

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia

Kênia Soares de Souza

**Participação do hormônio alfa-melanócito estimulante na
melhora do reparo de feridas pelos efeitos sistêmicos da
tolerância oral**

KÊNIA SOARES DE SOUZA

**Participação do hormônio alfa-melanócito estimulante na
melhora do reparo de feridas pelos efeitos sistêmicos da
tolerância oral**

Orientadora: Prof^a. Cláudia Rocha Carvalho

Área de concentração: Biologia Celular

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

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Outubro/2015

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

*Dedico este trabalho a TODOS que choraram e sorriram comigo
durante esta longa jornada ...*

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

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

João Guimarães Rosa

Grande Sertão: Veredas

Tente

E não diga que a vitória está perdida

Se é de batalhas que se vive a vida

Tente outra vez

Raul Seixas, Paulo Coelho e Marcelo Motta

Música Tente outra vez

Agradecimentos

Agradeço a Deus que me permitiu passar por esta grande alegria e estar aqui hoje com todos vocês

A toda minha família que sempre lutou ao meu lado, me estimulou e sustentou nos momentos mais difíceis da minha vida, meu refúgio durante as tempestades mais fortes...

Ao Gladison companheiro de todas as horas. Obrigado por toda amizade, cuidado e tanto amor dedicado a mim...

À professora Cláudia Carvalho que nunca desistiu de mim e sempre acreditou que este momento ia chegar...

Ao professor Nelson Vaz, grande mestre e (des)organizador de meu raciocínio...

Ao Thiago Cantaruti, irmão de coração, parceiro para toda a vida!! Pronto para todas as horas...obrigada por toda ajuda.

Ao Daniel Galdino por palavras tão doces ditas nos momentos certos que me fortaleceram sempre...

A Evelin, Nathália e Isabela por toda ajuda, conversas e sorrisos e renovação...como é bom ver a vida emanando de vocês!!

Aos meus queridos Geraldo, Claudiney e Raquel por gastarem seu tempo tão precioso me oferecendo pacientemente tanto conhecimentos pessoais e profissionais. Vocês são realmente exemplos que pretendo seguir!

Resumo

A injeção parenteral de proteínas toleradas tem efeitos sistêmicos e bloqueia imunizações e reações inflamatórias desencadeadas por antígenos não especificamente relacionados. Estes efeitos não dependem da presença dos dois antígenos no mesmo local e a injeção da proteína tolerada pode preceder a proteína não relacionada por até três dias. A injeção intraperitoneal de proteínas toleradas minutos antes de lesões na pele de camundongos inibe a inflamação durante o período inicial do reparo resultando em cicatrizes menores, com padrão de deposição de fibras colágenas na neoderme semelhante ao encontrado na pele intacta. O efeito da injeção da proteína tolerada é de ação rápida e sistêmica o que nos levou a suspeitar da participação de hormônios e neuropeptídios em seu mecanismo. Neste trabalho investigamos a participação do hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH), do peptídeo intestinal vasoativo (VIP), da substância P (SP) e de glicocorticóides na melhora do reparo de lesões de pele. Os níveis plasmáticos de neuropeptídios foram avaliados por ensaio imunoenzimático. Três dias após as lesões, encontramos níveis elevados de α -MSH e níveis inalterados de VIP e SP no plasma de camundongos tolerantes que receberam uma injeção i.p. da proteína tolerada. Nestes camundongos tolerantes, utilizando imunomarcção, detectamos também maior expressão de α -MSH na região das feridas. Os efeitos da injeção i.p. de α -MSH foram semelhantes àqueles produzidos pela injeção de proteínas toleradas, com redução do infiltrado inflamatório, redução da cicatriz e reorganização das fibras colágenas com padrão semelhante ao da pele intacta. A injeção da proteína agouti, um antagonista do receptor de α -MSH bloqueou os efeitos anti-inflamatórios da injeção da proteína tolerada. A injeção de um antagonista do receptor de glicocorticóide, RU 486, não inibiu estes efeitos. O conjunto de resultados indicam fortemente a participação do neuropeptídeo α -MSH nos efeitos anti-inflamatórios da injeção de proteínas toleradas.

Palavras chave: tolerância oral, reparo de feridas, pele, cicatrização, neuropeptídios

Abstract

Parenteral injection of a tolerated protein has systemic effects that are able to block immune responses and inflammatory reactions triggered by exposure to unrelated antigens. These effects are not dependent on the presence of the two antigens on the same site and the injection of the tolerated protein may precede the exposure to the second antigen by up to three days. The intraperitoneal injection of tolerated proteins soon before skin injury inhibits the inflammation in the initial phase of healing, resulting in smaller scars and an arrangement of collagen fibers in the neodermis similar to that found in intact skin. The fast and systemic effects of tolerated proteins made us suspect of the involvement of glucocorticoid, neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating-hormone (α -MSH), vasoactive intestinal-peptide (VIP) and substance P (SP) in their anti-inflammatory events. Plasma levels of peptides were assayed by immunoenzymatic methods. We found increased plasma levels of α -MSH after tolerated antigen injection, but no alteration in VIP and SP. Using immunofluorescence we detected higher expression of α -MSH in wounds of mice exposed to the tolerated protein. The effects of i.p. injection of α -MSH were similar to those of tolerated antigen i.p. injection, with reduced inflammatory infiltrates, smaller scars and better organization of collagen fibers. Injection of agouti signaling protein, an antagonist of α -MSH receptor, blocked the anti-inflammatory effects of the tolerated protein. These results indicate that α -MSH takes part in the anti-inflammatory and healing effects of the tolerated protein.

Keywords: oral tolerance, wound repair, skin, scarring, neuropeptides

Lista de figuras

Figura 1 – Protocolo experimental - Avaliação da injeção de hormônio alfa melanócito estimulante (α -MSH) na melhora da cicatrização.

Figura 2 – Protocolo experimental - Injeção de α -MSH ou uma proteína tolerada: similaridades na cicatrização?

Figura 3 – Protocolo experimental - Níveis séricos e cutâneos de neuropeptídeos

Figura 4 – Protocolo experimental - Injeção da proteína agouti

Figura 5 – Protocolo experimental - Injeção da proteína RU

Figura 6 – Injeção de α -MSH 1,0 mg/kg, 30 minutos antes de realização da ferida, diminui o número de leucócitos presentes na lesão.

Figura 7 – Análise das fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas após injeção de α -MSH.

Figura 8 – A injeção do hormônio alfa-melanócito estimulante melhora cicatrização de feridas cutâneas.

Figura 9 – O hormônio alfa-melanócito estimulante melhora o remodelamento da matriz extracelular.

Figura 10– Efeito do hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH) na deposição de colágeno.

Figura 11 – Semelhanças nos padrões de reparo produzidos pela injeção de α -MSH ou injeção de uma proteína tolerada

Figura 12 – Ambos, α -MSH e os efeitos indiretos da tolerância oral, diminuem a área de cicatriz.

Figura 13 – Injeção de α -MSH ou da proteína tolerada melhoram o remodelamento da matriz extracelular.

Figura 14 – Melhora da deposição de fibras colágenas na área da ferida.

Figura 15 – Análise dos níveis séricos dos neuropeptídios α -MSH, VIP e SP e da expressão tecidual de α -MSH e MC-1R.

Figura 16 – Análise das alterações produzidas pela proteína agouti durante as fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas.

Figura 17 – Efeito da administração de um antagonista do receptor de glicocorticóides (RU-486) durante as fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas.

Lista de abreviações

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ADH – Hormônio antidiurético

Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio

α-MSH – Hormônio alfa-melanócito estimulante

anti-DNP – Anticorpo anti- 2,4 - dinitrofenol

α-SMA – α-actina de músculo liso

APC – Célula apresentadora de antígeno

ASP – Proteína sinalizadora agouti

BMP – Proteína básica de mielina

BSA – Albumina de soro bovino

cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CEBIO – UFMG - Centro de bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais.

CD – (do inglês cluster of differentiation) - grupos de diferenciação

CD40L – Ligante de CD40

CD45 – Molécula de superfície expressa em todas as células hematopoiéticas

C57Bl/6 – Linhagem de camundongos

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

DETC – Células T epidérmicas dendríticas

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNP-OVA – dinitrofenil ligado a ovoalbumina

DNP-KLH – (do inglês keyhole limpet hemocyanin) - dinitrofenil ligado a hemocianina de lapa californiana (*Megathura crenulata*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EAE – Encefalomielite experimental autoimune

E-selectina – Moléculas de adesão celular presentes, por exemplo em leucócitos.

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

CGs – Glicocorticóides

GR – Receptor de glicocorticóide

HGG – Gama globulina Humana

HSP-90 – Proteína de choque térmico 90.

H&E – hematoxilina e eosina

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ – Interferon gama
i.p. – Intraperitoneal
IgG – imunoglobulinas G.
IL – Interleucina
I κ B α – Inibidor do fator nuclear kappa-B alfa
JAK/STAT – Proteínas Janus cinases/Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras transcricionais
MC-R – receptor de melanocortina
MC-1R – receptor de melanocortina do tipo 1
MC-2R – receptor de melanocortina do tipo 2
MC-3R – receptor de melanocortina do tipo 3
MC-4R – receptor de melanocortina do tipo 4
MC-5R – receptor de melanocortina do tipo 5
MEC – Matriz extracelular
MRL/MpJ – linhagem de camundongo (Murphy Roths Large)
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal.
mRNA – RNA mensageiro
NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B
NK-1 – Receptor neuroquinina 1
NLSs – Sequências de localização nuclear
OVA – Ovalbumina
PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês, phosphate buffered saline)
PC – Enzima prohormônio convertase
POMC – Pro-opiomelanocortina
RU-486 – Mifepristone
SP – Substância P
TCR – Receptor de célula T
TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
T_H1 – Linfócito T auxiliar 1.
T_H2 – Linfócito T auxiliar 2.
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β – Fator de necrose tumoral beta
VCAM – Molécula de adesão de células vascular
VIP – Peptídeo vasointestinal ativo

Sumário

1 – Introdução	14
1.1 – Tolerância Imunológica	14
1.2 – Tolerância Oral	15
1.3 – Tolerância oral e seus efeitos indiretos	17
1.4 – A pele	20
1.5 – Reparo de feridas de pele	21
1.6 – Neuropeptídios, sistema imune e pele	25
1.7 – Hormônio Alfa-Melanócito Estimulante	26
1.7.1 – Proteína Agouti	30
1.8 – Substância P	31
1.9 – Peptídeo intestinal vasoativo	31
1.10 – Glicocorticóides	32
2 – Justificativa	35
3 – Objetivos	37
3.1 – Objetivo Geral:	37
3.2 – Objetivos específicos:	37
4 – Materiais e Métodos	39
4.1 – Animais	39
4.2 – Indução da tolerância oral	39
4.3 – Antígeno	40
4.4 – Adjuvante	40
4.5 – Injeção parenteral de OVA	40
4.6 – Administração de α -MSH, proteína agouti (antagonista de α -MSH) mifepristone RU - 486 (antagonista do receptor de glicocorticóides)	40
4.7 – Realização das feridas excisionais	41
4.8 – Período pós-operatório e recuperação pós cirúrgica	41
4.9 – Determinação dos níveis séricos de α -MSH, SP e VIP	42
4.10 – Análises macroscópicas	43

4.11 – Histologia e aquisição das imagens -----	43
4.12 – Morfometria -----	44
4.13 – Imunofluorescência e microscopia confocal -----	44
4.14 - Análises estatísticas dos resultados -----	46
4.15 – Protocolos experimentais -----	47
5 – Resultados -----	52
5.1 – Capítulo I - Curva de dose-resposta para o peptídeo α -MSH -----	52
5.2 – Fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas em animais injetados com α -MSH -----	53
5.3 – Remodelamento das feridas -----	57
5.4 – Capítulo II - Comparação entre as alterações produzidas no reparo de lesões cutâneas pela injeção do neuropeptídeo α -MSH ou pela injeção de uma proteína tolerada -----	62
5.5 – A injeção da proteína tolerada aumenta os níveis séricos de α -MSH e sua expressão na região da ferida, onde também podemos encontrar a expressão do receptor de melanocortina do tipo1(MC-R1) -----	68
5.6 – A injeção da proteína agouti, antagonista do receptor de α -MSH,impede a ação anti-inflamatória da proteína tolerada -----	71
5.7 - Os efeitos inibitórios da tolerância oral no infiltrado inflamatório não foram inibidos pela injeção de um antagonista do receptor de corticosteróide -----	74
6 – Discussão -----	76
7 – Conclusões -----	86
8 – Referências bibliográficas -----	87
9 – Anexo - Artigo publicado referente a esta tese -----	99

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Tolerância Imunológica

Medawar e colaboradores, no fim da década de 50, demonstraram que camundongos de uma linhagem (por exemplo, A) expostos a células de uma linhagem diferente (por exemplo, B), durante o desenvolvimento embrionário, tornavam-se imunologicamente tolerantes às mesmas e na fase adulta aceitavam um enxerto de pele de doadores da linhagem B (Billingham et al., 1953). Estas observações deram suporte à teoria de que a tolerância imunológica seria estabelecida no período embrionário ou neonatal, momento no qual o organismo era capaz de discriminar entre o próprio e o estranho e eliminar os linfócitos capazes de reagir com o próprio organismo, tal como proposta posteriormente por Burnet, em 1959, na sua teoria da seleção clonal (Burnet, 1959). Alguns anos mais tarde, Bandeira e colaboradores fizeram experimentos semelhantes aos feitos por Medawar e colaboradores e mostraram que animais tolerantes mantêm clones aloreativos em seus corpos coexistindo com células aloantigênicas dos doadores, demonstrando que o estabelecimento da tolerância imunológica não depende da deleção clonal dos linfócitos aloreativos (Bandeira et al., 1989). Entretanto, atualmente a tolerância imunológica ainda é entendida, principalmente, com base na teoria da seleção clonal proposta por Burnet, sendo definida como um fenômeno capaz de evitar doenças auto-imunes, por mecanismos através dos quais o sistema imune evita a auto-reatividade a componentes do próprio organismo (Faria and Weiner, 2006; Janeway Jr, 2007).

1.2 – Tolerância Oral

O estudo da tolerância imunológica deveria estar historicamente vinculado a uma discussão da tolerância oral, uma vez que a inibição de reações alérgicas pela ingestão prévia de proteínas da dieta tem sido registrada experimentalmente desde o início do século XX (Besredka, 1909¹) (Wells, 1911). Antes disso, a ingestão de infusões de plantas sensibilizantes (*Poisson ivy*) era utilizada por populações indígenas norte americanas para evitar dermatites que poderiam surgir em decorrência do contato com as mesmas (Dakin, 1929).

Essas observações se referem ao que hoje é conhecido como tolerância oral, fenômeno dependente de linfócitos T, classicamente conceituado como sendo a supressão específica de uma resposta imune para um antígeno previamente administrado por via oral, que pode ser adotivamente transferida para animais normais por linfócitos T (Richman, 1978; Vaz et al., 1997; Weiner et al., 2011). A tolerância oral é usualmente avaliada por comparação entre grupos de animais imunizados com um antígeno e que, previamente, receberam ou não este antígeno por via oral e configurada como uma redução significativa das respostas dos animais que ingeriram o antígeno. Na maioria dos trabalhos a tolerância oral é vista como uma inibição das respostas imunes. Entretanto, estudos realizados por Verdolin e colaboradores, em 2001, mostraram que a redução das respostas imunes não é a consequência mais significativa da ingestão de proteínas: o que ocorre é uma estabilização da formação de anticorpos específicos em resposta a imunizações subsequentes em níveis inversamente proporcionais à dose de antígeno previamente ingerida

¹Besredka, A. (1909). De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxielactique. *Ann.Inst.Pasteur*, 23, 166-174.

(Verdolin et al., 2001). Trata-se, portanto, de um fenômeno fisiológico, ativo (Bandeira et al., 1989; Castro-Junior et al., 2012) e diário, a partir do qual o organismo é capaz de conviver harmonicamente com proteínas de sua dieta e, além disso, com uma grande variedade de produtos de bactérias (a microbiota nativa) que colonizam a mucosa intestinal (Macfarlane and Macfarlane, 1997). A mucosa intestinal é um ambiente rico em linfócitos (Faria and Weiner, 2005; Mayer and Shao, 2004; Weiner et al., 2011) e representa um dos maiores componentes do sistema imune (Bhardwaj et al., 1997; Faria and Weiner, 2005; Moog, 1981; Weiner et al., 2011). Nesse local, o organismo interage com uma parcela das proteínas da dieta, que são absorvidas intactas ou parcialmente digeridas e integradas à dinâmica interna do sistema imune (Gardner, 1988).

Os mecanismos propostos para explicar a ocorrência da tolerância oral após a administração oral de altas doses de antígeno, sugerem, por exemplo, que a ligação entre o receptor de célula T (TCR) e o complexo MHC-peptídeo pode acontecer na ausência de co-estimulação ou concomitantemente à presença de ligantes inibitórios (CD95 e CD95L) levando à supressão da resposta imune, pela anergia ou deleção de linfócitos (Faria and Weiner, 2005; Mayer and Shao, 2004; Weiner et al., 2011). Porém, observações de que camundongos neonatos não susceptíveis a tolerância oral podem tornar-se susceptíveis se receberem adotivamente linfócitos singênicos de doadores adultos (Hanson, 1980), sugerem que a tolerância oral é um fenômeno que requer algum grau de organização sistêmica e não um fenômeno subtrativo tal como os citados anteriormente (Vaz et al., 1997).

O estabelecimento da tolerância oral após a administração oral de baixas doses de antígeno, por sua vez, é explicado pela ativação de células T regulatórias. Alguns trabalhos mostram que estas células suprimem a resposta

imune através de citocinas imunossupressivas secretadas ou ligadas a superfície celular ou por meio de receptores inibidores cognatos (Cunha A. P., 2009; Faria and Weiner, 2005; Weiner et al., 2011).

1.3 – Tolerância oral e seus efeitos indiretos

Inesperadamente, em camundongos tolerantes à ovalbumina (OVA), tentativas de imunização parenteral com OVA em adjuvante, inibem também respostas imunes para antígenos não relacionados injetados simultaneamente ou até três dias depois do antígeno tolerado. Carvalho e colaboradores denominaram este fenômeno como efeitos indiretos da tolerância oral (Carvalho and Vaz, 1996; Carvalho et al., 1994). Originalmente, o fenômeno foi descrito por Vaz e colaboradores (Vaz et al., 1981). Camundongos oralmente tolerantes a OVA apresentavam um título reduzido de anticorpos anti-dinitrofenil (anti-DNP) quando imunizados com DNP-OVA, mas respondiam normalmente a DNP-KLH. Entretanto quando, nestes animais tolerantes a OVA, a DNP-KLH era administrada simultaneamente a DNP-OVA, a formação de anticorpos anti-DNP era reduzida; isto não acontecia em animais não tolerantes a OVA. No mesmo estudo foi demonstrado que animais tolerantes a OVA quando imunizados com OVA e agregados de globulina humana (HGG) tinham a produção de anticorpos para HGG reduzida (Vaz et al., 1981). Desde então, diversos trabalhos têm sido realizados no intuito de melhor compreender estes efeitos e têm confirmado que a injeção de uma proteína tolerada não é neutra para o sistema imune (Carvalho and Vaz, 1996), sendo capaz de inibir respostas imunes a outros antígenos não relacionados (Carvalho et al., 1994).

Utilizando um modelo de encefalomielite experimental autoimune (EAE), Miller e colaboradores demonstraram que ratos oralmente tolerantes a OVA e imunizados posteriormente com OVA e proteína básica de mielina (MBP) em adjuvante apresentavam uma redução da EAE (Miller et al., 1991).

Além da OVA, os efeitos indiretos da tolerância oral podem ser induzidos por proteínas da dieta usual de camundongos de laboratório, tais como a zeína, a principal proteína do milho, e mesmo por componentes do próprio corpo, como fibrinogênio murino, ao qual o organismo é naturalmente tolerante (Carvalho and Vaz, 1996).

O antígeno não relacionado deve ser administrado simultaneamente ou até três dias após o antígeno tolerado. A injeção do antígeno tolerado 24h depois do não relacionado, ou somente na imunização secundária, não tem efeitos inibidores (Carvalho et al., 1997). Além disso, a redução da produção de anticorpos para a proteína não relacionada permanece em imunizações posteriores mesmo na ausência do antígeno tolerado (Carvalho et al., 1994).

Na década de 90, Weiner e colaboradores sugeriram que os efeitos inibitórios observados em decorrência da injeção parenteral de uma proteína tolerada juntamente com um antígeno não relacionado, poderiam ser explicados por um mecanismo descrito como “supressão do espectador inocente” (*innocent bystander suppression*) (Miller et al., 1991). A inibição da resposta ao antígeno não relacionado ocorreria pela proximidade dos linfócitos tolerantes a OVA que secretariam citocinas supressoras que atuariam sobre todos os linfócitos a seu redor (Miller et al., 1991). No entanto, os efeitos inibitórios da injeção de antígenos tolerados não dependem da presença de ambas as proteínas em um mesmo local; eles ocorrem mesmo quando os antígenos são injetados por vias diferentes (subcutânea e intraperitoneal). Além

disso, a inibição de respostas ao antígeno não relacionado ocorre em imunizações subsequentes mesmo na ausência do antígeno tolerado (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997). Há também evidências de que os efeitos inibidores não decorrem do que se conhece como competição antigênica (Carvalho et al., 1994). O fenômeno, enfim, não depende da presença de ambas as proteínas em um mesmo local (Azevedo et al., 2012; Carvalho et al., 2002; Carvalho et al., 1997)

Além de inibir a produção de imunoglobulinas, a injeção da proteína tolerada também é capaz de inibir eventos inflamatórios tais como: (a) a formação de granulomas pulmonares ao redor de ovos de *Shistosoma mansoni*, quando ocorrem também mudanças significativas na expressão de ICAM-1 (Azevedo et al., 2012); (b) o edema de pata induzido pela injeção de carragenina (Ramos et al., 2009); (c) a fibrose no coração de ratos após infarto do miocárdio por uma overdose de isoproterenol (Ramos et al., 2012); (d) a peritonite induzida pela imunização com ovalbumina e uma segunda proteína não relacionada (Ramos et al., 2009); e (e) alterações em feridas cirúrgicas cutâneas, com redução da área do tecido de granulação, do número de células inflamatórias e de fibroblastos e com alteração do processo de remodelamento da região da ferida, incluindo um padrão de deposição de matriz extracelular mais similar ao observado na pele intacta, com características mais próximas do processo regenerativo e sem atraso do fechamento da lesão (Costa et al., 2011).

1.4 – A pele

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

É constituída pela epiderme, uma camada mais externa, composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado constituído por quatro tipos celulares: queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. Nessa camada de epiderme também se encontram linfócitos intraepiteliais. Logo abaixo da epiderme se observa a derme constituída por duas regiões: a derme papilar (tecido conjuntivo frouxo) e a derme reticular (conjuntivo denso não modelado). Na primeira, mais superficial, encontram-se as papilas dérmicas que se interdigitam com as cristas epidérmicas sendo constituídas por fibras reticulares (colágeno I e III bem finos) e fibras elásticas (Junqueira, 2004). Na segunda, mais profunda, a derme reticular, contém estruturas epidérmicas, tais como as glândulas sudoríparas e sebáceas e os folículos pilosos, sendo composta por fibras mais espessas e entrelaçadas de colágeno do tipo I e fibras elásticas, além de dermatam sulfato. Nela encontram-se fibroblastos, células inflamatórias e, quase sempre células adiposas na região mais profunda da derme reticular (Brodell, 2008; Gartner, 2007; Junqueira, 2004).

O panículo adiposo (também conhecido como hipoderme ou “gordura” subcutânea) é constituído por um tecido conjuntivo frouxo com quantidades variáveis de tecido adiposo e está localizada abaixo da derme. Em alguns animais, como camundongos e coelhos, abaixo do panículo adiposo observa-se a presença de uma camada vestigial de músculo estriado, denominada panículo carnoso (McGrath and Uitto, 2010).

1.5 – Reparo de feridas de pele

Uma lesão na pele envolve uma rede de comunicações entre os diferentes tipos celulares constituintes de seus diversos compartimentos e de sua matriz extracelular (MEC) (Eming et al., 2007). É um processo complexo, que apresenta uma sequência definida de eventos que se sobrepõem de forma contínua e temporal tendo a participação de variados fatores de crescimento, citocinas, entre outras substâncias (Pagnano, 2009; Rolfe and Grobbelaar, 2012). Pode ser dividido didaticamente em três estágios: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelamento (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006; Satish and Kathju, 2010; Schreml et al., 2010; Schultz et al., 2011).

Nas fases mais iniciais do reparo ocorre a formação de um coágulo rico em fibrina que preenche o espaço criado pelo ferimento, restabelecendo a hemostasia e funcionando como uma matriz provisória que permite a migração de células inflamatórias, tais como neutrófilos e monócitos-macrófagos, além de formar uma barreira contra a invasão de microrganismos superficiais evitando ainda a perda de plasma e líquido tissular (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006). Nesse contexto as plaquetas são importantes não somente

porque promovem a hemostasia, mas também fornecem fatores de crescimento e citocinas pro-inflamatórias que medeiam o recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos para o local da ferida. Além delas, outros produtos derivados de células lesadas e bactéria também contribuem para atrair neutrófilos para o local da lesão (Eming et al., 2009).

Sobrepondo-se a essa fase de hemostasia há uma ativação de queratinócitos, e uma fase denominada inflamatória onde há um influxo de leucócitos polimorfonucleares, seguido pelo recrutamento de monócitos do sangue, que se diferenciam em macrófagos e passam a ser as células mais abundantes no local da lesão e infiltração de linfócitos. Os macrófagos degradam e removem componentes do tecido danificado e neutrófilos que morrem no local (Bielefeld et al., 2013; Rubin, 2006; Satish and Kathju, 2010).. Além disso, macrófagos ativados sintetizam substâncias importantes como colagenases, fatores de crescimento e citocinas responsáveis pela migração de células epiteliais e o desenvolvimento do tecido de granulação direcionando a angiogênese e ativando fibroblastos (Rubin, 2006). Os mastócitos são responsáveis pela ativação de células do endotélio e consequente aumento da expressão de moléculas de adesão (Egozi et al., 2003), ativam os fibroblastos que sintetizam colágenos e auxiliam a deposição da matriz temporária e, posteriormente, de matriz permanente (Iba et al., 2004; Wulff et al., 2012). Moléculas de fibrinas, fibronectina, vitronectina e tenascina C ajudam a compor a matriz provisória (Eming et al., 2009).

Na fase de proliferação há um aumento do número e da migração dos queratinócitos resultando na restauração do epitélio. Há também a proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e angiogênese com formação do tecido de granulação constituído principalmente por fibroblastos,

miofibroblastos, macrófagos e capilares em proliferação (Eming et al., 2009; Rubin, 2006).

O papel dos subtipos de células T durante o reparo ainda é incerto. É provável que células Th1 e Th2 regulem diferencialmente o microambiente da ferida através da secreção de citocinas diferentes (Azouz et al., 2004; Park and Barbul, 2004). Células Th1 caracterizam-se pela produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- β , enquanto que as células Th2 liberam interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13. Os perfis de expressão de citocinas têm sido associados com diversos estados de ativação de macrófagos e processos de remodelamento de tecido. As células T também podem influenciar a cicatrização por interações diretas célula-célula com células residentes ou não no local da ferida como, por exemplo, a ligação da glicoproteína CD40L expressa nas células T pode interagir com CD40 expressa em queratinócitos, fibroblastos, plaquetas e macrófagos, e assim alterar o seu perfil de expressão de mediadores inflamatórios, e conseqüentemente, funções de reparo tecidual (Eming et al., 2009; Kaufman et al., 2001; Park and Barbul, 2004).

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

Na pele, as células T $\gamma\delta$, também chamadas células T epidérmicas dendríticas (DETC), que são restritas à epiderme, são importantes na manutenção da integridade do tecido estão ativadas na cicatrização de feridas. As DETC são consideradas fontes importantes de fatores de crescimento que

resultam na proliferação e diferenciação de queratinócitos (Eming et al., 2007; Jameson et al., 2002; Sharp et al., 2005).

Em uma fase mais tardia do processo de reparo ocorre o remodelamento da matriz resultando na formação da cicatriz e restabelecimento de sua barreira (Eming et al., 2014). Em condições fisiológicas normais a restauração da epiderme e a remodelação da matriz tende a restabelecer a integridade da pele de maneira normotrófica (com pequena cicatriz). Quando o reparo normal dá errado, há dois resultados principais: um defeito ulcerativo da pele, como uma ferida crônica, ou uma formação excessiva de cicatriz (cicatriz hipertrófica ou o quelóide). Na cicatrização hipertrófica, há um rápido crescimento da derme, que geralmente regride após seis meses, as fibras de colágeno são depositadas paralelamente à superfície da pele e seus vasos sanguíneos estão orientados verticalmente. Já em quelóides, há um crescimento contínuo da cicatriz, que se estende além das margens do tecido lesado, sem regressão espontânea, com bandas de colágeno espessas e orientadas ao acaso (Eming et al., 2014). Durante a fase de remodelamento do tecido as células T constituem o subconjunto de leucócitos mais freqüente em feridas de pele humana (Eming et al., 2009; Fishel et al., 1987).

Em humanos adultos, aproximadamente 30 por cento das cicatrizes se tornam hipertróficas, retraídas e menos resistentes a tensão sendo constituídas, em sua maioria, por matriz extracelular (MEC) rica em colágeno (Hopkinson-Woolley et al., 1994; Satish and Kathju, 2010; Schreml et al., 2010; Schultz et al., 2011). Por outro lado, o fechamento de feridas de pele em fetos é caracterizado por rápida re-epitelização, ausência de inflamação e restauração normal da arquitetura do tecido (Coolen et al., 2010), processo

chamado regeneração (Bielefeld et al., 2013; Gurtner et al., 2008). É importante ressaltar que em feridas de adultos estas fibras apresentam-se organizadas em bandas paralelas à epiderme, enquanto que em feridas fetais o colágeno depositado apresenta um padrão reticular indistinguível das fibras encontradas no tecido adjacente à lesão (Bielefeld et al., 2013; Rolfe and Grobbelaar, 2012; van Zuijlen PP, 2003).

1.6 – Neuropeptídios, sistema imune e pele

A relação entre os sistemas nervoso e imune na pele pode ocorrer através de fibras nervosas as quais liberam fatores neurais e podem, por exemplo, influenciar a apresentação de antígenos por células de Langerhans/dendríticas para células T *naive* induzindo-as para um perfil T_H2 ou T_H17, além disso, podem atuar na ativação e quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da lesão, degranulação de mastócitos, alterando o fluxo sanguíneo e o edema local (Chiu et al., 2012; Madva and Granstein, 2013).

Quando algum estímulo ativa sinais aferentes em nervos sensoriais, reflexos antidrômicos do axônio podem ser gerados e induzir a liberação de neuropeptídios nos terminais periféricos dos neurônios (Chiu et al., 2012).

Os neuropeptídios são um grupo heterogêneo de moléculas polipeptídicas constituídas por aproximadamente 5 a 50 aminoácidos. Eles são produzidos a partir de grandes precursores, os quais são clivados e modificados após a tradução (Auriemma et al., 2012; Lotti et al., 1995; Luger, 2002; Roosterman et al., 2006; Scholzen et al., 1998).

Os neuropeptídios podem ter ação parácrina, autócrina ou endócrina sendo produzidos na hipófise (Catania, 2007), pelas fibras noradrenérgicas e colinérgicas do sistema nervoso autônomo ou pelas fibras sensitivas, predominantemente pelos pequenos neurônios aferentes não mielinizados, as fibras C, e, em menor quantidade, pelas pequenas fibras mielinizadas A δ , presentes, por exemplo, na pele ou nos órgãos linfóides (Martinez-Martinez et al., 2012; Roosterman et al., 2006; Scholzen et al., 1998). Podem também ser produzidos por células do sistema imune, residentes ou que infiltram na pele sob condições inflamatórias (Hiltz and Lipton, 1990; Kokot et al., 2009; Scholzen et al., 1998).

Um fato curioso é que a denervação da pele ocasiona um retardo no tempo de fechamento de lesões cutâneas (Fukai et al., 2005), impede a regeneração de membros em anfíbios urodelos (salamandras, por exemplo) (Dresden and Moses, 1973), elimina a capacidade de regeneração e prejudica o reparo em lesões na orelha de camundongos das linhagens MRL/MpJ e C57BL/6, respectivamente (Buckley et al., 2012).

1.7 – Hormônio Alfa-Melanócito Estimulante

Embora há muito tempo conhecido por sua função na síntese de melanina (Shizume et al., 1962) atualmente sabe-se que o hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) apresenta também ampla atividade anti-inflamatória (Brzoska et al., 2008), sendo a maioria dos efeitos observados *in vitro* encontrada juntamente com a expressão de seu receptor de melanocortina do tipo 1 (MC-R1) (Luger and Brzoska, 2007).

Este peptídeo é produzido na *pars intermédia* da adeno-hipófise e por células residentes ou circulantes na pele, tais como queratinócios (epidermais e foliculares), melanócitos epidermais, sebócitos, células da microvasculatura dérmica, células de Langerhans, células do folículo piloso, células da glândula sudorípara, monócitos e macrófagos (Rajora et al., 1996; Scholzen et al., 2000; Slominski et al., 2000; Star et al., 1995; Thody et al., 1983).

O α -MSH é um peptídeo constituído por treze aminoácidos originado a partir do processamento pós-traducional da pro-opiomelanocortina (POMC) pela ação proteolítica de uma família de convertases pro-hormônios, dentre elas as enzimas PC1 e PC2/7B2 (Brod and Hood, 2008; Catania and Lipton, 1993; Harvey et al., 2012; Lipton and Catania, 1997; Luger et al., 1997; Muffley et al., 2011; Thody et al., 1983).

O peptídeo hormonal α -MSH suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias (Luger and Lotti, 1998), de histamina (Grutzkau et al., 2000), de prostaglandina, de radicais superóxidos (Star et al., 1995), a proliferação de linfócitos T, a indução de IL-10 (Bhardwaj et al., 1997), a ativação de basófilos humanos induzida por alérgeno (Bohm et al., 2012), os níveis de expressão das moléculas de adesão E-selectina, VCAM (Kalden et al., 1999) e ICAM-1 (Luger et al., 2003) e de moléculas co-estimulatórias, tal como CD86 (Raap et al., 2003). Além disso, ele é capaz de inibir a ativação de NF- κ B aumentando os níveis de cAMP impedindo a degradação da subunidade inibitória I κ B α e a translocação da subunidade p65 de NF- κ B para o núcleo em células monocíticas humanas da linhagem U937 (Manna and Aggarwal, 1998; Moustafa et al., 2002) e células endoteliais da microvasculatura dérmica (Scholzen et al., 2000). Grande parte dos efeitos anti-inflamatórios

demonstrados *in vitro* ocorreram juntamente como aumento da expressão de MC-1R (Kalden et al., 1999).

Na pele o α -MSH atua na regulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos e melanócitos, e modulação da produção de citocinas por células endoteliais e fibroblastos (Scholzen et al., 1998). Também foi demonstrado que ele é capaz de induzir células T reguladoras imunossupressoras *in vitro* e *in vivo*, as quais inibem a progressão da inflamação de pele, semelhante à psoríase, e suprimiram a ativação e proliferação de células T efetoras de pacientes com psoríase (Auriemma et al., 2012).

O tratamento com α -MSH é capaz de reduzir o edema de pata induzido pela injeção de carragenina (Hiltz and Lipton, 1990), reduzir a inflamação alérgica das vias aéreas (Raap et al., 2003) e suprimir a síntese de colágeno e reduzir a fibrose tecidual em modelo murino de escleroderma (Kokot et al., 2009).

Interessantemente, estudos mostraram que durante a regeneração em larvas de *Xenopus laevis* (ordem anura), há elevação da expressão de POMC, um precursor do hormônio α -MSH, em blastemas (tecido formado na região amputada que se desenvolverá na estrutura perdida) (King et al., 2003).

Existem cinco subtipos de receptores de melanocortinas, MC-1R a MC-5R, os quais pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G e possuem sete domínios transmembrânicos. Podem ser expressos em diferentes células (Brzoska et al., 2008; Luger and Brzoska, 2007), sendo MC-1R, MC-4R e MC-5R os que apresentam maior afinidade para α -MSH e são expressos em células da pele e do sistema imune (Brzoska et al., 2008; Luger and Brzoska, 2007).

Na pele a expressão do receptor MC-1R pode ocorrer em melanócitos (Bohm et al., 1999), queratinócitos (Curry et al., 2001; Moustafa et al., 2002; Muffley et al., 2011), fibroblastos (Bohm et al., 2006b; Brzoska et al., 2008; Catania et al., 1996), basófilos (Maaser et al., 2006; Manna and Aggarwal, 1998), células endoteliais e células da unidade pilosebácea. Além disso, macrófagos/monócitos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e células dendríticas também expressam esse receptor (Brzoska et al., 2008; Luger, 2002; Maaser et al., 2006). Sua expressão em células do sistema imune é associada a uma redução significativa da ativação e translocação de NF- κ B sugerindo sua participação na redução da inflamação (Luger, 2002; Maaser et al., 2006; Madva and Granstein, 2013).

Alfa-MSH não apresenta afinidade por MC-2R (Brzoska et al., 2008) e possui uma afinidade pequena para o MC-3R, que é menor ou igual à do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Há evidências da expressão de MC-3R em macrófagos e linfócitos sugerindo que eles medeiam alguns dos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH (Getting et al., 2003; Maaser et al., 2006).

O MC-4R, na pele, é expresso em células da papila dermal e MC-5R pode ser encontrado em mastócitos, adipócitos, sebócitos e macrófagos. Ambos receptores apresentam uma alta afinidade para o peptídeo α -MSH (Bohm et al., 2006a; Brzoska et al., 2008). Nas células B e T a ligação de α -MSH ao receptor MC-5R ativa a via JAK/STAT, o que sugere uma ação imunomodulatória deste receptor (Buggy, 1998). O MC-5R atua na regulação da secreção das glândulas sebáceas e termoregulação. Camundongos mutantes para o gene *mc-5r* apresentam uma redução na secreção das glândulas sebáceas (Buggy, 1998; Chen et al., 1997; Maaser et al., 2006) Além

disso, esse receptor pode ser encontrado em linfócitos (Luger and Brzoska, 2007).

Tanto o α -MSH quanto o MC-1R são expressos durante o reparo de feridas cutâneas, tanto em células inflamatórias, quanto queratinócitos da borda da ferida (Muffley et al., 2011).

Uma das perguntas que nós fizemos, que resultou no primeiro artigo publicado desta Tese, foi se a injeção i.p. de α -MSH reduzia o infiltrado inflamatório e melhorava o processo de reparo de feridas cutâneas (de Souza et al., 2015).

1.7.1 – Proteína agouti

A proteína agouti é expressa na região do folículo piloso, onde afeta a pigmentação da pele por ser um antagonista de MC-1R (Bultman et al., 1992; Lu et al., 1994). A ligação de α -MSH ao receptor eleva os níveis de cAMP e ativa a tirosinase, enzima limitante da velocidade de melanogênese, resultando na produção de eumelanina. Na presença de agouti, a síntese de eumelanina é desligada e a via padrão de produção da feomelanina é ativada (Dinulescu and Cone, 2000). É uma molécula de sinalização parácrina secretada por células da papila dermal (Bultman et al., 1992; Lu et al., 1994) cuja ação é um clássico antagonismo competitivo pelos receptores de melanocortina (Willard et al., 1995). Dessa forma, a proteína agouti é um potente antagonista de MC-1R e MC-4R (faixa nanomolar), um antagonista relativamente fraco de MC-3R, e um antagonista muito fraco para o MC-5R (Yang et al., 1997).

1.8 – Substância P

Além do α -MSH, outros neuropeptídios podem influenciar o reparo de feridas e/ou a tolerância oral. A substância P (SP) produzida pelo sistema nervoso (Brownstein et al., 1976; Duffy et al., 1975; Takahashi and Otsuka, 1975), por linfócitos (Lai et al., 1998), macrófagos (Germonpre et al., 1999), células epiteliais, queratinócitos (Watanabe et al., 2001), células endoteliais (Linnik and Moskowitz, 1989) e eosinófilos (Aliakbari et al., 1987) tem seus efeitos mediados pelo receptor neurocinina-1 (NK-1) que é expresso em células tronco epiteliais do bulbo piloso, sugerindo que este neuropeptídio pode ser um mediador do efeito da inervação na regeneração da pele (Martinez-Martinez et al., 2012), além disso, o tratamento tópico de feridas com SP diminui o tempo de cicatrização (Kant et al., 2013).

1.9 – Peptídeo intestinal vasoativo

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é produzido por neurônios e células endócrinas (Gomariz et al., 2001), sendo encontrado em fibras presentes no trato respiratório (Nohr and Weihe, 1991; Said and Mutt, 1969), no baço, timo (Bellinger et al., 1997), nas placas de Peyer (Ottaway et al., 1987) e em células inflamatórias como linfócitos (Gomariz et al., 1994a; Gomariz et al., 1994b; Leceta et al., 1994), neutrófilos e mastócitos (Cutz et al., 1978; O'Dorisio et al., 1980). VIP aumenta a produção do fator de crescimento endotelial (VEGF) por queratinócitos (Kakurai et al., 2009) e, se administrado simultaneamente ao

tratamento oral com ovalbumina (OVA), pode aumentar os efeitos tolerogênicos (Wang et al., 2007).

1.10 – Glicocorticóides

Os glicocorticóides (GCs), também chamados glicocorticosteróides, corticosteróides ou esteróides, são hormônios secretados pelo córtex da glândula supra-renal, especificamente pela zona fasciculada. O cortisol ou hidrocortisona é o principal GCs natural circulante no ser humano, enquanto que a corticosterona predomina em camundongos (Gartner, 2007). Sua síntese é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela *pars distalis* da hipófise anterior, em resposta à liberação, pelo hipotálamo, do neuropeptídeo denominado hormônio liberador de corticotrofina (CRH)(Charmandari et al., 2005). Quando os níveis de GC no sangue estão altos, por meio de um feedback negativo, a produção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é inibida e, conseqüentemente, a liberação de ACTH pela hipófise também (Barnes, 2011; Biddie et al., 2012; Charmandari et al., 2005). Além disso, o hormônio antidiurético (ADH), a ocitocina e as catecolaminas podem alterar a liberação de ACTH, assim como estados de febre, hipoglicemia, estresse e alteração do ciclo de sono-vigília. Já em situações de ansiedade, de cirurgia, de dor excessiva, dentre outras, a liberação de ACTH e CRH encontra-se aumentada elevando o nível plasmático de cortisol (Barnes, 2011; Biddie et al., 2012).

O efeito transcricional dos glicocorticóides se processa através do receptor de glicocorticóide (GR), uma proteína intracelular pertencente à superfamília de receptores de hormônios esteróides. Os receptores de

glicocorticóides permanecem inativos, no citoplasma, devido à ligação com um complexo multiprotéico do qual faz parte a proteína HSP-90. Quando o hormônio se liga ao receptor, este sofre uma mudança alostérica que resulta na dissociação da proteína HSP-90 e outras, expondo as sequências de localização nuclear (NLSs), permitindo, assim, que o complexo hormônio-receptor migre para o núcleo e interaja com sequências específicas no DNA, denominadas elementos de resposta a glicocorticóides, modulando a transcrição de diferentes genes responsivos a glicocorticóides, localizados nas proximidades dessas sequências (Palma et al., 2007).

Os GCs representam o agente antiinflamatório e imunossupressor endógeno mais poderoso, interferindo em praticamente todas as etapas das respostas imuno-inflamatórias (Vukelic et al., 2011). Eles têm sido relacionados com redução da proliferação de linfócitos, principalmente T e com diminuição da migração e ativação de leucócitos por meio da inibição da expressão das moléculas de adesão e redução da produção de prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, os GCs inibem a produção de um amplo espectro de citocinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-6, do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e atenuam os efeitos de certas moléculas inflamatórias em vários tecidos-alvo. Em concentrações fisiológicas, os GCs inibem a produção de citocinas de células T auxiliares de tipo 1 e estimulam a produção das citocinas de Tipo 2, deslocando, então, o padrão das respostas imunológicas (DeKruyff et al., 1998).

Estudos mostram que a síntese de cortisol na epiderme pode ser induzida por lesão tecidual, bem como pela citocina pró-inflamatória IL-1 β . (Hofman et al., 2007). Enquanto a aplicação sistêmica de glicocorticóides inibe o processo de reparo de feridas, uma vez que reduz a contração da ferida e

suprime as respostas celulares, incluindo a formação do tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Bitar et al., 1999; Christian et al., 2006; Oxlund et al., 1979), o tratamento tópico, com baixas dosagens, acelera a cicatrização da lesão, reduz a dor e o exsudado e impede a formação de uma quantidade excessiva de tecido de granulação.

2 – Justificativa

Em humanos adultos lesões de pele resultam na formação de cicatrizes, que frequentemente se tornam hipertróficas, retraídas e menos resistentes a tensão, constituídas, em sua maioria, por uma MEC rica em colágeno paralelamente distribuído em relação à epiderme. Por outro lado, fetos podem reconstruir completamente a arquitetura da pele após lesões, por um processo denominado de regeneração.

Além de fetos, existem animais, no estágio de larva ou adultos, que regeneram partes do corpo, como as salamandras (ordem caudados) e *Xenopus laevis* (ordem anura). Nesses a região amputada dá origem a um tecido chamado blastema (tecido formado na região amputada que se desenvolverá na estrutura pedida). Dados da literatura mostram que no blastema, durante a regeneração há elevação da expressão de POMC, um precursor do hormônio α -MSH, um potente anti-inflamatório. Fato importante é que fetos e outros animais que regeneram apresentam uma redução ou até mesmo ausência de inflamação durante o reparo.

A injeção parenteral de uma proteína tolerada mais adjuvante, simultaneamente a um agente capaz de induzir inflamação, tem efeitos sistêmicos e rápidos que bloqueiam a inflamação desencadeada em diferentes partes do organismo. Os efeitos sistêmicos da injeção i.p. da proteína tolerada pouco antes de uma lesão na pele melhora a cicatrização, sendo que o tecido reconstituído apresenta características mais próximas daquele sem lesão, normal. Estas observações conduziram a perguntas, tais como: quais os mecanismos envolvidos no efeito sistêmico, anti-inflamatório e de melhor cicatrização produzido pela injeção da proteína tolerada? Como o

desencadeamento da atividade linfocitária no local da injeção do antígeno tolerado altera processos inflamatórios em diferentes locais do organismo, especialmente a pele? Hormônios ou citocinas com ação endócrina podem mediar a ação sistêmica e rápida da injeção de proteínas toleradas?

Uma vez que o POMC, precursor de α -MSH é altamente expresso em tecidos que regeneram, pesquisamos se o neuropeptídeo α -MSH poderia atuar em animais nos quais foi injetada a proteína tolerada e contribuir para a melhora da cicatrização. Além do α -MSH, pesquisamos também SP uma vez que esse neuropeptídeo já foi correlacionado com melhor cicatrização de pele e VIP que já foi correlacionado com o favorecimento da indução da tolerância oral.

Outra possibilidade seria via glicocorticóides, uma vez que estas substâncias têm amplos efeitos anti-inflamatórios. Dados da literatura sugerem que glicocorticóides sistêmicos inibem o processo de reparo de feridas, mas o tratamento tópico, com baixas dosagens, acelera a cicatrização da lesão, reduz a dor, e o exsudado e impede a formação de uma quantidade excessiva de tecido de granulação.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo Geral:

Caracterizar os mecanismos envolvidos na redução da inflamação e na melhora do reparo de lesões cutâneas pela injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA) em camundongos previamente tolerizados por via oral com OVA.

3.2 – Objetivos específicos:

3.2.1 – Avaliar se a exposição (i.p.) ao peptídeo hormonal α -MSH simula os efeitos anti-inflamatórios da exposição de animais tolerantes a antígenos tolerados no reparo de lesão de pele.

3.2.2 – Verificar se a inibição da ação do peptídeo hormonal anti-inflamatório α -MSH, pela injeção de agouti, afeta os efeitos indiretos da exposição de animais tolerantes a antígenos tolerados no reparo de lesão de pele.

3.2.3 – Determinar se os efeitos indiretos da tolerância oral resultam no aumento do peptídeo hormonal α -MSH, VIP ou Substância P no plasma e/ou na pele.

3.2.4 – Verificar se os efeitos indiretos da tolerância oral resultam no aumento da expressão do receptor MC-1R do peptídeo hormonal α -MSH na pele.

3.2.5 – Verificar se um antagonista do receptor de glicocorticóide, RU-486 (mifepristone), reverte a ação anti-inflamatória dos efeitos indiretos da exposição de animais tolerantes a antígenos tolerados no reparo de lesão de pele.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Animais

Camundongos machos C57BL/6 (8-10 semanas), foram fornecidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, tratados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo número 7/2009). Os animais foram alojados em um ambiente com temperatura controlada (23-25°C) com um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à ração padrão para camundongos e água potável. Foram utilizados 6 animais por grupo.

4.2 – Indução da tolerância oral

Tolerância oral para OVA foi induzida pela ingestão, *ad libitum*, de uma solução contendo clara de ovo de galinha em água potável com concentração de 1:5, como única fonte de líquido, durante três dias consecutivos. A solução de clara de ovo foi preparada em nosso laboratório a partir de ovos comercialmente disponíveis e continha uma média de 4 mg OVA/mL. O consumo diário médio estimado foi de 20 mg OVA/camundongo e isso resultou em níveis significativos de tolerância. As garrafas foram trocadas todos os dias para evitar a contaminação. Os grupos controles receberam água filtrada. O tratamento oral foi interrompido 7 dias antes da imunização parenteral.

4.3 – Antígeno

Ovalbumina cristalizada (OVA, grau V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

4.4 – Adjuvante

O adjuvante usado na imunização i.p. foi o hidróxido de alumínio, Al(OH)₃ (Medicamento genérico, EMS, São Paulo, Brasil).

4.5 – Injeção parenteral de OVA

A imunização se deu por via intraperitoneal (i.p.) com 10 µg de OVA + 1,6 mg de Al(OH)₃ em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (salina a 0,9%), volume final 200 µl. Os grupos controles não tiveram tratamento oral, sendo mantidos com água, *ad libitum* e injetados por via (i.p) com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (salina a 0,9%).

4.6 – Administração de α-MSH, proteína agouti (antagonista de α-MSH) e mifepristone RU-486 (antagonista do receptor de glicocorticóides)

Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- ✓ α-MSH: injeção, por via i.p., com 1.0 mg/kg de α-MSH (CALBIOCHEM, San Diego, CA, USA) diluído em salina 0,9%, 30 minutos antes da realização da lesão cutânea.

- ✓ Antagonista do receptor de α -MSH – proteína agouti: injeção, por via i.p., com 125mg/kg de agouti (Phoenix Pharmaceuticals INC, Burlingame, CA, USA) diluído em salina 0,9%, por via i.p., 30 minutos antes da injeção de OVA e/ou realização da lesão.
- ✓ Antagonista do receptor de glicocorticóides – Mifepristone (RU-486): injeção, por via i.p., com 25mg/kg de RU-486 (Calbiochem, EMD Biosciences, Inc. San Diego CA), uma hora antes da injeção de OVA e/ou realização da lesão.

4.7 – Realização das feridas excisionais

Os camundongos foram anestesiados pela injeção i.p. de ketamina (97 mg/kg) e xilazina (16,5 mg/kg) diluídos em salina 0,9%. Após a anestesia, foi feita a tricotomia, limpeza da pele com álcool 70% e posteriormente, realizadas duas feridas excisionais na pele da região posterior dos animais com o auxílio de um punch usado em biópsias de pele humana, cujo diâmetro é de 6,5mm.

4.8 – Período pós operatório e recuperação pós cirúrgica

Após realização das lesões cutâneas na região dorsal, os animais foram acondicionados no interior de uma estufa, mantida com a porta semi-aberta, com a temperatura de aproximadamente 36°C, até que apresentassem mobilidade suficiente para serem acondicionados individualmente em gaiolas. Durante esse período tiveram os olhos cobertos com algodão embebido em salina 0,9% para evitar que os mesmos pudessem sofrer um ressecamento ocular, o que poderia resultar em uma posterior cegueira.

Após recuperação cirúrgica os animais foram mantidos individualmente por três, sete, quarenta ou sessenta dias com água e ração *ad libitum* até serem eutanaziados para coleta da pele com a região lesionada.

4.9 - Determinação dos níveis séricos de α -MSH, SP e VIP

Amostras de sangue foram coletadas, 3 dias após as lesões, em anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA) e aprotinina (0,6TIU/mL de sangue), centrifugadas (13.000 g durante 20 minutos a 4°C) para obtenção do plasma e armazenadas a -80°C. Os peptídeos das amostras do plasma foram eluídos através de colunas (Strata C18-E, Phenomenex, Inc, SutterCreek, CA, USA), de acordo com procedimentos descritos pelo fabricante e, em seguida, liofilizados. A dosagem dos neuropeptídeos foi feita por imunoenensaio enzimático utilizando kits e soluções obtidos da Phoenix pharmaceuticals, Inc (Burlingame, CA, USA) de acordo com procedimentos descritos pelo fabricante. Em resumo, foram adicionados 50 μ L/poço de amostra ou controle positivo, 25 μ L de anticorpo primário e 25 μ L de peptídeo biotinilado seguidos por incubação a temperatura ambiente (20-23°) por 2 horas. Posteriormente as placas foram lavadas 4 vezes com 350 μ L de tampão 1x, adicionadas de 100 μ L de solução estreptavidina-peroxidase de rábano (ou streptavidin-HRP, do inglês: *streptavidin-Horse Radish peroxidase*) e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Depois de lavadas 4 vezes com 350 μ L de tampão 1x as placas foram adicionadas de 100 μ L da solução de substrato TMB e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L/poço de HCl 2N e posteriormente lida em um leitor de Elisa a 450nm.

4.10 - Análises macroscópicas

As feridas foram fotografadas ao lado de uma régua milimetrada, usada como escala, com auxílio de uma câmera digital (Sony DSC-F717, Tokyo, Japan) aos 3, 7, 40 e 60 dias após a lesão. As imagens foram importadas para um software (ImageTool 3.0 <http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>), e as medidas obtidas manualmente para o cálculo da área da ferida e da cicatriz.

4.11 – Histologia e aquisição das imagens

Os camundongos foram eutanaziados por injeção letal de anestésico aos 3, 7, 40 e 60 dias após as lesões. A pele da região próxima das lesões foi tricotomizada, quando necessário, e a pele em torno das 2 lesões dissecadas. Uma das lesões foi fixada em formalina de Carson por 24h, seccionada ao meio, sendo cada metade, separadamente, desidratada em álcool, diafanizada em xilol e embebida em parafina de acordo com protocolo padrão. Cortes de 5µm a partir do meio da lesão foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), azul de toluidina ou tricromático de Gômori. Cada grupo tinha seis animais para cada data de coleta, sendo analisada uma secção por ferida/camundongo, somando um total de seis imagens por grupo, por data de coleta. As imagens dos cortes submetidos à H&E, azul de toluidina ou tricromático de Gômori, localizadas no capítulo I, foram adquiridas utilizando uma câmera Olympus Q Colour 3 acoplada ao microscópio Olympus BX50 conectadas ao computador através do programa Q-CapturePro (QImaging, Canadá).

As imagens dos cortes submetidos a H&E, azul de toluidina ou tricromático de Gômori, localizadas no capítulo II, foram escaneadas em um scanner de microscopia Panoramic MIDI (3DHistech Ltd., Budapest, Hungria) com objetiva de 20x. O software utilizado para analisar as imagens foi o Panoramic Viewer 1.15.2 (3D Histech Ltd., Budapest, Hungria) que pode ser obtido gratuitamente no site http://www.3dhistech.com/panoramic_viewer.

4.12 – Morfometria

Cortes histológicos foram analisados em um microscópio (Olympus BX40, Tokyo, Japan) usando um retículo acoplado próximo a lente da ocular e em magnificação de 1.000x. Fibroblastos e leucócitos foram identificados por suas características morfológicas em cortes corados em H&E: os núcleos dos fibroblastos são alongados e podem ser bastante condensados, enquanto que a maioria dos leucócitos são células redondas com núcleos de variadas formas. Os mastócitos foram identificados através da coloração de azul de toluidina, uma vez que seus grânulos são metacromáticos essas células são coradas de violeta. Leucócitos, fibroblastos e mastócitos foram contados em 10 campos de 10.000 μm^2 , dentro da área da ferida de um corte por camundongo e os resultados dos 5 ou 6 cortes por grupo foram expressos como a média \pm SEM.

4.13 - Imunofluorescência e microscopia confocal

A marcação por imunofluorescência e análise quantitativa por microscopia confocal foi usada para determinar a distribuição e quantificação,

de leucócitos (CD-45⁺), de miofibroblastos (α -actina de músculo liso - α -SMA), hormônio alfa- melanócito estimulante (α -MSH), do receptor de melanocortina do tipo 1 (MC1R), de colágeno I e colágeno III. Após coletadas uma das lesões foi imediatamente fixada e criosubstituída em uma solução contendo 80% de metanol e 20% de dimetilsulfóxido a uma temperatura de -80°C por 6 dias, transferida para a temperatura de -20°C por 1 dia e depois levada a temperatura ambiente. Em seguida os tecidos foram submetidos às etapas de desidratação em álcool absoluto, diafanização em xilol, infiltração e inclusão em paraplast. Foram então obtidos cortes transversais de 5 μ m a partir do meio da lesão, os quais foram submetidos às etapas de desparafinização, rehidratação e incubadas com uma solução de bloqueio (1% BSA + 0,1% Tween 20 em PBS) a temperatura ambiente por meia hora. Os cortes foram incubados overnight a 4°C com os seguintes anticorpos: APC rato anti-CD45 (BD Biociência, bdbiosciences.com), para investigar a distribuição e quantidade de leucócitos; camundongo anti- α -SMA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), coelho anti-MC-1R para receptor de melanocortina tipo I, coelho anti- α -MSH (kit cat N° S-3077, Bachem, Bubendorf, Suíça) para o peptídeo hormonal α -MSH e coelho anti-colágeno tipo I e coelho anti-colágeno tipo III (Rockland, Gibertsville, PA, USA) para colágenos I e III. Após 3 lavagens em PBS os cortes foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente e na ausência de luz com os seguintes anticorpos secundários: FITC-anti-coelho (kit cat N° S-3077, Bachem, Bubendorf, Suíça) para detecção de coelho anti- α -MSH ou Alexa Fluor-488 anti-coelho IgG (H+L) para detecção de coelho anti-colágenos I e III (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ou para detecção de coelho anti-MC-1R. Posteriormente, os cortes foram lavados, e as lâminas montadas com a utilização de uma solução de 10% 1.0 M Tris-HCl, pH 9.0 e 90% glicerol e

visualizadas usando um microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss 510 META; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Configurações ótimas necessárias para cada anticorpo foram determinadas no início de cada sessão de captura de imagem e mantidas constantes durante a análise de todas as amostras. Os padrões de distribuição e níveis de expressão de colágenos tipos I, III, de α -MSH, de MC-1R, CD45 e α -SMA foram analisados em fotomicrografias digitalizadas com software ImageTool 3.0 (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). As imagens foram capturadas em 12 bits e analisadas na faixa de escala de cinza de 0-255. A intensidade da fluorescência foi registrada como a soma dos valores de cinza de todos os pixels dividida pela área (em μm^2) $\times 10^{-3}$. Foram capturadas de 3-7 imagens/corte em diferentes áreas das feridas ou do tecido cicatricial.

4.14 - Análises estatísticas dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA). A significância das diferenças entre os grupos foi determinada através de análise de variância utilizando o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls ou Teste T de Student não pareado. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como a média \pm SEM.

4.15 – Protocolos experimentais

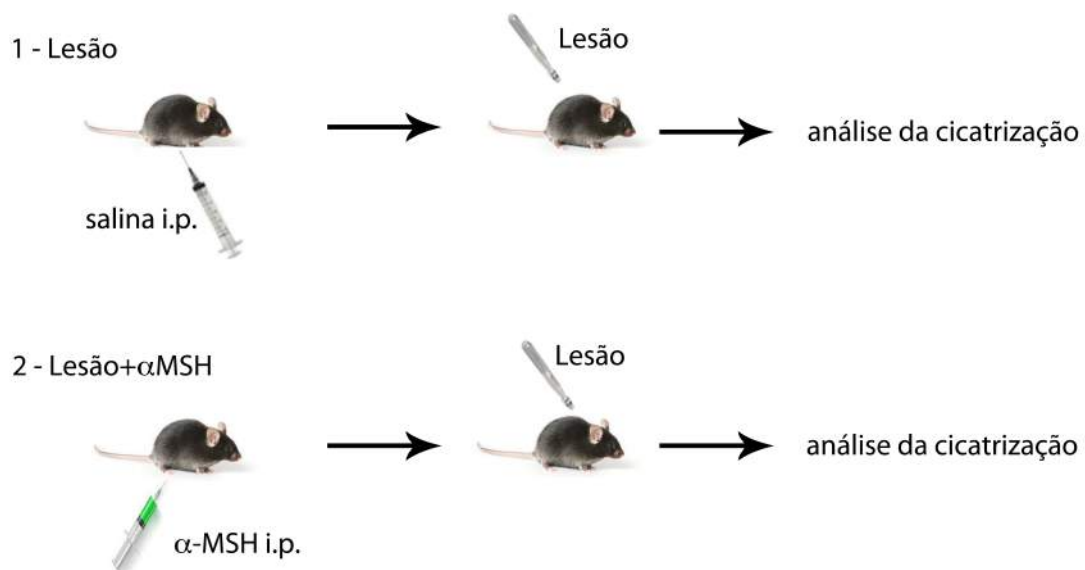


Figura 1 – Protocolo para avaliação dos efeitos da injeção de hormônio alfa melanócito estimulante (α -MSH) na cicatrização. Camundongos C57Bl/6 com idades entre 7 a 9 semanas receberam duas lesões excisionais na pele da região dorsal 30 minutos após injeção de salina (grupo controle da lesão) ou α -MSH (grupo experimental). Número de animais/grupo: 5

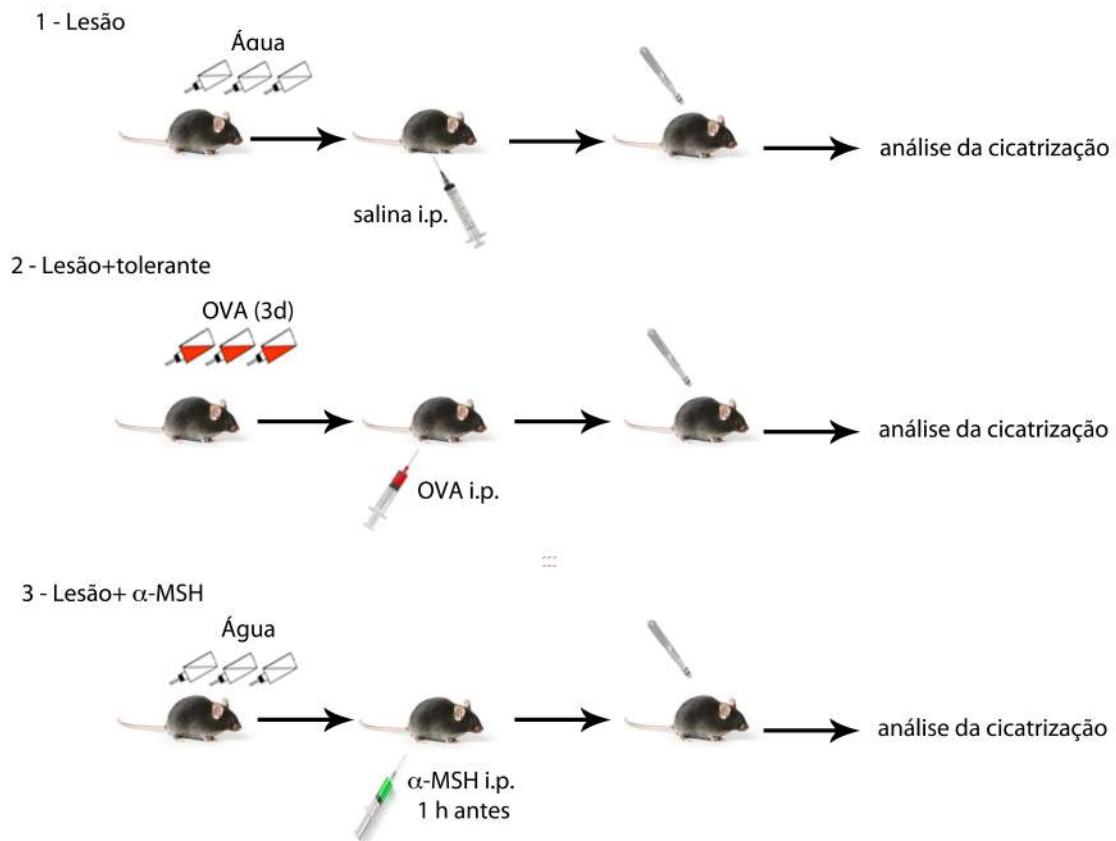


Figura 2 – Protocolo para comparação dos efeitos da injeção de α -MSH e de uma proteína tolerada: similaridades na cicatrização? Camundongos C57Bl/6 com idades entre 7 a 8 semanas, ingeriram OVA (grupo tolerante) ou água (grupos controle da lesão e grupo alfa-MSH). Sete dias depois do tratamento oral com OVA, animais tolerantes receberam duas lesões na pele da região dorsal e uma injeção i.p. de OVA + Al(OH)₃. Camundongos que ingeriram água, receberam duas lesões na pele da região dorsal e uma injeção i.p. de α -MSH (grupo α -MSH) ou de salina (grupo lesão). Número de animais/grupo: 6

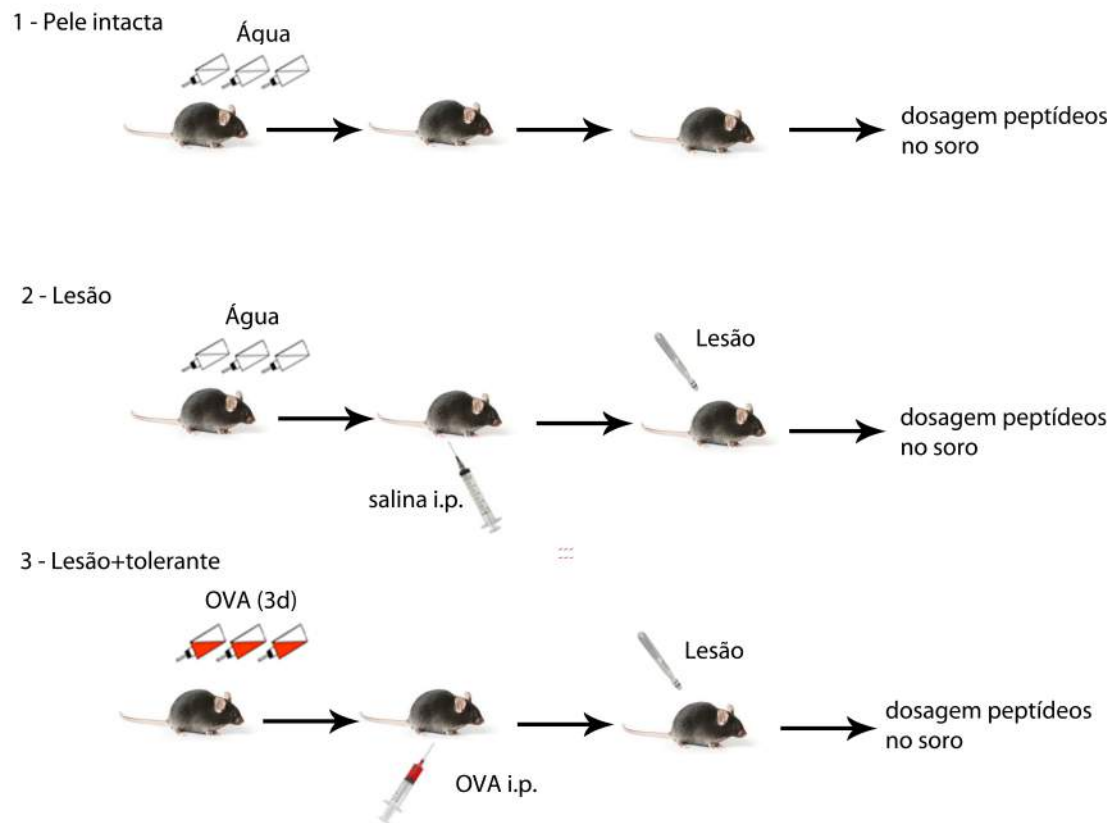


Figura 3 – Protocolo experimental para avaliação dos níveis sérico e cutâneo de neuropeptídeos – Camundongos C57Bl/6 com idades entre 7 a 8 semanas, ingeriram água (grupos controle) ou OVA (grupo tolerante). Sete dias depois do tratamento oral com OVA, animais tolerantes receberam duas lesões na pele da região dorsal e uma injeção i.p. de OVA + Al(OH)₃. Os níveis de neuropeptídeos no plasma foram dosados três dias após a lesão. Número de animais/grupo: 6

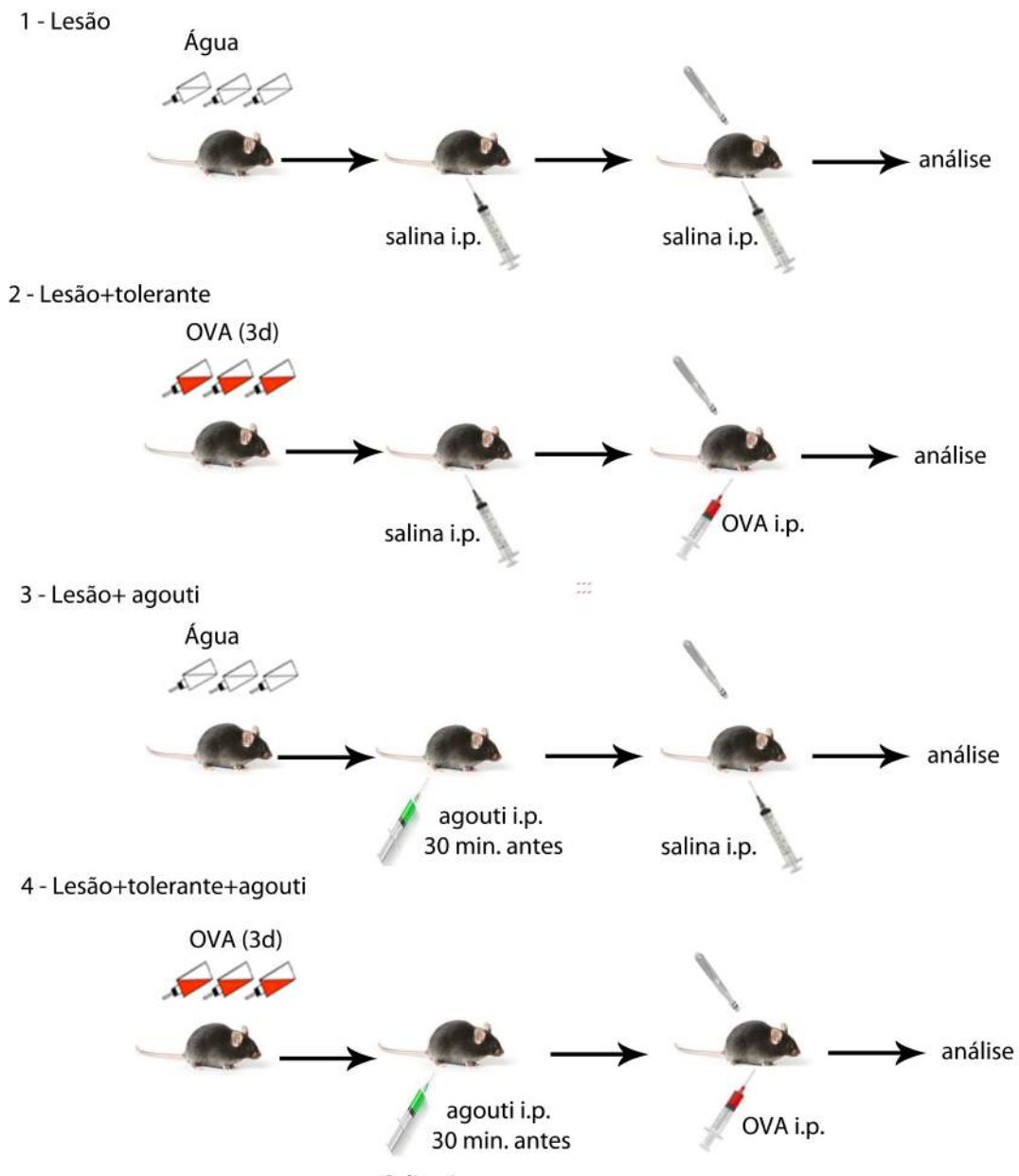


Figura 4 – Protocolo para avaliação do efeito da injeção da proteína agouti antes da injeção da proteína tolerada – Camundongos C57Bl/6 com idades entre 7 a 8 semanas, ingeriram água ou OVA e foram injetados ou não com a proteína agouti 30 minutos antes da injeção i.p. da proteína tolerada. Número de animais/grupo: 6

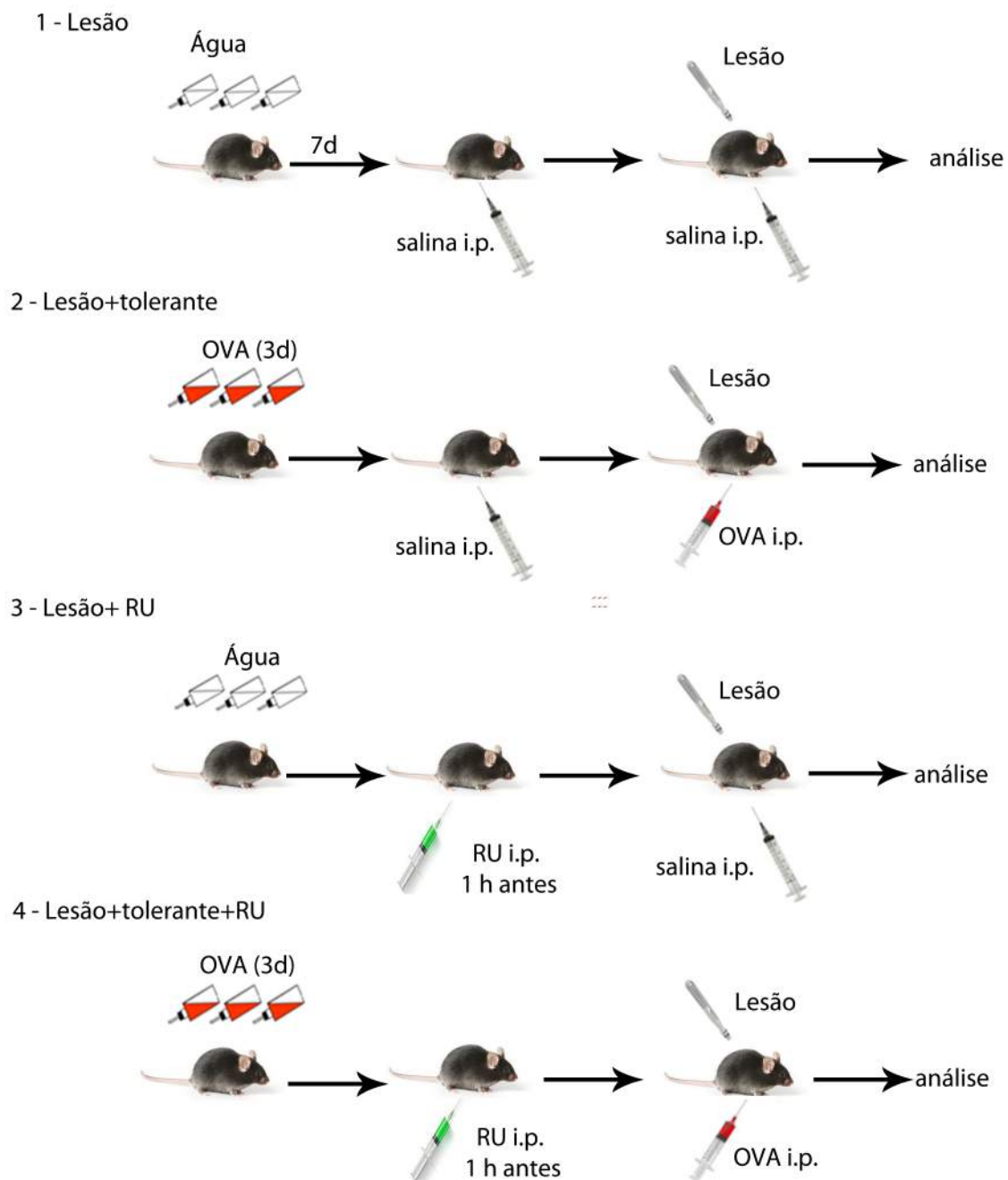


Figura 5 – Protocolo para avaliação do efeito da injeção de RU-486 antes da injeção da proteína tolerada – Camundongos C57Bl/6 com idades entre 7 a 8 semanas, ingeriram OVA e foram injetados com RU-486 (antagonista de glicocorticóides) uma hora antes da injeção da proteína tolerada em $Al(OH)_3$ e realização das lesões na pele. Número de animais/grupo: 6

5 – RESULTADOS – capítulo I

Para comparar as alterações produzidas pela injeção de α -MSH com aquelas resultantes da injeção de uma proteína tolerada no reparo de lesões cutâneas, investigamos inicialmente o efeito da injeção i.p. do peptídeo α -MSH durante o processo de cicatrização, uma vez que não foi encontrado na literatura nenhum dado a esse respeito.

5.1 – Curva de dose-resposta para o peptídeo α -MSH

Embora α -MSH seja amplamente conhecido por seu caráter anti-inflamatório não havia, na literatura, dados sobre o efeito da injeção i.p. desse peptídeo no reparo de lesões cutâneas. A partir dos dados existentes na literatura, sobre as ações deste peptídeo em outros eventos inflamatórios, testamos três diferentes doses de α -MSH, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 2,5 mg/kg, injetados 30 minutos antes de realização da lesão em um volume final de 200 μ l. Após 3 dias, as feridas foram coletadas, processadas e coradas com H&E, como descrito em materiais e métodos, para análises qualitativas histopatológicas e morfométrica do número de leucócitos presentes na área lesionada.

Tanto qualitativa quanto quantitativamente as lesões dos animais injetados com 1,0 mg/kg de α -MSH apresentaram sinais inflamatórios menos intensos que os demais e, por morfometria, uma menor quantidade de leucócitos, sendo portanto definida como a dose a ser aplicada aos estudos posteriores (figura 6).

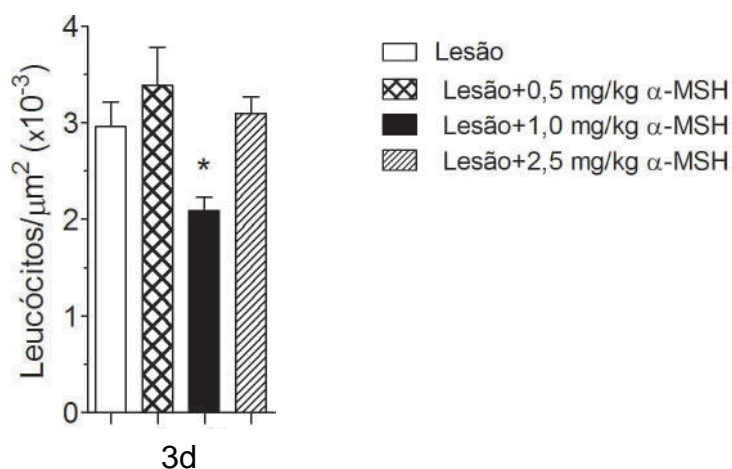


Figura 6 – A injeção de α -MSH 1,0 mg/kg, 30 minutos antes de realização da ferida, diminui o número de leucócitos presentes na lesão. Análise morfométrica do número de leucócitos 3 dias após a lesão + salina (barra branca), lesão + 0,5 mg/kg de α -MSH (barra reticulada), lesão + 1,0 mg/kg α -MSH (barra preta) ou lesão + 2,5 mg/kg (barra hachurada). Dados representam média \pm erro padrão, * $p \leq 0,05$ 1,0 mg/kg de α -MSH vs salina

5.2 – Fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas em animais injetados com α -MSH

A injeção de 1,0 mg/kg α -MSH, 30 minutos antes da realização da lesão, provoca alterações nas fases iniciais do processo de reparo. Através das análises qualitativas foi possível observar que animais tratados apresentam sinais inflamatórios menos intensos, tais como menos exsudato inflamatório e vasos menos congestionados, figura 7. No dia 3 é possível observar o coágulo de fibrina ocupando toda superfície da ferida (Fig.7 a-b). No dia 7 há uma re-epitelização completa em ambos os grupos e o epitélio pode ser visualizado

acima do tecido de granulação (Fig.7 d-e). Análises morfométricas da área ferida mostrou que os animais tratados com α -MSH, apresentam uma redução significativa do infiltrado de leucócitos, fibroblastos (Fig.7 f-h) e mastócitos (Fig.7 c, i), aos 3 e 7 dias quando comparados com os animais injetados com salina. A imunofluorescência com o anticorpo anti-CD45 confirmou a morfometria realizada para leucócitos (Fig.7 m-o). Já o número de miofibroblastos, ou seja, células marcadas com anti- α -SMA (Fig.7 j-l) não apresentou diferença significativa.

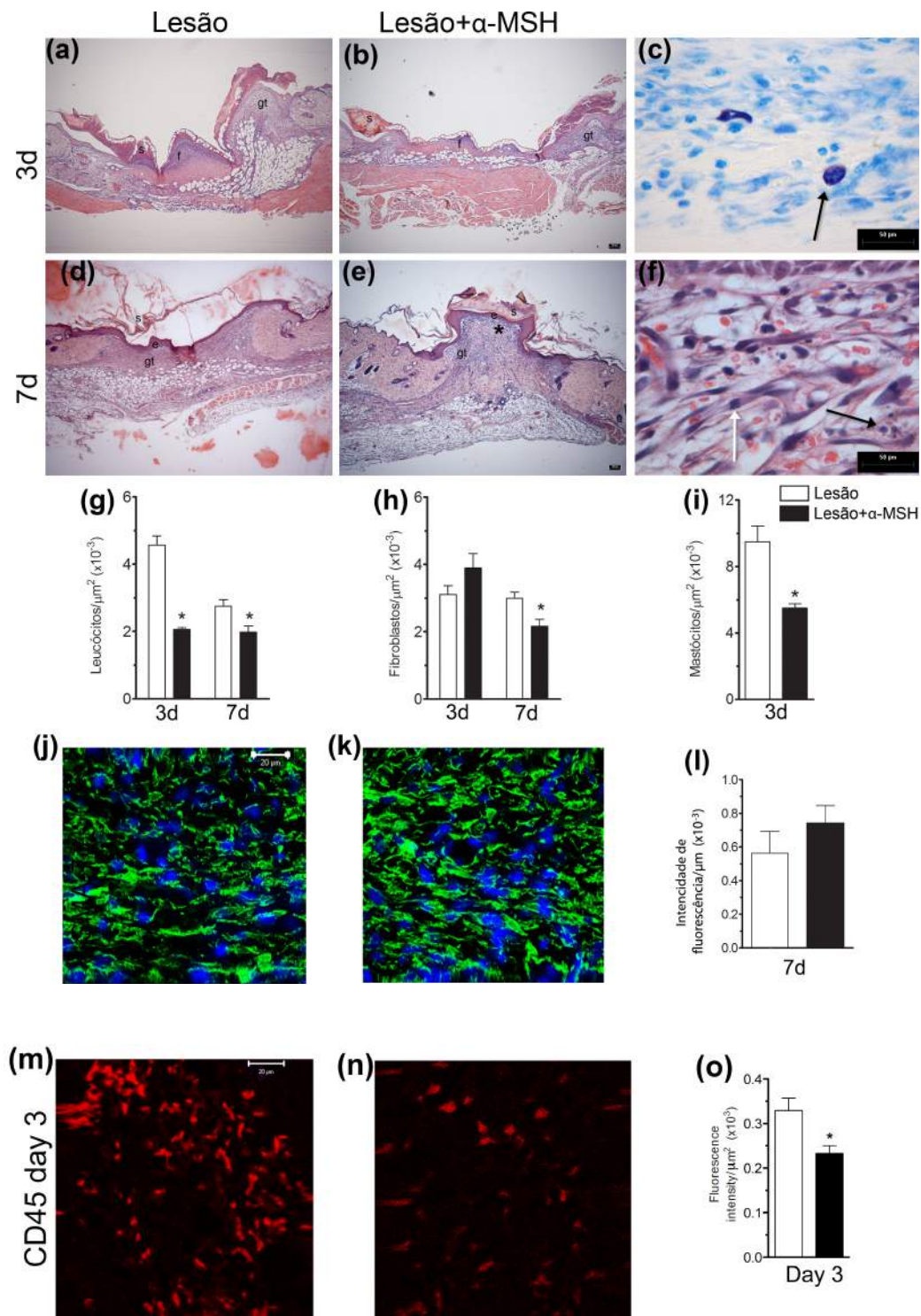


Figura 7 – Análise das fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas após injeção de α -MSH. Cortes de feridas coletadas 3 ou 7 dias após a lesão e coradas com H&E (a-f), azul de toluidina (c), imunomarcadas com anti- α -SMA (j-k) ou com anti-CD45 (m-n). Intensidade de fluorescência foi determinada em cortes imunomarcados com anti- α -SMA (miofibroblastos) e anti-CD45 (leucócitos). Feridas de camundongos tratados com α -MSH têm significativamente menos leucócitos (g, o) e mastócitos (i). No dia 7 após a ferida a re-epitelização ocorreu em ambos os grupos (d-e) e um menor número de fibroblastos estavam presentes nas feridas de animais tratados com α -MSH (h). Letras minúsculas na micrografia representam: f, coágulo de fibrina; s, crosta; e, epitélio; gt, tecido de granulação. Magnificação original das fotomicrografias 100x (a, b, d, e) ou 1000x (c, f); escala das barras: 100 μ m (a-e), 50 μ m (c, f) ou 20 μ m (j, k, m, n). O asterísco em (e) representa a área onde a região é mostrada em alta magnificação em (f) para ilustrar os leucócitos (setas pretas) e fibroblastos (seta branca). Em (c) estão apontados os mastócitos. Dados representam a média \pm SEM. * $p \leq 0.05$; N = 6.

5.3 – Remodelamento das feridas

A injeção de 1,0 mg/kg de α -MSH, 30 minutos antes da realização das feridas, não alterou significativamente a área da ferida aos 3 dias (Fig.8 a-b), mas aos 40 e 60 dias após a ferida a área das cicatrizes dos animais que receberam a injeção de α -MSH é significativamente menor (Fig.8 a, c) quando comparada à área das cicatrizes dos animais controle. Além disso, também apresentam diferenças na organização da matriz extracelular observada em cortes corados com tricromático de Gômori (Fig.9).

A derme da pele normal, intacta, apresenta um padrão de disposição de colágeno tipo cesta (Fig.9 b), enquanto as fibras de colágeno na nova derme das feridas controle (Fig.9 e, g) estão compactamente dispostas em um padrão anormal, com cicatrizes bem diferenciadas. Já as fibras de colágeno na nova derme formada em cicatrizes de animais tratados com α -MSH (Fig.9 f, h) estão dispostas segundo um padrão reticular muito parecido com a derme normal, com uma redução acentuada da cicatriz. Imunofluorescência utilizando anticorpos para colágeno I e III corrobora os achados histológicos e mostra uma maior expressão de colágeno III no grupo tratado com α -MSH aos 40 dias (Fig.10). Não houve regeneração de anexos da pele como, por exemplo, de folículo piloso.

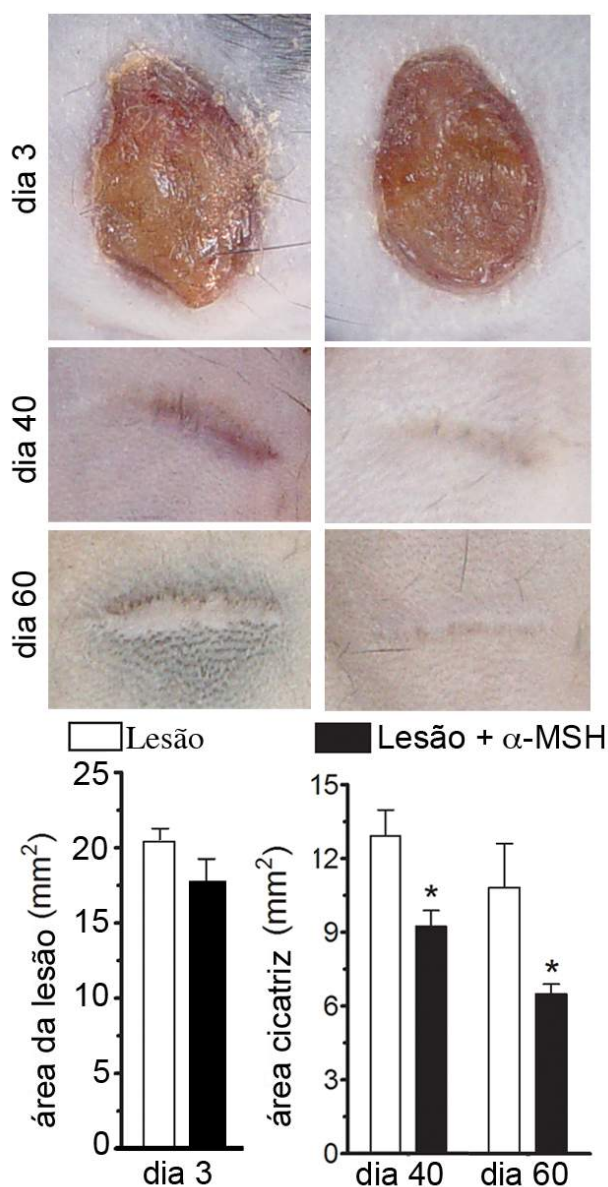


Figura 8 – A injeção do hormônio alfa-melanócito estimulante melhora cicatrização de feridas cutâneas. (a) imagens representativas de pele dorsal de camundongos do grupo controle (coluna da esquerda) e do grupo α -MSH (coluna da direita), aos 3, 40 e 60 dias após a lesão. Aos 3 dias, a crosta é proeminente no grupo controle lesão e aos 40 e 60 dias as cicatrizes são facilmente observadas, enquanto em camundongos tratados com α -MSH as cicatrizes são difíceis de distinguir. Gráficos com área das feridas em 3 dias (b) e a área da cicatriz (c) aos 40 e 60 dias. Dados representam a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$; N=6.

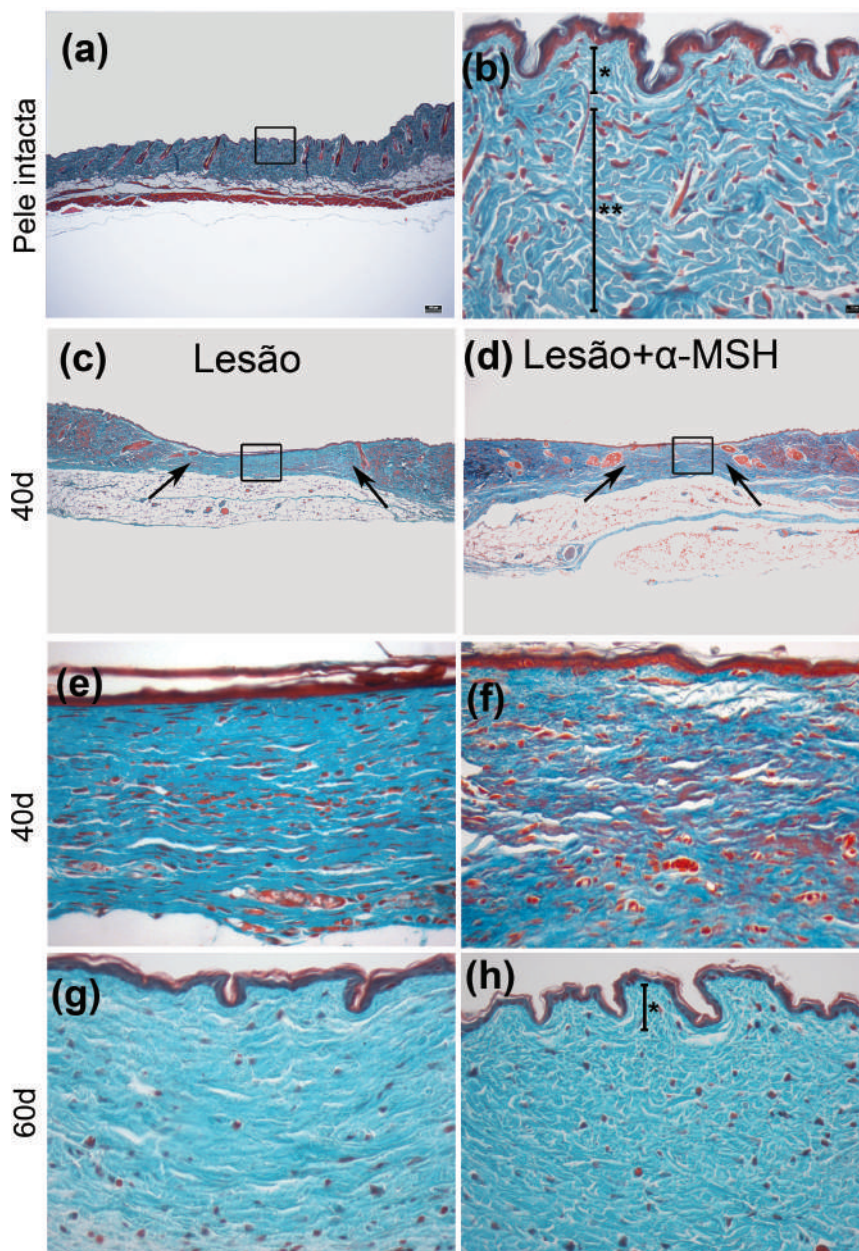


Figura 9 – Hormônio alfa–melanócito estimulante melhora o remodelamento da matriz extracelular. Fotomicrografia representativa da pele intacta normal (a-b), a cicatriz na pele de animais controle (c, e, g) e de animais tratados com α -MSH (d, f, h) nos dias 40 (e-f) e 60 (g-h) após a ferida. Os quadrados em menor magnificação (100x) presentes nas fotomicrografias (a, c, d) representam a área onde a região é mostrada em alta magnificação (1000x) respectivamente em (b, e, f) para melhor ilustrar o padrão de re-organização tecidual. No dia 60 após a ferida, a nova derme formada em camundongos injetados com α -MSH (h) é semelhante à derme normal com fibras de colágeno arranjadas em um padrão de cesta (b). Tecidos corados com tricromático de Gômori. Escala de barras: 100 μ m (a) e 10 μ m (b). Um asterisco indica a derme papilar (b, h) e dois asteriscos indicam a derme reticular (b).

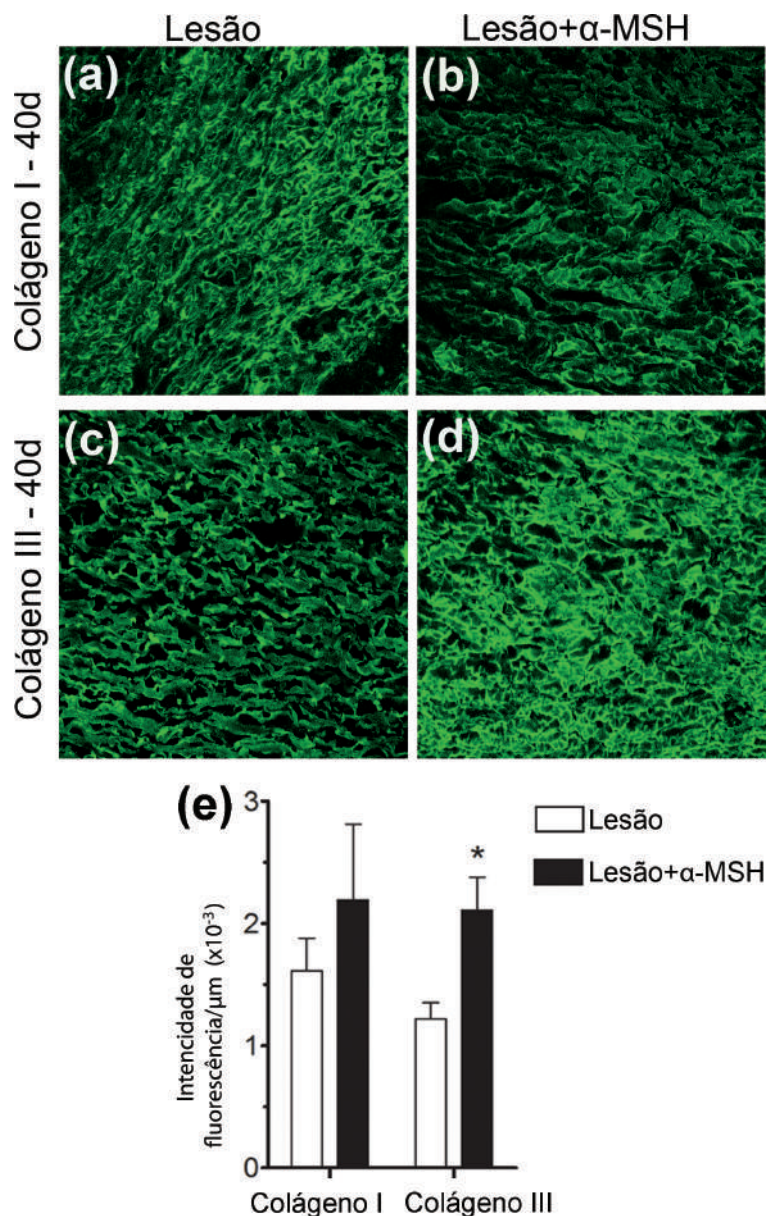


Figura 10 – Efeito do hormônio α -melanócito estimulante na deposição de colágeno.

Cortes de feridas coletadas 40 dias após a lesão e imunomarcadas com anti-colágeno I (imagens superiores) e anti-colágeno III (imagens inferiores) foram fotografadas em configurações idênticas, utilizando um microscópio confocal. A intensidade de coloração para colágeno I não é significativamente diferente entre os grupos (a-b, e), enquanto a intensidade de colágeno III é maior em lesões dos animais tratados com α -MSH (c-d, e). Imagens de microscopia confocal foram captadas com uma objetiva 63x, e os gráficos representam a intensidade da fluorescência verde (a soma de valores de cinza de todos os pixels dividida pela área (em μm^2) $\times 10^{-3}$ em feridas de controles (barras brancas) e feridas tratadas com α -MSH (barras pretas). Os dados representam a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$; N=6.

Os resultados descritos acima foram publicados na revista *Experimental Dermatology* em Janeiro de 2015 (anexo 1):

de Souza, K. S., T. A. Cantaruti, G. M. Azevedo, Jr., D. A. Galdino, C. M. Rodrigues, R. A. Costa, N. M. Vaz and C. R. Carvalho (2015). "Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone." *ExpDermatol* **24**(3): 198-203.

5 – Resultados – capítulo II

5.4 – Comparação entre as alterações produzidas no reparo de lesões cutâneas pela injeção do neuropeptídeo α -MSH ou pela injeção de uma proteína tolerada.

Para comparar os efeitos da injeção de α -MSH com a injeção de uma proteína tolerada um grupo de camundongos foi pré-tratado por via oral com uma solução contendo OVA, como forma de indução de tolerância oral para OVA. Sete dias após o tratamento oral, estes camundongos receberam uma injeção i.p. de 10 μ g de OVA + Al(OH)₃ minutos antes da realização da ferida na pele. O processo de fechamento das feridas e cicatrização foi comparado com um grupo que recebeu uma injeção i.p de 1mg/kg de α -MSH ou com um grupo que recebeu injeção i.p. de salina. Análises histológicas do processo de cicatrização das lesões cutâneas nos dias 3 e 7 (Fig. 11) mostraram que tanto a injeção de α -MSH quanto de OVA resulta na redução de células e do exsudado inflamatório, em comparação com o grupo controle injetado com salina 0,9%. No dia 3 (Fig.11 a-c), o coágulo de fibrina ocupa a superfície da ferida, embora esteja reduzido no grupo tolerante, e o tecido de granulação encontra-se em formação inicial, principalmente na região das bordas da ferida. No dia 7 (Fig.11 d-i), a re-epitelização já está completa em todos os grupos e o epitélio espessado pode ser visto sobre a área do tecido de granulação. Chama a atenção que as feridas dos animais do grupo controle lesão, injetados com salina, são maiores, mas não foi feita análise morfométrica da área da lesão. Análises morfométricas (Fig.11 m-o) dos cortes corados com H&E ou azul de toluidina (j-l) mostraram uma redução significativa de leucócitos, fibroblastos e

mastócitos, 3 e/ou 7 dias após a lesão, em ambos os grupos α -MSH e tolerante quando comparados ao grupo controle salina.

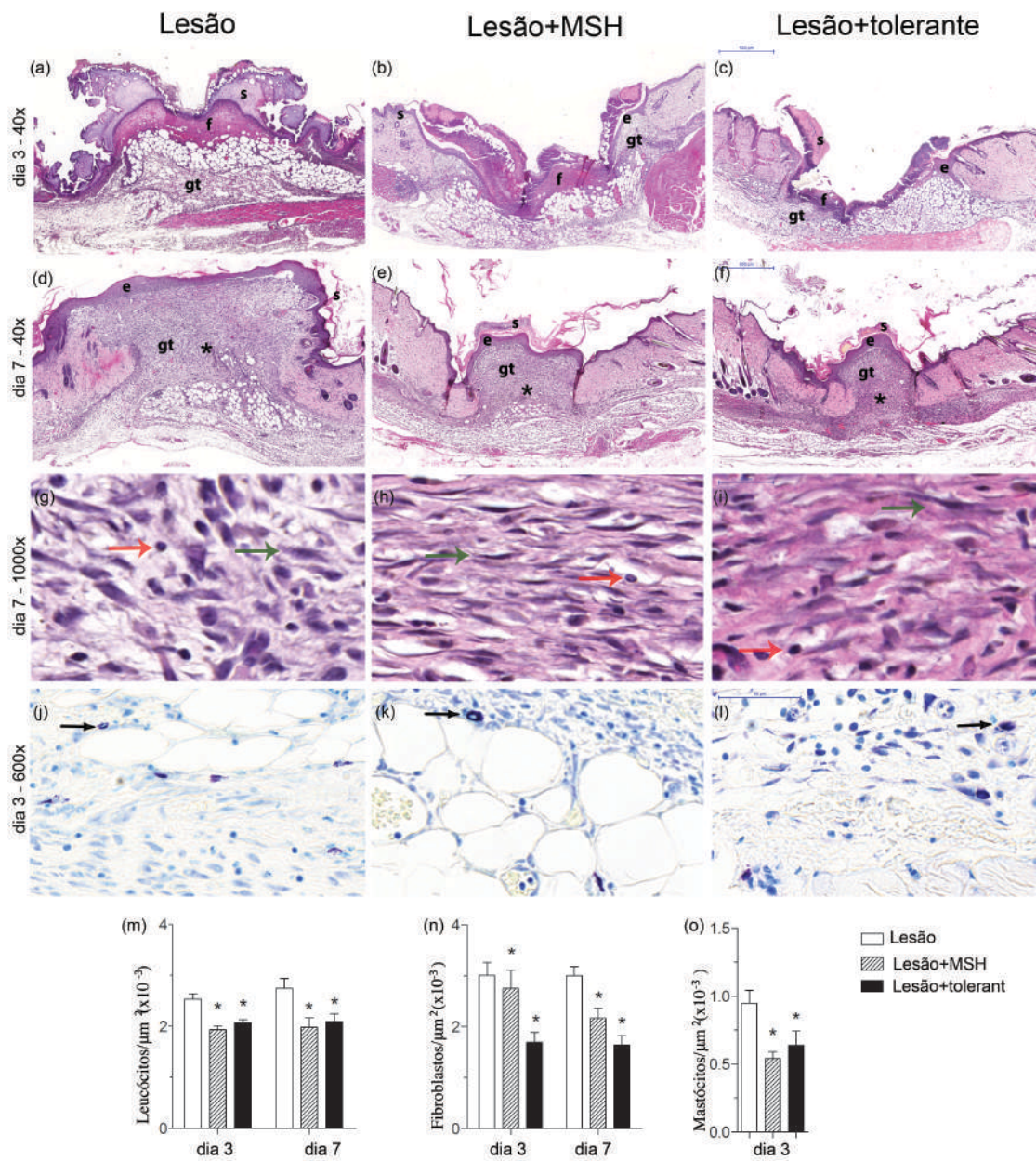


Figura 11 – Semelhanças nos padrões de reparo produzidos pela injeção de α -MSH ou injeção de uma proteína tolerada. Fotomicrografias de feridas coletadas 3 (a-c) ou 7 dias (d-l) após a lesão e coradas com H&E (a-i) ou azul de toluidina (j-l). Grupo α -MSH (b, e, h, k) e grupo tolerante (c, f, i, l) apresentaram uma redução significativa de leucócitos (m), fibroblastos (n) e mastócitos (o) 3 e 7 dias, comparados ao grupo controle (a, d, g, j). As letras nas fotomicrografias representam: s, crosta; f, fibrina; e, epitélio; gt, tecido de granulação. Análise morfológica do número de leucócitos (m), fibroblastos (n) e mastócitos (o) no grupo controle da lesão (barra branca), α -MSH (barra hachurada) e tolerante (barra preta). Magnificação original das fotomicrografias 40x (a-f), 1000x (g-i) e 600x (j-l). Escala das barras: 500 μ m (a-f), 50 μ m (j-l) e 20 μ m (g-i). Dados representam a média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$. N=6.

Avaliamos também a área da lesão aos 7 dias e a área da cicatriz aos 60 dias após a realização das feridas (Fig.12). Aos 7 dias, a área da lesão é semelhante em todos os grupos (Fig.12 g), porém após 60 dias as cicatrizes de ambos os grupos α -MSH (Fig.12 e, h) e tolerante (Fig.12 f, h) são menores e menos evidentes quando comparadas às cicatrizes de animais controle (Fig.12 d, h) nos quais as cicatrizes são maiores e de fácil observação.

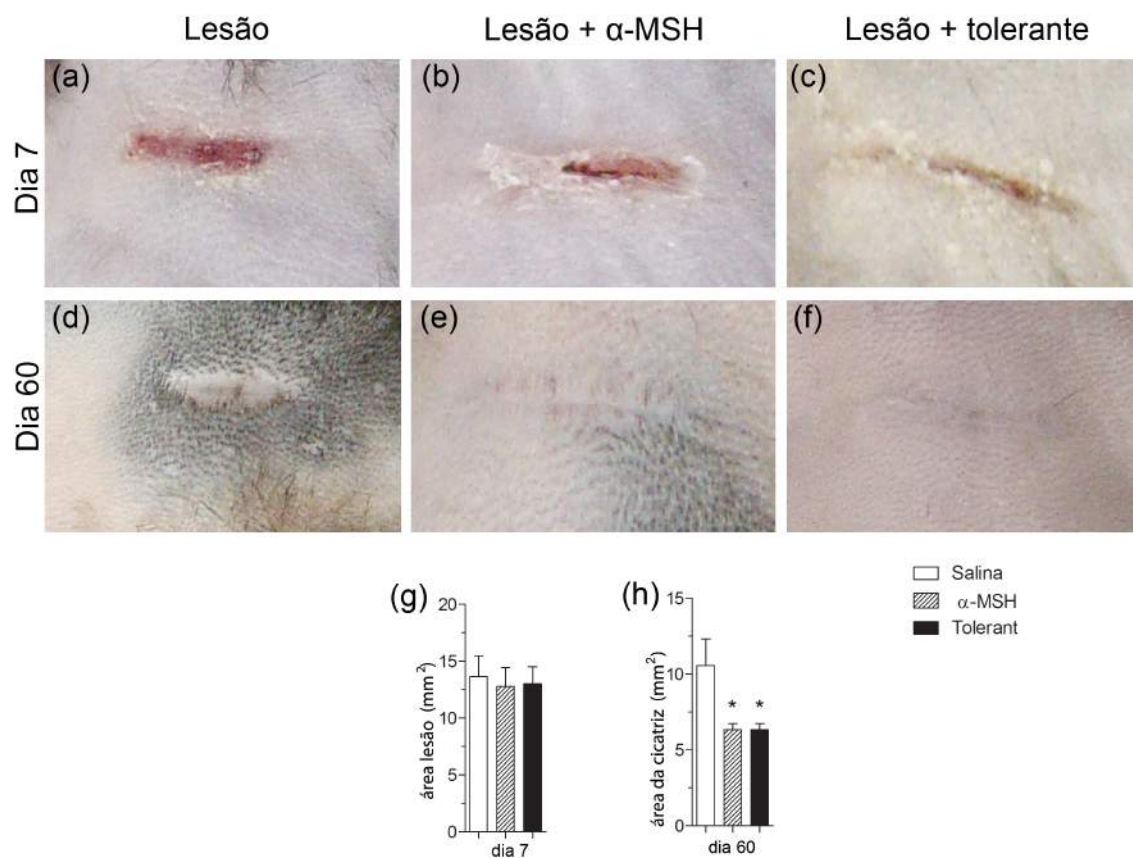


Figura 12 – Tanto a injeção de α -MSH quanto a injeção de uma proteína tolerada diminuíram a cicatriz. Imagens representativas da região dorsal da pele de animais controle da lesão (a, d), animais injetados com α -MSH (b, e) e animais injetados com a proteína tolerada (c, f) 7 e 60 dias após a lesão, como descrito na figura. Aos 7 dias não há diferença entre os grupos em relação à área da ferida (g). A área das cicatrizes (h) aos 60 dias nos animais dos grupos α -MSH (barra hachurada) e tolerante (barra preta) são menores do que no grupo controle (barra branca). Dados representam a média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$, N=6.

Análises histológicas de cortes corados com tricromático de Gômori 60 dias após a lesão (Fig.13) mostraram que tanto a injeção de α -MSH quanto da proteína tolerada, produz diferenças qualitativas significantes na organização da matriz extracelular. Na pele normal, sem ferida, é possível observar um padrão de deposição das fibras colágenas conhecido como tipo cesta, no qual as fibras são mais curtas e entrelaçadas (Fig.13 a, e). Por outro lado, a nova derme do grupo controle salina apresenta fibras colágenas compactamente arranjadas, paralelas entre si e a epiderme (Fig.13 b, f), disposição típica das cicatrizes. Diferentemente desse padrão característico de cicatrizes, os animais dos grupos α -MSH (Fig.13 c, g) e tolerante (Fig.13 d, h) apresentam um padrão mais semelhante à pele sem lesão, com fibras mais finas e entrelaçadas, mostrando uma similaridade com a pele intacta. Aos 60 dias após a lesão, não houve crescimento de pelos nem regeneração de anexos cutâneos em nenhum grupo, mas é possível perceber uma formação inicial da derme papilar nos grupos α -MSH e tolerante (Fig.13 g, h).

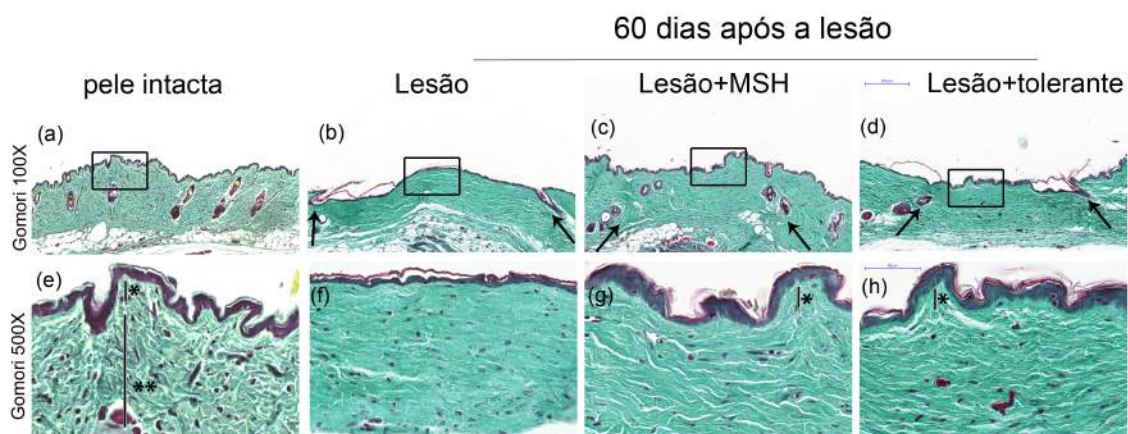


Figura 13 – Injeção de α -MSH ou da proteína tolerada melhoram o remodelamento da matriz extracelular. Fotomicrografias representativas da pele intacta (a, e) e de cicatrizes de camundongos que receberam injeção de salina (b, f), de α -MSH (c, g) e de uma proteína tolerada (d, h) após coloração de tricromático de Gômori. Imagens indicam uma melhor organização das fibras de matriz extracelular nas cicatrizes dos grupos α -MSH e tolerante 60 dias após as feridas. Asteriscos indicam: * derme papilar e ** derme reticular. Magnificação original nas fotomicrografias 100x (a-d), 500x (e-h). Escala das barras: 200 μ m (a-d), 50 μ m (e-h). Os retângulos mostram os locais onde ocorreram as magnificações.

Para avaliar a deposição de colágenos I e III, os cortes das lesões coletados aos 60 dias foram imunomarcados com anti-colágeno I e anti-colágeno III e analisadas em microscopia confocal. Na figura 14, podemos ver que as intensidades de fluorescência para colágeno I e colágeno III não são significativamente diferentes entre os grupos.

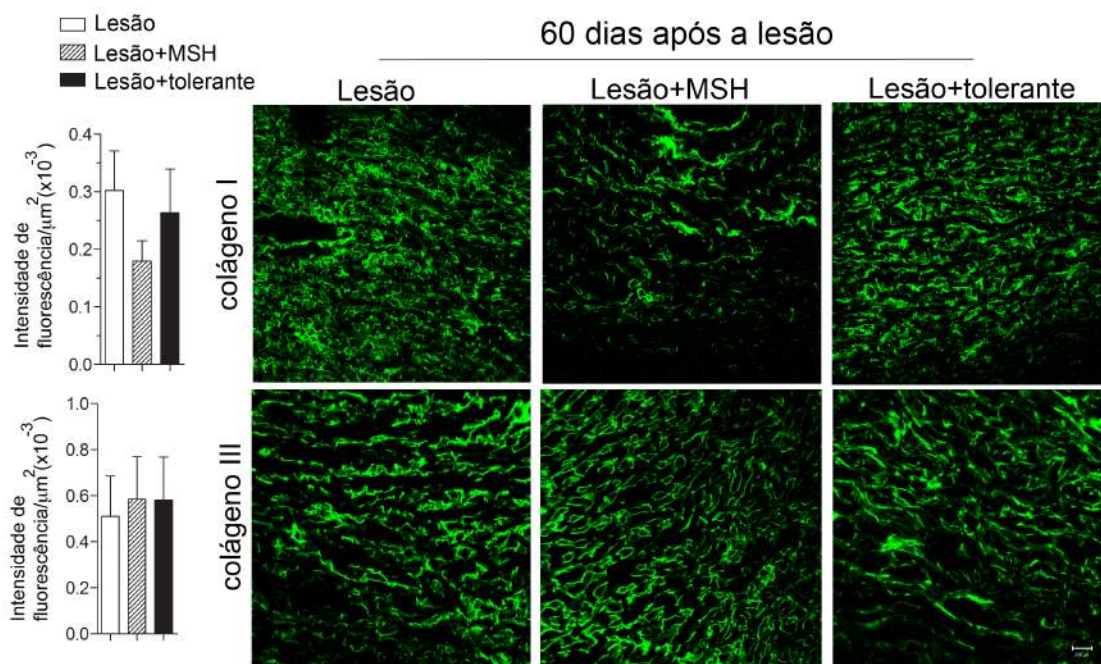


Figura 14 – Deposição de fibras colágenas na área da cicatriz. Intensidade de fluorescência para colágeno tipo I (parte superior da figura) e colágeno tipo III (parte inferior da figura) 60 dias após as lesões dos animais do grupo controle lesão (a, d, barra branca), do grupo α -MSH (b, e, barra hachurada) e do grupo tolerante (c, f, barra preta). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal na objetiva de 63x. Os gráficos representam a intensidade de fluorescência verde (os valores dos tons de cinza de cada pixel foram divididos pela área (μm^2) $\times 10^{-3}$). Não houve diferença entre os grupos na intensidade de expressão de fibras colágenas do tipo I e III. Dados representam a média \pm erro padrão, N=6.

5.5 - A injeção da proteína tolerada aumenta os níveis séricos de α -MSH e sua expressão na região da ferida, onde também podemos encontrar a expressão do receptor de melanocortina do tipo 1.

Uma vez que a injeção de α -MSH e a injeção de uma proteína tolerada produzem efeitos semelhantes na cicatrização de feridas de pele, pesquisamos se a injeção da proteína tolerada estaria sendo mediada pelo peptídeo α -MSH. Uma vez que o peptídeo VIP e a SP também poderiam estar envolvidos nos efeitos sistêmicos da tolerância oral, avaliamos também estes peptídeos. Inicialmente pesquisamos se a injeção da proteína tolerada resultaria em

aumento dos peptídeos no plasma. Para isto, camundongos pré-tratados com OVA oral (tolerantes a OVA) e controles não tratados com OVA oral receberam uma injeção i.p. de OVA pouco antes da ferida na pele. A figura 15-a amostra o aumento dos níveis séricos do peptídeo α -MSH no terceiro dia após a lesão em animais tolerantes a OVA que receberam uma injeção i.p. de OVA. Não houve diferença nos níveis plasmáticos dos outros dois peptídeos pesquisados, VIP e substância P.

A presença de α -MSH foi pesquisada também na região da ferida e, como controle, na pele intacta, sem lesão. O nível de expressão de α -MSH na região das feridas em animais tolerantes é maior que a encontrada nas feridas em animais controle e semelhante à da pele sem lesão (Fig.15 b). Interessantemente, as imagens representativas da pele após a imunomarcação mostram expressão de α -MSH principalmente na língua epitelial, região constituída por queratinócitos, e no leito da ferida, região rica em células inflamatórias e fibroblastos (Fig.15 d, e). Este padrão de expressão pode ser observado em feridas de animais controle (Fig.15 d) e de animais tolerantes (Fig. 15 e), porém em maior intensidade em animais tolerantes. Na pele intacta (Fig.15 c), a expressão de α -MSH ocorre na região do folículo piloso, principalmente das glândulas sebáceas resultando em maior intensidade de fluorescência nessa em relação à lesão dos animais controle (Fig.15 b). O receptor de α -MSH, MC-1R, também se encontra expresso na região da ferida, mas não há diferença entre os grupos controle e tolerante. A expressão do receptor MC-1R na pele intacta é significativamente maior (Fig.15 b). Durante o reparo das lesões, o receptor MC-1R localiza-se principalmente na região da língua epitelial (Fig.15 g, h), enquanto na pele sem lesão, o MC-1R encontra-se principalmente na região do epitélio e do folículo piloso (Fig.15 f).

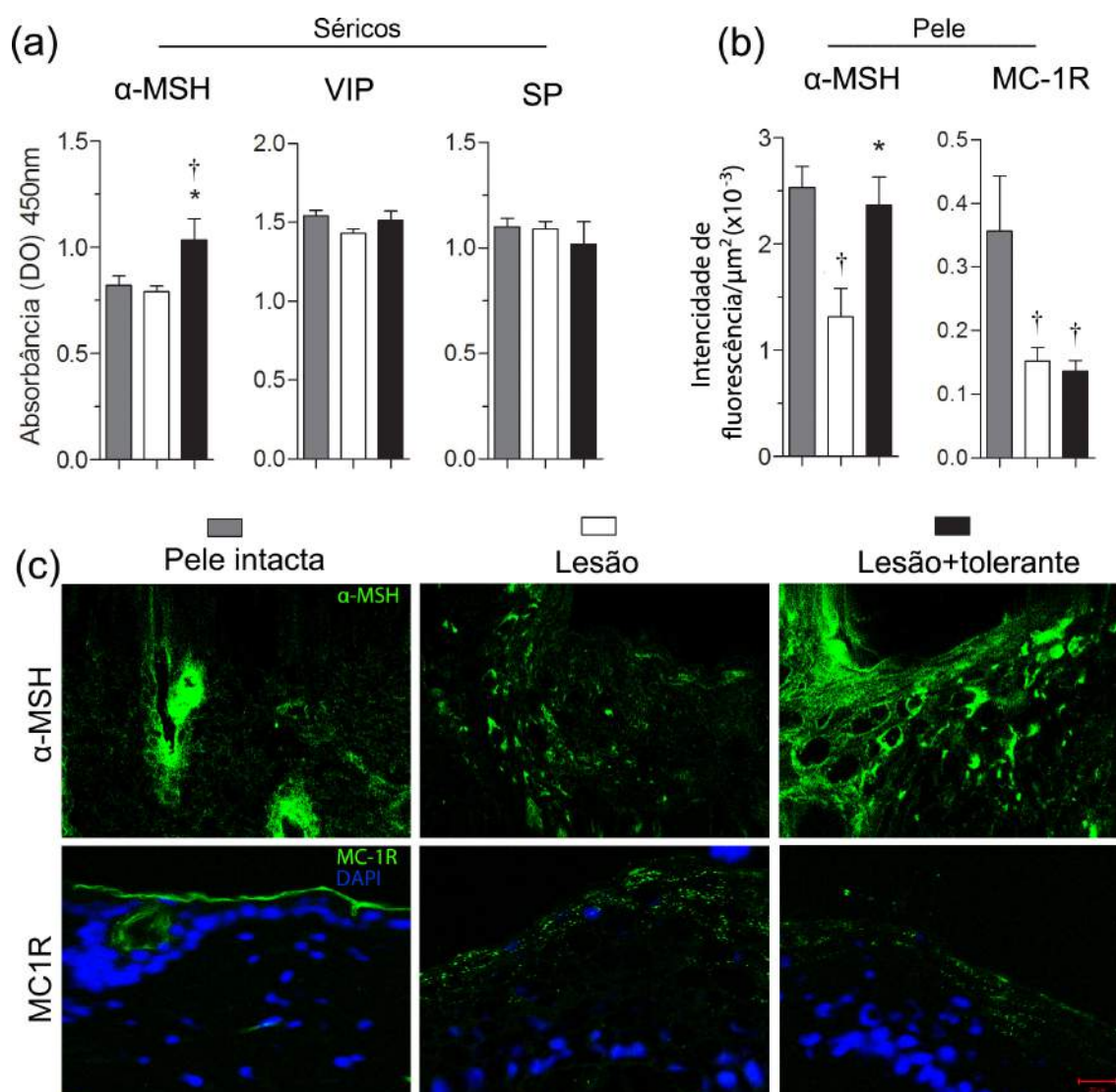
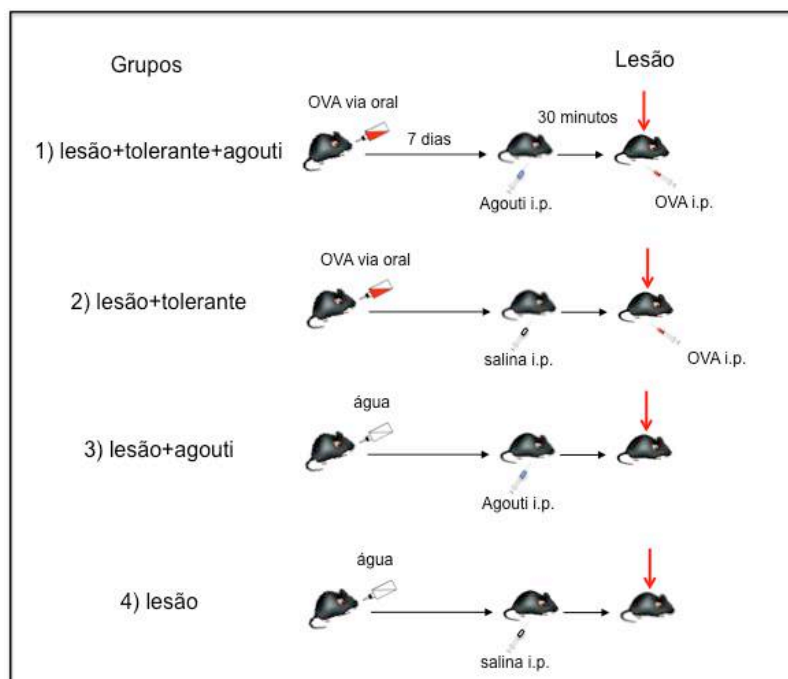


Figura 15 – A análise dos níveis séricos dos neuropeptídios α -MSH, VIP e SP e da expressão tecidual de α -MSH e MC-1R. Os níveis séricos (a) de α -MSH, VIP e SP foram analisadas por ensaio imunoenzimático 3 dias após a ferida. Para a imunofluorescência (c-h), as lesões foram coletadas após 3 dias e foram incubadas com anti- α -MSH (c-e) e anti-MC-1R (f-h). A pele intacta foi analisada para comparação (c, f). As imagens foram capturadas em microscópio confocal com objetiva de 63x e os gráficos (b) representam a intensidade da fluorescência verde (a soma de valores de cinza de todos os pixels dividida pela área (em μm^2) $\times 10^{-3}$). Nos gráfico os grupos são pele intacta (barra cinza), lesão (barra branca) e tolerante (barra preta). Barras de escala: 20 μm (c-h). Os dados representam a média \pm SEM. * $p \leq 0,05$ comparando com salina e \dagger $p \leq 0,05$ comparando com pele intacta, N=6.

5.6 – A injeção da proteína agouti, antagonista do receptor de α -MSH, impede a ação anti-inflamatória da proteína tolerada.

O aumento dos níveis séricos de α -MSH e de sua expressão nas feridas de animais tolerantes sugere que este peptídeo pode mediar o efeito anti-inflamatório desencadeado pela injeção da proteína tolerada. Assim, testamos se a injeção de agouti, antagonista de α -MSH, poderia inibir o efeito da proteína tolerada. Para isto, um grupo de camundongos (1) tolerantes a OVA recebeu uma injeção i.p. de agouti, 30 minutos antes da injeção i.p. da proteína tolerada (OVA) e lesão. Para controle, um grupo de camundongos (2) tolerantes a OVA recebeu uma injeção i.p. de salina, 30 minutos antes da injeção i.p. da proteína tolerada e lesão; outro grupo controle (3) recebeu uma injeção i.p. de agouti, 30 minutos antes da lesão; e outro grupo controle (4) recebeu uma injeção i.p. de salina, 30 minutos antes da lesão. Protocolos em materiais e métodos e conforme ilustração abaixo.



No terceiro dia após a lesão, os animais foram sacrificados e a pele com as lesões coletadas para análises histopatológicas e morfométricas. Na figura 16 estão apresentadas imagens representativas dos cortes corados com H&E onde é possível observar a formação da língua epitelial e a formação inicial do tecido de granulação. Sobre a superfície da ferida encontra-se o coágulo de fibrina, bastante reduzido em feridas de animais tolerantes sem injeção de agouti (Fig.16 b). Interessantemente, a injeção de agouti reverteu o efeito da injeção da proteína tolerada (Fig.16 d) e este grupo tornou-se semelhante ao grupo controle da lesão (Fig.16 a).

Nos cortes corados com H&E foram feitas análises morfométricas de células inflamatórias (Fig.16 e) e de fibroblastos (Fig.16 f) e nos cortes corados com azul de toluidina (não mostrados) foi feita a contagem de mastócitos na área da lesão (Fig.16 g). Estes resultados mostraram que o antagonista agouti reverteu a redução de células inflamatórias, fibroblastos e mastócitos encontrada em animais tolerantes, ou seja, após a injeção de agouti o infiltrado inflamatório das feridas dos animais tolerantes tornou-se semelhante ao encontrado nos animais controle não tolerantes. Análise das lesões do grupo que recebeu a injeção de agouti sem nenhum outro tratamento mostrou que este antagonista não produziu diferença no reparo das lesões.

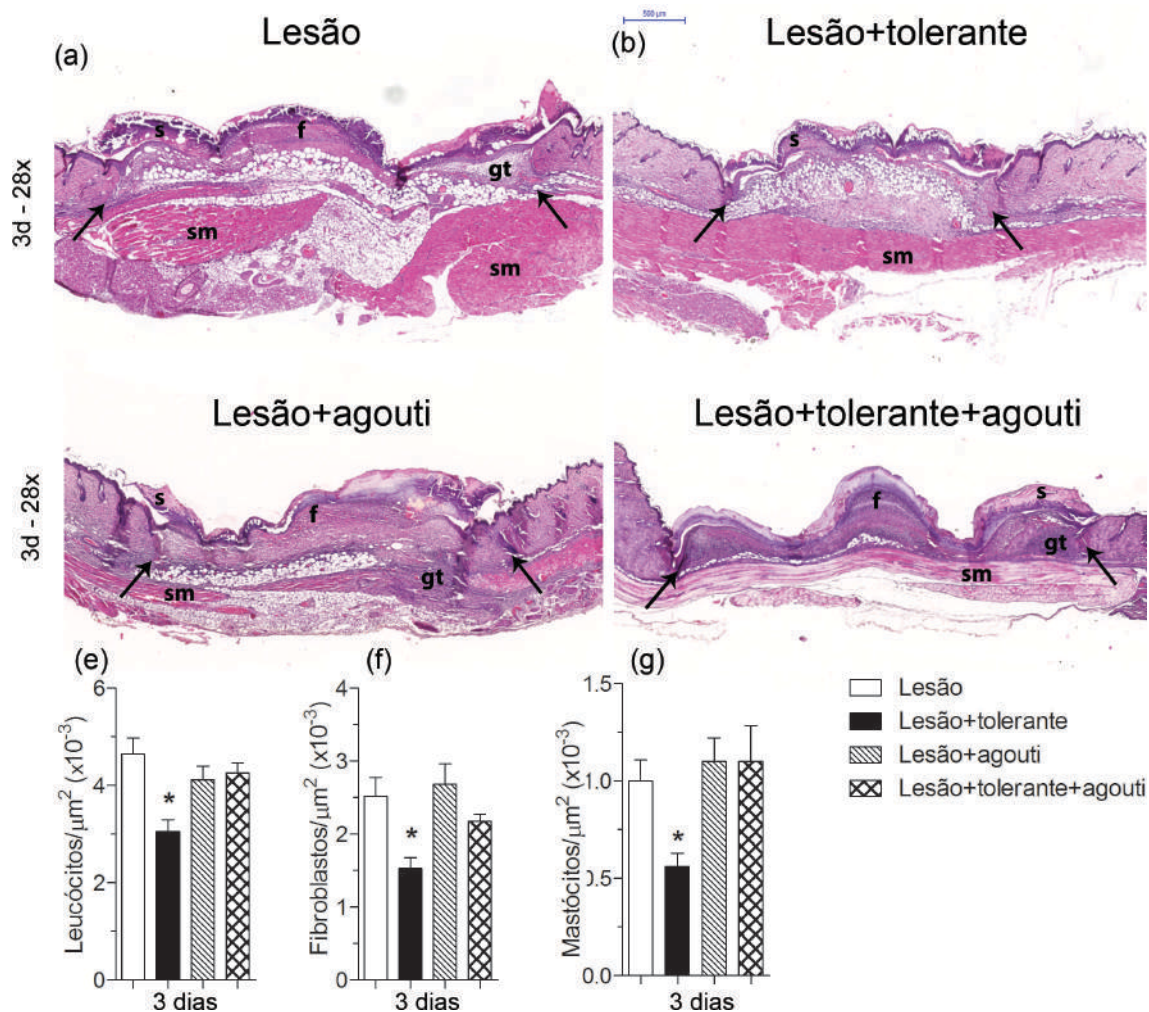


Figura 16 – A injeção da proteína agouti reverte o efeito da injeção da proteína tolerada na cicatrização de feridas cutâneas. Feridas coradas com H&E (a-d). Feridas de camundongos tolerantes a OVA que foram injetados com agouti, 30 minutos antes da injeção de OVA em adjuvante (d) foram comparadas com as feridas controle tolerante injetado com a proteína tolerada (b); controle lesão (a) e controle que recebeu injeção somente de agouti antes da lesão (c). Os camundongos que receberam uma injeção de agouti antes da proteína tolerada (barra reticulada) apresentaram mais leucócitos, fibroblastos e mastócitos (e-g) quando comparadas com as de animais tolerantes a OVA e que não foram injetados com agouti (barra preta), mas semelhante aos encontrados nos animais controle injetados com salina (barra branca) ou apenas com agouti (barra hachurada). As letras nas fotomicrografias representam: s, crosta; f, coágulo de fibrina; e, epitélio; gt, tecido de granulação; sm, músculo esquelético. Setas pretas: região da lesão. Magnificação original nas fotomicrografias 28x. Escala das barras: 500 μm . Dados representam a média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$. N=6.

5.7 - Os efeitos inibitórios da tolerância oral no infiltrado inflamatório não foram inibidos pela injeção de um antagonista do receptor de corticosteróide, RU-486 (mifepristone).

Diferentemente do que ocorreu com a injeção de agouti, a injeção de RU-486 não impediu o efeito anti-inflamatório da injeção de uma proteína tolerada. Ou seja, os animais tolerantes a OVA, que foram injetados com 25mg/kg do antagonista de glicocorticóide, 1 hora antes da injeção de OVA+Al(OH)₃ e imediata realização da lesão (Fig.17 d), apresentaram a mesma redução das células inflamatórias, fibroblastos e mastócitos (Fig.17 e-g), observadas nas lesões de animais tolerantes e imunizados com OVA+Al(OH)₃, mas que não foram injetados com RU-486 (Fig.17 b)

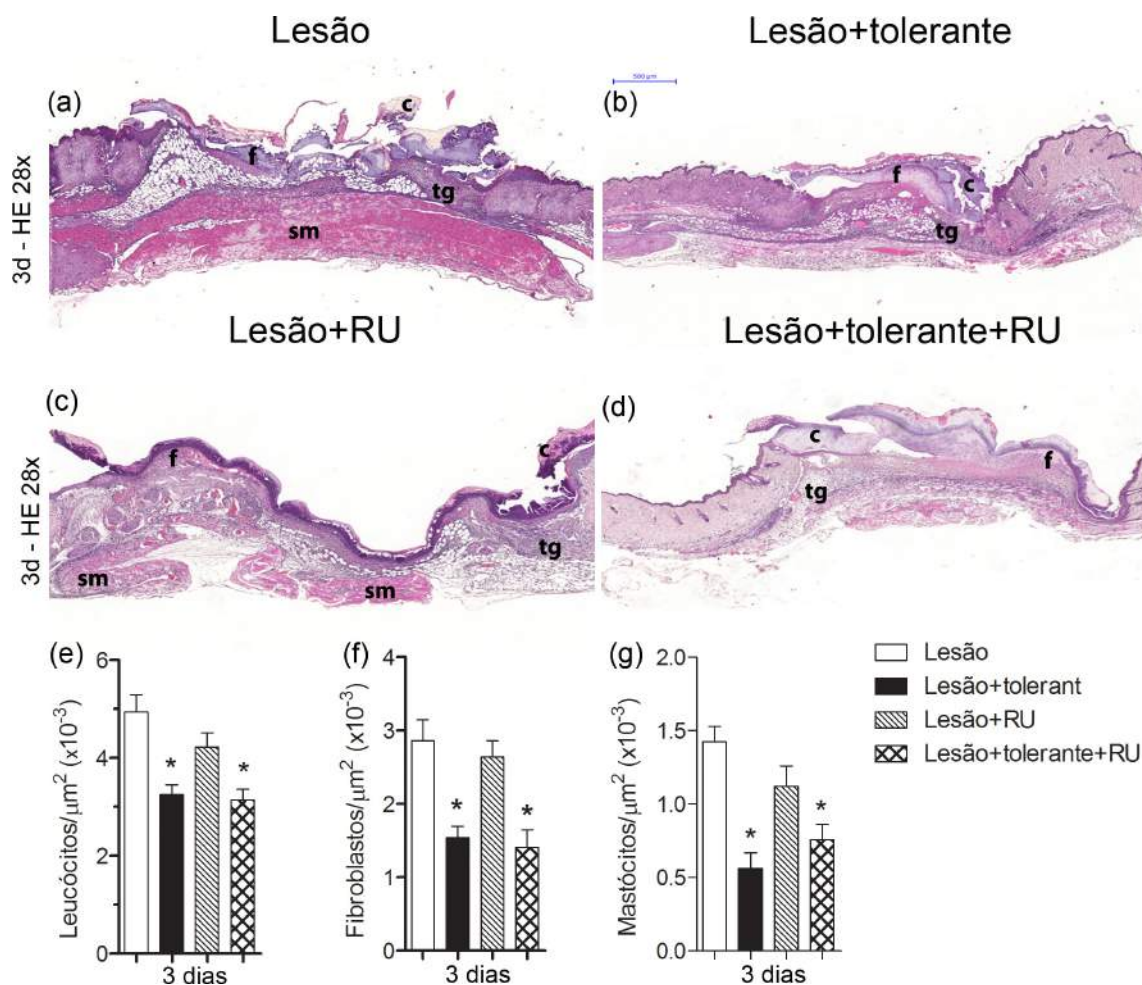


Figura 17 – A injeção do antagonista do receptor de glicocorticóides não impede os efeitos da injeção da proteína tolerada na cicatrização de feridas cutâneas. Feridas coletadas três dias após realização das mesmas e coradas com H&E (a-d). Feridas de animais tolerantes a OVA e injetados com RU-486 uma hora antes da injeção de OVA em adjuvante e realização da ferida (d), apresentaram uma redução significativa de leucócitos (e), fibroblastos (f) e mástócitos (g) na região da ferida, semelhante aos animais tolerantes a OVA (b) e diferentemente dos grupos injetados com salina (a) ou somente RU-486 (c). As letras nas fotomicrografia representam: c, crosta; f, coágulo de fibrina; e, epitélio; sm, músculo esquelético; tg, tecido de granulação. Magnificação original nas fotomicrografias 28x (a-d). Escala das barras: 500 μm. Análise morfométrica nos animais do grupo lesão (barra branca), tolerante (barra preta), RU (barra hachurada) e tolerante+RU (barra reticulada). Dados representam a média ± erro padrão. *p<0,05. N=6.

6 – Discussão

A inflamação fisiológica é fundamental para a recuperação dos tecidos, mas uma alteração da mesma pode ser prejudicial ao processo de reparo. Uma das consequências da resposta inflamatória persistente no local da ferida é o desequilíbrio da atividade proteolítica, que sobrecarrega os mecanismos protetores do tecido (Eming et al., 2007). Esse evento tem a participação de diferentes células e um grande número de fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias, tais como neuropeptídeos (Rolfe and Grobbelaar, 2012).

O α -MSH, uma melanocortina natural que atua na síntese de eumelanina, tem se destacado por apresentar ampla atividade anti-inflamatória. Diferentes estudos mostraram que a injeção i.p. de α -MSH em camundongos bloqueia a inflamação aguda da pata produzida por carragenina e a sensibilidade de contato de uma maneira relacionada com a dose (Hiltz and Lipton, 1990). Neste trabalho mostramos que a injeção i.p. de 1,0 mg/kg de α -MSH em camundongos C57BL/6, 30 minutos antes de uma ferida na pele, reduzem a inflamação da ferida. Por outro lado, a injeção de 0,5 mg/kg ou 2,5 mg/kg de α -MSH não reduzem a inflamação da ferida indicando que α -MSH tem uma curva invertida em forma de U para o seu efeito anti-inflamatório como relatado em estudos utilizando diferentes modelos de inflamação (Delgado et al., 1998; Lyson and McCann, 1993). Interessantemente, a injeção i.p. de 1,0 mg/kg de α -MSH, logo antes da realização da ferida na pele, resultou em cicatrizes menores e menos distinguíveis da pele adjacente.

A melhora da cicatriz nos animais injetados com α -MSH provavelmente é iniciada logo após a sua injeção, afetando a fase de hemostasia/inflamação da cicatrização de feridas e convergindo na direção de alterações combinadas

da migração/ação de leucócitos e fibroblastos. É interessante que no grupo α -MSH, dos resultados relatados no capítulo 1 deste trabalho, o número de fibroblastos na área da lesão foi significativamente reduzido no dia 7, enquanto a intensidade de imunofluorescência para α -SMA que é expressa em miofibroblastos não foi diferente da encontrada para o grupo controle lesão. Nós sugerimos que isso pode ser atribuído ao padrão alterado de ativação de fibroblastos desencadeada pelo peptídeo α -MSH o que explica a alteração posterior da deposição de matriz extracelular e organização em nova derme. Seria interessante avaliar em trabalhos futuros se o tratamento com α -MSH ativa diferentes tipos de fibroblastos durante a reconstituição cutânea, uma vez que os fibroblastos não são homogêneos como sugerido por (Driskell et al., 2013).

A redução ou ausência da cicatriz após o fechamento de feridas na pele de fetos tem sido correlacionada com uma matriz extracelular rica em colágeno do tipo III e ácido hialurônico (King et al., 2013). Isso está de acordo com os nossos resultados que mostram um nível maior de colágeno III após injeção de α -MSH e nenhuma alteração nos níveis de colágeno I. O colágeno III pode atenuar o estresse biomecânico o que pode indicar que fibroblastos nas lesões do grupo α -MSH são submetidos a diferentes sinais de estresse e modificam ainda mais a matriz extracelular (MEC) uma vez que durante a maturação e as fases de remodelação o colágeno é remodelado e realinhado ao longo das linhas de tensão.

Outra observação importante no nosso trabalho é que a reorganização da derme papilar foi observada no grupo α -MSH aos 60 dias após a ferida. No entanto, mais estudos são necessários para explorar melhor o significado desta

reorganização da derme papilar e verificar se isto seria um passo na direção da regeneração do folículo piloso e de maior interação derme/epiderme.

Nosso estudo sobre a atuação do α -MSH na cicatrização de feridas preenche uma lacuna importante na literatura sobre os efeitos sistêmicos desse peptídeo hormonal na cicatrização de feridas cutâneas e abre uma nova possibilidade de intervenção terapêutica para lidar com a formação de cicatrizes indesejáveis. Mais estudos são necessários para descobrir os efeitos moleculares de α -MSH sobre a cicatrização de feridas cutâneas e da sua interação com outros fatores parácrinos, tais como IL-10 e TGF- β 3, que também impedem a formação de cicatrizes excessivas.

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez que uma única injeção de α -MSH administrado previamente por via i.p. melhora acentuadamente o processo de reparo. De forma semelhante aos efeitos sistêmicos da injeção de proteínas toleradas (Costa et al., 2011), a injeção de 1,0 mg/kg desse peptídeo se mostrou capaz de reduzir a inflamação e melhorar a deposição de matriz extracelular, o que nos chamou muita atenção.

A tolerância oral é um fenômeno muito intrigante e pouco reconhecido como uma consequência usual dos contatos que temos através das mucosas. Embora seja mais bem conhecido que a ingestão de uma proteína pode inibir a resposta imune específica para esta proteína, mais intrigante e menos conhecido é que a injeção parenteral de uma proteína tolerada mais adjuvante tem efeitos sistêmicos que inibem a inflamação em diferentes locais do organismo. O estudo dos mecanismos destes efeitos sistêmicos da injeção de uma proteína tolerada nos levou a considerar a participação de neuropeptídios. Então expandimos nossa investigação para saber se os neuropeptídios α -MSH,

VIP e SP estariam envolvidos na melhora do reparo de feridas cutâneas por meio dos efeitos sistêmicos da injeção de proteínas toleradas.

Assim, sabendo que os efeitos da injeção de proteínas tolerada são sistêmicos e de ação rápida, analisamos os níveis séricos dos três neuropeptídios já descritos na literatura como sendo capazes de alterar a cicatrização ou a tolerância oral.

Nossos resultados mostraram que houve um aumento dos níveis séricos de α -MSH, mas nenhuma diferença nos níveis de VIP ou SP em animais tolerantes 3 dias após receberem uma injeção da proteína tolerada. Como este resultado sugeria a participação do hormônio α -MSH nos efeitos sistêmicos da tolerância oral aprofundamos os estudos sobre a possível participação de α -MSH na melhora da cicatrização de feridas cutâneas resultante da injeção da proteína tolerada.

Utilizando a técnica de imunohistoquímica verificamos que na região da ferida de animais tolerantes há maior expressão do peptídeo α -MSH em comparação com feridas de animais controle. Esse nível, no entanto, é semelhante ao da pele intacta. As regiões que apresentaram maior expressão do peptídeo α -MSH em lesões de animais tolerantes foram a língua epitelial, rica em queratinócitos, o leito da ferida, rico em células inflamatórias e fibroblastos e a região de formação inicial do tecido de granulação rica em células endoteliais e fibroblastos. Na pele intacta o padrão de expressão é diferente da ferida, pela maior expressão do peptídeo nos folículos pilosos que estão ausentes na região da ferida.

O aumento dos níveis séricos de α -MSH provavelmente é resultado da secreção deste peptídeo pela glândula hipófise e liberada de maneira endócrina, entretanto o aumento da expressão em feridas de animais

tolerantes pode ter outras origens. Quando estímulos nocivos ativam nervos sensoriais, os potenciais de ação podem ser transmitidos, a partir de um ramo, de forma antidrômica e induzir a liberação de neuropeptídios nos terminais de neurônios periféricos (Chiu et al., 2012). Dessa forma, a liberação de α -MSH na pele poderia alterar as funções de células da pele e células do sistema imune, tais como a proliferação celular, produção de citocinas, apresentação de antígenos, neurotransmissão sensorial e degradação de mastócitos sob condições fisiológicas ou fisiopatológicas (Luger, 2002), que podem resultar na melhora do processo de cicatrização após a injeção da proteína tolerada.

Além disso, células locais também podem contribuir para expressão do peptídeo na pele. A clivagem proteolítica de POMC dá origem ao hormônio adenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez, dá origem ao peptídeo α -MSH. A expressão de ACTH já foi detectada na camada basal da epiderme (Slominski et al., 1998), sugerindo que estas melanocortinas estão envolvidas na proliferação e diferenciação de queratinócitos (Bohm et al., 2006a). Durante estímulos lesivos queratinócitos aumentam a síntese de mRNA de POMC e liberação de α -MSH (Bohm et al., 2006b), bem como de citocinas, tais como IL1 e TNF- α (Sanchez, 2010). Além disso, α -MSH inibe a ativação de NF κ B/p65 em queratinócitos (Moustafa et al., 2002). A injeção da proteína tolerada eleva os níveis de α -MSH em lesões de animais tolerantes, e esse peptídeo, por meio de MC-1R localizados em queratinócitos, de maneira autócrina ou endócrina, pode participar da re-epitelização, bem como da inibição da ativação de NF κ B alterando a liberação de citocinas por estas células.

Os macrófagos são criticamente importantes para a cicatrização de feridas cutâneas uma vez que exercem funções específicas em diversos estágios deste processo (Willenborg and Eming, 2014). O peptídeo α -MSH

pode ser secretado por macrófagos (Star et al., 1995). Nossos resultados mostram que aos 3 dias após a lesão, há uma expressão elevada deste peptídeo no leito da ferida, local repleto de macrófagos nesta fase do reparo. Embora haja uma redução de células inflamatórias, o número de macrófagos, após 5 dias, encontra-se aumentado em lesões incisionais (Costa et al., 2011) e inalteradas em lesões excisionais (Costa et al., 2015) de animais tolerantes injetados com a proteína tolerada. Possivelmente, além do sistema nervoso e queratinócitos, os macrófagos também sejam um dos produtores de α -MSH na pele durante os efeitos indiretos da tolerância oral.

Alguns estudos sugerem um papel antifibrogênico para α -MSH. Em modelo de camundongos neonatais nos quais a fibrose cutânea foi induzida por injeções subcutâneas repetidas com TGF- β 1 a deposição de colágeno foi significativamente suprimida por co-injeção de α -MSH (Bohm et al., 2004). Além disso, no modelo de escleroderma induzido em camundongos por bleomicina, α -MSH reduziu a fibrose da pele e o teor de colágeno (Kokot et al., 2009). No nosso trabalho a intensidade de colágeno I nas cicatrizes do grupo α -MSH não foi diferente do grupo controle lesão no dia 40, entretanto o colágeno III foi aumentado. Em nosso modelo, α -MSH alterou o padrão de organização do colágeno I tornando-o mais semelhante ao encontrado em pele intacta, sem lesão.

Em animais tolerantes encontramos também uma redução de fibroblastos, que é revertida pela injeção de um antagonista do receptor de α -MSH. Embora não haja uma redução na produção de colágeno em animais tolerantes aos 60 dias, é observada a formação de uma cicatriz menor, mais suave cuja matriz extracelular é mais organizada, apresenta deposição de fibras colágenas mais semelhantes a da pele intacta, bem como a formação da

derme papilar. O bloqueio da redução de fibroblastos em animais tolerantes por um antagonista do receptor de α -MSH é um forte indicativo da participação deste peptídeo neste fenômeno.

O peptídeo α -MSH inibe a expressão de moléculas de adesão, tais como ICAM-1 (Luger et al., 2003) e a injeção da proteína tolerada também inibe a expressão de ICAM-1 ao redor de granulomas em torno de ovos de *Schistosoma mansoni* no pulmão de animais tolerantes (Azevedo et al., 2012). Em nosso trabalho ainda não analisamos a expressão de ICAM-1 nas feridas de animais tolerantes, mas uma possibilidade é que α -MSH se ligue, via MC-1R, e reduza a expressão de ICAM-1 em células endoteliais resultando em uma reduzida migração de células inflamatórias para a região da lesão.

Os resultados comparativos das análises histológicas e imunohistoquímicas entre a injeção da proteína tolerada e a injeção de α -MSH durante o processo de reparo de feridas cutâneas, sugerem que ambos têm ações similares. Em ambos os grupos há uma redução de leucócitos, mastócitos e fibroblastos. Similaridades entre as cicatrizes formadas 60 dias após a lesão, tanto no grupo tolerante quanto no grupo α -MSH, expandem a possibilidade de que este neuropeptídeo participe dos efeitos sistêmicos da tolerância oral.

A proteína agouti é um potente antagonista de MC-1R e MC-4R (faixa nanomolar), um antagonista relativamente fraco de MR-R2 e MC-3R, e um antagonista muito fraco para o MC-5R (Dinulescu and Cone, 2000). Nossos resultados mostram que os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pela injeção de uma proteína tolerada podem ser bloqueados pela proteína agouti: a injeção de agouti em animais tolerantes impediu a redução do número de leucócitos, mastócitos e fibroblastos na região da ferida durante a fase

inflamatória do processo de reparo. A redução da ação anti-inflamatória observada nas fases iniciais do reparo de feridas em animais tolerantes pela injeção da proteína agouti é um fator chave para relacionar a participação do neuropeptídeo α -MSH aos efeitos sistêmicos da tolerância oral.

Os neurônios nociceptores e células imunes compartilham muitas vias de interação molecular e em resposta a eles uma intensa rede de fibras sensoriais e autonômicas, em tecidos periféricos, comunicam-se diretamente com o sistema imune formando uma rede neurogênica rápida de interações (Chiu et al., 2012).

Os neuropeptídeos podem ser liberados dos terminais periféricos de neurônios sensoriais aferentes da pele e modular funções em células nesse local, em células do sistema imune, tais como a proliferação celular, produção de citocinas, apresentação de antígenos, neurotransmissão sensorial e degradação de mastócitos sob condições fisiológicas ou fisiopatológicas (Luger, 2002) que podem resultar na melhora do processo de cicatrização.

A atividade imunológica é dinâmica e conservativa, sendo que as imunopatologias interferem com esta estabilidade e resultam em uma expansão oligoclinal, com conseqüente perda da conectividade entre linfócitos (Vaz and Carvalho, 2014). A injeção da proteína tolerada em adjuvante deve alterar esta conectividade de tal modo que aumenta a expressão do peptídeo α -MSH favorecendo reações inflamatórias menos intensas e melhorando o processo de cicatrização de feridas. Os efeitos indiretos da tolerância oral dependem de linfócitos e os receptores MC-1R, MC-4R e MC-5R também são expressos nestas células (Bohm et al., 2006b; Brzoska et al., 2008; Yamaguchi et al., 2009). A injeção da proteína agouti, por via i.p., pode bloquear estes receptores em linfócitos, perturbando a estabilidade da conexão entre estas

células e interferindo nas alterações sistêmicas que permitem a ocorrência dos efeitos indiretos.

Uma das perguntas frequentes que ouvimos sobre as ações dos efeitos anti-inflamatórios da injeção de proteínas toleradas é se esses envolvem os glicocorticóides. Então, considerando que no fenômeno dos efeitos indiretos da tolerância oral pode haver aumento transitório de corticosteróide, avaliamos a participação deste hormônio em nosso modelo de cicatrização de feridas. Nossos resultados, usando o antagonista RU-486 (mifepristone), não mostraram evidências do envolvimento de glicocorticóides nos efeitos sistêmicos da injeção de proteínas toleradas. As conseqüências de alterações sistêmicas ou locais dos níveis de glicocorticóides no fechamento de feridas cutâneas podem variar se estas alterações são agudas ou crônicas. Em estudos sobre a influência do stress crônico no fechamento de feridas, o aumento de glicocorticóide está correlacionado com um atraso no seu fechamento (Christian et al., 2006). Por outro lado, um aumento agudo de glicocorticóide e sua ação anti-inflamatória pode acelerar a cicatrização de feridas (Lin et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que uma injeção i.p. de RU-486 1h antes da injeção da proteína tolerada não inibiu os seus efeitos anti-inflamatórios. Mais estudos são necessários para descartar ou afirmar a participação deste hormônio nos efeitos indiretos da tolerância oral. Uma das possibilidades seria investigar os receptores deste hormônio ou a presença desse hormônio no plasma de animais tolerantes.

De qualquer maneira a observação de que o processo de reparo e fechamento de lesões cutâneas pode ser melhorado através de imunizações com pequenas doses de uma proteína previamente dada por via oral tem uma

importância biológica muito grande. Neste trabalho nós mostramos, pela primeira vez, que o neuropeptídeo α -MSH está envolvido neste fenômeno. Além disso, fomos os primeiros a avaliar o potencial anti-inflamatório de α -MSH na melhora de lesões cutâneas .

7 – Conclusões

- 1) O hormônio alfa-melanócito estimulante melhora o processo de cicatrização de feridas cutâneas reduzindo o número de leucócitos, fibroblastos, mastócitos e área de cicatriz e melhorando a organização das fibras de colágeno.
- 2) O padrão de reparo de lesões cutâneas ocasionado pela injeção i.p. de α -MSH é semelhante ao ocasionado pela injeção da proteína tolerada.
- 3) A injeção da proteína tolerada eleva os níveis séricos α -MSH e a expressão desse peptídeo no leito das feridas de animais tolerantes aos 3 dias após a lesão.
- 4) A injeção da proteína tolerada não modifica a expressão de receptor MC-1R, ao menos no tempo avaliado.
- 5) A injeção da proteína agouti pouco antes da administração da proteína tolerada inibiu a ocorrência dos efeitos sistêmicos da tolerância oral na cicatrização.
- 6) O hormônio alfa-melanócito estimulante participa da melhora observada em lesões cutâneas ocasionada pela injeção da proteína tolerada.

8 – Referências bibliográficas

- Aliakbari, J., S.P. Sreedharan, C.W. Turck, and E.J. Goetzi. 1987. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1440-1445.
- Auriemma, M., T. Brzoska, L. Klenner, V. Kupas, T. Goerge, M. Voskort, Z. Zhao, T. Sparwasser, T.A. Luger, and K. Loser. 2012. alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation. *J Invest Dermatol* 132:1814-1824.
- Azevedo, G.M., Jr., R.A. Costa, M.A. Resende, C.M. Rodrigues, N.M. Vaz, and C.R. Carvalho. 2012. Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. *Clin Dev Immunol* 2012:293625.
- Azouz, A., M.S. Razzaque, M. El-Hallak, and T. Taguchi. 2004. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc* 37:141-148.
- Bandeira, A., A. Coutinho, C. Carnaud, F. Jacquemart, and L. Forni. 1989. Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:272-276.
- Barnes, P.J. 2011. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 163:29-43.
- Bellinger, D.L., D. Lorton, L. Horn, S. Brouxhon, S.Y. Felten, and D.L. Felten. 1997. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of rat spleen, thymus, and lymph nodes. *Peptides* 18:1139-1149.
- Bhardwaj, R.S., U. Henze, B. Klein, G. Zwadlo-Klarwasser, U. Klinge, C. Mittermayer, and B. Klosterhalfen. 1997. Monocyte-biomaterial interaction inducing phenotypic dynamics of monocytes: a possible role of monocyte subsets in biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 8:737-742.
- Biddie, S.C., B.L. Conway-Campbell, and S.L. Lightman. 2012. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford)* 51:403-412.
- Bielefeld, K.A., S. Amini-Nik, and B.A. Alman. 2013. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* 70:2059-2081.
- Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-606.

- Bitar, M.S., T. Farook, S. Wahid, and I.M. Francis. 1999. Glucocorticoid-dependent impairment of wound healing in experimental diabetes: amelioration by adrenalectomy and RU 486. *J Surg Res* 82:234-243.
- Bohm, M., M. Apel, K. Sugawara, R. Brehler, K. Jurk, T.A. Luger, H. Haas, R. Paus, B. Eiz-Vesper, A.F. Walls, E. Ponimaskin, M. Gehring, A. Kapp, and U. Raap. 2012. Modulation of basophil activity: a novel function of the neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Allergy Clin Immunol* 129:1085-1093.
- Bohm, M., T.A. Luger, D.J. Tobin, and J.C. Garcia-Borron. 2006a. Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol* 126:1966-1975.
- Bohm, M., D. Metze, U. Schulte, E. Becher, T.A. Luger, and T. Brzoska. 1999. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp Dermatol* 8:453-461.
- Bohm, M., M. Raghunath, C. Sunderkotter, M. Schiller, S. Stander, T. Brzoska, T. Cauvet, H.B. Schioth, T. Schwarz, and T.A. Luger. 2004. Collagen metabolism is a novel target of the neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Biol Chem* 279:6959-6966.
- Bohm, M., M. Schiller, and T.A. Luger. 2006b. Non-pigmentary actions of alpha-melanocyte-stimulating hormone--lessons from the cutaneous melanocortin system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52:61-68.
- Brod, S.A., and Z.M. Hood. 2008. Ingested (oral) alpha-MSH inhibits acute EAE. *J Neuroimmunol* 193:106-112.
- Brodell, L.A.a.R., K.S. 2008. Skin Structure and Function The Body's Primary Defense Against Infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 16:113-117.
- Brownstein, M.J., E.A. Mroz, J.S. Kizer, M. Palkovits, and S.E. Leeman. 1976. Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res* 116:299-305.
- Brzoska, T., T.A. Luger, C. Maaser, C. Abels, and M. Bohm. 2008. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev* 29:581-602.
- Buckley, G., J. Wong, A.D. Metcalfe, and M.W. Ferguson. 2012. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *J Anat* 220:3-12.
- Buggy, J.J. 1998. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 331 (Pt 1):211-216.

- Bultman, S.J., E.J. Michaud, and R.P. Woychik. 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71:1195-1204.
- Burnet, M. 1959. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. In Cambridge University Press, London.
- Carvalho, C.R., H.L. Lenzi, R. Correa-Oliveira, and N.M. Vaz. 2002. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. *Braz J Med Biol Res* 35:1195-1199.
- Carvalho, C.R., and N.M. Vaz. 1996. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol* 43:613-618.
- Carvalho, C.R., B.A. Verdolin, A.V. de Souza, and N.M. Vaz. 1994. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol* 39:533-538.
- Carvalho, C.R., B.A. Verdolin, and N.M. Vaz. 1997. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol* 45:276-281.
- Castro-Junior, A.B., B.C. Horta, A.C. Gomes-Santos, A.P. Cunha, R. Silva Steinberg, D.S. Nascimento, A.M. Faria, and N.M. Vaz. 2012. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cell Immunol* 280:171-181.
- Catania, A. 2007. The melanocortin system in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 81:383-392.
- Catania, A., and J.M. Lipton. 1993. Alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides in host responses. From basic evidence to human research. *Ann N Y Acad Sci* 680:412-423.
- Catania, A., N. Rajora, F. Capsoni, F. Minonzio, R.A. Star, and J.M. Lipton. 1996. The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* 17:675-679.
- Charmandari, E., C. Tsigos, and G. Chrousos. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67:259-284.
- Chen, W., M.A. Kelly, X. Opitz-Araya, R.E. Thomas, M.J. Low, and R.D. Cone. 1997. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91:789-798.
- Chiu, I.M., C.A. von Hehn, and C.J. Woolf. 2012. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci* 15:1063-1067.
- Christian, L.M., J.E. Graham, D.A. Padgett, R. Glaser, and J.K. Kiecolt-Glaser. 2006. Stress and wound healing. *Neuroimmunomodulation* 13:337-346.

- Coolen, N.A., K.C. Schouten, E. Middelkoop, and M.M. Ulrich. 2010. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch Dermatol Res* 302:47-55.
- Costa, R.A., V. Ruiz-de-Souza, G.M. Azevedo, Jr., E. Gava, G.T. Kitten, N.M. Vaz, and C.R. Carvalho. 2011. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound Repair Regen* 19:487-497.
- Costa, R.A., Matos, L.B.O., Cantaruti, T.A., Souza, K.S., Vaz, N.M., Carvalho, C.R. 2015. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. *Immunobiology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.002>
- Cunha A. P., O., R.P., castro-Junior, A. B., Vaz, N.M., CARvalho, C. R. . 2009. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. *Cell Immunol.* 258:152-160.
- Curry, J.L., W. Pinto, B.J. Nickoloff, and A.T. Slominski. 2001. Human keratinocytes express functional alpha-MSH (MC1-R) receptors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37:234-236.
- Cutz, E., W. Chan, N.S. Track, A. Goth, and S.I. Said. 1978. Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. *Nature* 275:661-662.
- Dakin, R.L. 1929. Remarks on a cutaneous affection, produced by certain poisonous vegetables. *American Journal of the Medical Sciences* 7:17-265.
- de Souza, K.S., T.A. Cantaruti, G.M. Azevedo, Jr., D.A. Galdino, C.M. Rodrigues, R.A. Costa, N.M. Vaz, and C.R. Carvalho. 2015. Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Exp Dermatol* 24:198-203.
- DeKruyff, R.H., Y. Fang, and D.T. Umetsu. 1998. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J Immunol* 160:2231-2237.
- Delgado, R., A. Carlin, L. Airaghi, M.T. Demitri, L. Meda, D. Galimberti, P. Baron, J.M. Lipton, and A. Catania. 1998. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* 63:740-745.
- Dinulescu, D.M., and R.D. Cone. 2000. Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem* 275:6695-6698.
- Dresden, M.H., and R.E. Moses. 1973. Denervation effects on newt limb regeneration: DNA polymerase activity in vitro. *Dev Biol* 34:346-350.
- Driskell, R.R., B.M. Lichtenberger, E. Hoste, K. Kretzschmar, B.D. Simons, M. Charalambous, S.R. Ferron, Y. Herault, G. Pavlovic, A.C. Ferguson-

- Smith, and F.M. Watt. 2013. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504:277-281.
- Duffy, M.J., J. Wong, and D. Powell. 1975. Stimulation of adenylate cyclase activity in different areas of human brain by substance P. *Neuropharmacology* 14:615-618.
- Egozi, E.I., A.M. Ferreira, A.L. Burns, R.L. Gamelli, and L.A. Dipietro. 2003. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen* 11:46-54.
- Eming, S.A., M. Hammerschmidt, T. Krieg, and A. Roers. 2009. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 20:517-527.
- Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127:514-525.
- Eming, S.A., P. Martin, and M. Tomic-Canic. 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 6:265sr266.
- Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev* 206:232-259.
- Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2006. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 13:143-157.
- Fishel, R.S., A. Barbul, W.E. Beschorner, H.L. Wasserkrug, and G. Efron. 1987. Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. *Ann Surg* 206:25-29.
- Fukai, T., A. Takeda, and E. Uchinuma. 2005. Wound healing in denervated rat skin. *Wound Repair Regen* 13:175-180.
- Gardner, M.L. 1988. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu Rev Nutr* 8:329-350.
- Gartner, L.P.H., J.L. . 2007. Tratado de Histologia em Cores. Elsevier, Rio de Janeiro. 576 pp.
- Germonpre, P.R., G.R. Bullock, B.N. Lambrecht, V. Van De Velde, W.H. Luyten, G.F. Joos, and R.A. Pauwels. 1999. Presence of substance P and neurokinin 1 receptors in human sputum macrophages and U-937 cells. *Eur Respir J* 14:776-782.
- Getting, S.J., H.C. Christian, C.W. Lam, F.N. Gavins, R.J. Flower, H.B. Schioth, and M. Perretti. 2003. Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. *J Immunol* 170:3323-3330.

- Gomariz, R.P., E. Garrido, J. Leceta, C. Martinez, R. Abalo, and M. Delgado. 1994a. Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1599-1604.
- Gomariz, R.P., J. Leceta, E. Garrido, T. Garrido, and M. Delgado. 1994b. Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes. *Regul Pept* 50:177-184.
- Gomariz, R.P., C. Martinez, C. Abad, J. Leceta, and M. Delgado. 2001. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 7:89-111.
- Grutzkau, A., B.M. Henz, L. Kirchhof, T. Luger, and M. Artuc. 2000. alpha-Melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278:14-19.
- Gurtner, G.C., S. Werner, Y. Barrandon, and M.T. Longaker. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314-321.
- Hanson, D.G. 1980. Ontogeny of orally-induced tolerance to soluble proteins in mice. Priming and tolerance in newborns. *J.Immunol* 127:1518-1524.
- Harvey, S., C. Aramburo, and E.J. Sanders. 2012. Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview. *Endocrine* 41:19-30.
- Hiltz, M.E., and J.M. Lipton. 1990. Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation and contact sensitivity. *Peptides* 11:979-982.
- Hofman, D., K. Moore, R. Cooper, M. Eagle, and S. Cooper. 2007. Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers. *J Wound Care* 16:227-230.
- Hopkinson-Woolley, J., D. Hughes, S. Gordon, and P. Martin. 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci* 107 (Pt 5):1159-1167.
- Iba, Y., A. Shibata, M. Kato, and T. Masukawa. 2004. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 4:1873-1880.
- Jameson, J., K. Ugarte, N. Chen, P. Yachi, E. Fuchs, R. Boismenu, and W.L. Havran. 2002. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296:747-749.
- Janeway Jr, C.A., P. Traves, et al., editor. 2007. *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença*. Artmed, Porto Alegre.
- Junqueira, L.C.C., J. 2004. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Kakurai, M., T. Demitsu, N. Umemoto, Y. Kobayashi, T. Inoue-Narita, N. Fujita, M. Ohtsuki, and Y. Furukawa. 2009. Vasoactive intestinal peptide and

inflammatory cytokines enhance vascular endothelial growth factor production from epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol* 161:1232-1238.

- Kalden, D.H., T. Scholzen, T. Brzoska, and T.A. Luger. 1999. Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression. *Ann N Y Acad Sci* 885:254-261.
- Kant, V., A. Gopal, D. Kumar, S. Bag, N.P. Kurade, A. Kumar, and S.K. Tandan. 2013. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. *Eur J Pharmacol* 715:345-353.
- Kaufman, J., B.A. Graf, E.C. Leung, S.J. Pollock, L. Koumas, S.Y. Reddy, T.M. Blieden, T.J. Smith, and R.P. Phipps. 2001. Fibroblasts as sentinel cells: role of the CDcd40-CDcd40 ligand system in fibroblast activation and lung inflammation and fibrosis. *Chest* 120:53S-55S.
- King, A., S. Balaji, and S.G. Keswani. 2013. Biology and function of fetal and pediatric skin. *Facial Plast Surg Clin North Am* 21:1-6.
- King, M.W., T. Nguyen, J. Calley, M.W. Harty, M.C. Muzinich, A.L. Mescher, C. Chalfant, M. N'Cho, K. McLeaster, J. McEntire, D. Stocum, R.C. Smith, and A.W. Neff. 2003. Identification of genes expressed during *Xenopus laevis* limb regeneration by using subtractive hybridization. *Dev Dyn* 226:398-409.
- Kokot, A., A. Sindrilaru, M. Schiller, C. Sunderkotter, C. Kerkhoff, B. Eckes, K. Scharffetter-Kochanek, T.A. Luger, and M. Bohm. 2009. alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma? *Arthritis Rheum* 60:592-603.
- Lai, J.P., S.D. Douglas, and W.Z. Ho. 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* 86:80-86.
- Leceta, J., M.C. Martinez, M. Delgado, E. Garrido, and R.P. Gomariz. 1994. Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat. *Peptides* 15:791-797.
- Lin, T.K., M.Q. Man, J.L. Santiago, T.C. Scharschmidt, M. Hupe, G. Martin-Ezquerria, J.K. Youm, Y. Zhai, C. Trullas, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2014. Paradoxical benefits of psychological stress in inflammatory dermatoses models are glucocorticoid mediated. *J Invest Dermatol* 134:2890-2897.
- Linnik, M.D., and M.A. Moskowitz. 1989. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides* 10:957-962.
- Lipton, J.M., and A. Catania. 1997. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 18:140-145.

- Lotti, T., G. Hautmann, and E. Panconesi. 1995. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol* 33:482-496.
- Lu, D., D. Willard, I.R. Patel, S. Kadwell, L. Overton, T. Kost, M. Luther, W. Chen, R.P. Woychik, W.O. Wilkison, and et al. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802.
- Luger, T.A. 2002. Neuromediators--a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci* 30:87-93.
- Luger, T.A., and T. Brzoska. 2007. alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3:iii52-55.
- Luger, T.A., and T. Lotti. 1998. Neuropeptides: role in inflammatory skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10:207-211.
- Luger, T.A., T. Scholzen, and S. Grabbe. 1997. The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2:87-93.
- Luger, T.A., T.E. Scholzen, T. Brzoska, and M. Bohm. 2003. New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 994:133-140.
- Lyson, K., and S.M. McCann. 1993. Alpha-melanocyte-stimulating hormone abolishes IL-1- and IL-6-induced corticotropin-releasing factor release from the hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 58:191-195.
- Maaser, C., K. Kannengiesser, and T. Kucharzik. 2006. Role of the melanocortin system in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1072:123-134.
- Macfarlane, G.T., and S. Macfarlane. 1997. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* 222:3-9.
- Madva, E.N., and R.D. Granstein. 2013. Nerve-derived transmitters including peptides influence cutaneous immunology. *Brain Behav Immun* 34:1-10.
- Manna, S.K., and B.B. Aggarwal. 1998. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol* 161:2873-2880.
- Martinez-Martinez, E., C.I. Galvan-Hernandez, B. Toscano-Marquez, and G. Gutierrez-Ospina. 2012. Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. *PLoS ONE* 7:e36421.
- Mayer, L., and L. Shao. 2004. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 4:407-419.

- McGrath, J.A., and J. Uitto. 2010. Anatomy and Organization of Human Skin. In Rook's Textbook of Dermatology. Wiley-Blackwell, 1-53.
- Miller, A., O. Lider, and H.L. Weiner. 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174:791-798.
- Moog, F. 1981. The lining of the small intestine. *Sci Am* 245:154-158, 160, 162 et passim.
- Moustafa, M., M. Szabo, G.E. Ghanem, R. Morandini, E.H. Kemp, S. MacNeil, and J.W. Haycock. 2002. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha stimulated NFkappaB/p65 in human keratinocytes by alpha-melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone peptides. *J Invest Dermatol* 119:1244-1253.
- Muffley, L.A., K.Q. Zhu, L.H. Engrav, N.S. Gibran, and A.M. Hocking. 2011. Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand alpha-melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair. *J Histochem Cytochem* 59:278-288.
- Nohr, D., and E. Weihe. 1991. The neuroimmune link in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of cat and rat: peptides and neural markers. *Brain Behav Immun* 5:84-101.
- O'Dorisio, M.S., T.M. O'Dorisio, S. Cataland, and S.P. Balcerzak. 1980. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 96:666-672.
- Ottaway, C.A., D.L. Lewis, and S.L. Asa. 1987. Vasoactive intestinal peptide-containing nerves in Peyer's patches. *Brain Behav Immun* 1:148-158.
- Oxlund, H., I. Fogdestam, and A. Viidik. 1979. The influence of cortisol on wound healing of the skin and distant connective tissue response. *Surg Gynecol Obstet* 148:876-880.
- Pagnano, L.d.O.B.-A., Silvana Martinez, PACHECO, Maria Rita; OLIVEIRA, Daniela. 2009. BASICS ASPECTS OF WOUND HEALING AND GENERAL FACTORS RELATED TO TISSUE REPAIR. *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*.
- Palma, B.D., P.A. Tiba, R.B. Machado, S. Tufik, and D. Suchecki. 2007. [Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor]. *Rev Bras Psiquiatr* 29 Suppl 1:S33-38.
- Park, J.E., and A. Barbul. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187:11S-16S.
- Raap, U., T. Brzoska, S. Sohl, G. Path, J. Emmel, U. Herz, A. Braun, T. Luger, and H. Renz. 2003. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol* 171:353-359.

- Rajora, N., G. Ceriani, A. Catania, R.A. Star, M.T. Murphy, and J.M. Lipton. 1996. alpha-MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 59:248-253.
- Ramos, G.C., S. Dalbo, D.P. Leite, E. Goldfeder, C.R. Carvalho, N.M. Vaz, and J. Assreuy. 2012. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. *Autoimmunity* 45:233-244.
- Ramos, G.C., C.M. Rodrigues, G.M. Azevedo, Jr., V. Pinho, C.R. Carvalho, and N.M. Vaz. 2009. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology* 126:354-362.
- Richman, L.K., Chiler, J. M., Brown, W. R., Hanson, D. G., Vaz, N. M. . 1978. Enterically-induced immunological tolerance- I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble protein antigens. *J. Immunol.*, 121:2429-2434.
- Rolfe, K.J., and A.O. Grobelaar. 2012. A review of fetal scarless healing. *ISRN Dermatol* 2012:698034.
- Roosterman, D., T. Goerge, S.W. Schneider, N.W. Bunnett, and M. Steinhoff. 2006. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev* 86:1309-1379.
- Rubin, E.G., F. 2006. Patologia: bases clinicopatológicas da medicina. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Said, S.I., and V. Mutt. 1969. A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 107:51-56.
- Sanchez, A.P. 2010. Immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol* 85:747-749.
- Satish, L., and S. Kathju. 2010. Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing. *Dermatol Res Pract* 2010:790234.
- Scholzen, T., C.A. Armstrong, N.W. Bunnett, T.A. Luger, J.E. Olerud, and J.C. Ansel. 1998. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7:81-96.
- Scholzen, T.E., D.H. Kalden, T. Brzoska, T. Fisbeck, M. Fastrich, M. Schiller, M. Bohm, T. Schwarz, C.A. Armstrong, J.C. Ansel, and T.A. Luger. 2000. Expression of proopiomelanocortin peptides in human dermal microvascular endothelial cells: evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1. *J Invest Dermatol* 115:1021-1028.
- Schreml, S., R.M. Szeimies, L. Prantl, M. Landthaler, and P. Babilas. 2010. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 63:866-881.

- Schultz, G.S., J.M. Davidson, R.S. Kirsner, P. Bornstein, and I.M. Herman. 2011. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen* 19:134-148.
- Sharp, L.L., J.M. Jameson, G. Cauvi, and W.L. Havran. 2005. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol* 6:73-79.
- Shizume, K., W. Mori, and A.B. Lerner. 1962. On the action of melanocyte stimulating hormone. *Gen Comp Endocrinol Suppl* 1:110-114.
- Slominski, A., N.V. Botchkareva, V.A. Botchkarev, A. Chakraborty, T. Luger, M. Uenalan, and R. Paus. 1998. Hair cycle-dependent production of ACTH in mouse skin. *Biochim Biophys Acta* 1448:147-152.
- Slominski, A., J. Wortsman, T. Luger, R. Paus, and S. Solomon. 2000. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 80:979-1020.
- Star, R.A., N. Rajora, J. Huang, R.C. Stock, A. Catania, and J.M. Lipton. 1995. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8016-8020.
- Takahashi, T., and M. Otsuka. 1975. Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res* 87:1-11.
- Thody, A.J., K. Ridley, R.J. Penny, R. Chalmers, C. Fisher, and S. Shuster. 1983. MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* 4:813-816.
- van Zuijlen PP, R.J., van Veen HA, van Marle J, van Trier AJ, Groeneveld F, Kreis RW, Middelkoop E. 2003. Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. 29:423-431.
- Vaz, N., A.M. Faria, B.A. Verdolin, and C.R. Carvalho. 1997. Immaturity, ageing and oral tolerance. *Scand J Immunol* 46:225-229.
- Vaz, N.M., and C.R. Carvalho. 2014. On the origin of immunopathology. *J Theor Biol.*
- Vaz, N.M., L.C. Maia, D.G. Hanson, and J.M. Lynch. 1981. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76:83-91.
- Verdolin, B.A., S.M. Ficker, A.M. Faria, N.M. Vaz, and C.R. Carvalho. 2001. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res* 34:211-219.

- Vukelic, S., O. Stojadinovic, I. Pastar, M. Rabach, A. Krzyzanowska, E. Lebrun, S.C. Davis, S. Resnik, H. Brem, and M. Tomic-Canic. 2011. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem* 286:10265-10275.
- Wang, Y., Y. Mei, S. Bao, and L. Xu. 2007. Vasoactive intestinal polypeptide enhances oral tolerance by regulating both cellular and humoral immune responses. *Clin Exp Immunol* 148:178-187.
- Watanabe, M., K. Nakayasu, M. Iwatsu, and A. Kanai. 2001. [Endogenous substance P in corneal epithelial cells and keratocytes]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 105:603-607.
- Weiner, H.L., A.P. da Cunha, F. Quintana, and H. Wu. 2011. Oral tolerance. *Immunol Rev* 241:241-259.
- Wells, H.G. 1911. Studies on the Chemistry of Anaphylaxis (III). Experiments with Isolated Proteins, Especially Those of the Hen's Egg. *The Journal of Infectious Diseases* 9:147-171.
- Willard, D.H., W. Bodnar, C. Harris, L. Kiefer, J.S. Nichols, S. Blanchard, C. Hoffman, M. Moyer, W. Burkhart, J. Weiel, and et al. 1995. Agouti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist. *Biochemistry* 34:12341-12346.
- Willenborg, S., and S.A. Eming. 2014. Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *J Dtsch Dermatol Ges* 12:214-221, 214-223.
- Wulff, B.C., A.E. Parent, M.A. Meleski, L.A. DiPietro, M.E. Schrementi, and T.A. Wilgus. 2012. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *J Invest Dermatol* 132:458-465.
- Yamaguchi, Y., A. Morita, A. Maeda, and V.J. Hearing. 2009. Regulation of skin pigmentation and thickness by Dickkopf 1 (DKK1). *J Invest Dermatol Symp Proc* 14:73-75.
- Yang, Y.K., M.M. Ollmann, B.D. Wilson, C. Dickinson, T. Yamada, G.S. Barsh, and I. Gantz. 1997. Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol Endocrinol* 11:274-280.

Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone

Kênia Soares de Souza¹, Thiago Anselmo Cantaruti¹, Geraldo Magela Azevedo Junior^{1,2}, Daniel Antero de Almeida Galdino¹, Claudiney Melquíades Rodrigues¹, Raquel Alves Costa^{1,3}, Nelson Monteiro Vaz⁴ and Cláudia Rocha Carvalho¹

¹Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ²Hospital Público Regional de Betim, Minas Gerais, Brasil; ³Universidade Federal de São João del Rey, Minas Gerais, Brasil; ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Correspondence: Cláudia Rocha Carvalho, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 31270-901, Brasil, Tel.: +55-31-34092797, Fax: +55-31-34092810, e-mail: crochac@icb.ufmg.br

Abstract: Skin wound healing is a complex process involving many types of cells and molecules and often results in scar tissue formation in adult mammals. However, scarless healing occurs in foetal skin and minimal scars may occur after cutaneous healing in the adult with reduced inflammation. Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) is widely distributed within the central nervous system and in other body regions, such as the skin, and has strong anti-inflammatory activity. The aim in the present experiments was to learn whether intraperitoneal (i.p) injection of α -MSH just before skin wounds antagonize inflammation and improves skin wound healing in adult mice. C57BL/6 young adult mice received an i.p. injection of 1 mg/kg of α -MSH and, 30 min later, two circular through-and-through holes (6.5 mm diameter) were made in their dorsal skin under anaesthesia. Control mice were wounded after vehicle injection. The wound healing process was analysed macroscopically and

microscopically at 3, 7, 40 and 60 days. Skin samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m, stained with H&E or toluidine blue for cell analysis or Gomori's trichrome for extracellular matrix (ECM) analysis. Other samples were fixed in DMSO+methanol, embedded in paraplast and incubated with anti-CD45, antismooth muscle actin, anticollagen-I and anticollagen-III for immunofluorescence analysis. Alpha-MSH significantly reduced the number of leucocytes, mast cells and fibroblasts at 3 and 7 days after injury. On days 40 and 60, α -MSH reduced scar area and improved the organization of the collagen fibres indicating that it may direct the healing into a more-regenerative/less-scarring pathway.

Key words: alpha-melanocyte-stimulating hormone and scarless healing – inflammation – scars – wound healing

Accepted for publication 23 November 2014

Introduction

Skin wound healing in adult mammals results in the formation of scars that may be visible with different degrees, from a smooth and barely detectable line to hypertrophic or keloid scars (1). The mature scar tissue develops some weeks after the wound when most of the cells found on the wound bed undergo apoptosis, and the region is now made mainly by extracellular matrix (ECM) proteins (2). Actually, the reorganization of this matrix involves the degradation and replacement of the immature ECM, rich in fibronectin and type III collagen, by type I collagen with fibres organized in bands (3,4). However, scarless skin wound healing is a normal outcome after skin lesion during the early foetal development in mammals. At this stage of skin development, skin wound healing may totally reconstruct the original tissue architecture in a process called regeneration (5–7).

One of the hypotheses suggested to explain why the process of repair changes during ontogeny involves the activation of the immune system, as adult athymic mice or mouse foetuses with an immature immune system are able to repair skin wounds without scars (8,9). In fact, the repair of foetal wounds follows a different kinetics of inflammatory cell infiltration wherein macrophages and mast cells are reduced in numbers and differentially activated (10,11). Concerning the fibres of collagen, lesions in foetal skin

display a larger proportion of collagen III/I than those in adult skin. Interestingly, the difference is not restricted to this proportion but also in the organization of the fibres. In foetal wounds, collagen is deposited in a basket-weave pattern undistinguishable from the pattern observed in neighbouring normal tissues, whereas in adult wounds, the fibres are aligned in linear parallel bands (12–14).

In addition to the immune system, the sensory nervous system plays a role in mediating inflammation and healing and the interaction between these two systems can be mediated by cytokines and neuropeptides. In the skin, neuropeptides are synthesized and released predominantly by small unmyelinated afferent neurons, known as C-fibres, and in smaller amounts by myelinated A-delta fibres. In addition, neuropeptide may be produced by skin resident cells, such as keratinocytes, endothelial cells and fibroblasts, as well as by cells of the immune system that infiltrate the skin under inflammatory conditions (15,16).

Skin diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, include a neurogenic component (15,17,18). Moreover, neuropeptides are implicated in inflammatory, angiogenic and fibroproliferative processes occurring during skin lesions (15).

Among several neuropeptides, alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), a natural melanocortin, is outstanding by

displaying a strong anti-inflammatory and immunomodulatory activity suggesting a general role for α -MSH in the regulation of inflammatory immune responses (17,19–22). Alpha-MSH is a tri-decapeptide originating from the post-translational processing of pro-opiomelanocortin (POMC) by the proteolytic action of a family of prohormone convertases (23). Although originally described in the pituitary gland, α -MSH is made by skin cells such as keratinocytes, Langerhan's cells, melanocytes, cells from hair follicles, endothelial cells from the dermal microvasculature and also monocytes and lymphocytes (24–26).

The actions of α -MSH are triggered by its binding to melanocortin receptors (MC-R) that include five subtypes MC-1R to MC-5R (27,28). MC-1R is expressed in cells of different tissues, among which skin cells, such as melanocytes, keratinocytes, fibroblasts, basophils, endothelial cells and cells of pilosebaceous unities. In addition, MC-1R is also expressed in macrophages, lymphocytes, neutrophils, mast cells and dendritic cells (29,30). Initially, it was believed that the main function of MC-1R was related to skin physiology and melanogenesis, but its expression in cells of the immune system, associated with a significant reduction in the activation and translocation of NF- κ B shows that it is actively involved in inflammation (31,32). Among the melanocortins, α -MSH is the one displaying higher affinity for MC-1R, and therefore, it has been suggested that its anti-inflammatory effects are mediated by binding and activation of MC-1R (33,34).

Studies performed on mice have shown that intracerebroventricular or intraperitoneal administration of α -MSH 1–13 or its COOH-terminal tripeptide α -MSH 11–13 inhibits the cutaneous inflammation induced by application of topical irritants and intradermal injection of cytokines (17,35,36). During murine wound repair, MC-1R and α -MSH were detected in inflammatory cells and keratinocytes at the leading edge of the migrating epithelial tongue in the wound area (26). However, the role of α -MSH in the inflammatory, fibroproliferative and remodelling phases of cutaneous wound healing has not been previously addressed.

As the absence or reduction of inflammation during the process of skin wound healing is correlated with scarless or better healing, we studied the effects of intraperitoneal injection of α -MSH before excisional skin lesions. Herein we show that it is able to inhibit leucocyte infiltration into the wound and to improve the healing in adult mice.

Materials and methods

Animals

Eight- to 10-week-old male C57BL/6 mice were provided by Institute of Biological Sciences, Universidade Federal Minas Gerais (UFMG), Brazil and treated according to the guidelines of the Ethics Committee of Animal Experimentation of UFMG (Protocol number 7/2009). The groups contained six mice per time point.

Administration of α -MSH

Experimental groups were intraperitoneally (i.p.) injected with 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg or 2.5 mg/kg of α -MSH (CALBIOCHEM, San Diego, CA, USA) diluted in saline, 30 min before skin excisional wound.

Wounding

Mice were anesthetized with ketamine (97 mg/kg) and xylazine (16.5 mg/kg) and their dorsal thoracic skin was shaved and cleaned with 70% ethanol before wound. Two circular through-and-through (6.5 mm diameter) full-thickness excisional wounds

were made by picking up a fold of skin and using a biopsy punch, resulting in one wound on each side of the midline. The wounds were left unsutured and without dressing. All the animals were housed individually to prevent traumatic damage to the wounds by other mice.

Macroscopic analysis

Wounds or the healed area were photographed with an in-picture ruler for scale using a digital camera (Sony DSC-F717, Tokyo, Japan) at 3, 40 and 60 days postwounding. The images were imported into image analysis software (Image Tool 3.0 <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>), and outlines were manually traced for calculation of wound area and scar area.

Histology

Mice were sacrificed by lethal doses of anaesthetics at 3, 7, 40 and 60 days, shaved when necessary, and the skin around the two lesions was dissected. One of the lesions was fixed in Carson's modified Milloning's phosphate-buffered formalin for 24 h, perpendicularly sectioned in its half and the separate pieces were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin for histological studies following standard protocols. Serial 5 μ m transverse sections from the middle of the wound were stained with haematoxylin and eosin (H&E), toluidine blue or Gomori's trichrome. Each group contained six mice per time point, and we analysed one section per wound, per mouse, per time point resulting in six sections per time point. The experiments for analyses 3 days after wound were performed three times, and in this case, the data shown are from one representative experiment. Digital images of tissues were obtained using a BX50 Olympus microscope and an Olympus Q Colour 3 Camera (Olympus, Tokyo, Japan), which was connected to a computer running the Q-Capture Pro software program (Q Imaging, Surrey, BC, Canada).

Morphometry

Histological sections were examined under a light microscope using an intersection grid placed at the ocular lens, at high magnification (1000 \times). Fibroblasts and leucocytes were identified by their characteristic morphology in H&E-stained sections: the nuclei of fibroblasts are elongated and can be quite condensed. Most of the leucocytes are rounded cells with variable nuclei forms. Mast cells were identified after toluidine blue staining that metachromatically stains these cells purple. Leucocytes, fibroblasts and mast cells were counted in 10 fields of 100 μ m², within the wound healing area of one section per mouse, and the results from six sections per group were expressed as the mean \pm SEM. For the dose-response experiment, we analysed four sections per group.

Immunostaining and confocal microscopy

Immunofluorescence-labelling and quantitative confocal microscopy were used to investigate the distribution and quantity of leucocytes (CD45+), myofibroblasts (α -smooth muscle actin, α -SMA), collagen type I and collagen type III. One of the lesions were immediately fixed and cryosubstituted in a -80°C solution containing 80% methanol and 20% dimethyl sulfoxide for 6 days, transferred to -20°C for 1 day and then brought to room temperature. Samples were rinsed 3 \times in absolute ethanol, 2 \times in xylene and embedded in paraplast. Five μ m transverse sections from the middle of the wound were mounted on slides, deparaffinized, rehydrated and incubated in blocking solution (1% BSA and 0.1% Tween 20 in PBS) at room temperature for 1 h. Sections were

incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: APC rat anti-CD45 (BD Biosciences, bdbiosciences.com), mouse anti- α -SMA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), rabbit anticollagen type I and rabbit anticollagen type III (Rockland, Gilbertsville, PA, USA). After 4–5 rinses in PBS, sections were incubated for 1 h at room temperature in the dark with Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG_{2a} (γ 2a) or Alexa Fluor[®] 488 anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) secondary antibody. After several rinses in PBS, sections were mounted in a mixture of 10% 1.0 M Tris-HCl, pH 9.0 and 90% glycerol and viewed using a laser scanning confocal microscope (Zeiss 510META; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Optimal confocal settings (aperture, gain and laser power) for each antibody used were determined at the beginning of each imaging session and then held constant during the analysis of all the samples. Nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). The distribution patterns and levels of expression of collagens types I and III, and α -SMA were analysed on digitalized photomicrographs with Image Tool 3.0 software (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Images were captured at 12 bit and analysed in the grey scale range of 0–255. Fluorescence intensity was recorded as the sum of grey values of all pixels divided by the area (in μm^2) $\times 10^3$. Background fluorescence was measured in each sample and subtracted from the values obtained for the fluorescence intensity. We captured 3–5 images per section in different areas of wound bed or scar tissue.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and the statistical significance of differences between groups was determined using one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. The results were expressed as the mean \pm SEM.

Results

Dose-response experiment

In the first experiment, three doses of alpha-MSH were tested for their effects in cutaneous wound healing: 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg and 2.5 mg/kg. The peptide was injected intraperitoneally (i.p.) 30 min before excisional skin wound, and 3 days after wounding, the lesions were harvested and processed for routine histology and H&E staining. We analysed four sections per group and in addition to qualitative analyses of inflammatory signals we counted leucocytes on the wound bed as described in M&M. The data for each group (mean \pm SEM) were as follows: vehicle (2.963 ± 0.2535); alpha-MSH 0.5 mg/kg (3.388 ± 0.3985); alpha-MSH 1.0 mg/kg (2.090 ± 0.1399); alpha-MSH 2.5 mg/kg (3.100 ± 0.1670). Only the dose of 1.0 mg/kg significantly inhibited leucocyte counts and this was the dose used in subsequent experiments.

Scarless cutaneous wound healing in adult mice after intraperitoneal injection of α -MSH

Experimental mice received an i.p. injection of 1.0 mg/kg of α -MSH 30 min before wound in their dorsal skin. Control mice were wounded after i.p. vehicle injection. There was a striking difference between the healing of full-thickness skin wounds between the control and the experimental group (Fig. 1). At 3 days, the lesions in α -MSH mice were well demarcated with regular and smooth borders continuous with the rest of the lesion. At 40 and

60 days, the wound sites from mice treated with α -MSH are difficult to discern and significantly smaller than the obvious scars at the sites of the control wounds (Fig. 1).

Impaired inflammatory cells infiltration and reduced fibroblasts in the healing wounds after intraperitoneal injection of α -MSH

Histological analysis of the lesions performed at 3 and 7 days showed that injection of α -MSH resulted in qualitative differences

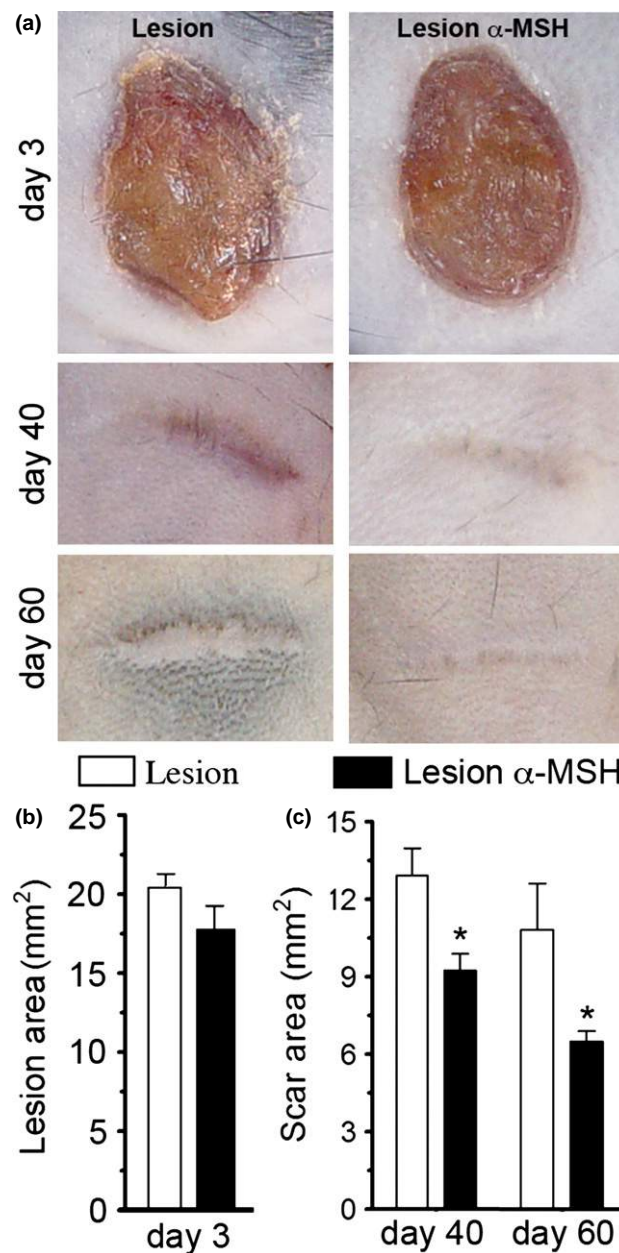


Figure 1. Injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) improves cutaneous wound healing. (a) Representative pictures of dorsal skin from mice of control group (left column) and α -MSH group (right column), at 3, 40 and 60 days after lesion; At 3 days, the scab is prominent in control lesion group and at 40 and 60 days the scars are well noted at the sites of the control lesions while at the sites of lesions in mice treated with alpha-MSH the scars are difficult to discern. Wound healing area (b) at 3 days and scar area (c) at 40 and 60 days. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$; $N = 6$ mice.

such as decreased inflammation with less inflammatory exudate, vascular congestion and inflammatory cells (Fig. 2). At 3 days, the fibrin clot occupies the wound healing area and at 7 days, re-epithelialization is complete in both groups. At 7 days, thickened epithelium can be seen above the granulation tissue area. Morphometric analysis of sections stained with H&E or toluidine blue showed a significant reduction of leucocytes, fibroblasts and mast cells in α -MSH group (Fig. 2g–i). Immunostaining with anti-CD45 confirmed the reduction of leucocytes at the healing area in mice injected with α -MSH (Fig. 2m–o). Expression of α -SMA, a phenotypic marker of myofibroblasts, was examined in the healing wounds, and there was marked expression of this marker in the cell-rich granulation tissue with no difference between groups at 7 days (Fig. 2j–l).

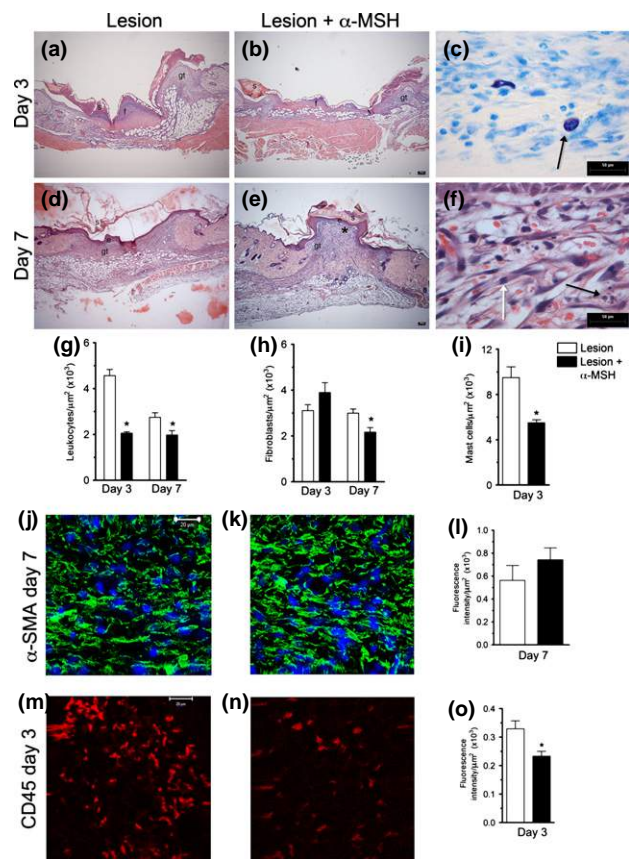


Figure 2. Analyses at the initial phases of cutaneous wound healing. Sections of wounds harvested on days 3 and 7 postwounding were stained with H&E (a, b, d, e, f) or toluidine blue (c) or immunostained with anti- α -SMA (j, k) or with anti-CD45 (m, n). Fluorescence intensity was determined in sections immunostained with anti- α -SMA (myofibroblasts, l) and anti-CD45 (leucocytes, o). Wounds from melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) treated mice have significantly lower leucocytes (g, o) and mast cells (i). At day 7, postwounding re-epithelialization has occurred in both groups (d, e) and small number of fibroblasts was present in wounds from alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) treated mice (h). Small letters on photomicrographs represent: f, fibrin clot; s, scab; e, epithelium; gt, granulation tissue. Original magnification of photomicrographs 100 \times (a, b, d, e) or 1000 \times (c, f); scale bars: 100 μ m (a, b, d, e), 50 μ m (c, f) or 20 μ m (j, k, m, n). The asterisk in (e) represents the area where the region is shown in higher magnification in (f) to illustrate leucocytes (black arrow) and fibroblasts (white arrow). In (c), mast cell was pointed. Data represent mean \pm SEM. * P 0.05; N = 6 mice.

Improved collagen deposition in the healed area after intraperitoneal injection of α -MSH

Histological analysis of tissue sections stained with Gomori's trichrome at 40 and 60 days after lesion showed that injection of α -MSH produced significant qualitative differences in the organization of extracellular matrix (Fig. 3). Note the basket-weave pattern of collagen in the dermis of normal, unwounded skin (Fig. 3b). By contrast, the collagen fibres in the neodermis of the control wound (Fig. 3e,g) are compactly arranged in an abnormal pattern with distinct scarring. The collagen fibres in the neodermis of wounds treated with α -MSH (Fig. 3f,h) are arranged in a reticular pattern closely resembling that from normal dermis with a marked reduction in scarring. Immunofluorescence staining using antibodies for collagen I and collagen III corroborates the histological findings and shows a higher expression of collagen III in α -MSH group at 40 days (Fig. 4). No hair growth and no regeneration of skin

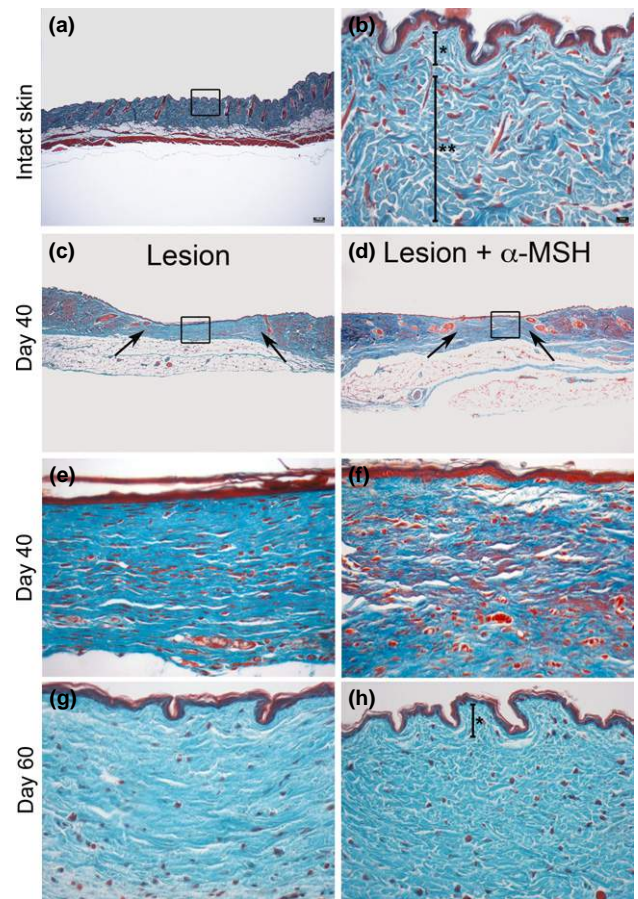


Figure 3. Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) improves extracellular matrix remodelling. Representative photomicrographs of normal intact skin (a, b), skin from control mice with scar tissue (c, e, g) and skin from alpha-MSH treated mice with scarless tissue (d, f, h) at day 40 (c–f) and day 60 (g, h) after wounding. The boxes in low magnification (100 \times) photomicrographs (a, c, d) represent the area where the region is shown in higher magnification (1000 \times) in (b, e, f) to better illustrate the pattern of tissue organization. At day 60 after lesion, the neodermis in alpha-MSH injected mice (h) closely resembles that of the normal dermis with the collagen fibres arranged in a basket-weave pattern (b). Gomori's trichrome-stained sections. Scale bars: 100 μ m in low magnification picture (a) and 10 μ m in high magnification picture (b). One asterisk (papillary dermis, b, h) and two asterisks (reticular dermis, b).

appendages were observed although reorganization of papillary dermis seems to be prominent in the α -MSH group at 60 days (Fig. 3h).

Discussion

Wound healing is a complex process involving cell death, cell proliferation, differentiation, migration and the synthesis and remodelling of the extracellular matrix (ECM) resulting in restoration of tissue integrity. This process occurs in a coordinate and overlapping sequence of events that may be separated into three stages: haemostasis/inflammation, proliferation and remodelling (5,6,37). It involves a large number of growth factors, cytokines and other substances such as neuropeptides (11). We reported here the first evidence that injection of α -MSH improves cutaneous wound healing. Intraperitoneal injection of 1 mg/kg of α -MSH prior to cutaneous excisional wounds resulted in a marked improvement

in the architecture of the neodermis and a reduction in scarring. This was preceded by significantly reduced leucocyte infiltration into healing wounds and also reduction in other inflammatory signals such as inflammatory exudate, vascular congestion and oedema.

It has been previously shown that i.p. injection of α -MSH into mice blocked acute inflammation in the footpaw and contact sensitivity in a dose-related manner (17). In our hands, the i.p. injection of 0.5 mg/kg or 2.5 mg/kg of α -MSH into C57BL/6 mice did not block wound triggered inflammation indicating that α -MSH has an inverted U-shaped curves for its anti-inflammatory effect as reported in studies using different models of inflammation (38,39).

The present study does not define the molecular mechanism through which systemic administration of α -MSH exerts the effects on cutaneous wound healing and several of the various pathways implicated in the regulation of inflammation and fibroblast activation may be involved. Alpha-MSH affects nuclear factor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation and cytokines production/action, expression of adhesion molecules and inflammatory cell migration, T-cell proliferation and activity, expression of antioxidative enzymes, prostaglandin and histamin (21,40–43).

It is important to note that in our experiments α -MSH was administered i.p. only once soon before skin wounding and that the effects of α -MSH on the early phases of wound healing resulted in altered remodelling of dermis. Thus, the scarless response in α -MSH group is probably initiated soon after its injection, affects the haemostasis/inflammation phase of wound healing converging in combined alterations in leucocyte and fibroblast migration/action. It is interesting that in α -MSH group the number of fibroblasts in the healing area was significantly reduced at day 7 while the immunofluorescence intensity to α -SMA that is expressed by myofibroblasts was not different from control lesion group. We think that this can be attributed to altered pattern of fibroblast activation triggered by α -MSH peptide explaining the subsequent alteration in ECM deposition and organization in neodermis. It would be interesting to look whether α -MSH treatment activates different fibroblast lineages in dermal reconstitution (44).

Some reports in the literature suggest an antifibrogenic role for α -MSH. In a neonatal mouse model in which dermal fibrosis was induced by repetitive intracutaneous injections with $\text{TGF-}\beta\text{1}$, collagen deposition was significantly suppressed by co-injection of α -MSH (45). In addition, in the bleomycin mouse model for scleroderma, α -MSH reduced skin fibrosis and collagen content (42). In our work, the intensity of collagen I in the scars of α -MSH group was not different from control lesion group at day 40, while collagen III was increased. In our model, α -MSH changed the pattern of collagen I organization turning it more similar to that found in intact skin.

The scarless response in foetal wound healing has been correlated with an extracellular matrix rich in type III collagen and hyaluronan (46) which is in accordance with our results that shows higher level of collagen III after α -MSH injection and no alteration in the levels of collagen I. Collagen III is supposed to attenuate biomechanical stress which can indicate that fibroblast in the lesions from α -MSH group is submitted to different stress signals and modifies further the ECM since during maturation and remodelling phases collagen is remodelled and realigned along tension lines.

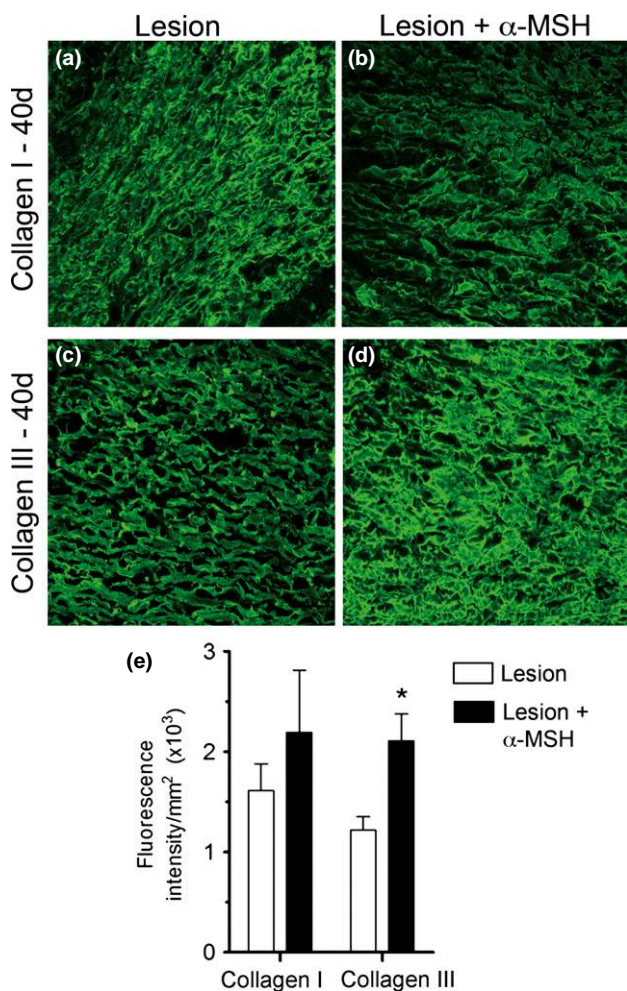


Figure 4. Effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) on collagen deposition in healed wounds. Sections of wounds harvested 40 days postwounding and immunostained with anticollagen I (upper panels) and anticollagen III (lower panels) were photographed under identical settings using a confocal microscope. Wounds treated with α -MSH show an increase in the intensity of staining for collagen III (d, e) compared to that in the control wound (c, e). The intensity of staining for collagen I is not significantly different between groups (a, b, e). Confocal microscope images were captured with a 63 \times objective, and the graphs represent the green fluorescence intensity (the sum of grey values of all pixels divided by the area in μm^2) $\times 10^3$ in control wounds (open bars) and α -MSH wounds (black bars). Data represent mean \pm SEM. * P 0.05; N = 6 mice.

Another important observation in our work is that the reorganization of papillary dermis seems to be prominent in the α -MSH group at 60 days. However, further studies are necessary to substantiate this observation and to explore its significance for hair follicle regeneration and enhancement of neoderms/epidermis interaction.

The present study covers an important gap in the literature regarding the systemic effects of α -MSH on cutaneous wound healing and opens a new possibility for therapeutic intervention to deal with undesirable scar formation. Efforts to uncover the molecular effects of α -MSH on cutaneous wound healing and its interaction with other paracrine factors, such as IL-10 and TGF β 3, that also prevents excessive scarring should be emphasized.

Acknowledgements

Research grants provided by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Cláudia R Carvalho received fellowship from CNPq. Confocal microscopy images were taken at Centro de Aquisição e Processamento de Imagens-UFGM with the kindly assistance of Prof. Gregory Kitten. APC rat anti-mouse-CD45 was gently provided by Dra. Jaqueline Germano de Oliveira from FIOCRUZ.

Author contribution

K.S.S. performed the research, analysed the data and wrote the paper. T.A.C. and G.M.A. performed histopathological analysis. D.A.A.G. and C.M.R. helped in wounding experiments. R.A.C. co-supervised the study and analysed immunohistochemistry data. N.M.V. contributed to writing the paper and is senior author. C.R.C. designed and supervised the research and wrote the paper.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

- 1 Bayat A, McGrouther D A, Ferguson M W. *BMJ* 2003; **326**: 88–92.
- 2 Desmouliere A, Redard M, Darby I *et al.* *Am J Pathol* 1995; **146**: 56–66.
- 3 Longaker M T, Whitby D J, Adzick N S *et al.* *J Pediatr Surg* 1990; **25**: 63–68; discussion 68–69.
- 4 Longaker M T, Whitby D J, Ferguson M W *et al.* *J Pediatr Surg* 1989; **24**: 799–805.
- 5 Bielefeld K A, Amini-Nik S, Alman B A. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**: 2059–2081.
- 6 Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y *et al.* *Nature* 2008; **453**: 314–321.
- 7 Ud-Din S, Volk S W, Bayat A. *Exp Dermatol* 2014; **23**: 615–619.
- 8 Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim J S *et al.* *Wound Repair Regen* 2006; **14**: 265–276.
- 9 Mescher A L, Neff A W. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; **93**: 39–66.
- 10 Cowin A J, Brosnan M P, Holmes T M *et al.* *Dev Dyn* 1998; **212**: 385–393.
- 11 Rolfe K J, Grobbelaar A O. *ISRN Dermatol* 2012; **2012**: 698034.
- 12 Namazi M R, Fallahzadeh M K, Schwartz R A. *Int J Dermatol* 2011; **50**: 85–93.
- 13 van Zuijlen P P, Ruurda J J, van Veen H A *et al.* *Burns* 2003; **29**: 423–431.
- 14 Whitby D J, Ferguson M W. *Development* 1991; **112**: 651–668.
- 15 Luger T A. *J Dermatol Sci* 2002; **30**: 87–93.
- 16 Scholzen T, Armstrong C A, Bunnett N W *et al.* *Exp Dermatol* 1998; **7**: 81–96.
- 17 Hiltz M E, Lipton J M. *Peptides* 1990; **11**: 979–982.
- 18 Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M *et al.* *Nature* 2014; **510**: 157–161.
- 19 Brod S A, Hood Z M. *J Neuroimmunol* 2008; **193**: 106–112.
- 20 Jahovic N, Arbak S, Tekeli O *et al.* *Peptides* 2004; **25**: 129–132.
- 21 Luger T A, Brzoska T, Scholzen T *et al.* *Ann N Y Acad Sci* 2000; **917**: 232–238.
- 22 Raap U, Brzoska T, Sohl S *et al.* *J Immunol* 2003; **171**: 353–359.
- 23 Benjannet S, Rondeau N, Day R *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 3564–3568.
- 24 Catania A, Lipton J M. *Endocr Rev* 1993; **14**: 564–576.
- 25 Luger T A, Scholzen T, Grabbe S. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; **2**: 87–93.
- 26 Muffley L A, Zhu K Q, Engrav L H *et al.* *J Histochem Cytochem* 2011; **59**: 278–288.
- 27 Catania A. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 383–392.
- 28 Getting S J. *Pharmacol Ther* 2006; **111**: 1–15.
- 29 Becher E, Mahnke K, Brzoska T *et al.* *Ann N Y Acad Sci* 1999; **885**: 188–195.
- 30 Bohm M, Luger T A, Tobin D J *et al.* *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 1966–1975.
- 31 Getting S J, Christian H C, Lam C W *et al.* *J Immunol* 2003; **170**: 3323–3330.
- 32 Luger T A, Brzoska T. *Ann Rheum Dis* 2007; **66** (Suppl 3): iii52–iii55.
- 33 Lipton J M, Catania A. *Immunol Today* 1997; **18**: 140–145.
- 34 Patel H B, Montero-Melendez T, Greco K V *et al.* *Front Immunol* 2011; **2**: 41.
- 35 Ceriani G, Macaluso A, Catania A *et al.* *Neuroendocrinology* 1994; **59**: 138–143.
- 36 Macaluso A, McCoy D, Ceriani G *et al.* *J Neurosci* 1994; **14**: 2377–2382.
- 37 Schreml S, Szeimies R M, Prantl L *et al.* *J Am Acad Dermatol* 2010; **63**: 866–881.
- 38 Delgado R, Carlin A, Airaghi L *et al.* *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 740–745.
- 39 Lyson K, McCann S M. *Neuroendocrinology* 1993; **58**: 191–195.
- 40 Kalden D H, Scholzen T, Brzoska T *et al.* *Ann N Y Acad Sci* 1999; **885**: 254–261.
- 41 Nicolaou A, Estdale S E, Tsatmali M *et al.* *FEBS Lett* 2004; **570**: 223–226.
- 42 Kokot A, Sindrilaru A, Schiller M *et al.* *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 592–603.
- 43 Brzoska T, Luger T A, Maaser C *et al.* *Endocr Rev* 2008; **29**: 581–602.
- 44 Driskell R R, Lichtenberger B M, Hoste E *et al.* *Nature* 2013; **504**: 277–281.
- 45 Bohm M, Raghunath M, Sunderkotter C *et al.* *J Biol Chem* 2004; **279**: 6959–6966.
- 46 Leung A, Crombleholme T M, Keswani S G. *Curr Opin Pediatr* 2012; **24**: 371–378.