com a ingestão contínua da proteína tolerada (HANSON & MORIMOTO, 1980; VAZ *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2015). A tolerância possui aplicações terapêuticas; ela pode ser usada para reduzir ou inibir a inflamação, e até prevenir doenças auto-imunes e alergias, como a dermatite atópica – mesmo após a sensibilização do organismo (FARIA & WEINER, 2006; HOSTMANN *et al.*, 2015; BAEK *et al.*, 2016).

A tolerância oral é um evento imunológico específico de forma que a ingestão de ovoalbumina (OVA), por exemplo, inibe a formação de anticorpos anti-OVA frente a uma administração parenteral da OVA mais adjuvante. Caso a imunização no animal que ingeriu OVA ocorra com outra proteína a formação de anticorpos para a outra proteína ocorre normalmente. Porém, se a proteína não-tolerada for injetada juntamente com a tolerada (OVA), ou até 72h depois, há uma redução da resposta imune também para a proteína não-tolerada. Esse fenômeno inibitório, demonstrado por vários estudos desde a década de 1980, é conhecido como efeito indireto da tolerância oral, ou *bystander suppression* (VAZ *et al.*, 1981; MILLER *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 1997).

Na tentativa de explicar o fenômeno, propôs-se que a inibição concomitante era devido à proximidade entre linfócitos T tolerantes e linfócitos T reativos à proteína não tolerada, via produção de TGF- β . Tal evento foi denominado *innocent*

bystander suppression (MILLER *et al.*, 1991). Porém, os trabalhos de Carvalho e colaboradores mostraram que o fenômeno ocorre mesmo quando as proteínas são administradas por vias diferentes e em tempos diferentes (se o antígeno não tolerado for injetado até 72h após o tolerado), e ele permanece em uma segunda imunização com o antígeno não tolerado. Portanto, a inibição descrita não pode ser explicada pela contiguidade de linfócitos T e uma visão sistêmica, que considera reações imunológicas como eventos interligados, parece ser mais adequado para entender os efeitos indiretos (CARVALHO *et al.*, 1994; CARVALHO & VAZ, 1996; CARVALHO *et al.*, 1997).

Os efeitos indiretos atuam diretamente no processo inflamatório. Há trabalhos que mostram redução da inflamação provocada por injeção de carragenina em pata de camundongos e redução de tamanho em granulomas após injeção ovos de *S. mansoni*, através da injeção concomitante de proteínas toleradas (RAMOS *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2012). Outros trabalhos evidenciam redução de infiltrado inflamatório e otimização do reparo em feridas cutâneas, com promoção de um perfil regenerativo do reparo, pela injeção de proteína tolerada (COSTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016; CANTARUTI *et al.*, 2017).

Como discutido anteriormente, a inflamação exacerbada no reparo cutâneo pode atrasá-lo ou prejudicar a ocorrência de um reparo funcional. Várias estratégias tem sido estudadas para inibir ou modificar o processo inflamatório de lesões. Nosso grupo tem estudado os efeitos indiretos da tolerância oral como estratégia de otimização do reparo, na tentativa de compreender melhor os eventos e os mecanismos da tolerância oral que conduzem a melhora observada.

1.6 Camundongos nude

Em 1966 foi publicada a descrição da aparição espontânea, em camundongos de laboratório, de animais de fenótipo nude (FLANAGAN, 1966). Estes camundongos não apresentam pelagem e têm disgenesia de timo, apresentando profunda deficiência de células T (timo dependentes),

desenvolvimento tardio, baixa capacidade reprodutiva, e alta susceptibilidade a infecções e mortalidade. Estudos genéticos posteriores demonstraram que tal fenótipo corresponde a uma mutação pleiotrópica do fator de transcrição Foxn1 (anteriormente chamado de Whn), a qual possui herança autossômica recessiva (FLANAGAN, 1966; KÖPF-MAIER *et al.*, 1990; GALLO *et al.*, 2017).

De uma forma geral, os camundongos nude apresentam alterações cutâneas, observáveis no processo de queratinização, nos folículos pilosos e nas unhas, e alterações imunológicas, relativas a uma profunda deficiência de linfócitos T funcionais (GALLO *et al.*, 2017; ROTA & DHALLA, 2017; BUKOWSKA *et al.*, 2018). Os folículos pilosos estão presentes em mesmo número que nos indivíduos de fenótipo selvagem (WT), mas a queratinização anormal resulta no enovelamento dos mesmos na região média do folículo, de modo que não chegam a penetrar na epiderme. A queratinização anormal também afeta a placa ungueal, que se torna mais fina, frágil e irregular (FLANAGAN, 1966; KÖPF-MAIER *et al.*, 1990; GALLO *et al.*, 2017). Já as alterações imunológicas estão profundamente associadas à disgenesia de timo, local responsável pela maturação de precursores hematopoiéticos em linfócitos T funcionais. A morfogênese do timo é bloqueada no início do desenvolvimento, gerando profunda alteração estrutural do órgão - não há formação das regiões subcapsular, cortical e medular. O timo vestigial resultante, quando presente, apresenta uma estrutura bidimensional alinfóide que não permite a entrada de precursores hematopoiéticos (GALLO *et al.*, 2017; ROTA & DHALLA, 2017). Uma vez que os camundongos homozigotos Foxn1^{-/-} têm grande deficiência de linfócitos T maduros, estes animais são muito empregados em estudos imunológicos, de permeação cutânea, oncológicos e que envolvam transplantes de tecidos – neste caso, a imunodeficiência os torna incapazes de rejeitarem os transplantes e dispensa a necessidade de imunossupressão adicional (GALLO *et al.*, 2017; BUKOWSKA *et al.*, 2018).

O gene que codifica Foxn1 localiza-se no cromossomo 11, em camundongos. O fator de transcrição regula mais de 50 genes-alvo, como as quinases B e C e diversas citocinas. O fator de transcrição Foxn1 promove a diferenciação terminal de células epiteliais, sendo essencial na organogênese tímica, tanto para a diferenciação do epitélio tímico em porções medular e cortical

quanto para o estabelecimento da estrutura 3D do órgão. Ele também é importante para a diferenciação e homeostase das células epiteliais tímicas da fase fetal em diante, e está diretamente ligado à síntese de diversas citocinas, bem como à expressão de ligantes de superfície e moléculas, envolvidos na seleção de linfócitos T (GALLO *et al.*, 2017; ROTA & DHALLA, 2017).

Trabalhos de Gawronska e colaboradores (2004) evidenciaram que o reparo de feridas cutâneas de camundongos nude possui um desfecho regenerativo, ao contrário do que normalmente se observa nas demais espécies de mamíferos. Feridas de orelha de camundongos nude, realizadas com *punch* dermatológico, apresentaram regeneração completa da arquitetura tecidual, mediada pela formação de estrutura semelhante a blastema, seguida de regeneração de derme, cartilagem, vasculatura e musculatura. Em posterior comparação do reparo de feridas cutâneas na região dorsal em seis diferentes tipos de camundongos imunodeficientes, o nude foi o único tipo que apresentou regeneração em vez de cicatrização. Dentre as diferenças observadas estão: ausência de cicatriz; menores níveis de: colágeno, PDGF e TGF- β (citocinas pró-fibróticas), de resposta inflamatória e de células CD8+; maiores níveis de elasticidade da zona lesionada (em relação a pele intacta de animais nude) e de ácido hialurônico. Ainda, sugere-se que a pele de animais nude possui um perfil neotênico, porque a ausência de expressão de Foxn1 confere à pele características imaturas – no caso, a pele apresenta um perfil de expressão gênica predominantemente proliferativo e com menor grau de diferenciação celular (GAWRONSKA-KOZAK *et al.*, 2004; GAWRONSKA-KOZAK *et al.*, 2006; KUR-PIOTROWSKA *et al.*, 2017; GAWRONSKA-KOZAK, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

O fechamento de lesões é essencial para a manutenção da vida, e a participação de linfócitos no reparo de lesões ainda é pouco conhecida. A investigação das interações celulares durante o reparo fisiológico e de alterações destas interações em processos patológicos é fundamental para identificar alvos terapêuticos que otimizem o fechamento da lesão sem promover a fibrose do tecido. Comparamos histologicamente a espessura da derme e da epiderme, a organização da matriz extracelular e os anexos da pele de camundongos nude (homozigotos para a mutação em Foxn1) e heterozigotos, antes e após lesões na pele. Também avaliamos histologicamente se os efeitos indiretos da injeção intraperitoneal de uma proteína tolerada têm efeitos no reparo de lesões de pele destes animais. Os resultados irão contribuir para uma melhor compreensão da participação dos linfócitos no reparo de lesões cutâneas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o reparo de lesões cutâneas em camundongos da linhagem BALB/c portadores dos genótipos $Foxn1^{-/-}$ (nude) e $Foxn1^{-/+}$ (heterozigoto), bem como avaliar se a administração parenteral de proteínas toleradas interfere no processo de reparo tecidual de animais nude.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar morfologicamente a pele intacta de camundongos BALB/c nude e heterozigoto, avaliando a derme e a epiderme, a organização da matriz extracelular e os anexos de pele - folículos pilosos e glândulas sebáceas;
- Comparar morfologicamente o leito da ferida cutânea em camundongos BALB/c nude e heterozigoto, no dia 7 após a lesão, avaliando o infiltrado inflamatório através de análise morfométrica;
- Comparar morfologicamente a área do reparo em camundongos BALB/c nude e heterozigoto, no dia 40 após a lesão, avaliando a organização da matriz extracelular e a presença ou não dos anexos de pele, a saber folículos pilosos e glândulas sebáceas;
- Verificar se a administração parenteral de proteínas toleradas gera alterações no fechamento de lesões dos camundongos BALB/c nude e heterozigotos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Camundongos BALB/c fêmeas, de oito semanas de idade, de cada um dos genótipos investigados foram utilizados neste estudo. Os camundongos C57BL/6 e BALB/c Foxn1^{+/+} (WT) foram obtidos do biotério CEBIO (UFMG), e foram empregados apenas para as observações comparativas de pele intacta - eles não fizeram parte dos experimentos de lesão cutânea. Já os camundongos BALB/c Foxn1^{+/-} (heterozigoto) e Foxn1^{-/-} (nude) foram obtidos do Biotério do Departamento de Morfologia, coordenado pela Profa. Gleide Fernandes de Avelar, e integraram os experimentos descritos posteriormente. Esses camundongos foram acomodados no biotério da Profa. Gleide durante os experimentos, em ambiente com temperatura controlada (até 25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Eles foram mantidos no biotério em microisoladores esterilizados com filtração de ar, e foram alimentados com ração padrão autoclavada e água filtrada, *ad libitum*, mas a confecção e a coleta das lesões foram realizadas no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração. Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Indução de tolerância oral

Os animais foram alimentados com ração para animais de laboratório (Nuvital/Nuvilab); esta possui milho em sua composição, cereal cuja fração proteica mais abundante é a zeína.

4.3 Imunização parenteral com a proteína da dieta

Cada camundongo pertencente ao grupo experimental Zeína recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,1 mL contendo 10 µg de zeína e 1,6 mg do adjuvante Al(OH)₃. A solução injetada foi preparada em salina fisiológica, a

partir da diluição de 2 µL de zeína 5 mg/mL (solução de Etanol/H₂O 7:3). Os grupos controle Salina receberam injeção de salina, e as injeções ocorreram cinco minutos antes da realização da lesão cutânea.

4.4 Delineamento experimental

Os camundongos BALB/c heterozigoto e nude foram aleatoriamente organizados em grupos experimentais de 6 animais, divididos nos grupos Salina 7 dias, Zeína 7 dias, Salina 40 dias e Zeína 40 dias, segundo seu genótipo (**Figura 1**). A pele obtida no dia da lesão com o *punch* dermatológico foi analisada como amostra de pele intacta (dia 0) dos animais heterozigoto e nude.

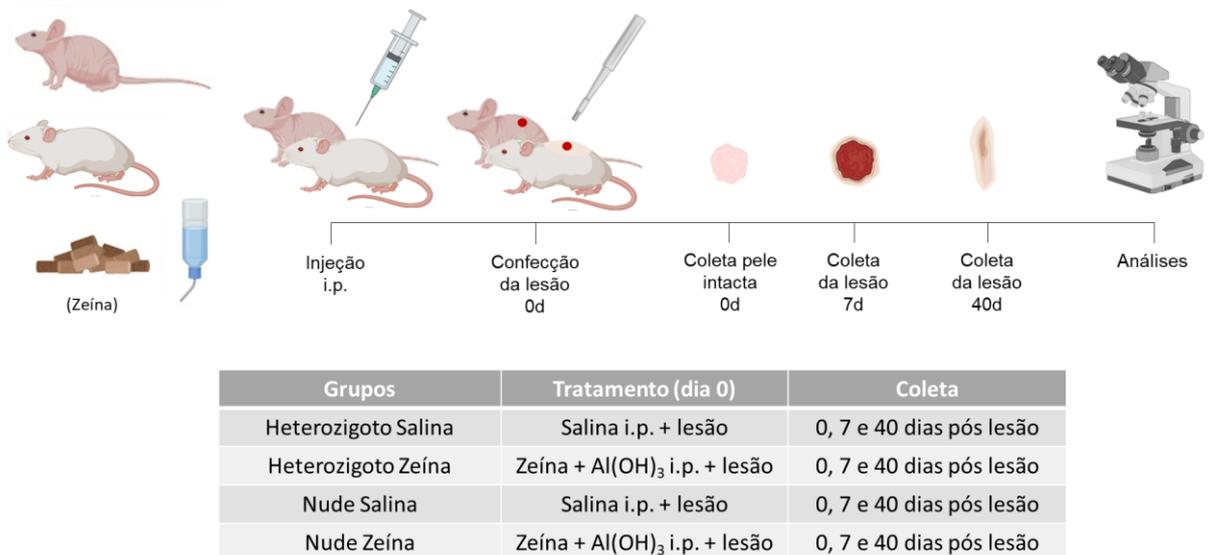


Figura 1 – Protocolo experimental para comparação histológica de pele intacta e lesionada dos camundongos heterozigoto e nude. Os camundongos foram mantidos com alimentação padrão durante todo o período do experimento, quando receberam o tratamento prescrito, segundo seu grupo experimental. Após tricotomia e higienização da região dorsal, confeccionou-se a ferida com o auxílio de um *punch* dermatológico; a pele removida foi coletada como amostra de pele intacta, e as lesões foram coletadas nos dias 7 e 40 após a lesão, para posterior análise histológica. Os camundongos representam as linhagens nude (em bege) e heterozigoto (em branco).

Os grupos foram imunizados minutos antes da lesão, da seguinte forma: o grupo Salina recebeu apenas injeção i.p. de salina, e o grupo Zeína recebeu 10 µg zeína + 1,6 µg Al(OH)₃ em salina por via i.p.. As lesões foram realizadas nos grupos Salina e Zeína, e amostras foram coletadas nos dias 0, 7 e 40 pós lesão. O protocolo experimental está descrito de forma resumida na **Figura 1**.

4.5 Lesão excisional e período pós-operatório

Os camundongos foram anestesiados por injeção i.p. de xilasina (15 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) diluídos em salina fisiológica. A região dorsal foi tricotomizada e limpa com álcool 70% e, foram realizadas duas feridas excisionais com o auxílio de *punch* dermatológico de 6,5 mm de diâmetro. Para isso, o animal foi posicionado em decúbito lateral, levantando-se ligeiramente a pele do dorso para formar uma dobra de pele, alinhada com o plano mediano do corpo. O *punch* foi pressionado contra essa dobra em região imediatamente inferior à escápula, de forma a atravessar a dobra, o que resultou em duas feridas excisionais (**Figura 2**). Logo após a realização das lesões, os animais foram acondicionados em estufa a 37°C enquanto estiveram sob efeito da anestesia, e tiveram os olhos cobertos com algodão embebido em salina fisiológica, para evitar ressecamento e posterior cegueira. Após o fim da anestesia, quando os camundongos apresentaram mobilidade suficiente, cada animal foi mantido em gaiolas individuais, para evitar lesões por outros animais.

4.6 Coleta da região lesionada e processamento histológico

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por 7 ou 40 dias, com água e ração *ad libitum*, e então foram eutanasiados para a coleta das lesões. Para isso os animais foram anestesiados com xilasina e cetamina;

após tricotomia, limpeza com álcool 70% e coleta da ferida, foram eutanasiados por deslocamento cervical. As lesões foram devidamente posicionadas em papel filtro e fixadas em formalina de Carson por 24h e mantidas em um recipiente contendo álcool 70% até que fossem submetidas às próximas etapas do processamento histológico.

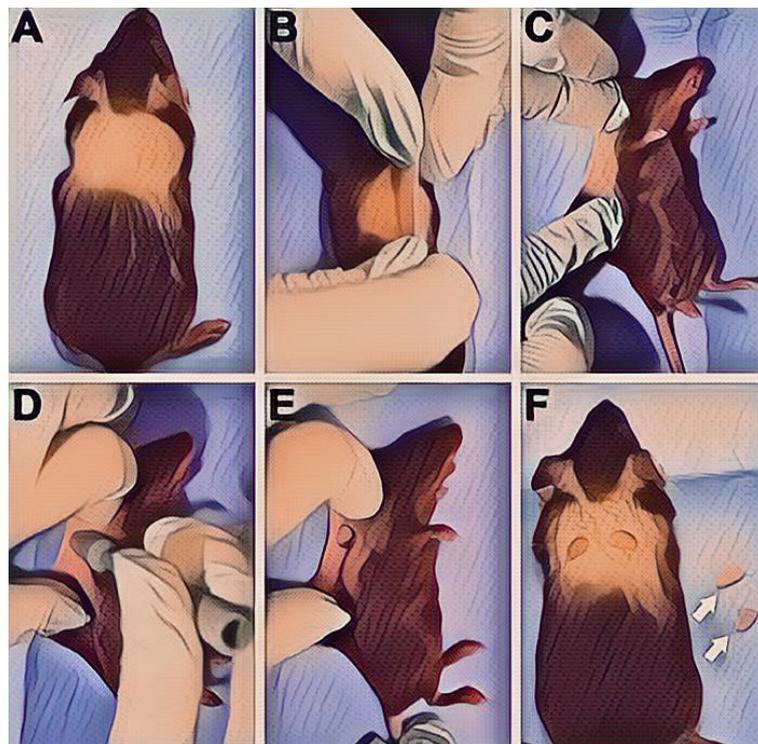


Figura 2 – Procedimento de confecção de feridas excisionais no dorso tricotomizado dos camundongos. Após o devido posicionamento dos camundongos e da dobra de pele (A-C), o *punch* é pressionado contra a dobra e a atravessa, formando duas feridas excisionais e duas amostras de pele intacta, indicadas pelas setas brancas (D-F). Adaptado de RHEA & DUNWALD (2020).

Após a fixação, cada ferida foi perpendicularmente seccionada ao meio, em relação ao plano crânio-caudal do camundongo, de forma a expor o meio da ferida em uma das extremidades da peça. Uma das metades foi processada para inclusão e posterior corte histológico, e a outra metade foi guardada para uso futuro, caso fosse necessário. O processamento ocorreu segundo os protocolos padrão específicos, os quais consistem em etapas de:

a) desidratação, na qual faz-se imersão da peça em uma série gradual de diferentes concentrações de álcool (80-100%) à temperatura ambiente, por 30 minutos cada; b) diafanização, na qual faz-se imersão da peça em três soluções de xilol, à temperatura ambiente, por 20 minutos cada; c) infiltração, na qual a peça é impregnada pelo material de inclusão à quente (parafina à 56°C); e d) inclusão, na qual a peça é posicionada em molde com o material de inclusão derretido.

Em seguida, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura em micrótomo manual (Microm – HM 315), e os cortes seguiram para as colorações histológicas, segundo protocolos padrão específicos.

4.7 Análise histopatológica qualitativa e quantitativa

As colorações histológicas permitiram a avaliação morfológica e morfométrica das lesões, por microscopia de luz. Analisou-se um corte por animal, para cada coloração. Foi possível avaliar o reparo cutâneo de forma qualitativa nas lesões de 7 dias e de 40 dias, observando-se aspectos como distribuição do infiltrado inflamatório, aspecto e disposição de fibras colágenas, tecido de granulação, tecido epitelial e adiposo, dentre outros. Utilizou-se a coloração Hematoxilina/Eosina (HE) para realizar uma descrição qualitativa geral, a coloração Alcian Blue/Safranina (AS) para a identificação seletiva de mastócitos, a coloração Tricrômico de Masson para uma visualização seletiva do tecido conjuntivo e da organização de suas fibras colágenas.

Realizou-se também uma avaliação quantitativa de infiltrado inflamatório (leucócitos), fibroblastos e mastócitos nas lesões de 7 dias – a quantificação de leucócitos e fibroblastos foi realizada nos cortes corados com HE, e a avaliação de mastócitos foi feita nos cortes corados com AS. Utilizou-se a objetiva de 100x, sob imersão, e uma grade quadrangular (retículo) acoplada à ocular do microscópio – sob essas condições de observação, a área da grade corresponde a um campo de 100 µm². Realizou-

se a contagem das células no interior de cada campo, sendo que se distribuiu dez campos de $100 \mu\text{m}^2$ na região da lesão, sobre o tecido de granulação formado, conforme mostrado na **Figura 3**. Para a contagem de mastócitos, considerou-se também a área de tecido adjacente à lesão (correspondente ao total de vinte campos de $100\mu\text{m}^2$ cada), onde se encontram muitos mastócitos infiltrados.

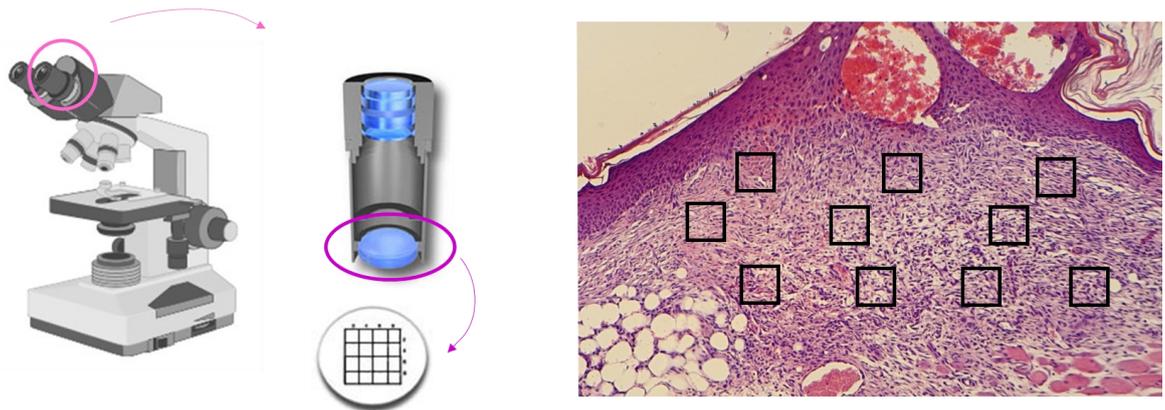


Figura 3 – Esquema base do procedimento de avaliação quantitativa ao microscópio de luz. A figura indica a localização do retículo ao microscópio, e como ele é utilizado para marcar os campos de contagem na amostra. Os campos de contagem são posicionados na região da lesão da forma indicada, sobre o tecido de granulação.

4.8 Aquisição de imagens

Os cortes submetidos às colorações de H&E, Alcian Blue/Safranina e Tricrômico de Masson foram analisados ao microscópio Olympus BX50, e as imagens dos cortes, utilizadas para a montagem das figuras, foram adquiridas utilizando-se uma câmera Olympus Q Colour 3 acoplada ao microscópio, conectada ao computador através do programa Q-Capture Pro (QImaging, Canadá).

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA); para comparação entre três grupos utilizou-se o teste de One-Way ANOVA, e foi aplicado o pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM, sendo que a diferença foi considerada significativa para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica de pele intacta

Cortes histológicos de pele intacta (dia 0) foram submetidos a coloração por Hematoxilina/Eosina (H&E), Alcian Blue/Safranina (AS) e Tricrômico de Masson, para as análises morfológicas comparativas dos animais em estudo. Utilizou-se também cortes de pele intacta de animais C57BL/6 WT, linhagem de camundongos usual para vários trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, e de BALB/c WT, linhagem selvagem (Foxn1^{+/+}) dos animais mutados heterozigoto e nude, a título comparativo. O objetivo foi detectar possíveis diferenças morfológicas que pudessem interferir nas análises posteriores.

A coloração de Hematoxilina/Eosina é empregada na rotina histológica para a avaliação de estruturas gerais dos tecidos, corando os núcleos celulares em roxo e demais estruturas em variados tons de rosa e roxo. A coloração de Alcian Blue/Safranina foi escolhida por permitir a diferenciação de mastócitos cujos grânulos contém heparina (maduros) ou glicosaminoglicanos sulfatados (imatuross), corados em vermelho e azul, respectivamente. E o Tricrômico de Masson é empregado para diferenciar tecido conjuntivo e tecido muscular, corando os núcleos celulares em roxo, o colágeno do tecido conjuntivo em azul e o tecido muscular em vermelho.

De forma geral, observou-se que os animais heterozigoto e nude apresentam algumas diferenças histológicas, em relação a BALB/c WT e C57BL/6 WT - especialmente a linhagem nude.

A epiderme dos camundongos WT é fina e regular; as células da camada germinativa possuem formato mais cubóide, enquanto as células superiores são bem finas, e a camada córnea apresenta pouco material descamativo. Já a epiderme do heterozigoto é um pouco mais espessa do que em animais WT; a camada germinativa possui células cubóides, por

vezes tendendo a prismáticas, e percebe-se um acúmulo de material acidófilo nas regiões superiores, seguido por maior presença de material descamativo. E a epiderme do animal nude é mais espessa que as anteriores, possuindo camadas celulares mais aparentes e trechos mais hiperplásicos ao longo do tecido; as células da camada basal variam entre morfologia cubóide e prismática. Ainda, a camada espinhosa é a mais pronunciada em espessura, e possui núcleos nitidamente mais descondensados, com nucléolos visíveis em aumento de 400X. As camadas superiores são mais finas, e a camada córnea é bem mais espessa, apresentando paraceratose. A presença de material descamativo é maior no nude do que no animal heterozigoto (**Figura 4**).

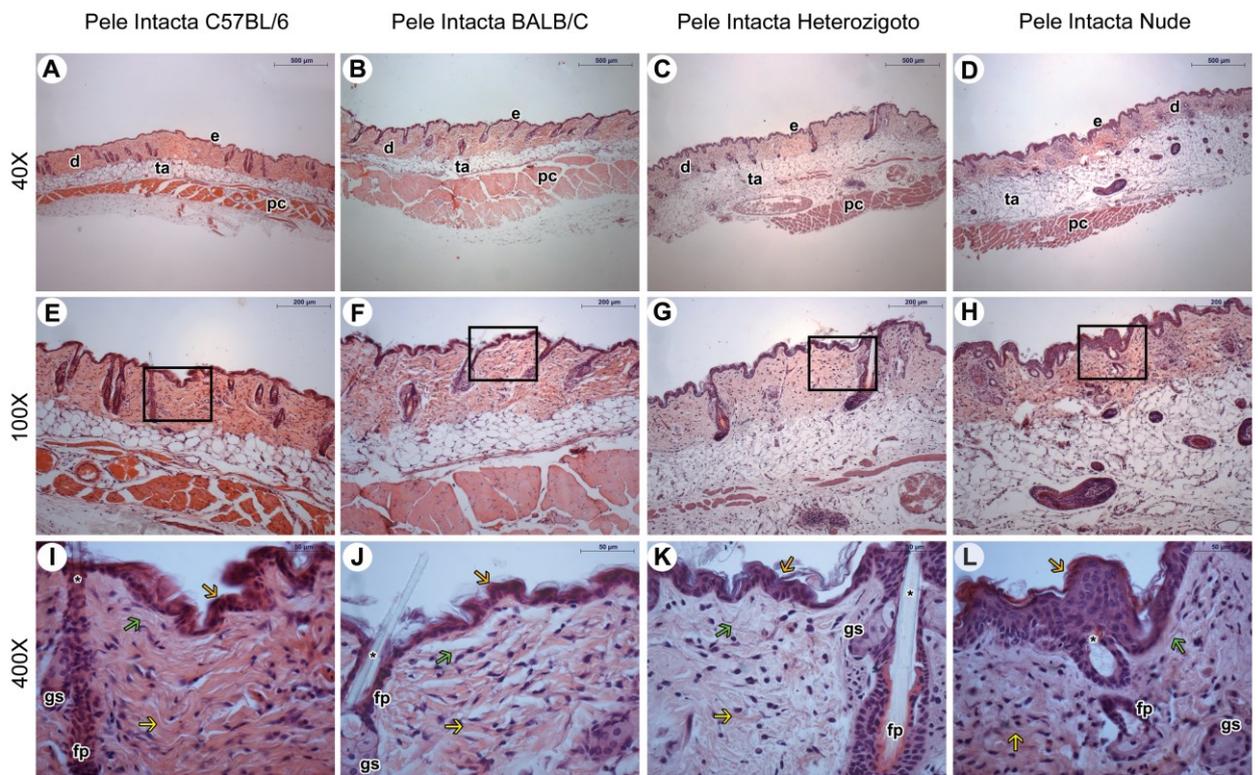


Figura 4 – Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por H&E. Os quadros pretos em E-H indicam as regiões que foram ampliadas em I-L. Observa-se aqui as diferenças no aspecto geral da pele dos animais, relativas a epiderme (e), derme (d), tecido adiposo (ta), folículos pilosos (fp) e glândulas sebáceas (gs). As setas indicam as regiões de derme papilar (seta verde), derme reticular (seta amarela) e epiderme (seta laranja), enquanto o asterisco (*) indica a região de saída do pelo para o meio externo. Escala de barras: 500µm, 200µm, 50µm.

A derme em linhagens WT possui espessura visualmente semelhante. C57BL/6 WT tem projeções dérmicas bem mais suaves, de percepção mais difícil, enquanto BALB/c WT possui projeções mais delimitadas e mais numerosas (**Figura 4**). Já o heterozigoto possui projeções dérmicas mais numerosas, evidentes e elevadas, enquanto o nude possui projeções dérmicas ainda mais evidentes, mas menos numerosas que em heterozigoto. Ainda, o animal nude possui derme bem mais celularizada do que os demais – dentre essa população celular aumentada, pode-se incluir os mastócitos (**Figuras 4 e 6**). Eles são bem mais numerosos na pele do nude, enquanto nas demais linhagens eles não são tão numerosos, e povoam a derme de maneira semelhante entre si.

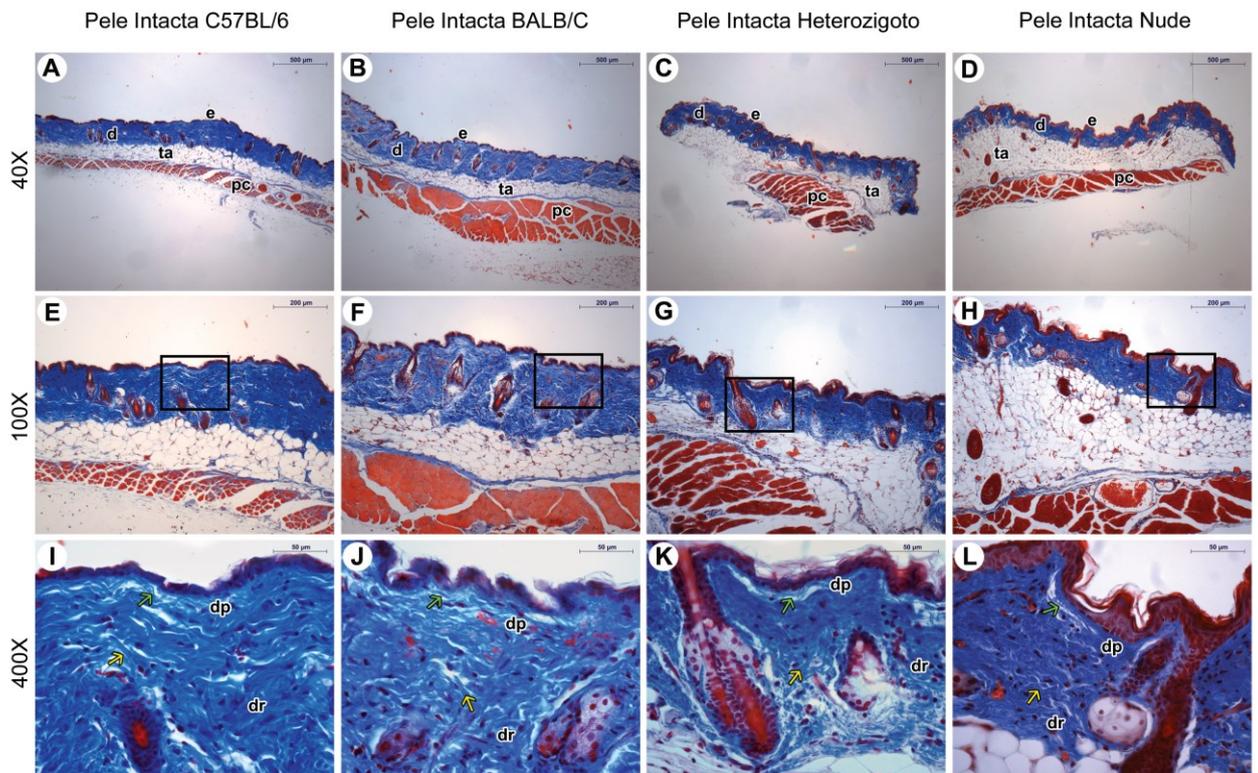


Figura 5 – Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por Masson. Os quadros pretos em E-F indicam as regiões que foram ampliadas em I-L. Observa-se aqui o aspecto das fibras colágenas dos animais, tanto em derme papilar (dp) quanto em derme reticular (dr). As setas indicam fibras da derme papilar (seta verde) e da derme reticular (seta amarela). Escala de barras: 500µm, 200µm, 50µm.

Em relação à organização geral da derme (**Figuras 4 e 5**), os animais WT e heterozigoto são semelhantes; a derme papilar possui fibras finas e delicadas, e as fibras de colágeno da derme reticular são bem definidas e possuem arranjo em rede, além de densidade em colágeno semelhante entre si, próximo ao que se observa normalmente (**Figura 5 I-K**). Já os animais nude possuem fibras menos definidas e aparentemente mais densas em colágeno, segundo microscopia de luz, em relação aos outros animais. Isso ocorre tanto na derme papilar, cujas fibras parecem ser mais espessas e mais compactadas do que nos outros animais, quanto na derme reticular, cujas fibras também parecem ser mais espessas e mais compactadas em relação aos demais grupos (**Figura 5 I-L**). Os animais nude também possuem transição entre derme papilar e reticular menos evidente, e as fibras da derme reticular apresentam arranjo em rede (**Figura 5 I-L**).

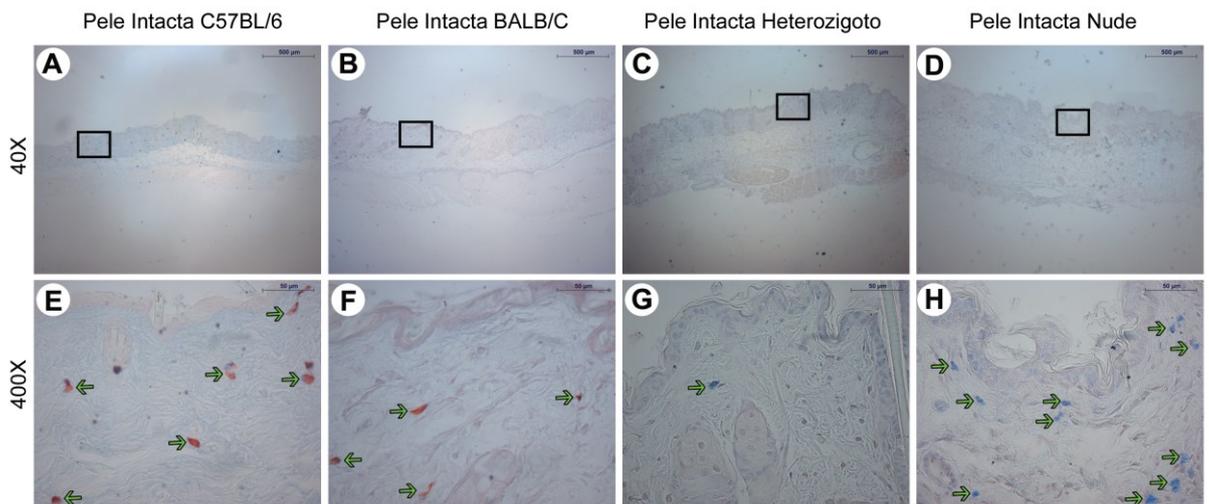


Figura 6 – Fotomicrografias de pele intacta a partir da coloração por Alcian Blue/Safranina. Os quadros pretos em A-D indicam as regiões que foram ampliadas em E-F. É possível observar a distribuição diferenciada de mastócitos na pele intacta dos animais, aqui corados em vermelho e azul, e indicados pelas setas verdes (E-H). Escala de barras: 500µm e 50µm.

O tecido adiposo dérmico se apresenta em uma camada bem mais fina nos animais WT BALB/c e C57BL/6, nos quais os bulbos pilosos chegam em geral até o limite da transição derme/tecido adiposo ou estão ligeiramente mergulhados no tecido adiposo. Já nos animais heterozigoto e nude o tecido adiposo dérmico se apresenta como uma camada bem espessa (**Figuras 4 e 5**), na qual os bulbos dos folículos pilosos em geral estão completamente imersos. O tecido adiposo profundo nem sempre é coletado ou observado nos cortes; em geral, o tecido adiposo presente nas micrografias corresponde ao tecido adiposo superficial, cuja posição é dorsal em relação ao panículo carnososo.

Em relação aos anexos cutâneos, C57BL/6 WT, BALB/c WT e BALB/c heterozigoto são bem semelhantes; folículo piloso e glândula sebácea são semelhantes em aspecto. As diferenças morfológicas são mais marcantes em nude: as glândulas sebáceas são hipertróficas, hiperplásicas e mais numerosas ao longo da derme (**Figura 4**), e os pelos dos folículos são vistos em geral até a região das glândulas sebáceas, e raramente alcançam a epiderme - pouquíssimos pelos saem do folículo, quando saem são muito curtos - lembrando que esses animais não passaram por tricotomia.

5.2 Análise histológica da região lesional aos 7 dias

Analisou-se aspectos histológicos gerais do tecido ao 7º dia pós-lesão, em cortes corados por H&E – dentre eles reepitelização, infiltrado celular e maturidade do tecido de granulação (**Figura 7**). Realizou-se também análise morfométrica do infiltrado celular de fibroblastos, células inflamatórias e mastócitos no tecido de granulação, nos cortes corados por H&E e Alcian Blue/Safranina (**Figura 7 e 9**). Por fim, realizou-se análise qualitativa da deposição de matriz extracelular, através da coloração de Tricrômico de Masson (**Figura 10**).

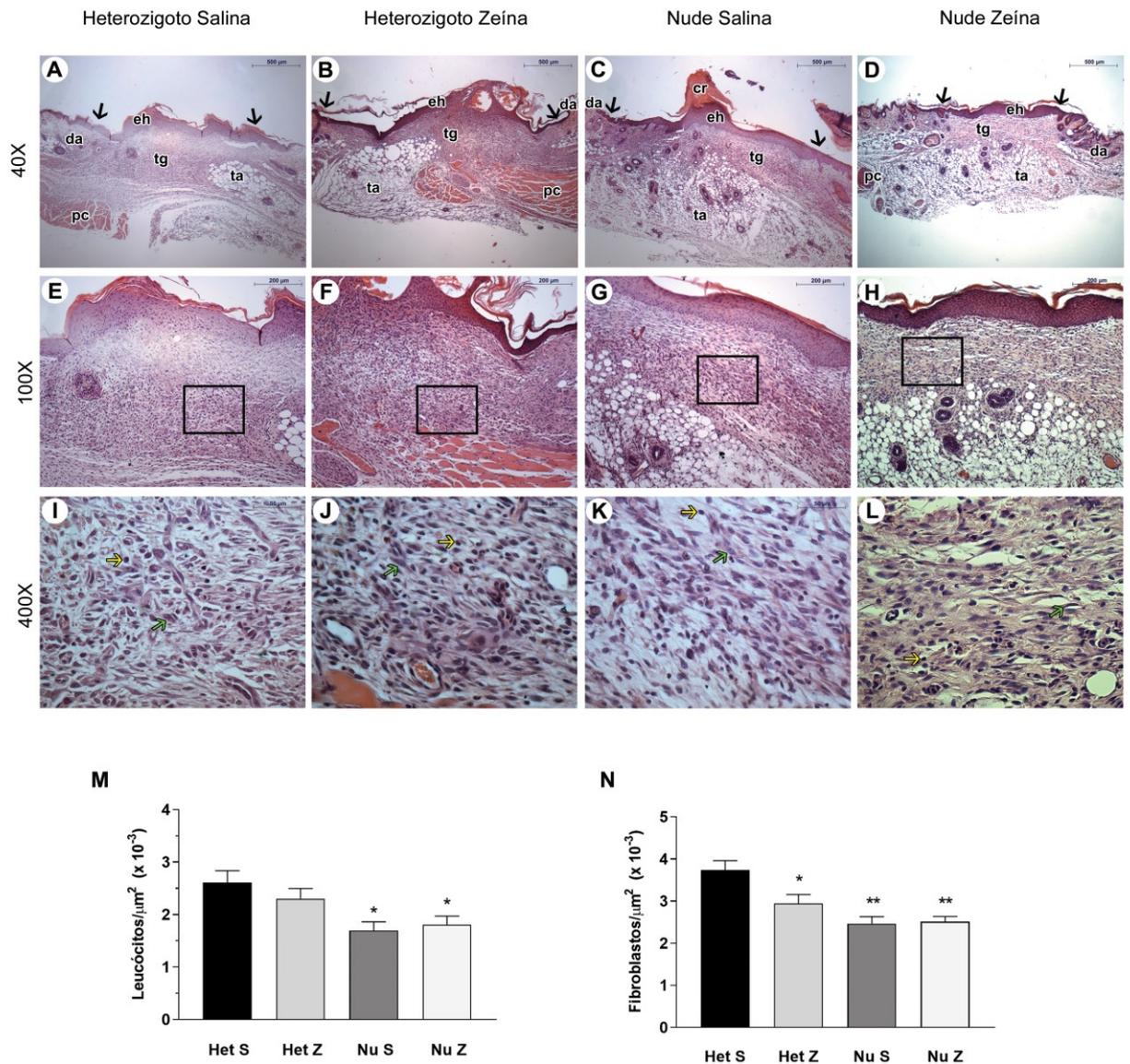


Figura 7 – Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Hematoxilina/Eosina. Fotomicrografias representativas de pele corada com HE, 7 dias após a lesão (A-L), e análise morfométrica de leucócitos (M) e fibroblastos (N) na região da lesão. As setas pretas (A-D) indicam os limites da área lesional, e as letras pequenas representam crosta (cr), derme adjacente (da), epitélio hiperplásico (eh), panículo carnoso (pc), tecido adiposo (ta) e tecido de granulação (tg). Os quadros pretos em E-H indicam as regiões que foram ampliadas em I-L. As setas em I-L indicam leucócitos (seta amarela) e fibroblastos (seta verde) quantificados na análise morfométrica. Nos gráficos (M-N), as siglas correspondem aos grupos Heterozigoto (Het) ou Nude (Nu), e Salina (S) ou Zeína (Z). Os dados representam a média \pm SEM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo Heterozigoto Salina, e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Heterozigoto Salina. Escala de barras: 500 μm , 200 μm , 50 μm .

Observou-se no grupo controle Heterozigoto Salina (**Figura 7 A, E, I**) que todos os animais apresentam reepitelização completa; o epitélio neoformado apresenta características hiperproliferativas (acantose, hipergranulose, hiperkeratose e parakeratose) e encontra-se acima da linha normal ao epitélio adjacente. A crosta apresenta-se solta ou parcialmente aderida ao epitélio neoformado, e a área lesional apresenta tecido conjuntivo com pequena deposição de colágeno, cuja trama é mais frouxa e possui fibras bem curtas, finas e pouco coradas (**Figura 10**).

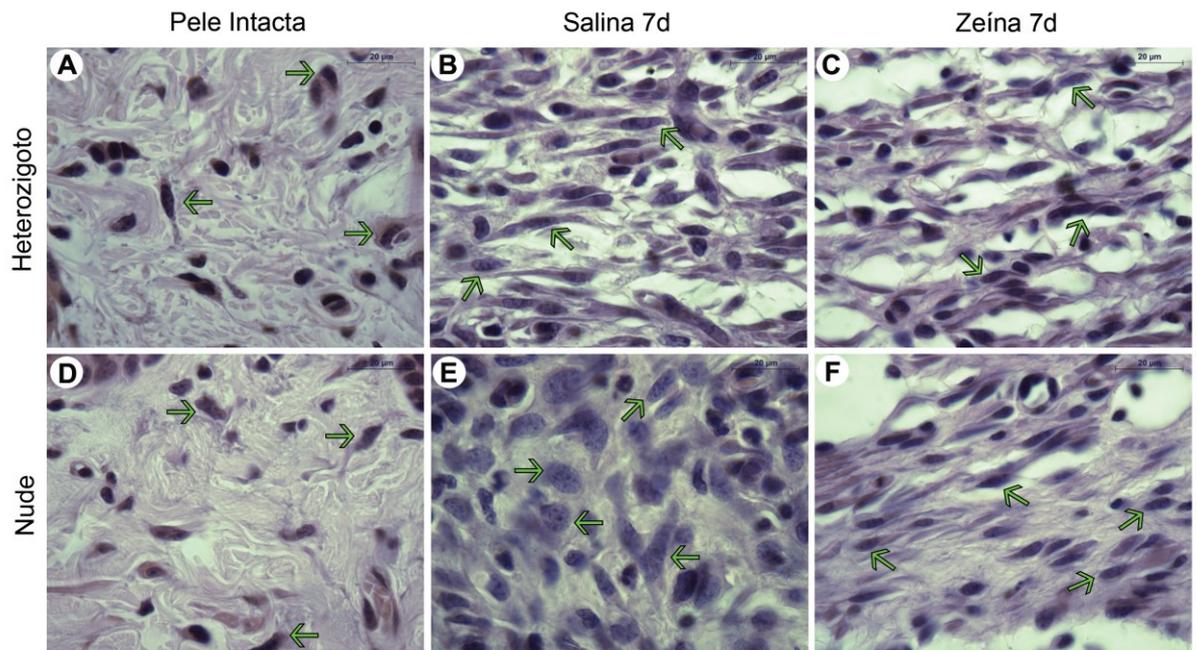


Figura 8 – Fotomicrografias de fibroblastos em lesões de 7 dias a partir da coloração por Hematoxilina/Eosina. Fotomicrografias representativas de pele corada com HE, intacta (A e D) e 7 dias após a lesão (B-C e E-F), em aumento de 1000 vezes. As setas verdes indicam exemplos de fibroblastos observados no tecido de granulação. Escala de barras: 50 µm.

A zona de transição entre este tecido conjuntivo cicatricial - chamado de tecido de granulação - e a derme intacta é bem nítida. O tecido de granulação apresenta celularidade bem alta, o que inclui leucócitos e fibroblastos, e estes últimos apresentam morfologia usual (citoplasma fusiforme, núcleos ovalados com cromatina descondensada e

nucléolos evidentes – ver **Figura 8**). Observa-se também que a infiltração celular se estende para além da região lesional, espalhando-se para os tecidos adjacentes – derme intacta, tecido adiposo e tecido muscular. Ainda, observa-se edema e vasos congestionados, além de uma infiltração de tecido adiposo na área lesional.

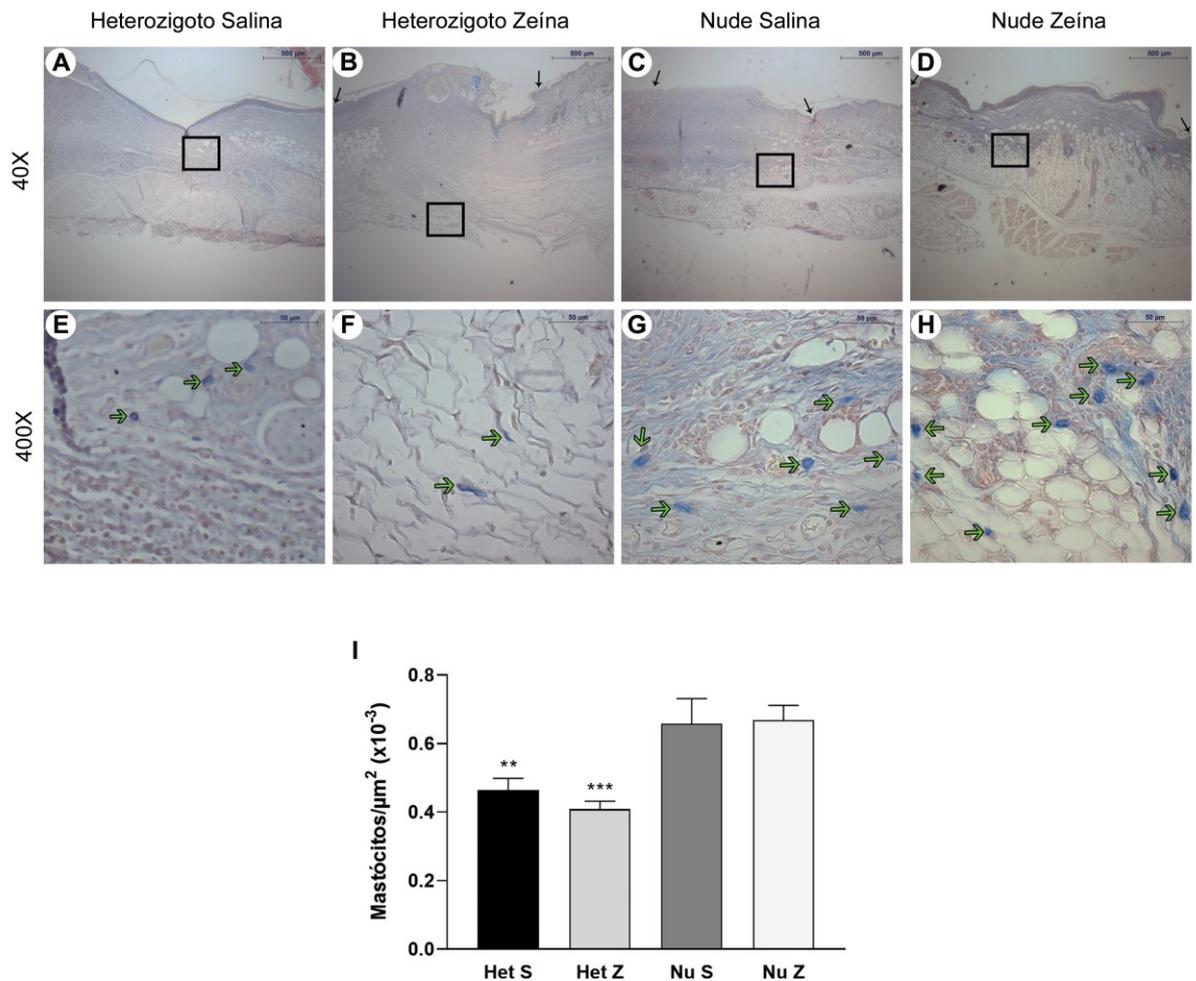


Figura 9 – Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Alcian Blue/Safranina. Fotomicrografias representativas de pele corada com Alcian Blue/Safranina, 7 dias após a lesão (A-H), e análise morfométrica de mastócitos no tecido de granulação do corte (I). Os quadros pretos em A-D indicam as regiões que foram ampliadas, e foram posicionados de forma a evidenciar a presença de mastócitos na região lesional. As setas pretas em A-D indicam os limites da região lesional, e as setas verdes em E-H indicam mastócitos quantificados na análise morfométrica. No gráfico (I), as siglas correspondem aos grupos Heterozigoto (Het) ou Nude (Nu), e Salina (S) ou Zeína (Z). Os dados representam a média \pm SEM; ** $p < 0,01$ em relação aos

grupos Nude Salina e Nude Zeína, e $***p \leq 0,001$ em relação aos grupos Nude Salina e Nude Zeína. Escala de barras: 500 μ m, 200 μ m, 50 μ m.

No grupo experimental Heterozigoto Zeína (**Figura 7 B, F, J**) observou-se que todos os animais apresentam reepitelização completa; o epitélio neoformado também apresenta características hiperproliferativas e encontra-se acima da linha normal ao epitélio adjacente. A crosta apresenta-se solta em relação ao epitélio neoformado, nos cortes histológicos. A área lesional parece ser menor do que no grupo Heterozigoto Salina, e apresenta tecido de granulação com deposição de colágeno diferente em relação ao controle – a trama é mais fechada e densa, e possui fibras mais definidas, espessas e coradas (**Figura 10**). A zona de transição entre tecido cicatricial e derme intacta é mais suave e mais difícil de detectar do que no grupo heterozigoto controle. E o tecido de granulação não apresenta tanto edema e congestão de vasos, apresentando menor celularidade em relação ao grupo Heterozigoto Salina (**Figuras 7 e 10**).

A análise quantitativa do número de leucócitos, fibroblastos e mastócitos mostrou que houve uma redução significativa de fibroblastos, mas não de leucócitos, no grupo Heterozigoto Zeína em relação ao grupo controle Salina (**Figura 7, M-N**), e não houve diferença no número de mastócitos (**Figura 9, I**). Os fibroblastos apresentam morfologia usual, e não se observou diferenças morfológicas em relação aos fibroblastos do grupo controle. Observa-se também que a infiltração celular é mais contida na região lesional em relação a Heterozigoto Salina, apesar de espalhar-se parcialmente para os tecidos adjacentes – derme intacta, tecido adiposo e tecido muscular. O grupo Heterozigoto Zeína apresenta uma maior infiltração de tecido adiposo na área lesional, em relação ao grupo controle. Os aspectos qualitativos observados sugerem que o grupo experimental Heterozigoto Zeína apresentou infiltrado inflamatório mais

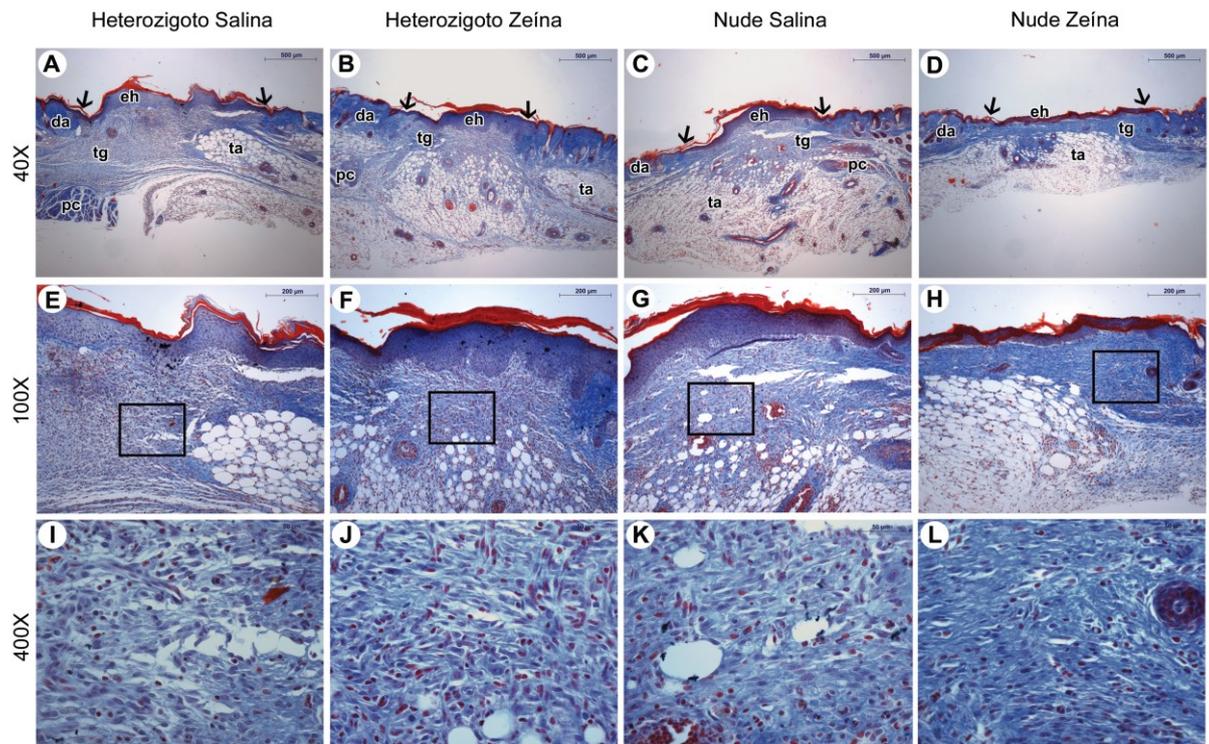


Figura 10 – Análise histopatológica de lesões de 7 dias a partir da coloração por Tricrômico de Masson. Fotomicrografias representativas de pele corada com Masson, 7 dias após a lesão. As setas pretas (A-D) indicam os limites da área lesional, e as letras pequenas representam derme adjacente (da), epitélio hiperplásico (eh), panículo carnososo (pc), tecido adiposo (ta) e tecido de granulação (tg). Os quadros pretos em E-H indicam as regiões que foram ampliadas em I-L. Escala de barras: 500µm, 200 µm, 50 µm.

contido à área da lesão, menor número de fibroblastos e tecido cicatricial mais maduro em relação ao grupo Heterozigoto Salina.

Observou-se no grupo Nude Salina (**Figura 7 C, G, K**) que todos os animais apresentam reepitelização completa; o epitélio neoformado apresenta características hiperproliferativas (acantose, hipergranulose, hiperkeratose e parakeratose) e encontra-se acima da linha normal ao epitélio adjacente. A crosta apresenta-se solta ou parcialmente aderida ao epitélio neoformado. A área lesional é menos extensa em relação aos grupos heterozigotos, e apresenta tecido de granulação com maior deposição de colágeno do que em Heterozigoto Salina. Sua trama está mais avançada e densa em colágeno do que no grupo Heterozigoto

Salina, mas ainda está se organizando. O colágeno se organiza em arranjos fibrilares, que podem ou não formar fibras mais espessas e delimitadas. A zona de transição entre tecido cicatricial e derme intacta é mais suave do que no grupo Heterozigoto Salina. O tecido de granulação apresenta menor edema, congestão de vasos e capilares mais numerosos, além de alta celularidade, comparados ao grupo Heterozigoto Salina.

A análise morfométrica no grupo Nude Salina indicou uma maior presença de mastócitos (**Figura 9, I**) e uma menor presença de leucócitos e fibroblastos (**Figura 7, M-N**) no tecido cicatricial em relação ao grupo Heterozigoto Salina, de forma estatisticamente significativa. Em animais nude controle vários fibroblastos apresentam morfologia diferenciada, e estão muito ativados. Eles são maiores em dimensão, em relação ao que se observa usualmente, e possuem núcleos vesiculosos bem arredondados e maiores, com vários nucléolos pequenos (**Figura 8**) A infiltração celular nas regiões adjacentes ao tecido de granulação é, em geral, menor do que em Heterozigoto Salina, mas observa-se um aumento na quantidade de mastócitos na derme intacta adjacente. Observa-se também uma maior infiltração de tecido adiposo na área lesional, em relação ao grupo Heterozigoto Salina. Os aspectos qualitativos observados sugerem que o grupo Nude Salina apresentou menos inflamação, com menor número de células inflamatórias e de fibroblastos, e tecido cicatricial mais maduro em relação ao grupo Heterozigoto Salina.

Observou-se no grupo Nude Zeína que todos os animais apresentam reepitelização completa; o epitélio neoformado apresenta características hiperproliferativas e encontra-se acima da linha normal ao epitélio adjacente. A crosta apresenta-se solta em relação ao epitélio neoformado. Em relação ao grupo Nude Salina, o grupo Nude Zeína apresenta tecido de granulação com deposição de colágeno diferente – a trama é mais fechada, regular e contínua, com fibras mais delimitadas, compactas e coradas (**Figura 10**). A zona de transição entre tecido

cicatricial e derme intacta é mais suave e mais difícil de detectar do que no grupo Nude Salina. O tecido de granulação apresenta menor edema e, aparentemente, uma quantidade bem menor de capilares, além de menor celularidade de forma geral, em relação ao grupo Nude Salina.

A análise morfométrica não mostrou diferença significativa no número de fibroblastos, leucócitos e mastócitos no tecido cicatricial de Nude Zeína, em relação ao grupo Nude Salina (**Figura 7 e 9**). Observou-se que os fibroblastos apresentaram morfologia usual em processos cicatriciais - citoplasma fusiforme, núcleos ovalados com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (ver **Figura 8**).

Observa-se também que a infiltração celular é mais contida ao tecido de granulação, em relação ao grupo Nude Salina e parece espalhar-se pouco para os tecidos adiposo e muscular adjacentes – já a derme intacta adjacente apresenta maior número de células, inclusive mais mastócitos (**Figura 9, J**). Aqui também se observa uma maior infiltração de tecido adiposo na área lesional. Os aspectos qualitativos observados sugerem que este grupo apresentou aspectos inflamatórios menos evidentes, quantidade bem menor de fibroblastos hiperativados e tecido cicatricial mais maduro em relação ao grupo Nude Salina.

5.3 Análise histológica da região lesional aos 40 dias

Cortes histológicos das amostras coletadas ao 40° dia pós-lesão foram submetidos a coloração por Tricrômico de Masson, e analisou-se a organização de fibras colágenas no tecido cicatricial (**Figura 11**).

Nessa coloração, percebe-se em todos os grupos que o epitélio reconstituído se apresenta normotrófico, com o mesmo aspecto e espessura observados no epitélio adjacente. A epiderme reconstituída não apresenta regeneração de anexos cutâneos (folículo piloso e glândula sebácea). Já a derme não é reconstituída - observa-se a interrupção da continuidade tecidual, com o preenchimento da área

correspondente por tecido cicatricial e/ou adiposo. Além disso, o tecido cicatricial é menos extenso aos 40 dias pós lesão do que aos 7 dias pós lesão.

No grupo Heterozigoto Salina, observa-se que a neoderme apresenta fibras paralelas entre si em toda a sua extensão, diferentemente da pele intacta, que apresenta fibras com arranjo em rede. As fibras da cicatriz aparentam ser bem mais curtas, mais finas e menos coradas do que as fibras da derme intacta adjacente. A trama é bem mais aberta do que se observa em pele intacta.

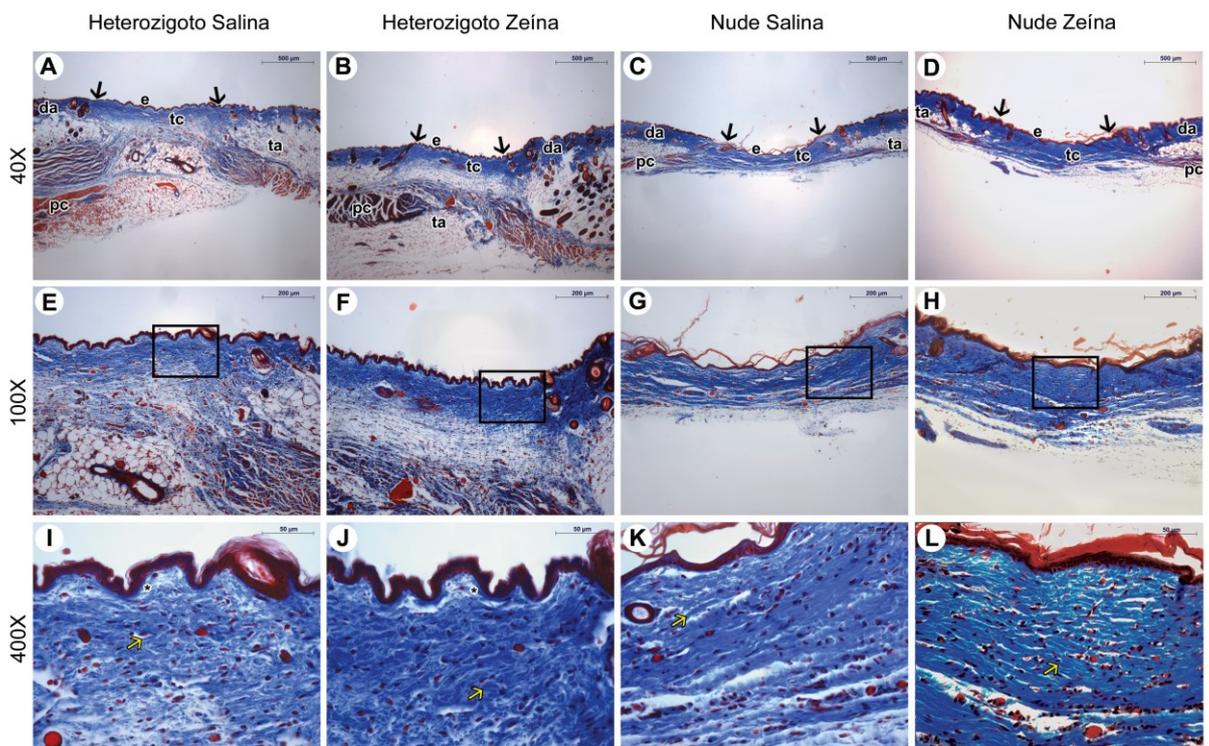


Figura 11 – Análise histopatológica de lesões de 40 dias a partir da coloração por Tricrômico de Masson. Fotomicrografias representativas de pele corada com Masson, 40 dias após a lesão. As letras pequenas representam derme adjacente (da), epitélio (e), pânículo carnoso (pc), tecido adiposo (ta) e tecido cicatricial (tc). As setas pretas (A-D) indicam os limites da área lesional, e os quadros pretos em E-H indicam as regiões que foram ampliadas em I-L. Nos quadros I-L, as setas amarelas indicam fibras colágenas do tecido cicatricial, enquanto os asteriscos (*) indicam áreas de reorganização inicial de derme papilar. Escala de barras: 500µm, 200 µm, 50 µm.

No grupo Heterozigoto Zeína, observa-se que o tecido cicatricial é menos extenso em relação ao grupo Heterozigoto Salina, e o arranjo das fibras colágenas é paralelo na região central da lesão, mas nas bordas é mais semelhante ao arranjo em rede encontrado na derme intacta adjacente. O aspecto das fibras colágenas nas bordas da lesão parece mais semelhante ao que se encontra na derme intacta adjacente, em relação espessura, teor em colágeno e aspecto da trama tecidual.

No grupo Nude Salina, observa-se que o tecido cicatricial apresenta arranjo paralelo de fibras colágenas em toda a sua extensão. As fibras se organizam em arranjos fibrilares maiores e são um pouco mais coradas e melhor definidas em relação ao grupo Heterozigoto Salina. A trama é mais aberta do que na pele intacta do nude. Observa-se também que o tecido cicatricial apresenta áreas com reorganização da derme papilar.

No grupo Nude Zeína, observa-se que o tecido cicatricial é menos extenso em relação ao grupo Nude Salina. O arranjo das fibras colágenas é paralelo na região central da lesão, e nas bordas é mais semelhante ao arranjo em rede encontrado na derme intacta adjacente. As fibras se organizam em formações fibrilares mais espessas, definidas e coradas do que no grupo Nude Salina, de forma que o aspecto visual da trama é mais parecido com o que se observa na derme adjacente. A neoderme também apresenta áreas de reorganização da derme papilar.

6 DISCUSSÃO

Alguns trabalhos anteriores descreveram feridas cutâneas em nude como regenerativas, sem formação de tecido cicatricial (GAWRONSKA-KOZAK *et al.*, 2006; GAWRONSKA-KOZAK, 2011). É importante ressaltar que tais trabalhos descrevem o reparo de feridas incisionais cujas bordas foram mantidas próximas por cliques metálicos – o que não foi o caso deste trabalho, no qual utilizou-se o modelo de feridas excisionais. Outros trabalhos com reparo de lesões cutâneas em animais nude foram elaborados tendo modelos diferentes de feridas excisionais, nas quais as lesões recebem, por exemplo, administração tópica ou intradérmica de queratinócitos ou células-tronco mantidos em cultura, com ou sem métodos que impedem a contração da ferida (REES *et al.*, 2001; RODRIGUEZ *et al.*, 2015; DOI *et al.*, 2016). É importante considerar que a dinâmica de reparo de uma ferida incisional é muito diferente em relação a uma ferida excisional - afinal, a perda significativa de tecido e a maior intensidade da inflamação representam desafios maiores, aos quais os camundongos nude não conseguem responder de forma regenerativa, como demonstra este trabalho. Apesar da limitação que o modelo de ferimento excisional em camundongos apresenta - considerando-se a pele solta e a presença do panículo carnoso, que contribui para a contração da ferida nesses animais - este ainda é um modelo interessante para a compreensão do reparo em feridas cutâneas de maiores extensões, as quais possuem manejo mais complexo e são as mais desafiadoras no contexto clínico.

Estudos anteriores com camundongos nude fornecem informações importantes sobre o ambiente cutâneo e sobre o perfil inflamatório desses animais. Kur-Pietrowska e colaboradores (2017) relatam certa similaridade entre o perfil de expressão gênica da pele de camundongos nude adultos e de camundongos embriões de 14 dias (E14) – estes apresentam reparo regenerativo de lesões cutâneas. Os genes relacionados a reparo de lesões e sua fase inflamatória essencial, como fibronectina-1, *IL-1 α* e *IL-18*, possuem expressão aumentada, enquanto genes relacionados a diferenciação e desenvolvimento possuem expressão diminuída, inclusive aqueles relacionáveis a *Foxn1*. De forma geral, o perfil de expressão gênica na pele de animais nude

adultos e E14 aponta para um ambiente mais pró-regenerativo e de menor diferenciação, onde a resposta a uma lesão cutânea seria mais imediata. Essa retenção de certas características embrionárias em pele de adultos nude é um fenômeno neotênico. Curiosamente, a fase de transição do reparo regenerativo para o reparo cicatricial em embriões de camundongos ocorre em torno do 16º dia, período em que a expressão de *Foxn1* ocorre em toda a epiderme (LEE *et al.*, 1999).

O emprego de animais nude em estudos de reparo cutâneo pode oferecer informações interessantes, do contexto de pesquisa básica ao contexto clínico. Primeiro, porque o perfil pró-regenerativo desses animais pode ajudar na melhor compreensão do processo de reparo tecidual – o que pode gerar informações valiosas não apenas na compreensão do reparo cutâneo, mas também de outros tecidos e órgãos. Segundo, porque o sistema imune deles possui um funcionamento diferenciado – por exemplo, há evidências de que a ausência de linfócitos tímicos conduz a uma hiperativação compensatória de alguns leucócitos, como veremos mais adiante. Compreender melhor como se dá esse funcionamento diferenciado pode ser útil para entendermos melhor como as células do sistema imune se relacionam entre si em processos imunológicos de maior complexidade. Inclusive, os efeitos indiretos da tolerância oral estão entre esses processos - ainda não se sabe muito bem como a reexposição parenteral a uma proteína da dieta resulta em efeitos imunológicos de caráter sistêmico, ou quais células estão envolvidas e como elas atuam.

Dentre o que se sabe sobre os efeitos indiretos, pode-se discutir sobre as evidências de redirecionamento da resposta imune pela administração parenteral de tolerógenos, demonstrado em diferentes tipos de processos inflamatórios por nosso grupo de pesquisa. Observou-se que a reexposição parenteral a proteínas da dieta não ocasiona aumento dos títulos de anticorpos específicos no sangue, ao contrário do que se observa normalmente em imunizações – e, curiosamente, isso ocorre tanto para o tolerógeno quanto para uma outra proteína não-relacionada que seja administrada de forma concomitante (CARVALHO *et al.*, 1994). Em um modelo de peritonite induzida por sensibilização e posterior desafio intraperitoneal com OVA, os animais que receberam OVA previamente na

alimentação apresentaram peritonite mais branda, com menor infiltração de neutrófilos e eosinófilos (RODRIGUES et al., 2006). A indução de edema de pata pela injeção de carragenina, modelo inflamatório que não requer sensibilização prévia, resultou em menor edema nos animais que receberam injeção concomitante da proteína tolerada, ou tolerógeno (RAMOS et al., 2009). Aqui, observa-se que os efeitos produzidos pela reexposição parenteral ao tolerógeno não se restringem à administração concomitante de uma proteína não-relacionada, mas engloba outros tipos de estímulo inflamatório. Em outro modelo, a injeção i.p. de OVA concomitante à injeção endovenosa de ovos de *Schistosoma mansoni* reduziu a formação de granulomas pulmonares em camundongos previamente alimentados com OVA (AZEVEDO et al., 2012). Em modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol, animais que receberam homogenato cardíaco por via oral anteriormente apresentaram infiltração leucocitária mais branda, apesar da maior expressão de FoxP3+ na área lesional, melhor perfil de reparo cardíaco e melhor performance cardíaca (RAMOS et al., 2012). Ainda, em modelo de ferida cutânea incisional e excisional, a reexposição parenteral a OVA ou zeína em animais tolerantes a estas proteínas reduziu aspectos inflamatórios da lesão e promoveu melhora do tecido cicatricial em fase de remodelamento, tanto em camundongos normais quanto em camundongos diabéticos (COSTA et al., 2011; CANTARUTI et al., 2017).

Em suma, esses trabalhos contemplam diferentes modelos inflamatórios para um mesmo modelo de indução de tolerância, e em conjunto reforçam a constatação de que o redirecionamento da resposta imune ocorre de forma sistêmica, de maneira a reduzir a reatividade específica exacerbada e otimizar o reparo tecidual, onde houver um processo inflamatório concomitante ou posterior à reexposição parenteral ao tolerógeno (CARVALHO et al., 1994). Esse efeito pode ser observado até 5 dias após a injeção do tolerógeno, mas não ocorre caso a injeção da proteína ocorra 24 horas após a lesão (CANTARUTI et al., 2017; FRANCO-VALÊNCIA et al., 2022). A via de administração empregada para a reexposição foi a via intraperitoneal, majoritariamente. Mas, em um contexto clínico, essa é uma via mais invasiva e arriscada – por exemplo, para pacientes hospitalizados cujo quadro de saúde seja mais crítico, como grandes queimados.

Na busca de alternativas, em trabalhos mais recentes do nosso grupo investigou-se as vias subcutânea e tópica – ambas resultaram em melhora na inflamação e no tecido cicatricial, mas apenas a via subcutânea é efetiva para a observação dos efeitos indiretos sistêmicos. A via tópica é efetiva apenas localmente, na ferida sobre a qual o tolerógeno foi depositado (FRANCO-VALÊNCIA, 2020).

Ainda, demonstrou-se que a tolerância oral está ligada à participação de linfócitos T, tanto em termos de atividade linfocitária quanto em termos de maior presença deles no ambiente inflamatório (RICHMAN *et al.*, 1978; IZCUE *et al.*, 2009; CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016; CANTARUTI *et al.*, 2017). Entretanto, ainda não se sabe que tipos de linfócitos podem estar contribuindo para os efeitos positivos da injeção de tolerógeno, por exemplo, no reparo de lesões cutâneas, e nem como isso ocorre (CANTARUTI *et al.*, 2017; NÓBREGA, 2019; FRANCO-VALÊNCIA, 2020). Então, neste trabalho buscou-se contribuir com a melhor compreensão desse envolvimento de linfócitos T, empregando-se lesão cutânea excisional como modelo inflamatório, e animais nude – que não apresentam linfócitos T típicos - como modelo animal.

Em relação às análises de pele intacta dos animais, observou-se algumas diferenças morfológicas entre eles. Comparando-se animais WT C57BL/6 e BALB/c com os animais mutados para Foxn1 (heterozigoto e nude), observa-se que as diferenças gerais se resumem a tecido adiposo mais espesso e epiderme mais descamativa nos animais mutados. O grupo Nude possui diferenças mais marcadas em relação aos demais - epiderme mais proliferativa, folículos pilosos com pelos anormais, e derme cheia de mastócitos. Essas mesmas características morfológicas foram observadas e descritas anteriormente (FLANAGAN, 1966; KELLER *et al.*, 1976; WALENDZIK *et al.*, 2020). Descobriu-se que a pele deles apresenta fenótipo neotênico, com perfil de expressão gênica mais proliferativo e com menor grau de diferenciação (KUR-PIOTROWSKA *et al.*, 2017). Os pelos apresentam diferenciação defeituosa de queratinócitos durante a fase anágena, e se espiralam no interior do folículo, ou se quebram, antes de atingirem a epiderme – isso é o que caracteriza o fenótipo nude nesses animais (FLANAGAN, 1966; MEIER *et al.*, 1999). Além da expressão de Foxn1, outro fator importante na formação e diferenciação de novos folículos pilosos é a

interação entre células indiferenciadas do bulbo piloso e linfócitos T reguladores Foxp3⁺ (ALI *et al.*, 2017). Mas animais nude também não possuem linfócitos T, e até o momento ainda não está claro qual seria o papel dessa ausência nas alterações pilosas observadas em camundongos Foxn1^{-/-}. Ainda, o número aumentado de mastócitos encontrado na pele intacta desses animais também foi reportado anteriormente, bem como a diferenciação de mastócitos e a predominância de mastócitos imaturos na pele deles (ALDENBORG & ENERBÄCK, 1986; KELLER *et al.*, 1976;; MAYRHOFER & BAZIN, 1981; RIBATTI, 2018).

Comparando-se os grupos Nude Salina e Heterozigoto Salina, percebe-se que animais nude possuem um perfil de reparo mais proliferativo e menos inflamado do que os animais heterozigotos eutímicos. Nas lesões de 7 dias observa-se perfis inflamatórios diferentes; nos animais nude há aspectos inflamatórios menos pronunciados, infiltrado celular com perfil diferente - menos fibroblastos e leucócitos, e mais mastócitos - e fibroblastos muito ativados. Além disso, a deposição de matriz encontra-se mais pronunciada – aos 7 dias está avançada, em organização, e aos 40 dias há fibras colágenas que parecem ser mais espessas, contínuas e coradas, além de mais áreas de reorganização de derme papilar. Essas observações reforçam a constatação de que animais nude possuem perfil de reparo mais proliferativo, como apontam trabalhos anteriores (CHIRCOP *et al.*, 2002; GAWRONSKA-KOZAK, 2011).

Comparando-se os animais eutímicos - grupos Heterozigoto Salina e Heterozigoto Zeína - observa-se que o grupo Zeína apresenta características correspondentes aos efeitos indiretos da tolerância oral, mas de forma mais branda do que se observou em trabalhos anteriores (CANTARUTI *et al.*, 2017; FRANCO-VALÊNCIA *et al.*, 2022). As lesões aos 7 dias apresentam redução de edema e do infiltrado celular, e deposição de MEC mais pronunciada e homogênea ao longo da área da lesão, no grupo Zeína. Mas a redução da infiltração celular foi mais branda do que o usual – e só houve diferença significativa para a redução de fibroblastos. Aos 40 dias as lesões do grupo Zeína possuem aspecto e coloração mais contínuos em relação à pele adjacente, inclusive no aspecto visual das fibras colágenas, mas o arranjo delas tende a ser

mais paralelo do que se observou em trabalhos anteriores do grupo com reparo de feridas (NÓBREGA, 2019; FRANCO-VALÊNCIA, 2020). Esse abrandamento dos efeitos indiretos da tolerância oral sobre o reparo cutâneo pode ter sofrido influência de dois fatores: uma possível interferência da heterozigose nos mecanismos da tolerância oral; ou alterações no estabelecimento dessa tolerância. Ambos serão discutidos mais à frente.

Ao comparar-se os grupos Nude Salina e Nude Zeína, também se observa uma modificação mais branda dos efeitos indiretos da tolerância oral sobre o reparo cutâneo do grupo Zeína, comparado ao que se observou em trabalhos anteriores (CANTARUTI *et al.*, 2017; FRANCO-VALÊNCIA *et al.*, 2022). Isso ocorre tanto em aspectos inflamatórios quanto em aspectos de remodelamento da lesão, perceptíveis na análise qualitativa, e pode ser mais explorado em trabalhos futuros. No grupo Zeína há indícios de resposta inflamatória mais controlada, em lesões de 7 dias - redução de edema, menor congestão vascular e capilares menos numerosos. Mas a modificação do infiltrado celular não apresentou diferença estatística, apesar desse infiltrado parecer visualmente menor. Os fibroblastos, que no grupo Nude Salina apresentam diferenças morfológicas indicativas de maior ativação, apresentam morfologia usual no grupo Nude Zeína. Essas diferenças morfológicas não foram observadas nos trabalhos anteriores, mas nestes observou-se diferenças na expressão de α -SMA entre os grupos salina e zeína, o que pode estar relacionado a diferenças na ativação de fibroblastos (CANTARUTI, 2016; FRANCO-VALÊNCIA, 2020). Quanto ao remodelamento da lesão, a deposição de matriz também é mais pronunciada e homogênea no grupo Zeína, tanto aos 7 quanto aos 40 dias, e a organização das fibras aos 40 dias é mais semelhante ao que se observa na derme adjacente, em relação ao grupo Salina. Mas o arranjo das fibras aos 40 dias no grupo Zeína tende a ser mais paralelo do que se observou nos trabalhos anteriores. Em geral, a ocorrência de efeitos da injeção de tolerógenos sobre o reparo em Nude Zeína, ainda que em menor grau, pode indicar que linfócitos não tímicos estejam participando do estabelecimento da tolerância oral em nude. Ou pode decorrer de outros fatores, como discutiremos adiante. Ainda, cabe ressaltar que uma análise morfométrica de capilares será importante para verificar se há diferença significativa entre os grupos Nude Salina e Nude Zeína.

Ao comparar-se os animais tolerizados – Heterozigoto Zeína e Nude Zeína - observa-se que a injeção de zeína promoveu melhora do reparo tecidual de ambos, mas gerando perfis inflamatórios diferentes. As diferenças nos perfis inflamatórios eram esperadas, já que nude não possui linfócitos T. O tecido cicatricial aos 7d e 40d também possui aspecto diferenciado; as fibras colágenas em nude são mais coradas e compactadas, e as fibras aos 40d são visualmente mais próximas da derme adjacente do que no heterozigoto. Isso é coerente com as diferenças identificadas na comparação dos grupos Nude Salina e Heterozigoto Salina, e com o que se encontra descrito na literatura – animais nude realmente apresentam um perfil mais regenerativo de reparo tecidual, comparados tanto a animais eutímicos quanto a animais que apresentam diferentes perfis de imunodeficiência. Dentre as diferenças mais marcantes estão reepitelização acelerada, altos níveis de TGF- β 3 e ácido hialurônico e baixos níveis de TGF- β 1 na região lesional (GAWRONSKA-KOZAK *et al.*, 2006). Além disso, os grupos Zeína tendem a apresentar maior infiltração de adipócitos na região lesional do que seus pares Salina.

É possível que a tolerização tenha sido parcialmente comprometida nos animais nude e heterozigoto por estes terem recebido ração autoclavada, como parte do protocolo padrão de manutenção de animais imunodeficientes. Além de eliminar toda a carga microbiana que a ração pusesse conter, esse procedimento provavelmente alterou a estrutura proteica da zeína, bem como de outras proteínas contidas na ração – o que pode resultar na obtenção de peptídeos diferentes na mucosa gastrointestinal. Uma vez que a tolerância oral depende do contato entre as proteínas ingeridas e as células do sistema imune, a tolerância oral a zeína pode ter sido comprometida após a autoclavagem da ração. Esse é um fator que precisa ser melhor estudado em experimentos futuros. Mas, ainda assim, observou-se diferenças importantes entre os grupos salina e zeína, tanto em animais heterozigoto quanto em nude. Isso é um indicativo de que é possível observar modificação do curso do reparo tecidual pela injeção de zeína em animais nude, ainda que ela apresente um perfil diferenciado de animais eutímicos. Para verificar se os efeitos da injeção de zeína são decorrentes de tolerância oral em menor grau, na ausência de linfócitos tímicos, será

interessante fazer os experimentos em camundongos nude alimentados com ração não autoclavada, para descartar alterações relativas ao processo de esterilização da ração.

A literatura apresenta relatos sobre linfócitos T ($CD3^+$) extratímicos, tanto em animais WT quanto em animais nude. Linfócitos intraepiteliais (IEL), por exemplo, estão associados aos epitélios intestinal, respiratório, genitourinário e cutâneo; eles são predominantemente $CD3^+$ em animais eutímicos - células $CD3^-$ expressam cadeias ζ em vez de cadeias γ no receptor, e estão relacionadas à diferenciação extratímica intestinal - com predomínio de $CD8^+$ em alguns locais, e evidências sugerem que parte deles possui origem extratímica (GUY-GRAND *et al.*, 1994; BEAGLEY & HUSBAND, 1998). IEL intestinais são abundantes no epitélio do intestino (1 IEL para cada 10 células epiteliais), não recirculam, e exibem um fenótipo efetor ou de memória, geralmente oligoclonal e relacionado à microbiota comensal (VAN KAER & OLIVARES-VILLAGÓMEZ, 2018). Em estudo sobre fenótipos de IEL intestinais em animais nude e eutímicos, detectou-se células $CD3^+CD8^+Thy1^-$ e $CD3^+CD8^+Thy^{low}$ expressando $TCR\gamma\delta$ em animais nude, e também número significativo de células $CD3^-CD8^+$ na mesma localização de IEL intestinais (DE GEUS *et al.*, 1990). Observou-se também que, em nude, linfócitos T extratímicos ocupam principalmente a mucosa intestinal, mas a linfopoiese ocorre mesmo na ausência do linfonodo mesentérico e das placas de Peyer – essa via gera maior quantidade de linfócitos $\gamma\delta$ e alguns $\alpha\beta$, e é reprimida em animais eutímicos (GUY-GRAND *et al.*, 2003; NONAKA *et al.*, 2005).

Em estudo conduzido por Speiser *et al.* (1992) utilizou-se quimeras de medula óssea a partir de camundongos SCID (C.B-17/lcr-scid/scid, sem LTs mas com timo funcional) e nude, para avaliar-se o desenvolvimento de LTs citotóxicos após infecção viral. Camundongos SCID receptores de medula óssea nude desenvolveram LT maduros restritos ao MHC nude e restritos ao MHC do receptor, mas a depleção de LTs no material medular gerou apenas LTs restritos ao MHC do receptor. Com isso, os autores sugerem que animais nude possuem uma etapa extratímica de seleção clonal positiva para linfócitos. Ainda, observou-se em animais eutímicos linfócitos identificados apenas no epitélio intestinal, de

fenótipo CD8 $\alpha\alpha^+$ com TCR β reativo a superantígenos (GUY-GRAND *et al.*, 2003) – o que sugere que essas células podem ser importantes para os fenômenos imunológicos que ocorrem na mucosa intestinal, seja na homeostase/reparo ou na interação com a microbiota e proteínas/peptídeos obtidos da alimentação (GUY-GRAND *et al.*, 2003). Outro relato interessante é o de Kennedy e colaboradores (1992), que relatam que animais nude apresentam acúmulo crescente de linfócitos Thy-1 $^+$, CD3 $^+$, CD4 $^+$ e CD8 $^+$ a medida que envelhecem, e estes apresentam números decrescentes de marcadores de células T imaturas, e que em qualquer idade os linfonodos apresentam mais células maduras do que o baço.

Em relação a este trabalho, a observação de efeitos indiretos da tolerância oral em camundongos nude abre perspectiva para a investigação de que tipos de linfócitos estão envolvidos no estabelecimento da tolerância, tanto na fase intestinal quanto na reexposição parenteral ao tolerógeno. Como linfócitos $\alpha\beta$ estão presentes em quantidade pouco expressiva em nude, é provável que linfócitos $\gamma\delta$ participam desse processo – relatos anteriores demonstram que a depleção de TCR $\gamma\delta$ de animais eutímicos resultou em inibição da tolerância oral (KE *et al.*, 1997). Seria interessante avaliar quais são as semelhanças e diferenças em relação ao estabelecimento da tolerância em animais eutímicos. Ainda, a literatura relata que linfócitos $\gamma\delta$ participam de eventos importantes na homeostase e no reparo de lesões em tecidos de barreira, como a renovação epitelial, o combate a agentes externos e o recrutamento de células para o ambiente lesional, e participam inclusive da homeostase do tecido adiposo (JAMESON *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2020). Considerando-se as mudanças na dinâmica de células imunológicas devido à deficiência de linfócitos T, e inclusive as alterações relativas ao tecido adiposo, o estudo do reparo cutâneo em animais nude também pode fornecer informações valiosas sobre a gama de mecanismos celulares envolvidos tanto na tolerização quanto no reparo cutâneo em si.

Relatos sobre atividade adipogênica em camundongos Foxn1 $^{+/+}$ e Foxn1 $^{+/-}$ indicam que Foxn1 está envolvido em vias de sinalização ligadas à diferenciação adipogênica. Observou-se que animais heterozigotos apresentam menor

expressão de reguladores chave da adipogênese, como PPAR γ e leptina, e menor ganho de peso, ao receberem dieta rica em lipídeos. Observou-se relação entre a inativação progressiva de Foxn1, de Foxn1^{+/+} para Foxn1^{-/-}, e a menor expressão gênica desses reguladores da adipogênese, tanto ao receberem a dieta lipídica quanto durante o reparo de lesões cutâneas (WALENDZIK *et al.*, 2020). Ainda, há evidências de que adipócitos do tecido adiposo dérmico são ativados durante o reparo cutâneo, de forma que a proliferação de células precursoras gera adipócitos que ocupam a área lesional na fase inflamatória, e que são importantes para o recrutamento de fibroblastos e a reestruturação da derme (SCHMIDT & HORSLEY, 2013; Shook *et al.*, 2020). Porém, é possível que o ambiente menos propenso à diferenciação adipogênica permita um redirecionamento fisiológico para um estado mais proliferativo, de forma semelhante ao que ocorre com queratinócitos. E isso seria coerente com a observação de uma camada mais espessa de tecido adiposo dérmico em heterozigotos e nude, e com a observação de maior infiltração de células adiposas na área lesional de animais nude, como descrito neste trabalho.

Experimentos em nude indicam que esses animais apresentam hiperativação de macrófagos, a qual sofre influência da microbiota intestinal e regride aos níveis usuais de atividade quando os animais são reconstituídos com timo ou linfócitos esplênicos de camundongos doadores (SHARP & COLSTON, 1984). Esses dados indicam que a hiperativação macrofágica seria uma resposta compensatória desenvolvida na ausência de linfócitos tímicos, e intensificada pela presença de microbiota comensal. É possível que algo semelhante ocorra também com outras células imunológicas em nude, como mastócitos - a presença pronunciada dessas células na derme de animais nude poderia ser também uma resposta imunológica relacionada à ausência de LTs no ambiente cutâneo. Mas, até o momento, não há dados suficientes sobre isso na literatura. A ativação compensatória de macrófagos, e possivelmente de outras células imunes, pode ser um fator importante na resposta de animais nude à reexposição parenteral ao tolerógeno, e seria interessante investigar mais cuidadosamente essa variável.

Para dar sequência às investigações iniciadas neste trabalho, considerando-se as implicações referentes a autoclavagem da ração e modificação da zeína, pode-se empregar outra proteína, como a OVA, na tolerização e reexposição parenteral. Nesse caso, seria possível inserir o grupo controle da OVA que não foi previamente tratado por via oral – afinal, como todos os camundongos já apresentam exposição oral à zeína ao comerem a ração, a injeção de zeína gera os efeitos indiretos da tolerância oral, e não uma reação imunizante. Pode-se ainda investigar diferentes subtipos celulares por imunofluorescência – como leucócitos (CD45⁺), linfócitos (CD3⁺), macrófagos (F4/80, e RELM- α para macrófagos M2), mastócitos (CD45⁺/CD117⁺) e miofibroblastos (α -SMA) - para melhor compreender como a ausência de linfócitos tímicos altera o recrutamento e o perfil de atividade dessas células durante o reparo cutâneo. Pode-se também analisar o sistema elástico na pele desses animais, através de coloração Resorcina-Fucsina, e fazer análise adicional de espessura e densidade de fibras colágenas, através de coloração de Picrossírius visualizada sob luz polarizada.

7 CONCLUSÃO

Observou-se que há diferenças na pele e no reparo cutâneo de animais heterozigoto e nude, e que a administração parenteral de uma proteína da dieta gerou alterações no reparo de ambas as linhagens, tanto aos 7 dias quanto aos 40 dias pós lesão.

Isso dá indícios de que a ausência de linfócitos T tímicos pode alterar, mas não impedir, a observação de efeitos indiretos em animais nude – possivelmente pela presença de linfócitos extratímicos em seu corpo. Esses resultados contribuem para a compreensão progressiva do fenômeno da tolerância oral e de seus mecanismos celulares, o que é muito importante para o entendimento de como este fenômeno pode ser utilizado como estratégia terapêutica efetiva.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDENBORG, F.; ENERBÄCK, L. Histamine content and mast cell numbers in tissues of normal and athymic rats. **Agents and Actions**, v. 17, n. 5-6, p. 454–459, mar. 1986.

ALI, N.; ZIRAK, B.; RODRIGUEZ, R. S.; PAULI, M. L.; TRUONG, H. A.; LAI, K.; AHN, R.; CORBIN, K.; LOWE, M. M.; SCHARSCHMIDT, T. C.; TARAVATI, K.; TAN, M. R.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; NOSBAUM, A.; BERTOLINI, M.; LIAO, W.; NESTLE, F. O.; PAUS, R.; COTSARELIS, G.; ABBAS, A. K.; ROSENBLUM, M. D. Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 1119-1129.e11, jun. 2017.

AZEVEDO, G. M., Jr; COSTA, R. A.; RESENDE, M. A.; RODRIGUES, C. M.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Indirect Effects of Oral Tolerance Inhibit Pulmonary Granulomas to *Schistosoma mansoni* Eggs. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

BAEK, J. O.; ROH, J. Y.; JUNG, Y. Oral tolerance inhibits atopic dermatitis-like type 2 inflammation in mice by modulating immune microenvironments. **Allergy**, v. 72, n. 3, p. 397–406, 22 jul. 2016.

BANDEIRA, A., COUTINHO, A., CARNAUD, C., JACQUEMART, F., FORNI, L. 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**, v. 86, n. 1, p. 272–276, 1989.

BEAGLEY, K.; HUSBAND, A. J. Intraepithelial Lymphocytes: Origins, Distribution, and Function. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 18, n. 3, p. 237–254, 1998.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 2059–2081, 4 out. 2012.

BUKOWSKA, J.; KOPCEWICZ, M.; WALENDZIK, K.; GAWRONSKA-KOZAK, B. Foxn1 in Skin Development, Homeostasis and Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1956, 4 jul. 2018.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo - Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Gen, Guanabara Koogan, 2013.

BROCKES, J. P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. 566–574, ago. 2002.

CANTARUTI, T. A. **Efeitos indiretos da tolerância oral a zeína melhoram a cicatrização de pele em camundongos diabéticos**. 2016. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

CANTARUTI, T. A.; COSTA, R. A.; DE SOUZA, K. S.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 314–323, 6 abr. 2017.

CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; DE SOUZA, A. V.; VAZ, N. M. Indirect Effects of Oral Tolerance in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 39, n. 6, p. 533–538, jun. 1994.

CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M. Indirect Effects are Independent of the Way of Tolerance Induction. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, n. 6, p. 613–618, jun. 1996.

CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; VAZ, N. M. Indirect Effects of Oral Tolerance Cannot be Ascribed to Bystander Suppression. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 3, p. 276–281, mar. 1997.

CASTRO-JUNIOR, A. B.; HORTA, B. C.; GOMES-SANTOS, A. C.; CUNHA, A. P.; SILVA STEINBERG, R.; NASCIMENTO, D. S.; FARIA, A. M.; VAZ, N. M. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 171–181, dez. 2012.

CHIA, C. Y.; MEDEIROS, A. D.; CORRAES, A.; MANSO, J.; SILVA, C.; TAKIYA, C. M.; VANZ, R. L. Healing effect of andiroba-based emulsion in cutaneous wound healing via modulation of inflammation and transforming growth factor beta 3. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1000–1015, nov. 2018.

CHIRCOP, M. P.; YU, Y.; BERNEY, C. R.; YANG, J. L.; CROWE, P. J.; WALSH, W. R. Wound healing and growth factor expression in T lymphocyte deficiency. **ANZ Journal of Surgery**, v. 72, n. 7, p. 491–495, jul. 2002.

CHUN, K.-H. Mouse model of the adipose organ: the heterogeneous anatomical characteristics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 44, n. 9-10, p. 857–875, out. 2021.

CODEN, M. E.; BERDNIKOV, S. Eosinophils in wound healing and epithelial remodeling: Is coagulation a missing link? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 93–103, 14 mar. 2020.

COSTA, R. A.; RUIZ-DE-SOUZA, V.; AZEVEDO, G. M., Jr, GAVA, E.; KITTEN, G. T.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 4, p. 487–497, 7 jun. 2011.

COSTA, R. A.; MATOS, L. B.; CANTARUTI, T. A.; DE SOUZA, K. S.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, p. 475–485, mar. 2016.

COWIN, A. J.; BROSNAN, M. P.; HOLMES, T. M.; FERGUSON, M. W. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. **Developmental Dynamics**, v. 212, n. 3, p. 385–393, jul. 1998.

CUNHA, A. P.; OLIVEIRA, R. P.; JÚNIOR, A. B.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. **Cellular Immunology**, v. 258, n. 2, p. 152–160, 2009.

CUNHA, M. G.; CUNHA, A. L. G.; MACHADO, C. A. Hipoderme e tecido adiposo subcutâneo: duas estruturas diferentes. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 4, p. 355-359, 2014.

DAKIN, R. Remarks on a Cutaneous Affection, produced by certain Poisonous Vegetables. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 7, p. 98–99, maio 1829.

DOI, H.; KITAJIMA, Y.; LUO, L.; YAN, C.; TATEISHI, S.; ONO, Y.; URATA, Y.; GOTO, S.; MORI, R.; MASUZAKI, H.; SHIMOKAWA, I.; HIRANO, A.; LI, T. S. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 5 jan. 2016.

DRISKELL, R. R.; JAHODA, C. A.; CHUONG, C. M.; WATT, F. M.; HORSLEY, V. Defining dermal adipose tissue. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 9, p. 629–631, 1 set. 2014.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. **Current Dermatology Reports**, v. 7, n. 4, p. 350–358, 28 set. 2018.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 232–259, ago. 2005.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 13, n. 2-4, p. 143–157, 1 jun. 2006.

FERGUSON, M. W. J.; O'KANE, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1445, p. 839–850, 29 maio 2004.

FLAJNIK, M. F.; KASAHARA, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 47–59, 8 dez. 2009.

FLANAGAN, S. P. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genetical Research**, v. 8, n. 3, p. 295–309, dez. 1966.

FRANCO-VALÊNCIA, K. **Aplicação de proteínas toleradas por via subcutânea ou tópica melhora a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos**. 2020. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

FRANCO-VALENCIA, K.; NÓBREGA, I.; CANTARUTI, T.; BARRA, A.; KLEIN, A.; AZEVEDO-JR, G. M.; COSTA, R. A.; CARVALHO, C. R. Subcutaneous injection of an immunologically tolerated protein up to 5 days before skin injuries improves wound healing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, 2022.

GALLO, V.; CIRILLO, E.; GIARDINO, G.; PIGNATA, C. FOXP1 Deficiency: from the Discovery to Novel Therapeutic Approaches. **Journal of Clinical Immunology**, v. 37, n. 8, p. 751–758, 21 set. 2017.

GAWRONSKA-KOZAK, B. Regeneration in the Ears of Immunodeficient Mice: Identification and Lineage Analysis of Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 7-8, p. 1251–1265, jul. 2004.

GAWRONSKA-KOZAK, B.; BOGACKI, M.; RIM, J. S.; MONROE, W. T.; MANUEL, J. A. Scarless skin repair in immunodeficient mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 3, p. 265–276, 28 jun. 2006.

GAWRONSKA-KOZAK, B. Scarless skin wound healing in FOXP1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. **Matrix Biology**, v. 30, n. 4, p. 290–300, maio 2011.

GAWRONSKA-KOZAK, B. Foxp1 Control of Skin Function. **Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 5685, 16 ago. 2020.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L.; AL, E. **Tratado de histologia em cores**. 3.ed. Rio De Janeiro (Rj): Elsevier, 2007.

GUY-GRAND, D.; ROCHA, B.; MINTZ, P.; MALASSIS-SERIS, M.; SELZ, F.; MALISSEN, B.; VASSALLI, P. Different use of T cell receptor transducing modules in two populations of gut intraepithelial lymphocytes are related to distinct pathways of T cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 673–679, 1 ago. 1994.

GUY-GRAND, D.; AZOGUI, O.; CELLI, S.; DARCHE, S.; NUSSENZWEIG, M. C.; KOURILSKY, P.; VASSALLI, P. Extrathymic T Cell Lymphopoiesis: Ontogeny and Contribution to Gut Intraepithelial Lymphocytes in Athymic and Euthymic Mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 3, p. 333–341, 27 jan. 2003.

HANSON, D.G.; MORIMOTO, T. A role of digestion in orally induced tolerance to ovalbumin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 65, n. 3, p. 227-228, 1980.

HERSON, M. R.; NETO, N. T.; PAGGIARO, A. O.; CARVALHO, V. F.; MACHADO, L. C. C.; UEDA, T.; FERREIRA, M. C. Estudo epidemiológico das sequelas de queimaduras: 12 anos de experiência da Unidade de Queimaduras da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. **Rev Bras Queimaduras**. v. 8, n. 3, p.82-86, 2009.

HOSTMANN, A.; MEYER, T.; MAUL, J.; PREISS, J.; BOORTZ, B.; THIEL, A.; DUCHMANN, R.; ULLRICH, R. Preexisting antigen-specific immune responses are modulated by oral KLH feeding in humans. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1991–1996, 27 abr. 2015.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 313–338, 1 abr. 2009.

JAMESON, J.; UGARTE, K.; CHEN, N.; YACHI, P.; FUCHS, E.; BOISMENU, R.; HAVRAN, W. L. A role for skin $\gamma\delta$ T cells in wound repair. **Science**, vol. 296, n. 5568, p. 747-749, abr. 2002.

JIANG, D.; RINKEVICH, Y. Scars or Regeneration?—Dermal Fibroblasts as Drivers of Diverse Skin Wound Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 617, 17 jan. 2020.

JOHNSON, M. D.; WITHERDEN, D. A.; HAVRAN, W. L. The Role of Tissue-resident $\gamma\delta$ T Cells in Stress Surveillance and Tissue Maintenance. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 686, 11 mar. 2020.

JULIER, Z.; PARK, A. J.; BRIQUEZ, P. S.; MARTINO, M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 13–28, abr. 2017.

KE, Y.; PEARCE, K.; LAKE, J. P.; ZIEGLER, H. K.; KAPP, J. A. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. **The Journal of Immunology**, vol. 158, n. 8, p. 3610-3618, 1997.

KELLER, R.; HESS, M. W.; RILEY, J. F. Mast cells in the skin of normal, hairless and athymic mice. **Experientia**, v. 32, n. 2, p. 171–172, fev. 1976.

KENNEDY, J. D.; PIERCE, C. W.; LAKE, J. P. Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. **Journal of Immunology**, vol. 148, n. 6, p. 1620-1629, 1992.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, n. 3, p. 298–312, 7 fev. 2019.

KÖPF-MAIER, P.; MBONEKO, V. F.; MERKER, H. J. Nude mice are not hairless. A morphological study. **Acta Anatomica**, v. 139, n. 2, p. 178–190, 1990.

KUR-PIOTROWSKA, A.; KOPCEWICZ, M.; KOZAK, L. P.; SACHADYN; P., GRABOWSKA, A.; GAWRONSKA-KOZAK, B. Neotenic phenomenon in gene expression in the skin of Foxn1- deficient (nude) mice - a projection for regenerative skin wound healing. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 56, 9 jan. 2017.

LAHMANN, W. M.; MENEZES, J. S.; VERDOLIN, B. A.; VAZ, N. M. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 8, p. 813-821, 1992.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 14 maio 2016.

LAROUCHE, J.; SHEORAN, S.; MARUYAMA, K.; MARTINO, M. M. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 7, p. 209–231, jul. 2018.

LEE, D.; PROWSE, D. M.; BRISSETTE, J. L. Association between Mouse nude Gene Expression and the Initiation of Epithelial Terminal Differentiation. **Developmental Biology**, v. 208, n. 2, p. 362–374, abr. 1999.

LOSQUADRO W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3), p. 283–289, 2017.

MAYRHOFER, G.; BAZIN, H. Nature of the thymus dependency of mucosal mast cells. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 64, n. 3, p. 320-331, 1981.

MEIER, N.; DEAR, T. NEIL.; BOEHM, T. Whn and mHa3 are components of the genetic hierarchy controlling hair follicle differentiation. **Mechanisms of Development**, v. 89, n. 1-2, p. 215–221, dez. 1999.

MILLER, A.; LIDER, O.; WEINER, H. L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 791–798, 1 out. 1991.

MINEUR, P.; COLIGE, A. C.; DEROANNE, C. F.; DUBAIL, J.; KESTELOOT, F.; HABRAKEN, Y.; NOËL, A.; VÖÖ, S.; WALTENBERGER, J.; LAPIERE, C. M.; NUSGENS, B. V.; LAMBERT, C. A. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 6, p. 1261–1273, 17 dez. 2007.

NONAKA, S.; NAITO, T.; CHEN, H.; YAMAMOTO, M.; MORO, K.; KIYONO, H.; HAMADA, H.; ISHIKAWA, H. Intestinal $\gamma\delta$ T Cells Develop in Mice Lacking Thymus, All Lymph Nodes, Peyer's Patches, and Isolated Lymphoid Follicles. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 1906–1912, 7 fev. 2005.

NÓBREGA, I. C. **Estudo da temporalidade dos efeitos da injeção parenteral de proteínas imunologicamente toleradas no reparo de feridas na pele**. 2020. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

OLIVEIRA, R. P.; SANTIAGO, A. F.; FICKER, S. M.; GOMES-SANTOS, A. C.; FARIA, A. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and

leads to long-lasting effects. **Journal of Immunological Methods**, v. 421, p. 36–43, jun. 2015.

PEREIRA, J. R. C. Tratamento de cicatrizes patológicas com associação de cefalín, heparina e alantoina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p. 603-608, 2003.

RAINA, N.; RANI, R.; PAHWA, R.; GUPTA, M. Biopolymers and treatment strategies for wound healing: an insight view. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, p. 1–17, 29 out. 2020.

RAMOS, G. C.; RODRIGUES, C. M.; AZEVEDO, G. M., Jr; PINHO, V.; CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. **Immunology**, v. 126, n. 3, p. 354–362, mar. 2009.

RAMOS, G. C.; DALBÓ, S.; LEITE, D. P.; GOLDFEDER, E.; CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M.; ASSREUY, J. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. **Autoimmunity**, v. 45, n. 3, p. 233–244, 2012.

REES, R. S.; ADAMSON, B. F.; LINDBLAD, W. J. Use of a cell-based interactive wound dressing to enhance healing of excisional wounds in nude mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 4, p. 297–304, jul. 2001.

RHEA, L.; DUNNWALD, M. Murine Excisional Wound Healing Model and Histological Morphometric Wound Analysis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 162, 21 ago. 2020.

RIBATTI D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 176, n. 1, p. 55–60, 2018.

RICHMAN, L. K.; CHILLER, J. M.; BROWN, W. R.; HANSON, D. G.; VAZ, N. M. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 6, p. 2429–2434, 1978.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2010.

RODRIGUES, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 517–525, 2006.

RODRIGUES, M.; KOSARIC, N.; BONHAM, C.A.; GURTNER, G.C. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665-706, jan 2019.

RODRIGUEZ, J.; BOUCHER, F.; LEQUEUX, C.; JOSSET-LAMAUGARNY, A., ROUYER, O.; ARDISSON, O.; RUTSCHI, H.; SIGAUDO-ROUSSEL, D.; DAMOUR, O.; MOJALLAL, A. Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, dez. 2015.

ROTA, I. A.; DHALLA, F. FOXN1 deficient nude severe combined immunodeficiency. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 12, n. 1, 11 jan. 2017.

SCHMIDT, B. A.; HORSLEY, V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. **Development**, v. 140, n. 7, p. 1517–1527, 12 mar. 2013.

SEVILLA, L.; PÉREZ, P. Roles of the Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in Skin Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1906, 29 jun. 2018.

SEN, C. K.; GORDILLO, G. M.; ROY, S.; KIRSNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT, T. K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 17, n. 6, p. 763–71, 2009.

SHARP, A. K.; COLSTON, M. J. Elevated Macrophage Activity in Nude Mice. **Experimental cell biology**, v. 52, n. 1-2, p. 44–47, 1984.

SONAMUTHU, J.; CAI, Y.; LIU, H.; KASIM, M.; VASANTHAKUMAR, V. R.; PANDI, B.; WANG, H.; YAO, J. MMP-9 responsive dipeptide-templated natural protein hydrogel-based wound dressings for accelerated healing action of infected diabetic wound. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 1058–1069, jun. 2020.

SPEISER, D. E.; STIIBI, U.; ZINKERNAGEL, R. M. Extrathymic positive selection of $\alpha\beta$ T-cell precursors in nude mice. **Nature**, v. 355, n. 6356, p. 170–172, jan. 1992.

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

SUNDBERG, J. P.; NANNEY, L.B.; FLECKMAN, P.; KING, L. E. 23 Skin and Adnexa. *In* : TREUTING, P. ; DINTZIS, S. M. **Comparative Anatomy and Histology, a mouse and human atlas**. 1. ed. Amsterdam : Boston; Elsevier/Academic Press, 2012. p. 433-455.

THOMAS, H.C.; PARROTT, M.V. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. **Immunology**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 1974.

VAN KAER, L.; OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D. Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 7, p. 2235–2244, 19 mar. 2018.

VAZ, N. M.; MAIA, L. C.; HANSON, D. G.; LYNCH, J. M. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 2, p. 110–115, ago. 1977.

VAZ, N. M.; MAIA, L. C.; HANSON, D. G.; LYNCH, J. M. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 83–91, mar. 1981.

VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Assimilation, tolerance and the end of innocence. **Ciência e Cultura**, v. 46, p. 351-357, 1994.

VAZ, N.; FARIA, A. M.; VERDOLIN, B. A.; CARVALHO, C. R. Immaturity, Ageing and Oral Tolerance. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, n. 3, p. 225–229, set. 1997.

VERDOLIN, B. A.; FICKER, S. M.; FARIA, A. M.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 2, p. 211–219, fev. 2001.

WALENDZIK, K.; KOPCEWICZ, M.; BUKOWSKA, J.; PANASIEWICZ, G.; SZAFRANSKA, B.; GAWRONSKA-KOZAK, B. The Transcription Factor FOXN1 Regulates Skin Adipogenesis and Affects Susceptibility to Diet-Induced Obesity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 6, p. 1166-1175.e9, jun. 2020.

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunological Reviews**, v. 182, n. 1, p. 207–214, ago. 2001.

WELLS, H. G.; OSBORNE, T. B. The Biological Reactions of the Vegetable Proteins I. Anaphylaxis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 66–124, 3 jan. 1911.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, v. 10, n. 9, p. 200223, set. 2020.

ZHAO-FLEMING, H.; HAND, A.; ZHANG, K.; POLAK, R.; NORTHCUT, A.; JACOB, D.; DISSANAIKE, S.; RUMBAUGH, K. P. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on post-surgical complications against the backdrop of the opioid crisis. **Burns & Trauma**, v. 6, n. 1, 13 set. 2018.