

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

Liana Biajoli Otoni de Matos

Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram o processo de reparo
de lesões excisionais na pele de camundongos

Belo Horizonte
2011

Liana Biajoli Otoni de Matos

Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram o processo de reparo
de lesões excisionais na pele de camundongos

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

Orientadora: Cláudia Rocha Carvalho

Colaboradores: Geraldo Magela de Azevedo Júnior
Nelson Monteiro Vaz
Raquel Alves Costa

Belo Horizonte
2011

Dedico este trabalho à minha família, em especial minha filha, Ana Luísa, por entender os momentos de ausência e, ao meu marido, João César, pelos momentos de compreensão e incentivo. À Dr^a. Raquel Alves Costa por todo ensinamento, paciência, amizade e calma. E à Prof.^a Cláudia Rocha Carvalho pelos ensinamentos e confiança.

Agradecimentos

- Ao professor Nelson Monteiro Vaz pelas discussões que me fizeram compreender imunologia e percebê-la de maneira diferente daquela antes vista.
- Ao doutorando Geraldo Magela de Azevedo Júnior por toda ajuda nas análises histológicas.
- Ao professor Gregory Thomas Kitten pelo seu empenho e dedicação na organização do uso e manutenção do microscópio confocal utilizado neste trabalho.
- À professora Lucíola da Silva Barcelos por nos ensinar o modelo de ferida excisional.

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

Agradecimentos Especiais

- À Prof^a. Claudia Rocha Carvalho por ter confiado a mim este trabalho, ter me aceitado no laboratório mesmo não me conhecendo e, principalmente, pela paciência.
- À Dr^a. Raquel Alves Costa por ter me iniciado no mundo da morfologia, histologia e imunologia. Pelas discussões de trabalhos, por todos os ensinamentos que vão de como cuidar de animais a como analisar os materiais coletados, pelas conversar amigas e pela compreensão sempre.
- Aos amigos do grupo: Geraldo, Thiago, Mariana e Kênia pela constante ajuda.
- Aos demais amigos do laboratório e da Pós-graduação pelos momentos de alegria, amizade e companheirismo.
- Aos Professores da Pós-graduação pelas aulas e ensinamentos tão importantes ao aprendizado e compreensão de muitos resultados obtidos.
- Ao João Cesár, marido, companheiro e amigo. Por ter me incentivado a fazer o mestrado e ter sempre se mostrado interessado a ouvir e argumentar.
- À minha filha, Ana Luísa, razão da minha vida. Por entender os momentos de ausência e retribuí-los com mais carinho.
- À minha família: minha mãe (Dulcinea), meu pai (Paulo César), minha irmã (Larissa), Dinda Lizete e Tia Téia pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Regeneração e cicatrização.....	14
1.2 A inflamação e sua influência no processo de reparo tecidual.....	16
1.3 Tolerância oral.....	20
1.4 Relação tolerância oral e inflamação.....	21
2 - OBJETIVO.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais	25
3.2 Antígeno.....	25
3.3 Adjuvante.....	25
3.4 Tratamento oral com clara de ovo.....	25
3.5 Imunização parental.....	26
3.6 Modelo experimental para estudo da lesão excisional no dorso.....	26
3.7 Avaliação da cinética de fechamento da ferida excisional no dorso do camundongo.....	26
3.8 Coleta do material e processamento histológico da lesão excisional.....	27
3.9 Processamento para Histoquímica da lesão excisional.....	27
3.10 Análise Morfológica do tecido da lesão excisional.....	28
3.11 Processamento para análise de imunofluorescência da lesão excisional.....	29
3.12 Análise de linfócitos T, neutrófilos, colágeno I, colágeno III, tenascina C e miofibroblasto na lesão excisional	29
3.13 Análise quantitativa de linfócitos T, neutrófilos, colágeno I e III miofibroblastos e tenascina C na área da lesão excisional.....	31
3.14 Análise estatística dos resultados.....	31
4 - RESULTADOS.....	32
4.1 Análise do efeito indireto da tolerância oral na cinética de fechamento de lesões na pele do dorso de camundongos.....	32

4.2 Efeitos da administração parenteral de uma proteína tolerada sobre o processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos.....	35
4.3 Análise quantitativa do infiltrado inflamatório na área da lesão após imunização com proteína tolerada.....	39
4.4 Análise da matriz depositada na área da lesão durante o processo de reparo das feridas excisionais após imunização com proteína tolerada.....	50
5 - DISCUSSÃO.....	60
6 - CONCLUSÕES.....	67
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

Lista de Abreviaturas

OVA – Ovalbumina

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

i.p. – Via intraperitoneal

DMSO – Dimetilsulfóxido

HE – Coloração de Hematoxilina e Eosina

PBS – *Phosphate Buffered Saline* – Salina Tamponada com Fosfato

BSA – Albumina de Soro fetal

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

Fig. - Figura

d – dia (s)

SMA – smooth muscle actin

DIC - differential interference contrast

DAPI – 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (marcador de DNA)

CD - Cluster of Differentiation

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

TGF- β - Fator de Transformação β

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias – granulócito macrófago

OPN – osteopontin

IL – interleucina

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

VEGF - Fator Endotelial de Crescimento Vascular

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

MMP – metaloproteinase

NKT – linfócito NKT

PMN – Polimorfonucleares

Lista de Figuras

Fig. 1 – Modelo excisional de lesão na pele do dorso	26
Fig. 2 - Coleta para processamento do material histológico	27
Fig. 3 - Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57Bl/6.....	33
Fig 4 – Cinética de fechamento da área da lesão no dorso de camundongos C57Bl/6.....	36
Fig. 5 - Análise histológica do processo de reparo 1 dia após lesão excisional na pele do dorso de camundongos.....	35
Fig. 6 - Análise histológica do processo de reparo 3 dia após lesão excisional na pele do dorso de camundongos.....	36
Fig. 7 - Análise histológica do processo de reparo 5 dia após lesão excisional na pele do dorso de camundongos.....	37
Fig. 8 - Análise histológica do processo de reparo 7 dia após lesão excisional na pele do dorso de camundongos.....	38
Fig. 9 – Número de células inflamatórias e fibroblastos por micrômetro quadrado presentes na área da lesão.....	40
Fig. 10 – Número de mastócitos por micrômetro quadrado presentes na área da lesão.....	41
Fig. 11 - Imagem da área da lesão mostrando presença de mastócitos.....	42
Fig. 12 – Marcação específica para granulócitos na área da lesão.....	44
Fig. 13 – Avaliação do número de granulócitos na área da lesão.....	45
Fig. 14 – Marcação para linfócitos T na área da lesão.....	46
Fig. 15 – Avaliação do número de linfócitos T na área da lesão.....	47
Fig. 16 – Marcação de miofibroblastos (Alfa-SMA+) na área da lesão.....	48
Fig. 17 – Avaliação do número de miofibroblastos (Alfa-SMA+) na área da lesão.....	49
Fig. 18 - Melhora do reparo da lesão pelos efeitos indiretos da tolerância oral.....	51

Fig. 19 - Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram a deposição de matriz na área da lesão após 40 dias.....	52
Fig. 20 – Efeitos indiretos da tolerância oral alteram o padrão de deposição das fibras de colágeno I depositadas na área da lesão.....	54
Fig. 20 – Efeitos indiretos da tolerância oral alteram o padrão de deposição das fibras de colágeno III depositadas na área da lesão.....	55
Fig. 22 – Os efeitos indiretos da tolerância oral não interferem na intensidade de fluorescência das fibras de colágeno I e III depositadas na área da lesão..	56
Fig. 23 – Os efeitos indiretos da tolerância oral interferem na deposição de Tenascina C na área da lesão.....	57
Fig. 24 – Os efeitos indiretos da tolerância oral interferem na deposição de Tenascina C na área da lesão.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1: Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência direta.....	30
--	-----------

Resumo

A re-exposição parenteral a ovalbumina (OVA) em animais tolerantes orais a OVA inibe a inflamação e respostas imunes a antígenos não relacionados injetados concomitantemente. Este efeito inibitório denominado efeitos indiretos da tolerância oral também diminui a inflamação após lesão incisional na pele. Neste trabalho, investigamos se a injeção i.p. de um antígeno tolerado concomitante com lesões excisionais feitas na pele do dorso de camundongos inibiria o processo inflamatório nestas lesões e se alteraria o processo de reparo das mesmas.

Camundongos C57BL/6 oralmente tolerantes a OVA por beber uma solução de clara de ovo durante 3 dias (Tolerantes) e camundongos controle que beberam água (Imunes), foram imunizados i.p. com OVA em Al(OH)₃ 7 dias após o tratamento oral e imediatamente antes da lesão cutânea ser feita. Em outro grupo controle (Lesão) foi feita apenas a lesão. As lesões foram feitas na pele do dorso, sob anestesia, com a utilização de um punch dermatológico de 6,5mm de diâmetro. Os animais foram sacrificados 1, 3, 5, 7, 14 e 40 dias após a lesão e a pele contendo a lesão foi coletada. Parte do material coletado foi fixado em formalina e embebido em parafina para análises histológicas (coloração de HE, Azul de Toluidina e Tricromático de Gomori), enquanto a outra parte foi fixada em 80% metanol e 20% DMSO e embebido em paraplast para análise de imunofluorescência com anti- Ly-6C/G (Gr-1), anti-CD3, anti-alfa-SMA, anti-tenascina-C, anti-colágeno I e anti-colágeno III. Além disso, fotografias da área da lesão foram obtidas do dia 0 ao dia 14 para medida de suas áreas.

Os grupos tolerante e imune apresentaram maior redução da área da lesão nos dias 3 e 5 após a lesão. O grupo Tolerante apresentou menor número de células inflamatórias e de fibroblastos na área da lesão e uma redução da cicatriz; as fibras de colágeno I e III depositadas na área da lesão eram mais similares às fibras da pele intacta e houve também um aumento da deposição de Tenascina-C. Concluímos que os efeitos indiretos da tolerância oral reduzem o processo inflamatório na área da lesão, bem como a cicatriz formada na pele.

Abstract

The parenteral injection of ovalbumin (OVA) in OVA-orally tolerant mice inhibits inflammation and immune responses to other antigens injected concomitantly. This inhibitory effect named indirect effect of oral tolerance also inhibits inflammation after incisional skin lesion. Herein, we investigate if the i.p. injection of an orally tolerated protein inhibits the inflammatory process in excisional lesions in the skin of adult mice and alters the repair process of these lesions.

C57BL/6 mice were made orally tolerant to OVA by drinking a solution of egg white for 3 days (Tolerant) and control mice drank tap water (Immune). Seven days after oral treatment both groups were immunized i.p. with OVA+Al(OH)₃ immediately before the skin lesions under anesthesia using a dermatological punch with 6.5 mm diameter. Another control group (Lesion) received the lesion without immunization. Mice were sacrificed 1, 3, 5, 7, 14 and 40 days after and the skin around the lesion was fixed in formalin and embedded in paraffin for histological analysis (HE staining, Toluidine Blue and Gomori Trichrome) or fixed in 80% methanol and 20% DMSO and embedded in paraplast for immunofluorescence analysis with anti-Ly-6C / G (Gr-1), anti-CD3, anti- α -SMA, anti-tenascin-C, anti- α -collagen I and collagen III. In addition, photographs of the wounds were obtained from day 0 to day 14 to measure their areas.

Tolerant and Immune groups showed greater reduction in wound area on days 3 and 5 after lesions. Tolerant mice had fewer inflammatory cells and fibroblasts in the wound area and a reduced scar; in tolerant mice collagen I and collagen III in the wound area were more similar to the fibers of the intact skin and tenascin-C was increased. We conclude that the indirect effects of oral tolerance reduce inflammation and scar tissue after skin wound healing.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Regeneração e cicatrização

A capacidade dos animais regenerarem partes do corpo após sua perda ou lesão sempre causou especial fascinação em cientistas interessados no estudo de desenvolvimento animal (Tseng et al, 2008). Para efetivamente refazer um membro perdido ou outra estrutura, mais do que o simples preenchimento com tecido fibrótico, é preciso formar novos tecidos similares aos formados durante o desenvolvimento embrionário (Mescher e Neff, 2004).

No século XVII, Abraham Trembley mostrou que hidras conseguem se regenerar mesmo quando cortadas em diversos pedaços. Além das hidras, as planárias também possuem capacidade regenerativa, como mostrado em experimentos de T.H. Morgan no início do século XX (citados por: Tseng et al, 2008).

Anfíbios da classe dos urodelos, como salamandras e tritões, possuem a capacidade de regenerar múltiplos tecidos como a cauda, coração, medula, cérebro, maxilar e retina e inclusive membros inteiros, em processos que demonstram um alto grau de plasticidade celular (Tseng et al, 2008). Essa característica regenerativa não é, no entanto, observada em anfíbios adultos da classe dos anuros ou em mamíferos adultos. Os estudos das diferenças na capacidade regenerativa entre diversos animais permitem a análise de processos envolvidos na diferenciação e organização celular que surgiram ao longo do processo evolutivo.

De acordo com Mescher e Neff (2004), o desenvolvimento da imunidade adaptativa nos vertebrados mandibulados que suplementa o mecanismo da imunidade inata e permite ao organismo adquirir alta especificidade de defesa contra microorganismos invasores, envolveu a produção de células de defesa e citocinas que, ao infiltrar o tecido lesado, impedem a dediferenciação celular ou

algum sinal necessário ao início da regeneração do membro. Assim, a resposta à lesão em presença dessa infiltração é caracterizada pelo reparo dos tecidos e pela fibrose, em lugar de regeneração, ou restauração do tecido original.

A regeneração da pele, além de incluir a formação e a orientação normal de colágeno (fibras reticulares), inclui também a formação de capilares, folículos pilosos e glândulas (Harty et al, 2003). Por outro lado, a formação de cicatrizes está relacionada à produção abundante e desorganizada de matriz extracelular por fibroblastos (Aarabi et al, 2007), fazendo com que no local lesado ocorra a fibrose.

Alguns poucos vertebrados mantêm a capacidade de restaurar com perfeição a parte lesada, funcional e estruturalmente. Armstrong e Ferguson (1995) compararam o reparo de lesões na pele de mamíferos marsupiais recém-nascidos e ainda no marsúpio com os de marsupiais adultos. Nos animais adultos, que não regeneram, as bandas de colágeno são diferentes em tamanho, diâmetro e orientação; a camada de tecido adiposo não retorna à espessura normal e a camada muscular da derme é substituída por colágeno. Por sua vez, até o dia 9 após o nascimento o fechamento da lesão não exibe tais mudanças estruturais e ocorre regeneração da pele. Assim, apenas durante a fase fetal em mamíferos eutéria, ou logo após o nascimento em marsupiais, o reparo de lesões de pele pode ocorrer sem a formação de cicatriz, com restauração plena dos tecidos. Na maioria dos casos, o processo de regeneração não ocorre e, o reparo das lesões, ocorre com cicatrização (Mendonça e Coutinho-Netto, 2009).

Alguns componentes da matriz extracelular da derme e suas vias de síntese e degradação durante o reparo são diferentes entre fetos e adultos. A pele fetal é rica em ácido hialurônico de alto peso molecular em um estado altamente hidratado que promove a migração de fibroblastos, protege as células contra danos por radicais livres e influencia a quantidade e a natureza do colágeno produzido. A síntese de ácido hialurônico persiste por mais tempo nas feridas de fetos do que nas de adultos e isso pode influenciar nas respostas inflamatórias e resultar na redução da cicatriz nos fetos (Harty et al,

2003). Além disso, os processos inflamatórios que ocorrem em mamíferos nessas duas fases da vida são diferentes uma vez que elas diferem na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

1.2 A inflamação e sua influência no reparo do tecido

O processo de reparo de uma lesão pode ser dividido em três fases: inflamação, formação do tecido e remodelação (Eming et al, 2007; Wang et al, 2006). Uma deficiência ou modificação em uma dessas fases altera a fase seguinte, retarda ou acelera o processo de reparo (Kinsey et al, 2003).

As lesões normalmente resultam no rompimento de capilares o que desencadeia a ativação de plaquetas, iniciando a cascata de coagulação, que converte fibrinogênio em fibrina e impede a perda de sangue no local (Martin and Leibovisch, 2005). Também se iniciam eventos inflamatórios sendo que um dos primeiros fatores inflamatórios liberados no local da lesão é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atraindo células do sistema imune (Martin e Feng, 2009). Também ocorre a produção de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de transformação tumoral (TGF-beta) ativando fibroblastos e células mesenquimatosas. Neutrófilos e macrófagos migram para o local devido a modificações que ocorrem nas superfícies das células endoteliais dos vasos capilares, que passam a expressar moléculas de adesão, e permitem a ligação e transmigração destes leucócitos para o local da lesão.

Os neutrófilos são os primeiros a chegar ao local lesado. Esta rápida chegada, embora eficiente na remoção rápida de bactérias, geralmente resulta na liberação de radicais livres que matam não somente agentes infecciosos, como também, células saudáveis (Martin e Leibovisch, 2005). Além disso, neutrófilos são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais.

Os macrófagos chegam ao local da injúria depois dos neutrófilos removem fibrina, células mortas e restos de neutrófilos. Também produzem citocinas e fatores de crescimento, que amplificam os sinais liberados por plaquetas e neutrófilos (Martin, 1997; Eming et al, 2007) e fatores angiogênicos, que também são importantes para a regulação da fibroproliferação (Martin e Leibovich, 2005).

Em um estudo sobre a importância do fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) Mann et al (2006) mostraram que durante o reparo da ferida na pele em animais transgênicos, que não produziam GM-CSF, ocorreu proliferação de queratinócitos, uma vascularização reduzida e, uma extensa deposição de colágeno com formação de fibrose na nova matriz formada. Desta forma, pode-se dizer que o macrófago é importante para o processo de reparo.

Em camundongos sem mastócitos ocorre redução no número de neutrófilos no local da ferida, embora o reparo ocorra de forma normal. Logo, acredita-se que os mastócitos presentes no tecido antes da lesão atuem na ativação imediata dos eventos que ocorrem neste local, que levam à atração de neutrófilos (Egozi et al 2003). Além disso, os mastócitos estão relacionados com a formação de novos vasos sanguíneos (Crivellato e Ribatti, 2005).

Os fatores liberados durante o processo inflamatório no local da injúria ativam fibroblastos que adicionam hialuronato e glicoproteínas na matriz extracelular e, mais tarde, colágeno para formação dos tecidos. Também ocorre a transformação de alguns fibroblastos em miofibroblastos, o que promove a contração da ferida (Martin, 1997; Harty et al, 2003).

Ainda existem controvérsias sobre o benefício do processo inflamatório para o reparo tecidual. Embora o processo inflamatório possa ser importante para impedir a proliferação e infiltração exacerbada de microorganismos nos órgãos lesados, estudos recentes têm demonstrado que ele não é essencial para o processo de reparo de tecido. Ao contrário, a inflamação em excesso resulta em fibrose. Martin et al (2003) mostraram, em camundongos PU.1 null

que não possuem macrófagos, neutrófilos e mastócitos, que esses animais regeneram feridas sem formação de fibrose. Isso nos permite inferir que a redução da resposta inflamatória está relacionada com um melhor reparo da ferida.

Outro estudo feito por Mori et al (2008) mostrou que o gene OPN (Osteopontin) é expresso pelos fibroblastos presentes no tecido de granulação da ferida e sua expressão coincide com a resposta inflamatória no local. Em experimento com camundongos OPN-null, verificou-se um reparo mais rápido das feridas e uma redução do infiltrado inflamatório, bem como, redução na formação de cicatriz. Neste trabalho Mori descreve que os macrófagos infiltrados no local da ferida são responsáveis por ativar fibroblastos que por sua vez passarão a expressar OPN.

Em um estudo sobre a inflamação e o reparo, Ferguson e O’Kane (2004) dizem que a ferida no embrião apresenta respostas inflamatórias diferentes quando comparada à ferida no adulto. No embrião, o sistema imunológico está em desenvolvimento, o que leva a diferenças na concentração de células (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e também nas citocinas secretadas, como é o caso do fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta) e suas isoformas. A ferida embrionária tem alta concentração de TGF-beta-3, sintetizado por fibroblastos e queratinócitos, mas uma baixa concentração de TGF-beta-1 e 2, que são responsáveis pela resposta inflamatória de plaquetas e macrófagos que, por sua vez, estão presentes em alta concentração em feridas em adultos (Ferguson and Kane, 2004; Martin, 1997). Sabe-se que o TGF-beta-1 é essencial para iniciar a inflamação e a formação do tecido de granulação já que tem atuação importante na migração celular para o local da injúria (Wang et al, 2006).

Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), pelos fibroblastos na ferida de pele de fetos, após estímulo pelo fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), é mínima quando comparada com a produção em adultos (Liechty et al, 2000). Enquanto a IL-8 recruta neutrófilos e promove a inflamação, a IL-6

recruta e ativa monócitos e macrófagos. A redução na produção dessas citocinas na ferida de fetos explica a quase ausência desses leucócitos e a redução da resposta inflamatória. Desta forma, quando IL-6 exógena é adicionada a feridas de fetos, ocorre a formação de cicatriz (Liechty et al, 2000; Harty et al, 2003).

Também há diferenças na produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, que inibe a migração celular de monócitos, macrófagos e neutrófilos para o local da injúria (Peranteau et al, 2008) e inibe a expressão de IL-6 e IL-8 (Liechty et al, 2000; Harty et al, 2003).

Eming et al. (2007) estudaram camundongos deficientes em IL-10 (IL-10^{-/-}), e verificaram a importância desta citocina na redução do processo inflamatório no reparo das feridas. Esses animais apresentaram um maior número de macrófagos na ferida e também tiveram um processo de cicatrização acelerado, com maior deposição de colágeno, quando comparado a animais normais que exibiam uma concentração maior de miofibroblastos na ferida.

Também Liechty et al. (2000), em experimento com feridas na pele de fetos de camundongos selvagens e IL-10^{-/-}, viram que na ferida dos fetos IL-10^{-/-} houve formação de cicatriz, bem como, infiltrado inflamatório mais intenso, quando comparado a animais normais, que não apresentaram cicatriz e exibiam um infiltrado inflamatório menor. Também compararam o reparo na pele de fetos e de adultos normais e IL-10^{-/-} e verificaram que adultos normais formam cicatrizes enquanto fetos normais não o fazem; e que adultos IL-10^{-/-} formam cicatrizes ainda mais pronunciada que os adultos normais e fetos IL-10^{-/-}.

Peranteau et al. (2008) mostraram que o aumento da expressão de IL-10 em adultos produz uma diminuição de mediadores inflamatórios produzindo um ambiente que propicia o reparo de feridas na pele com menor cicatriz.

Portanto, a atuação de uma série de fatores e citocinas produzidos no momento da lesão influenciam no processo de reparo e na formação do infiltrado inflamatório em feridas na pele e, isso, contribui para que ocorram diferenças entre o reparo em fetos e animais adultos. Além dos fatores e citocinas já citados, outros elementos como o fator de crescimento epitelial (EGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) (Stappenbeck et al, 2009), estão também presentes e influenciam no processo de reparo.

1.3 Tolerância oral

Através do trato gastrointestinal os organismos entram em contato com diversas substâncias externas, como as provenientes da alimentação. O contato com tantos elementos representa um constante estímulo antigênico para o organismo. No entanto, a consequência mais frequente destes contatos não é uma imunização progressiva, mas sim, a tolerância oral, definida como uma redução da resposta imune específica após imunização com antígeno previamente contactado por via oral (Carvalho et al, 2002).

A tolerância oral foi descrita inicialmente como uma inibição da sensibilização anafilática em cobaias através da sua alimentação prévia com leite bovino (Besredka, 1909) ou proteínas do ovo de galinha (Wells, 1911), (ver: Hanson et al. 1979). Porém, desde 1829, Dakin havia descrito a ingestão de um extrato de plantas sensibilizantes (poison ivy) por índios norte-americanos como método de prevenção de dermatites alérgicas.

Proteínas administradas por via oral são processadas por células apresentadoras de antígenos (APC) presentes no intestino que ativam linfócitos T e estas interações repercutem em todo o organismo, de tal maneira que camundongos alimentados com dieta livre de macromoléculas, apresentam alterações significativas no seu sistema imune (Menezes et al.,2003).

A injeção parental da proteína tolerada em adjuvante em animais tornados tolerantes orais por ingestão prévia da mesma resulta em uma diminuição da resposta imune antígeno-específica. Inesperadamente, fica também inibido o desencadeamento de respostas imunes primárias a outros antígenos não relacionados. Esse fenômeno de inibição de respostas a antígenos não relacionados ao antígeno tolerado é conhecido como *bystander suppression* ou, como preferido em nosso laboratório, efeito indireto da tolerância oral (Carvalho et al, 1994).

De acordo com Faria e Weiner (2006) a liberação de citocinas moduladoras como TGF- β , IL-4 e IL-10 depende da resposta de células T reguladoras à administração de baixas doses do antígeno. Uma das explicações para o mecanismo de ação do efeito indireto seria a ativação de linfócitos T reguladores gerados pelo contato com o antígeno pela via oral, que inibiriam a ativação de linfócitos para antígenos não específicos pela secreção de citocinas inibitórias como o TGF- β (Miller et al, 1991).

Experimentos em nosso laboratório mostraram que os efeitos indiretos não podem ser explicados pela proximidade entre os linfócitos tolerantes com linfócitos não tolerantes, ou seja, por “bystander supression” (Carvalho et al, 1994, 1997). Por exemplo, a injeção i.p. ovalbumina (OVA) em camundongos tolerantes a OVA impede a formação do granuloma nos pulmões de camundongos não infectados que foram submetidos à injeção intravenosa de ovos de *Schistosoma mansoni* (Carvalho et al , 2002). Os efeitos indiretos da tolerância oral também não podem ser explicados pela deleção clonal ou pela anergia de células T específicas (Carvalho et al, 1994, 1997).

1.4 Relação entre a tolerância oral e a inflamação

Experimentos realizados em nosso laboratório indicam que os efeitos indiretos da tolerância oral interferem no processo inflamatório. Rodrigues e colaboradores (2006) mostraram que a injeção de OVA em animais tolerantes orais a OVA bloqueia a migração de células para um local inflamado. Em outros experimentos, Ramos et al. (2008) mostraram que a injeção s.c. concomitante de OVA+hemoglobina em animais tolerantes orais a OVA, impede a peritonite desencadeada pela injeção i.p. de hemoglobina, bem como, inibe a produção de eosinófilos na medula óssea. Além disso, os efeitos indiretos da injeção parenteral do antígeno tolerado bloquearam a inflamação desencadeada pela injeção de carragenina na pata dos camundongos e resultou também na inibição da produção de NAG e MOP (indicadores indiretos do influxo de células polimorfonucleares e mononucleares) (Ramos et al. 2008).

Como falado anteriormente, a inflamação é de fundamental importância no processo de reparo que depende da quantidade de células e dos tipos celulares que chegam ao local lesado e, na dependência do que se passa, este processo pode ocorrer com a regeneração do tecido ou com a formação de cicatriz.

Por sabermos que os efeitos indiretos da tolerância oral interferem nos processos inflamatórios bloqueando a migração de certos tipos celulares para o local inflamado, levam à diminuição da produção de leucócitos pela medula óssea e, ainda, diminuem o infiltrado inflamatório, decidimos investigar se a tolerância oral pode contribuir para um melhor reparo de lesões cutâneas, diminuindo o infiltrado inflamatório e alterando os tipos celulares que migram para o local lesado.

O processo de cicatrização de lesões de pele pode ocorrer de duas formas: cicatrização primária, por primeira intenção (em feridas incisionais), ou cicatrização secundária, por segunda intenção (em feridas excisionais).

No caso do fechamento por primeira intenção, além de ser pequena de tal maneira que, durante o processo de resolução há menor destruição tecidual o que ocasiona uma reação inflamatória menor com menor formação de cicatriz

a ferida tem suas bordas aproximadas por sutura levando a um processo de re-epitelização mais rápido.

Já a cicatrização por segunda intenção, por ocorrer em feridas amplas onde houve remoção de parte do tecido e por não ter as bordas da ferida aproximadas, há uma grande reação inflamatória no local levando a um processo de reparo mais longo e maior propensão para formação de cicatriz. Além disso, o fechamento da lesão é dependente da contração do próprio tecido.

Desta maneira, desenvolvemos em nosso laboratório modelos para investigar os efeitos indiretos da tolerância oral no reparo de lesões na pele. Costa et al. (2011) analisou estes efeitos no processo de reparo de lesões incisionais na pele do dorso de camundongos tolerantes à OVA. Observou-se que nos animais tolerantes a OVA a injeção i.p de OVA+Al(OH)₃ concomitantemente com a lesão, houve melhor reparo da ferida incisional, onde o reparo ocorre por primeira intenção; houve redução do tecido de granulação e de miofibroblastos e as fibras de colágeno I e III estavam dispostas de forma similar à da pele intacta com espessura próxima à fibra de colágeno normal, quando comparados com animais não tolerantes. Ou seja, os efeitos indiretos da tolerância oral melhoraram o reparo de lesões incisionais (Costa et al. 2011).

Neste trabalho, avaliamos o processo de reparo em lesões excisionais na pele do dorso de camundongos adultos C57BL/6.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se os efeitos indiretos da tolerância oral alteram o reparo de lesões excisionais na pele do dorso de camundongos adultos.

2.2 Objetivos Específicos

1 - Avaliar “*in vivo*” a cinética de fechamento da lesão excisional, por medida da área da ferida nos dias: 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 .

2 - Analisar histologicamente a lesão excisional nos dias 1, 3, 5, 7, 14 e 40 avaliando o infiltrado inflamatório, o processo de re-epitelização, a presença de vasos, as regenerações de folículos pilosos e glândulas e a deposição de colágeno nos fragmentos dos tecidos coletados.

3 - Aos 1, 3, 5, 7, 14 e 40 dias após a ferida, avaliar por imunofluorescência o infiltrado inflamatório e a deposição de matriz extracelular na região da lesão:

3.1 - linfócitos T através da marcação com anticorpos anti-CD3.

3.2 – granulócitos através da marcação com anti-Ly-6C/G (Gr-1).

3.4 - miofibroblastos através da marcação com α - SMA.

3.5 -fibras de colágeno I e III na área da lesão com marcação por anticorpos específicos.

3.6 – tenascina-C na área da lesão com marcação por anticorpos específicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6, machos, com idade entre 8 e 10 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG. Durante todo o experimento os animais ficaram no Biotério de Animais Experimentais do Departamento de Morfologia (Câmara Climatizada) com ração padrão e água de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG. O número de animais por grupo foi 5 ou 6.

3.2 Antígeno

Ovalbumina cristalizada (OVA, grau V) obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) e solução de clara de ovo diluída 1:5 em água.

3.3 Adjuvante

Hidróxido de Alumínio – $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Medicamento Genérico, São Paulo, Brasil).

3.4 Tratamento Oral com clara de ovo

Os animais do grupo tolerante receberam solução de clara de ovo na concentração 1:5 em água como única fonte de líquido durante 3 dias consecutivos. Após a retirada da solução de clara de ovo os animais ficaram 7 dias bebendo água “*ad libitum*” e foi feita a lesão nos animais. Os demais grupos não receberam tratamento oral.

3.5 Imunização Parental

Animais do grupo tolerante e do grupo imune receberam 10 µg de OVA + 1,6 µg de Al(OH)₃ num volume final de 200 µl por via intraperitoneal (i.p.) minutos antes da lesão. Os animais do grupo controle não foram imunizados e receberam somente salina.

3.6 Modelo Experimental para estudo do fechamento da lesão excisional no dorso

Os animais foram anestesiados pela injeção *i.p.* de 0,10 ml de uma solução de cloridrato de Ketamina (97 mg/Kg) (Dopalen injetável-Vetbrands) e xilazina (16,5 mg/Kg) (Dopaser solução injetável) diluídos 1:3 em salina fisiológica. Após anestesia, fez-se tricotomia dos animais com lâmina de barbear, limpou-se e esterilizou-se o local com álcool 70% e foi feita ferida no dorso do animal com punch dermatológico com diâmetro de 6,5mm como mostra figura 1.

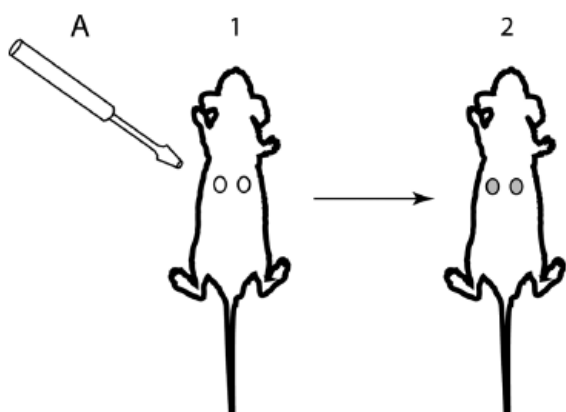


Fig. 1- Excisão no dorso. Adaptado de: GALIANO et al. 2004

3.7 Avaliação da cinética de fechamento da ferida excisional no dorso do camundongo

As lesões foram fotografadas nos dias 0, 1, 3, 7, 10 e 14. Para tanto, os camundongos foram anestesiados com dose mínima de anestésico, e eles foram posicionados em decúbito ventral ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram feitas com máquina digital (Sony DSC-F717, Japan) e foram transferidas para o computador para posterior análise com o programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA). Nesse programa a área da lesão é delimitada e medida em mm².

3.8 Coleta do material e processamento histológico da lesão excisional

Nos dias 1, 3, 5, 7, 14 e 40 após a lesão os animais foram sacrificados para avaliação histológica da mesma. Como cada animal possui duas feridas, enquanto uma foi fixada em formalina de Carlson em tampão Millong (pH 7.0) por 24h e incluída em parafina para análise histológica de rotina, a outra ferida foi fixada em DMSO (dimetilsulfóxido) + metanol para inclusão em paraplast para análise de imunofluorescência. Antes de ser fixada cada ferida foi cortada em duas partes a partir do centro da lesão, como mostra a figura 2.

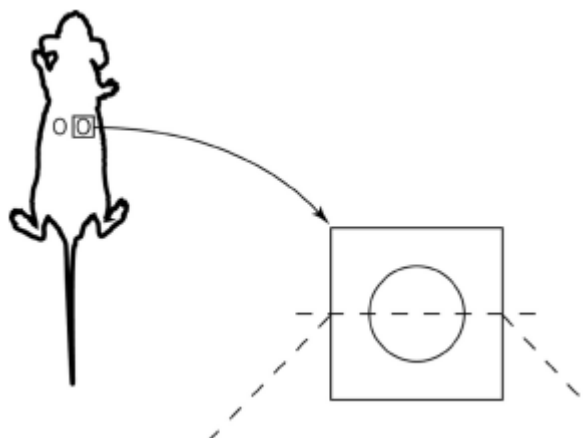


Fig 2- Coleta para processamento do material histológico: Adaptado de: GALIANO et al, 2004

3.9 Processamento para avaliação histológica da lesão excisional

O material histológico foi fixado em formallina de Carlson em tampão Millonig (pH 7.0) por 24h, transferido para álcool 70% e submetido às etapas de desidratação, diafanização, infiltração e inclusão em parafina a 56°C.

Após a inclusão realizaram-se cortes histológicos com uso do Micrótomo Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5µm. Esses cortes foram então corados com HE (Hematoxilina e Eosina), Tricromático de Gomori e Azul de Toluidina para avaliações histológicas qualitativas.

3.10 Análise Morfológica do tecido da lesão excisional

A coloração de HE foi utilizada para evidenciar os componentes estruturais do tecido, como folículo piloso, glândulas sebáceas, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo e infiltrado inflamatório. Os tecidos coletados de todos os dias foram corados em HE. O Tricromático de Gomori foi usado para análise de fibras colágenas e tecido conjuntivo e por isso somente o material coletado nos dias 14 e 40 após a lesão foram corados com esta técnica. O Azul de Toluidina foi utilizado para avaliar a presença de mastócitos na região da lesão durante o processo de reparo dos dias 1 e 3.

Para quantificar as células presentes na área da lesão foi feita uma análise morfométrica do número de células inflamatórias e fibroblastos. Desta forma, 10 áreas de 100 micrometros quadrados foram contadas na área da lesão. As áreas contadas foram sempre três áreas abaixo do epitélio, três áreas no meio da lesão (região da derme) e quatro áreas abaixo desta área e nas laterais.

3.11 Processamento para análise de imunofluorescência da lesão excisional

O material histológico (pele ao redor da lesão) foi cortado, esticado sobre papel filtro, fixado em metanol 80% / DMSO 20% e criosubstituída a – 80°C durante 6 (seis) dias quando foi removido para -20°C por 1 (um) dia.

Após esta etapa, a pele foi submetida às etapas de desidratação, diafanização, infiltração (Xilol 50% / Paraplast Plus 50% - 12 hs a 63°C) e inclusão em paraplast como segue protocolo:

Desidratação:	Álcool absoluto	30 min a temperatura ambiente
	Álcool absoluto	30 min a temperatura ambiente
	Álcool absoluto	30 min a temperatura ambiente
Diafanização:	Xilol	30 min a temperatura ambiente
	Xilol	30 min a temperatura ambiente
Infiltração:	Xilol 50%/ Paraplast Plus 50%	12hs a 63°C
	Paraplast	30 min a 63°C
	Paraplast	30 min a 63°C
Inclusão:	Paraplast	a 63°C

Após a inclusão em paraplast foram feitos cortes histológicos seriados com 5µm de espessura. Esses tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência com anticorpos anti-CD3, anti-Ly-6C/G, anti-colágeno I, anti-colágeno III, anti- α SMA (miofibroblasto) e anti-tenascina-C.

3.12 Análise da distribuição de linfócitos T, granulócitos, colágeno I, colágeno III, tenascina-C e miofibroblasto na área da lesão excisional

Para análise de linfócitos T, granulócitos, colágeno I, colágeno III, miofibroblasto e tenascina-C fez-se técnica de imunofluorescência indireta. Amostras das lesões de animais de cada grupo foram analisadas, sendo também utilizadas amostras de animais controles, sem nenhum tipo de tratamento ou lesão. Foram utilizados de 5 a 6 animais por grupo em cada experimento. A concentração dos anticorpos primários e secundários foi determinada para cada anticorpo especificamente tendo sido feito teste

controle com os tecidos sem anticorpos para verificar se ele não possuía auto-fluorescência tendo este resultado dado negativo para todos os grupos.

Etapas de imunofluorescência indireta:

Desparafinização:	Xilol	temperatura ambiente.
Hidratação:	Séries graduais de etanol, água, PBS	temperatura ambiente
Etapa de bloqueio:	PBS ¹ em BSA ² 1% em Tween ³ 20 0,1%	60 min a temperatura ambiente.
Incubação anticorpo primário:	Diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01%	<i>overnight</i> a 4°C
Lavagem de lâminas:	3 banhos com PBS.	5 min cada.
Incubação anticorpo secundário:	Diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% -	60 min a temperatura ambiente
Lavagem de lâminas:	3 banhos em PBS	5min cada
Montagem lâminas:	Solução de glicerina 90% TRIS 1M 10% pH 9,0	a 25°C

¹ Phosphated Buffered Saline – Tampão fosfato Salino

² Bovine Serum Albumine – Albumina de soro bovino (Boehringer Mannheim)

³ Tween 20 - detergente usado para inibir ligações inespecíficas de imunoglobulinas (Fisher Scientific)

Os cortes foram analisados em microscopia confocal Zeiss 510 Meta.

Os anticorpos utilizados encontram-se listados na tabela a seguir.

Tabela 1: Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência direta.

Anticorpos	Especificação	Diluição	Fonte
Primários	Policlonal, camundongo anti- α -SMA	1:50	Sigma - Aldrich
	Policlonal, cabra, anti- tenascina -C	1:200	SantaCruz
	Policlonal, coelho, anti- colágeno I	1:100	Rockland
	Policlonal, coelho, anti-colágeno III	1:100	Rockland
	Monoclonal, rato, anti- CD3	1:25	Pharmigen
Conjugado	Policlonal, Alexa 488, rato, anti-Ly-6C/G (Gr-1)	1:50	Caltag
Secundários	Policlonal, cabra anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488	1:400	Molecular Probes
	Policlonal, galinha anti-IgG de cabra conjugado a Alexa 488	1:400	Molecular Probes
	Policlonal, cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488	1:400	Molecular Probes
	Policlonal FITC-conjugado cabra anti IgG de rato	1:100	e-Bioscience
	DAPI	1:100	Molecular Probes

3.13 Análise quantitativa de linfócitos T, granulócitos, colágeno I e III miofibroblastos e tenascina-C na área da lesão excisional

Para investigar a presença dessas estruturas nos diferentes grupos (lesão, imune e tolerante) e a possível diferença entre os grupos foi feita a quantificação dos materiais coletados a partir da intensidade de fluorescência na região da lesão.

Para tanto foram feitas quatro medidas da intensidade de fluorescência na área da lesão de cada animal, sendo duas delas localizadas na região epitelial e duas na camada muscular. As imagens foram analisadas em escala de cinza no programa Image Tool 3.0. A intensidade de fluorescência é dada através do nível de cinza que pode variar de 0 (preto) a 255 (branco). Quanto mais próximo de 255, maior a intensidade de fluorescência da imagem.

3.14 Análise estatística dos resultados

Para análises estatísticas usou-se o programa Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, CA, USA) e as diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando ANOVA one-way e teste Student-Newman-Keuls. Valores para $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do efeito indireto da tolerância oral na cinética de fechamento de lesões na pele do dorso de camundongos

Para a indução de tolerância oral camundongos C57Bl/6 de 8 a 10 semanas de idade foram tratados com solução de clara de ovo 1:5 durante 3 dias consecutivos como única fonte de líquido. Este tratamento terminou sete dias antes de realizar a lesão na pele do dorso destes animais.

Os animais do grupo Lesão e Imune não passaram por tratamento oral com solução de clara de ovo ingerindo água *ad libitum* durante este período. No dia da lesão os animais do grupo Lesão foram anestesiados e receberam salina (0,25 ml) intraperitonealmente. Os animais dos grupos Imune e Tolerante depois de anestesiados receberam injeção i.p. de 10 µg de OVA adsorvida em 1,6 mg de $Al(OH)_3$. Logo após a injeção i.p. de salina e a imunização nos respectivos grupos, o dorso dos animais foi raspado e foram feitas as lesões excisionais utilizando-se um punch dermatológico de 6,5mm de diâmetro. Logo após a lesão ter sido feita não foram observadas diferenças macroscópicas entre os grupos.

Medimos a área das lesões, em vez de seu diâmetro, devido ao seu fechamento irregular em muitos animais. Para a medida, os animais foram levemente anestesiados e fotografados nos dias 1, 3, 5, 7, 10 e 14 após a lesão. A medida da área foi realizada nas fotografias digitais através do programa UTHSCSA Image Tool version 3.0.

Como mostra a Fig. 3, a cinética de fechamento da lesão foi similar entre os grupos sendo possível observar macroscopicamente, no entanto, que o reparo da ferida do animal do grupo Tolerante apresenta uma ferida mais regular, sem formação de crosta grossa e edemas ao redor da lesão quando comparado com os outros grupos (Fig 3- F e I).

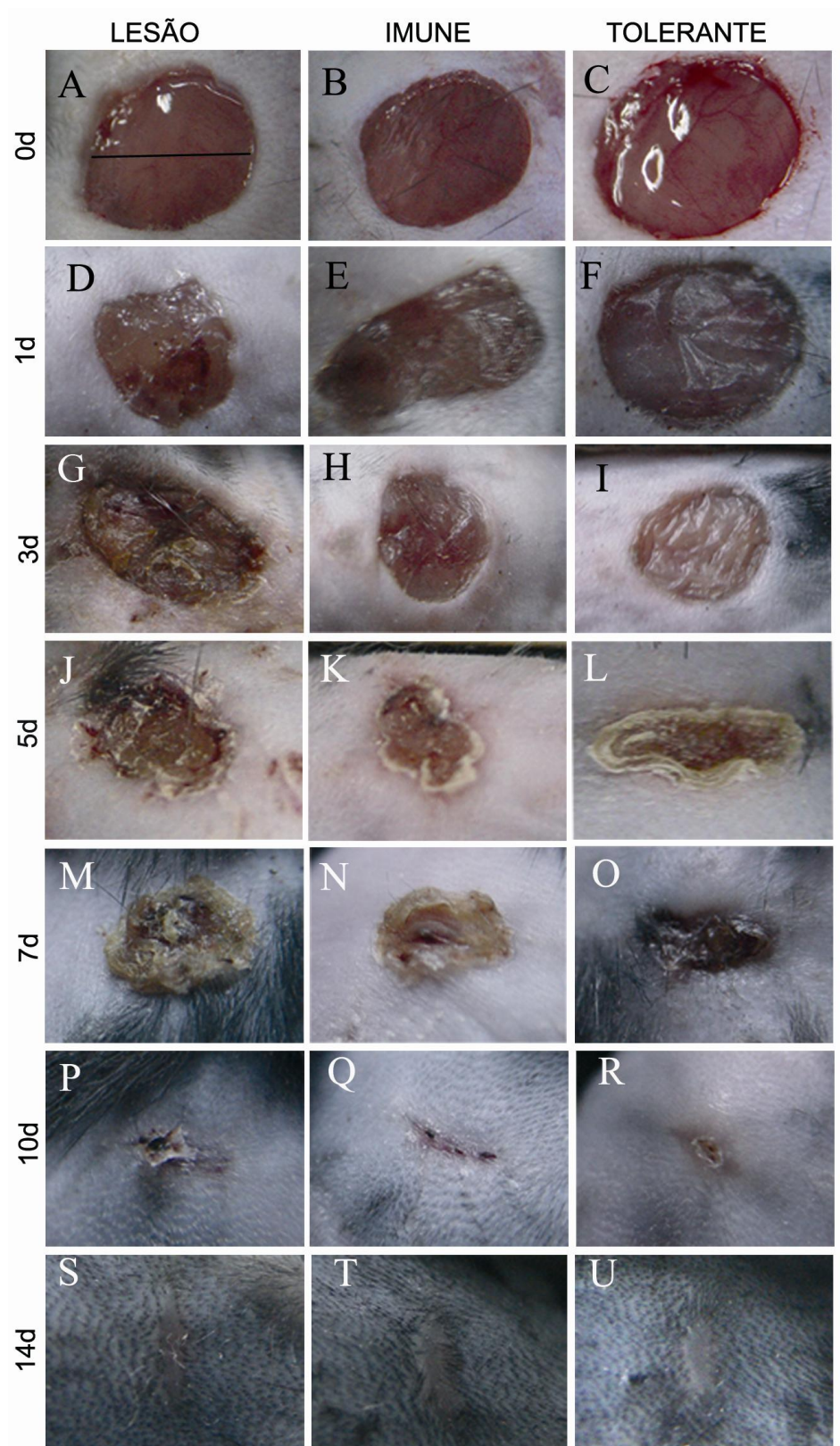


Fig 3 – Cinética de fechamento da lesão excisional no dorso de camundongos C57Bl/6. A figura mostra a lesão na pele do dorso dos camundongos que foi feita com puch dermatológico de 6,5 mm de diâmetro. As fotos da área foram feitas do dia 0, 3, 5, 7, 10 e 14 para avaliar se havia diferença macroscópica no processo de fechamento e reparo inicial desta lesão entre os grupos.

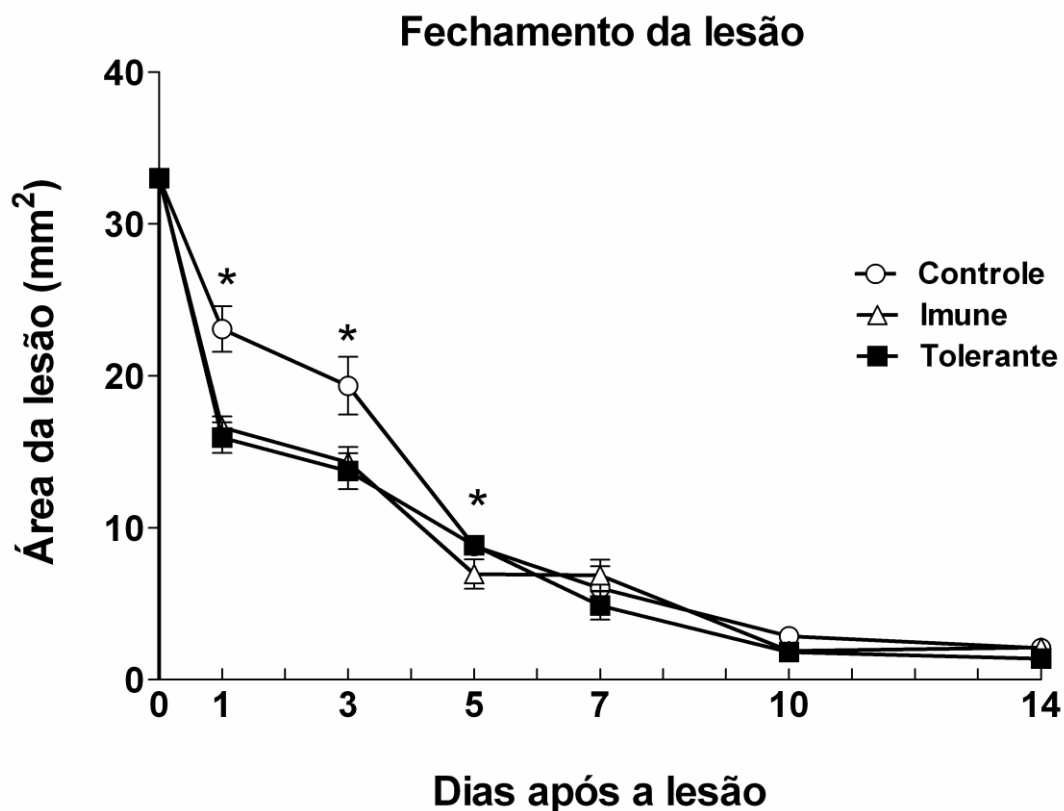


Fig 4 – Cinética de fechamento da área da lesão no dorso de camundongos C57Bl/6. O gráfico mostra o fechamento da área da lesão. A medida foi feita com auxílio do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool version 3.0. Asteriscos para análises no mesmo dia representam diferenças significativas em comparação com grupo controle que recebeu apenas a lesão ($p \leq 0,05$).

A cinética de fechamento da lesão foi similar entre os grupos, mas, houve diferenças na área da lesão nos dias 1 e 3 entre os grupos Tolerante e Imune quando comparados com o controle que recebeu apenas a Lesão. No dia 5 a diferença permaneceu apenas entre os grupos Imune e controle Lesão (Fig. 4). A partir deste dia não houve diferença na área de fechamento da lesão entre os grupos. O fechamento da lesão nos primeiros dias de reparo foi mais efetivo nos grupos Tolerante e Imune quando comparados com ao grupo controle.

4.2 Efeitos da administração parenteral de uma proteína tolerada sobre o processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos

Como mostra a Fig. 5 (A, B e C), um dia após a lesão, em todos os grupos, houve uma deposição de tecido adiposo na área da lesão e a aproximação da camada muscular do epitélio ao redor da área da lesão. Em todos os grupos o tecido está vascularizado e os vasos estão congestionados, porém, no grupo Tolerante a resposta inflamatória vascular é menor. Em todos os grupos nota-se a presença de necrose ao redor da área da lesão. Células inflamatórias já estão presentes sendo em sua maioria de neutrófilos e macrófagos. A crosta, neste primeiro dia, esta presente em todos os grupos sendo ela no grupo Tolerante mais delgada quando comparada à do grupo Lesão (Fig.5 D, E e F).

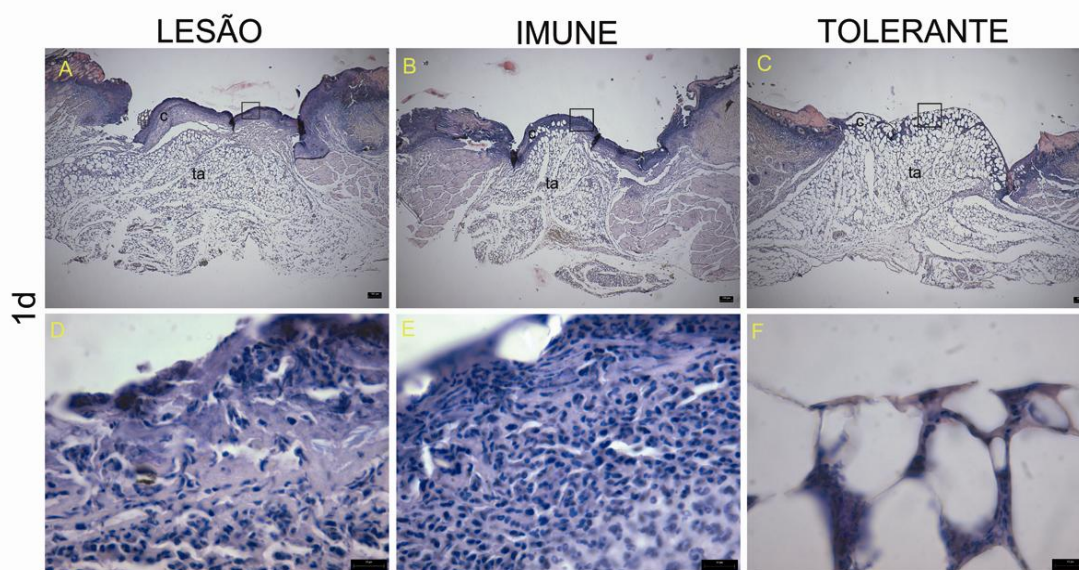


Fig. 5 - Análise histológica do processo de reparo 1 dia após lesão excisional na pele do dorso de camundongos. Em A, B e C observa-se deposição do tecido adiposo na área da lesão, as bordas da lesão estão necrosadas, com infiltrado inflamatório e crosta formada. D, E e F foto mostrando detalhe demarcado em A, B e C, respectivamente, da crosta formada. A, B, e C fotos em aumento 40X, escala da barra: 100µm e D, E e F fotos em aumento de 100x, escala da barra: 10 µm após coloração em HE. Letras indicam: c, crosta; ta, tecido adiposo.

No terceiro dia após a lesão (Fig. 6 A, B e C) a crosta está totalmente formada em todos os grupos, sendo mais delgada no grupo Tolerante. Este grupo também não apresenta necrose ao redor da borda da lesão como nos demais grupos. Também é possível observar início de reepitelização nas bordas da lesão em todos os grupos (Fig. 6 D, E e F). É abundante a presença de fibroblastos no grupo Tolerante e, além disso, a deposição inicial de matriz extracelular na área da lesão é observada neste grupo.

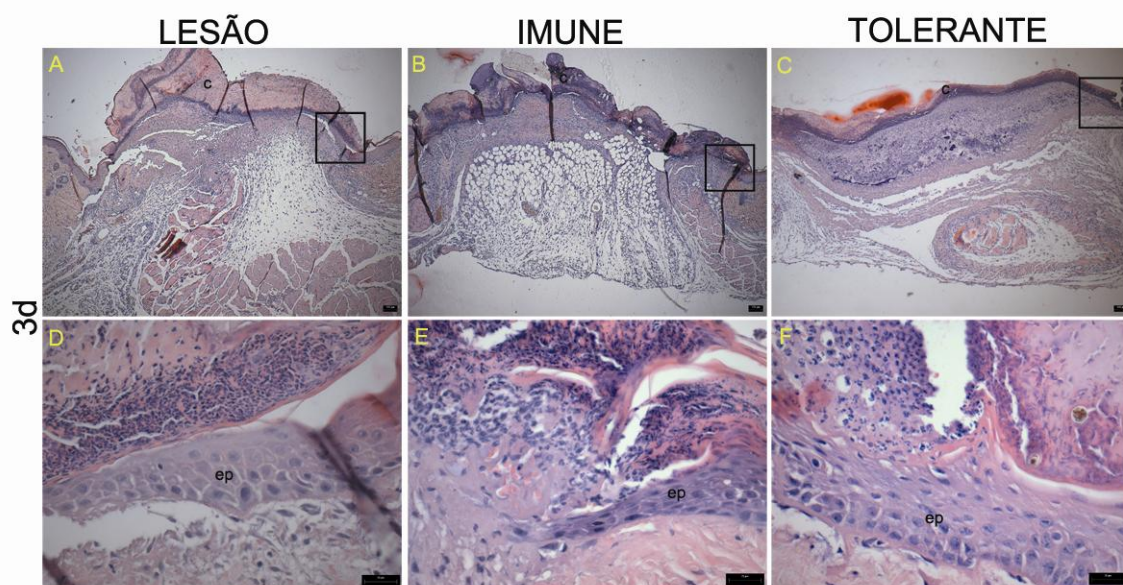


Fig. 6 - Análise histológica do processo de reparo 3 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos. Em A, B e C observa-se início de reepitelização nas bordas mostrado em detalhe em D, E e F, respectivamente. Início de deposição de matriz na área da lesão no grupo Tolerante (C). A, B, e C fotos em aumento 40X, escala da barra: 100µm e D, E e F fotos em aumento de 400x , escala da barra: 25 µm após coloração em HE. Letras indicam: c, crosta; ep: epitélio recém formado.

No quinto dia após a lesão (Fig. 7 A, B e C) as bordas, já não mais necrosadas, estão re-epitelizadas em todos os grupos. A área da lesão encontra-se menos elevada no grupo Tolerante quando comparada com o grupo Lesão e apresenta uma crosta espessa e regular. O tecido de granulação está bem formado sendo que o grupo Tolerante apresenta menor número de fibroblastos e de células inflamatórias que os demais grupos (Fig. 7 D, E e F). Ainda é possível observar neste dia a presença de tecido adiposo na área da

lesão nos grupos Lesão e Tolerante e de vasos sanguíneos principalmente no grupo Tolerante.

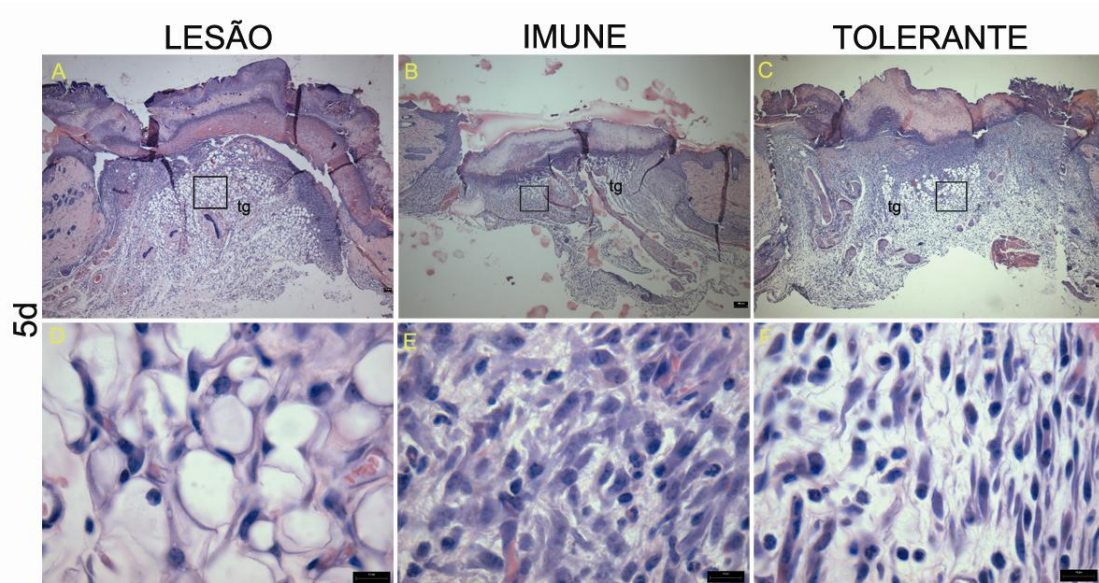


Fig. 7 - Análise histológica do processo de reparo 5 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos. Em A, B e C tecido encontra-se bem vascularizado e tecido de granulação começando a se formar, mostrado em D, E e F. A, B, e C fotos em aumento 40X, escala da barra: 100µm e D, E e F fotos em aumento de 100x , escala da barra: 10 µm após coloração em HE. Letras indicam: tg; tecido de granulação.

Sete dias após a lesão (Fig. 8 A, B e C) vê-se que o epitélio está formado em todos os grupos e somente no grupo Tolerante a crosta permaneceu aderida à área da lesão, nos demais grupos esta crosta se soltava facilmente ao manipular o animal.

No grupo Tolerante o tecido de granulação está bem formado possuindo poucos fibroblastos e poucas células inflamatórias que em sua maioria são linfócitos, além disso, ele apresenta deposição de matriz pronunciada quando comparada com os demais grupos e vasos sanguíneos menos dilatados (Fig.8 D, E e F).

Não há sinal de foliculogênese, adipogênese ou formação da camada muscular em nenhum dos grupos analisados.

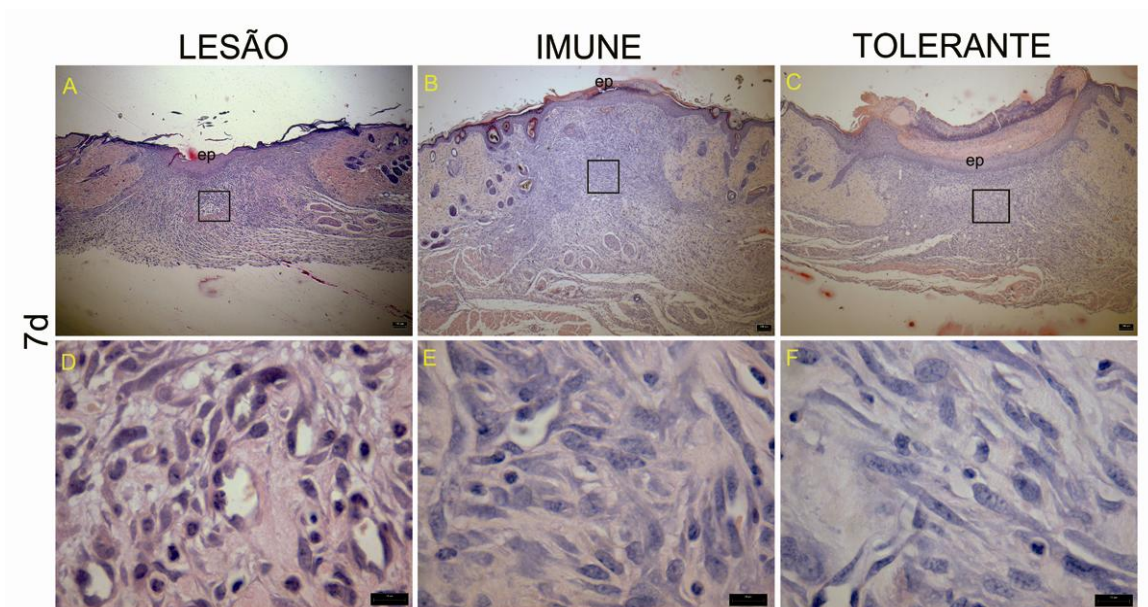


Fig. 8 - Análise histológica do processo de reparo 7 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos. Em A, B e C a área está reepitelizada e somente o grupo tolerante apresenta crosta grossa. Em D, E e F aumento mostrando tecido de granulação. A, B, e C fotos em aumento 40X, escala da barra: 100µm e D, E e F fotos em aumento de 100x , escala da barra: 10 µm após coloração em HE. Letras indicam ep, epitélio recém formado.

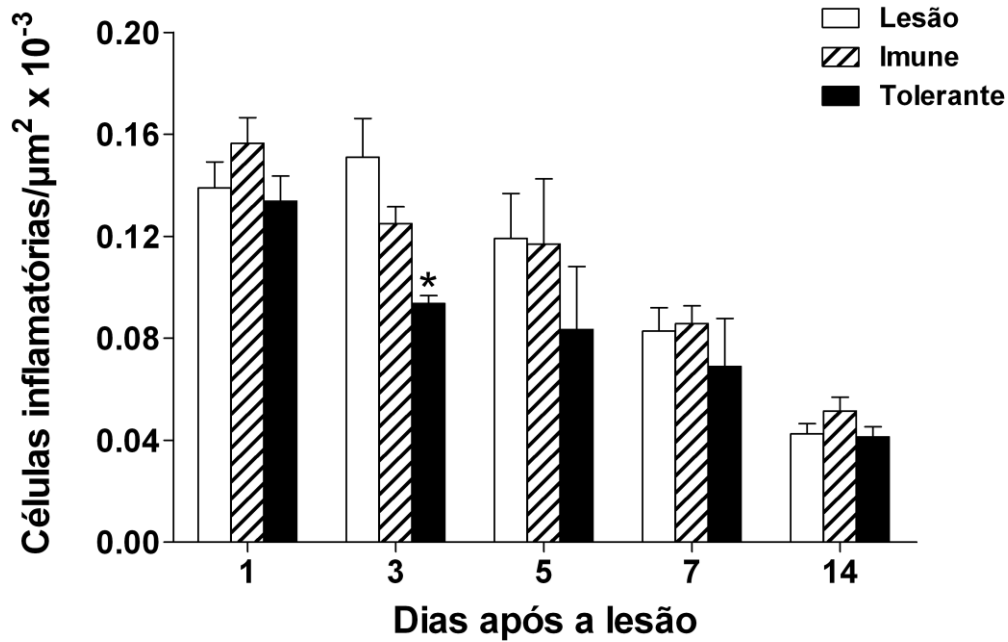
4.3 Análise quantitativa do infiltrado inflamatório na área da lesão após imunização com proteína tolerada

Para quantificar as células presentes na área da lesão foi feita uma análise morfométrica do número de células inflamatórias e fibroblastos. Desta forma, 10 áreas de 100 micrometros quadrados foram contadas na área da lesão. As áreas contadas foram sempre três áreas abaixo do epitélio, três áreas no meio da lesão (região da derme) e quatro áreas abaixo desta área e nas laterais.

O infiltrado inflamatório local foi contado do primeiro ao décimo quarto dia (Fig. 9A). Diferenças estatísticas na quantidade de células inflamatórias foram notadas somente no terceiro dia após a lesão: o infiltrado estava reduzido no grupo Tolerante quando comparado com o grupo Lesão.

O número de fibroblastos no dia 1 (Fig. 9B) é menor no grupo Tolerante quando comparado com o grupo Imune enquanto que o Imune apresentou mais fibroblastos que o grupo Lesão. Já no dia 3, o grupo Tolerante apresenta menor quantidade de fibroblastos quando comparado com o grupo Imune e não há diferença entre os grupos Imune e Lesão. E após 7 dias tanto o grupo Tolerante quanto o Imune apresentam menor quantidade de fibroblastos quando comparados com o grupo Lesão.

A Quantidade de células inflamatórias na área da lesão



B Quantidade de fibroblastos na área da lesão

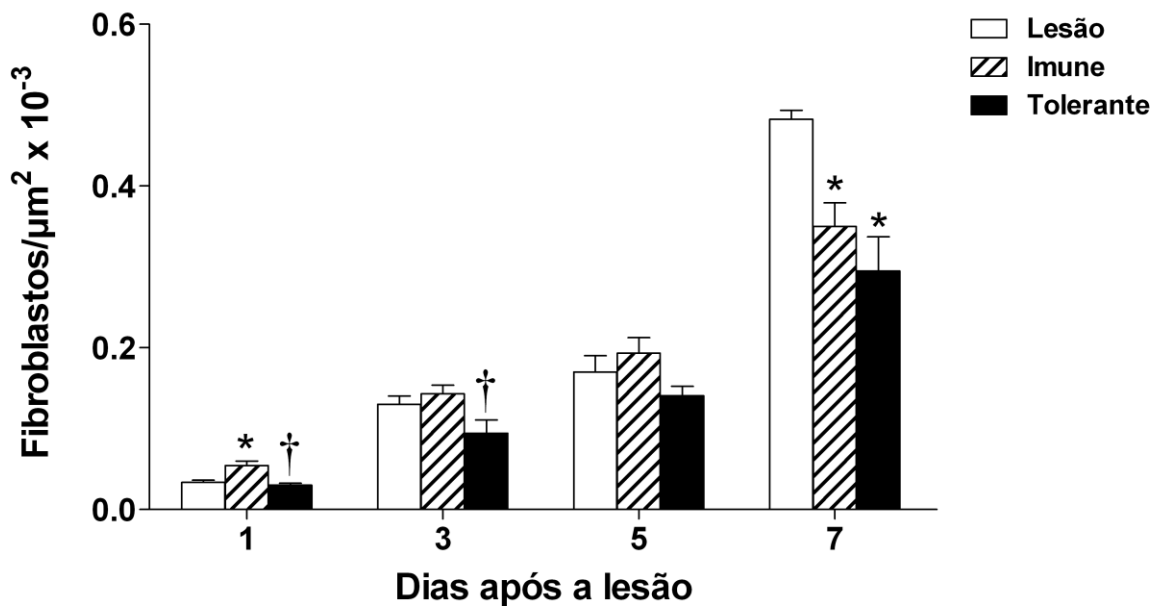


Fig. 9 – Número de células inflamatórias e fibroblastos por micrômetro quadrado presentes na área da lesão. (A) Células inflamatórias por $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$, (B) fibroblastos $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$. Barras abertas: injeção i.p. de salina + lesão, barras hachuradas: imunizados i.p. com 1,6mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ + 10 μg OVA, barra preta: : previamente tolerizados com OVA e imunizados i.p. com 1,6mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ + 10 μg OVA. Asterisco representa diferença significativa comparado com grupo lesão no mesmo dia e cruz representa diferença significativa comparado com o grupo imune no mesmo dia ($p \leq 0,05$)

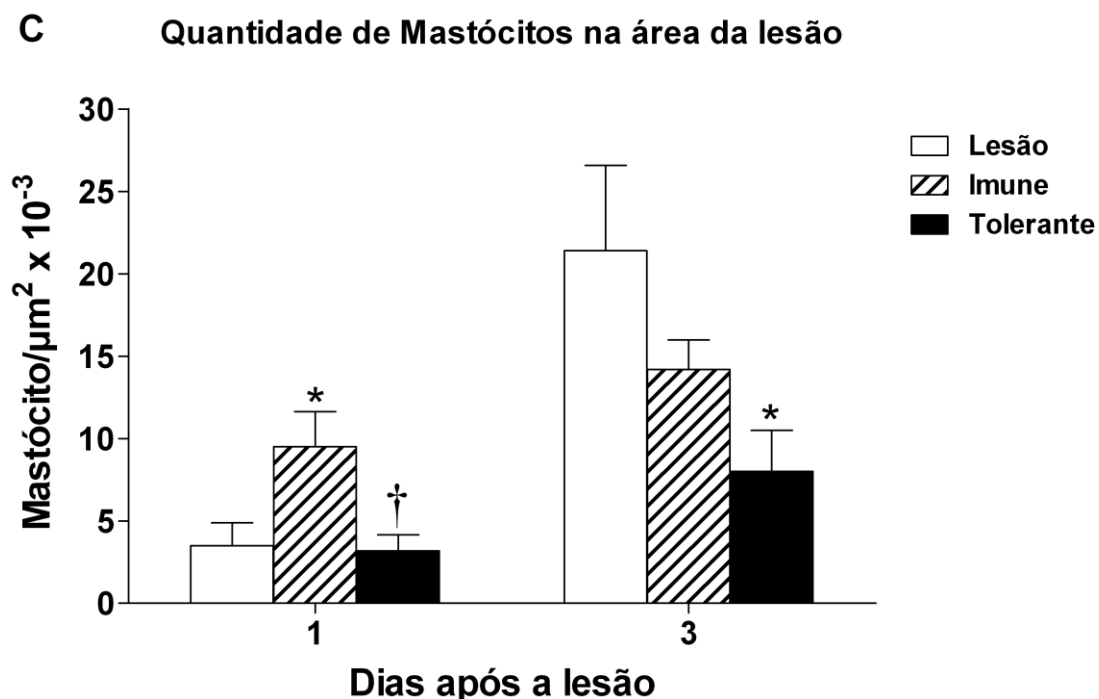


Fig. 10 – Número de mastócitos por micrômetro quadrado presentes na área da lesão. Barras abertas: injeção i.p de salina + lesão, barras hachuradas: imunizados i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ + 10 μg OVA, barra preta: : previamente tolerizados com OVA e imunizados i.p. com 1,6mg Al(OH)₃ + 10 μg OVA. Asterisco representa diferença significativa comparado com grupo lesão no mesmo dia e cruz representa diferença significativa comparado com o grupo imune no mesmo dia ($p \leq 0.05$)

Analizamos também de forma quantitativa se os mastócitos (Fig. 10) se encontram reduzidos no grupo Tolerante. Para tanto os tecidos com 1 e 3 dias foram corados com Azul de Toluidina e utilizou-se a mesma técnica de contagem descrita anteriormente.

No primeiro dia de lesão, o grupo Tolerante apresenta poucos mastócitos na área da lesão quando comparado com o grupo Imune (Fig. 10 e 11). E este apresenta mais mastócitos que o grupo Lesão. No terceiro dia somente o grupo Tolerante apresenta menos mastócitos quando comparado com o grupo Lesão (Fig. 10 e 11).

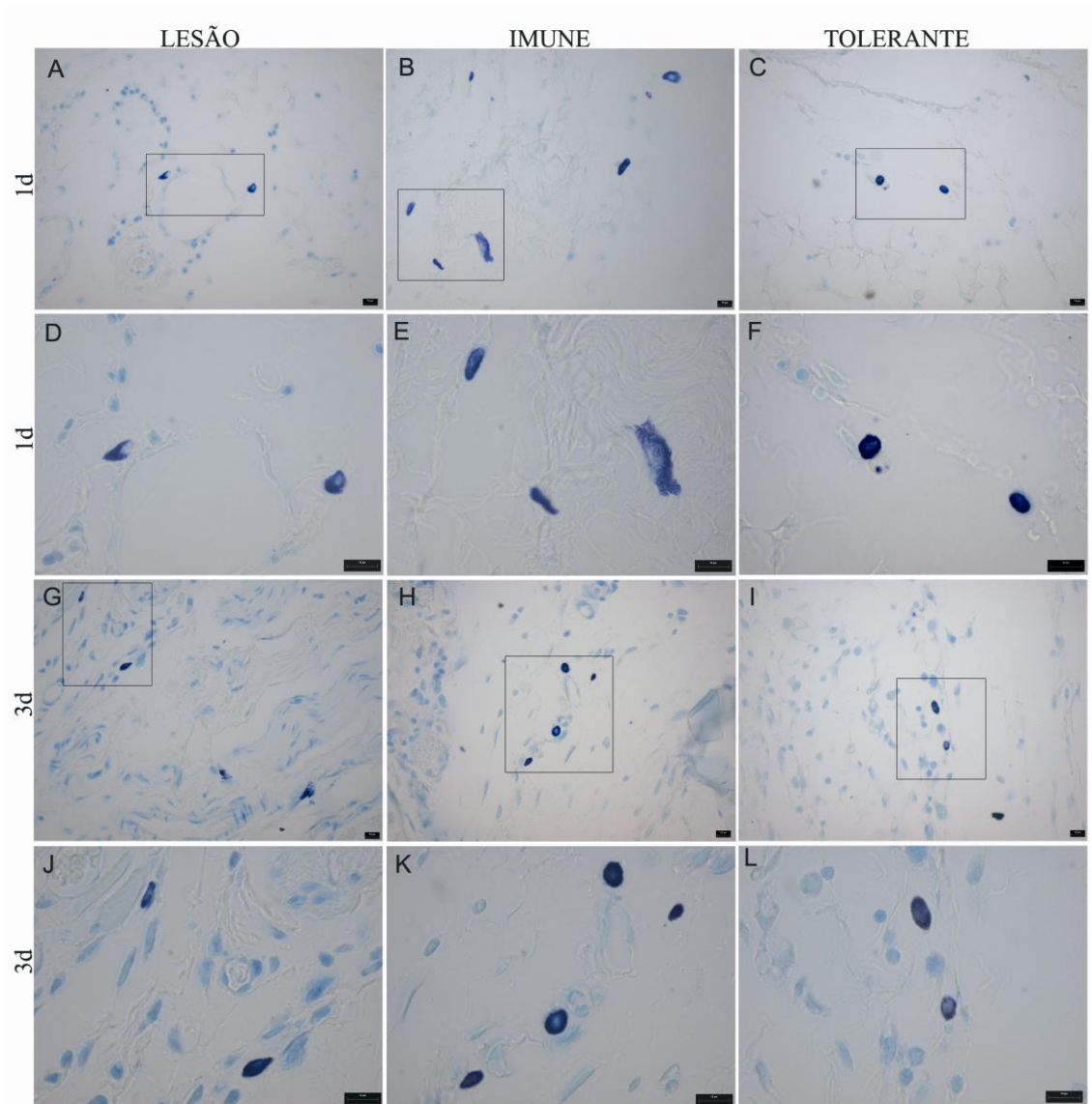


Fig. 11 - Imagem da área da lesão mostrando presença de mastócitos. O tecido foi corado com Azul de Toluidina para verificar a presença de mastócitos na área da lesão. Em A, B, C, G, H e I foto feita com objetiva de 40x – escala da barra: 10µm. O quadrado mostra onde foi feita foto com objetiva de 100x, figuras D, E, F, J, K e L – escala da barra: 10µm.

Em seu conjunto, estes achados mostram que os efeitos indiretos da tolerância oral interferem na migração das células inflamatórias para o local da lesão e, paralelamente, há melhoras no processo de reparo e cicatrização das lesões.

Realizamos outras análises do infiltrado inflamatório presente na área da lesão por imunofluorescência com anticorpos anti-granulócito, linfócitos T e miofibroblasto. Os resultados foram obtidos por análise da intensidade de fluorescência/ μm^2 da forma como descrito em material e métodos.

Granulócito:

No primeiro dia após a lesão, a intensidade de fluorescência dos granulócitos na área da lesão foi igual em todos os grupos (Fig. 12A, Fig. 13). No terceiro dia, no entanto, o grupo Lesão apresentou um número mais elevado destas células em relação aos demais grupos (Fig. 12B, Fig. 13).

Linfócitos T:

A intensidade de fluorescência para linfócitos T (CD3+) também foi medida na área da lesão 5 dias após a ferida ter sido feita. O grupo Tolerante apresentou maior intensidade de fluorescência quando comparado com os demais grupos, inclusive maior que a pele intacta (Fig. 14 e Fig. 15).

Analizamos também a intensidade de fluorescência de linfócitos T CD4 e T CD8. A intensidade de fluorescência destas células não foi significativa e os resultados desta marcação não foram colocados aqui.

Miofibroblastos:

Analizamos também a intensidade de fluorescência de alfa-SMA (Fig. 16 e Fig. 17) presente na área da lesão no sétimo dia. A intensidade de fluorescência neste dia foi maior no grupo Lesão quando comparado com os demais grupos. A intensidade de alfa-SMA com 5 dias também foi medida, porém, mostrou-se muito fraca não sendo os dados apresentados aqui.

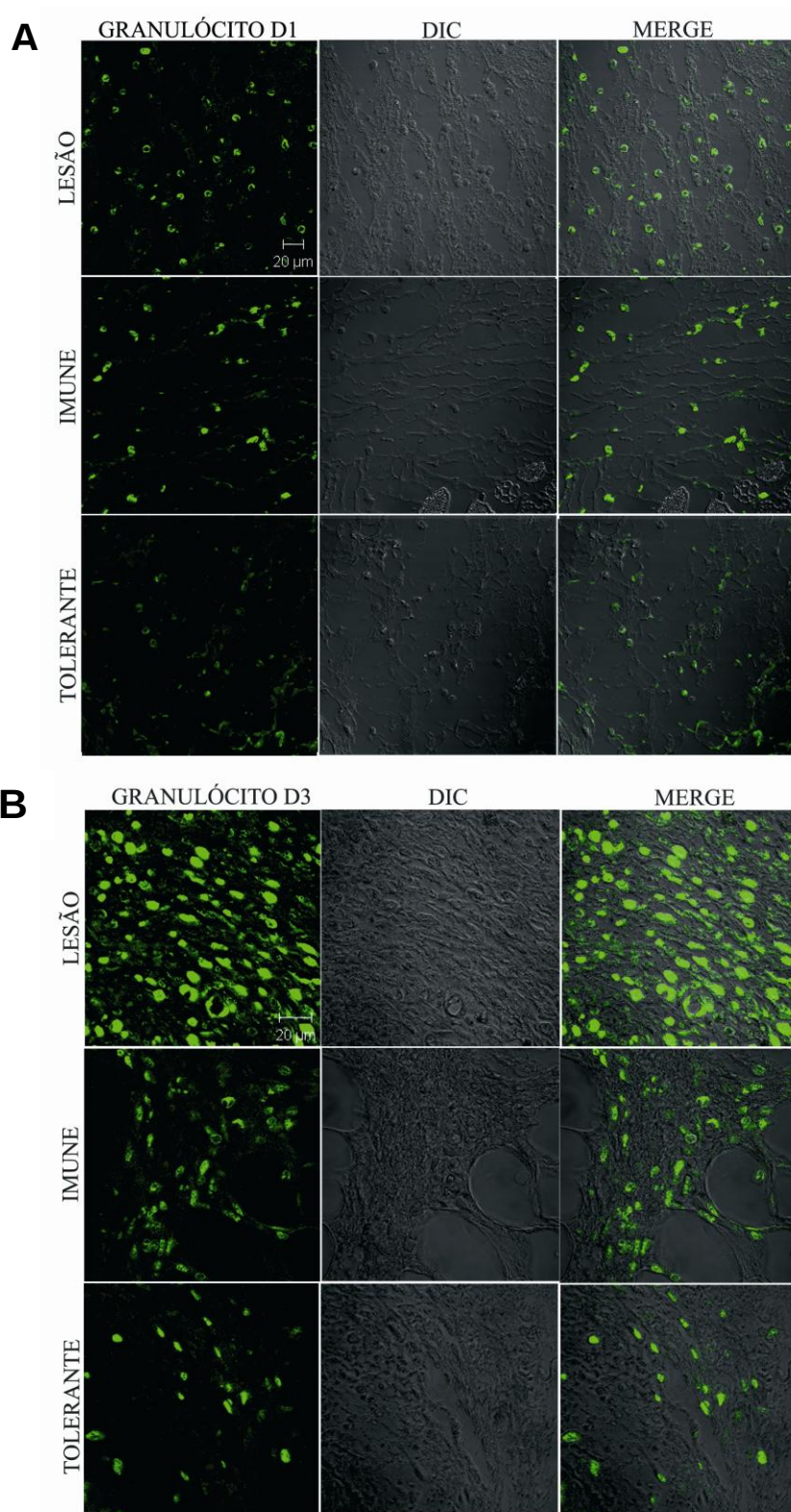


Fig. 12 – Marcação específica para granulócitos na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpo anti-Ly6C/G 1dia (em A) e 3 dias após a lesão (em B). Barra de escala: 20µm (todas as imagens possuem o mesmo aumento). Primeira coluna mostra as células marcadas com o anticorpo; segunda coluna: **DIC mostra a imagem do tecido sem a marcação** e terceira coluna: **MERGE mostra a sobreposição das imagens do DIC e da marcação.**

Intensidade de fluorescência de granulócitos na área da lesão

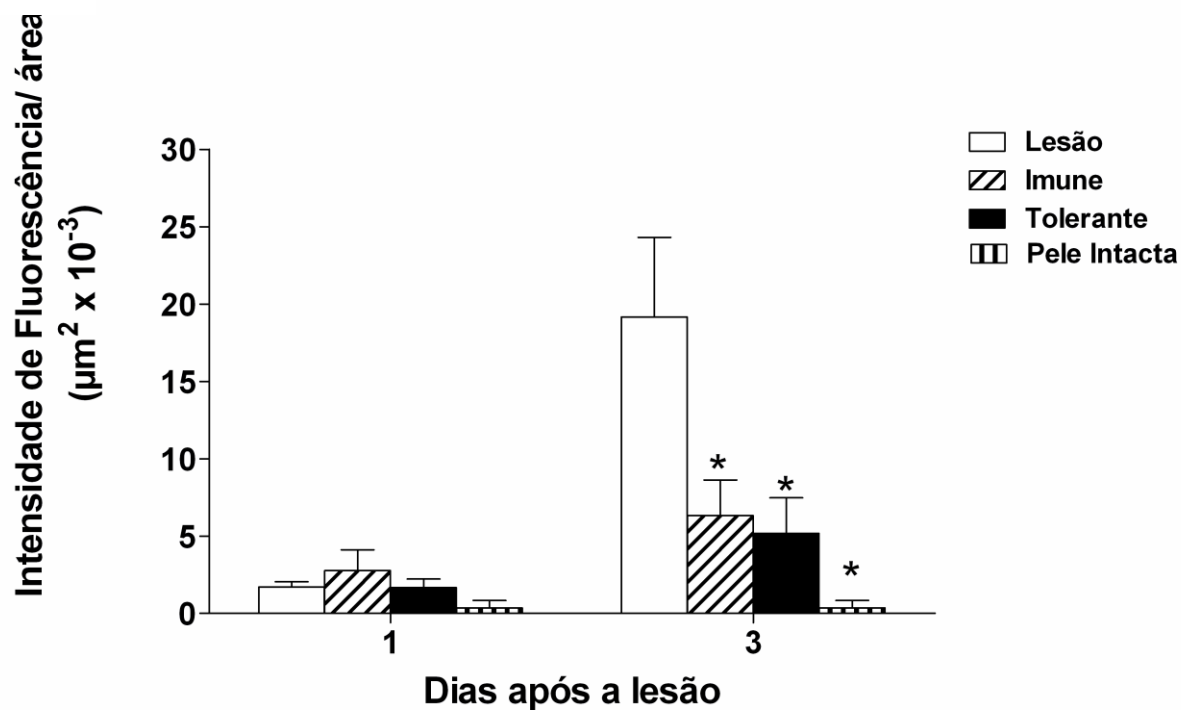


Fig. 13 – Avaliação do número de granulócitos na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpo anti-LyC/G. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência dos neutrófilos na área da lesão nos dia 1 e 3. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao grupo lesão no mesmo dia. ($p \leq 0,05$).

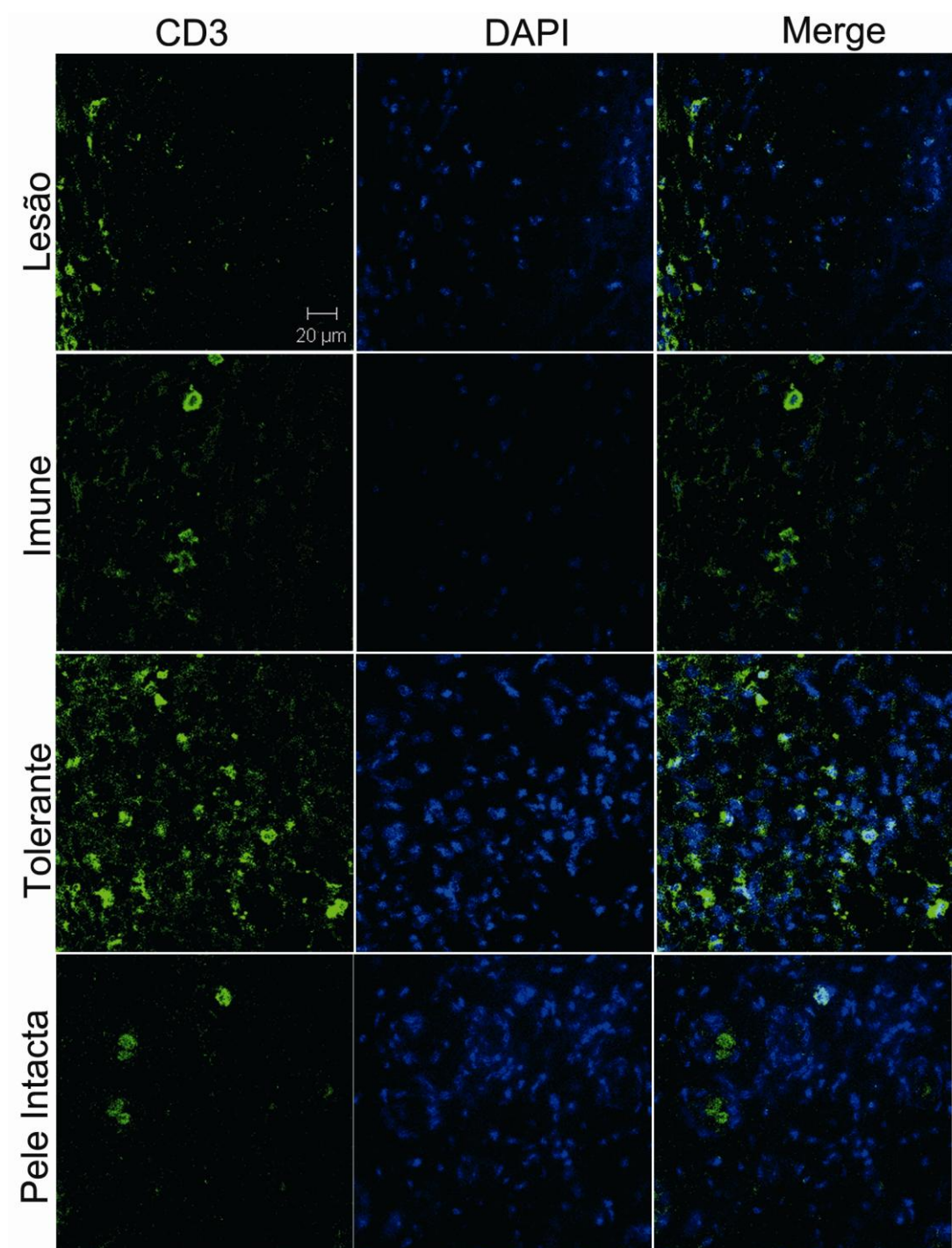


Fig. 14 – Marcação para linfócitos T na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpo anti-CD3, 5 dias após a lesão. Barra de escala: 20μm (todas as imagens possuem o mesmo aumento). Primeira coluna mostra linfócitos marcados com anticorpo, segunda coluna : DAPI mostra o núcleo das células presentes na mesma área da 1ª coluna (marcação específica para núcleo) e terceira coluna: MERGE mostra a sobreposição destas outras imagens.

Intensidade de Fluorescência de linfócitos T 5 dias após a lesão

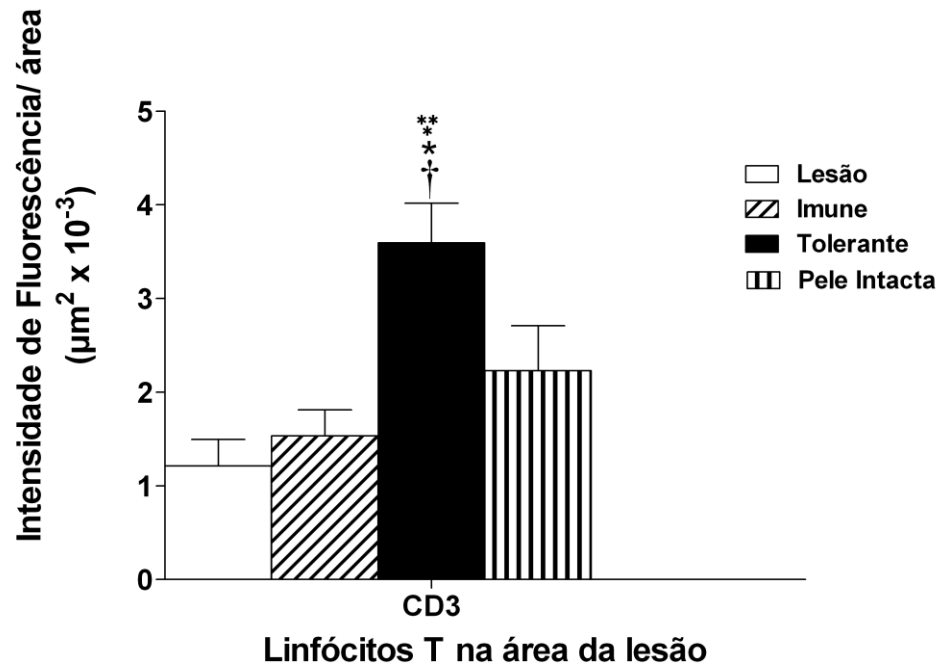


Fig. 15 – Avaliação do número de linfócitos T na área da lesão. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência dos linfócitos T na área da lesão. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao grupo lesão, cruz diferença em relação ao grupo imune e três pontos em relação à pele intacta. ($p \leq 0,05$).

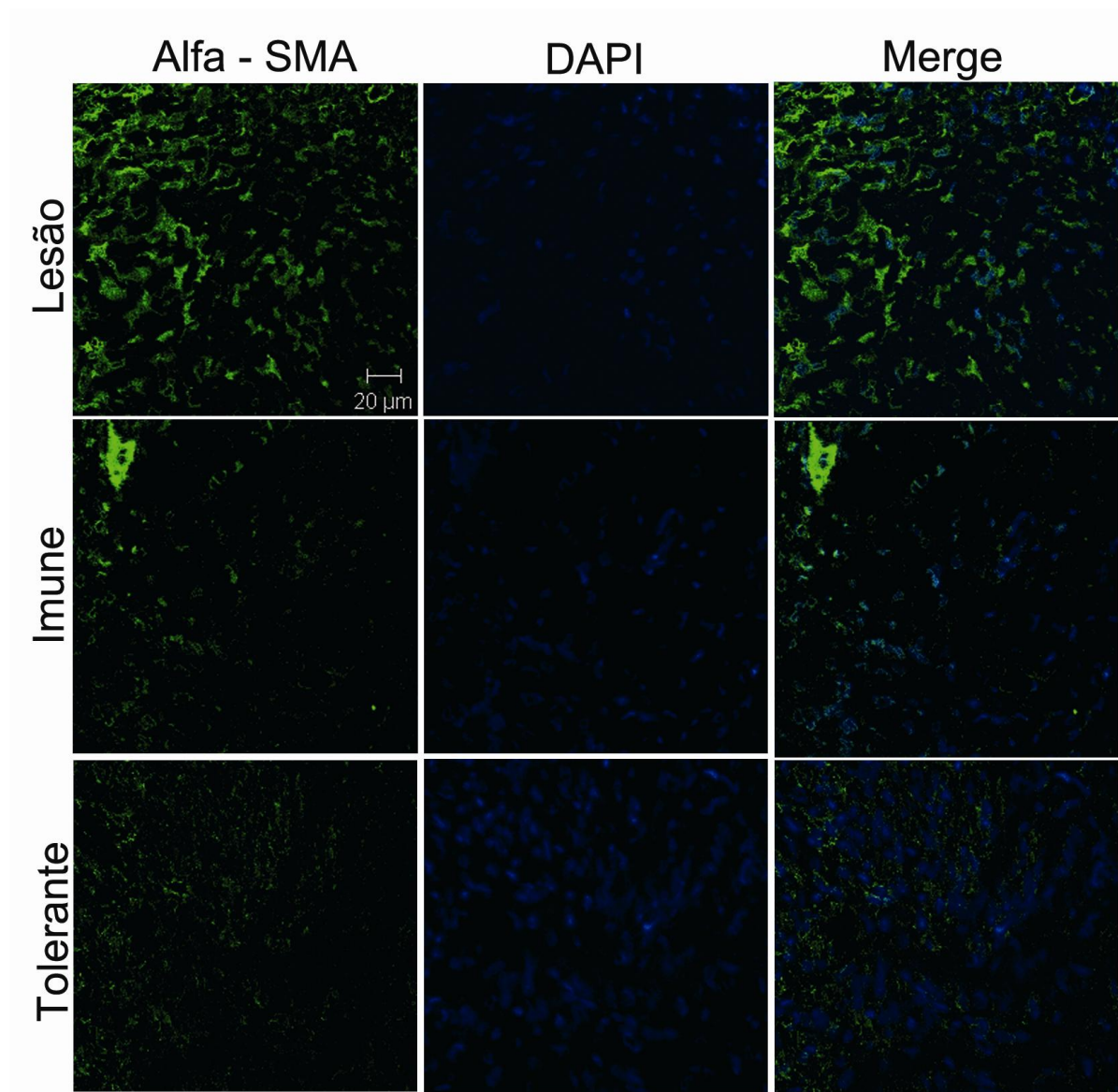


Fig. 16 – Marcação de miofibroblastos (alfa-SMA+) na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpo anti-alfa – SMA, 7 dias após a lesão. Barra de escala: 20μm (todas as imagens possuem o mesmo aumento). Primeira coluna mostra miofibroblastos marcados com anticorpo, segunda coluna : DAPI mostra o núcleo das células presentes na mesma área da 1ª coluna (marcação específica para núcleo) e terceira coluna: MERGE mostra a sobreposição destas outras imagens.

Intensidade de Fluorescência de Alfa SMA na área da lesão com 7 dias

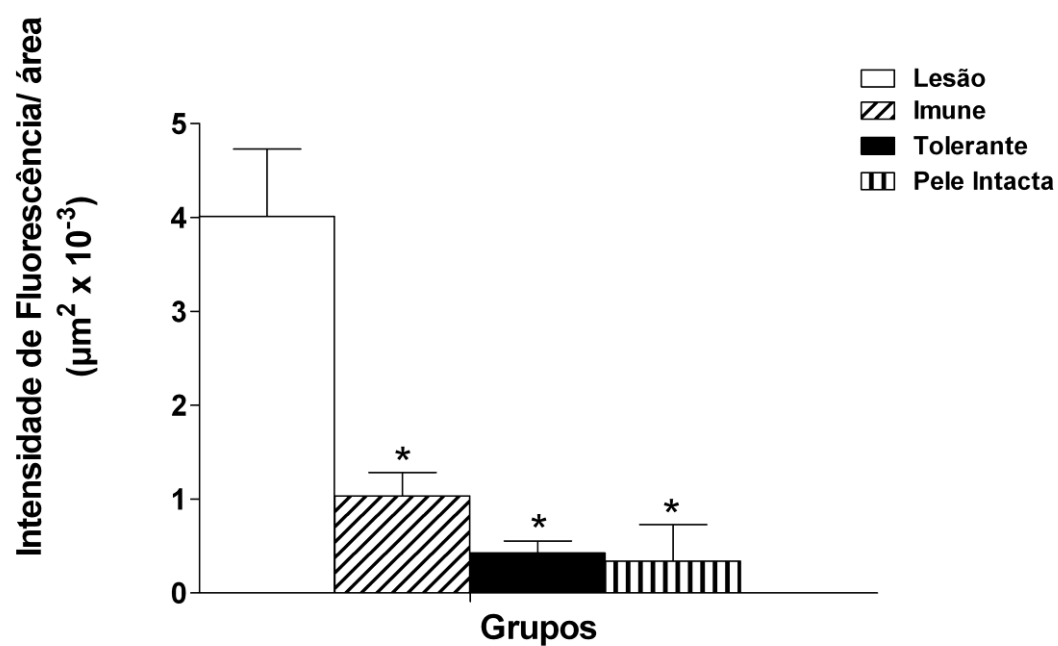


Fig. 17 – Avaliação do número de miofibroblastos (alfa-SMA+) na área da lesão. O gráfico mostra a intensidade de fluorescências de miofibroblastos presentes na área da lesão. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao grupo lesão. ($p \leq 0,05$).

4.4 Análise da matriz depositada na área da lesão durante o processo de reparo das feridas excisionais após imunização com proteína tolerada

Para analisar o processo de reparo e deposição de matriz extracelular na área da lesão em camundongos e avaliar se a imunização com uma proteína tolerada altera a deposição de colágeno e melhora o processo de reparo da ferida comparamos os tecidos dos grupos mencionados anteriormente através de análises histológicas e de imunofluorescência após a marcação da matriz extracelular depositada na área da lesão.

Os tecidos foram coletados após 14 e 40 dias após a lesão, fixados, incluídos em parafina e analisados após coloração em Tricromático de Gomori. Já a inclusão em paraplast para posterior marcação de imunofluorescência com anticorpos específicos foi feita somente com tecidos coletados com 40 dias.

Aos 14 dias após a lesão (Fig. 18 A-F) o tecido de todos os grupos encontra-se reepitelizado com epitélio fino e sem crosta. No grupo Tolerante, a matriz extracelular depositada na área da lesão é densa e bem parecida com a matriz presente na pele intacta ao redor da lesão enquanto que no grupo Lesão a matriz depositada na área da lesão é frouxa. Além disso, no grupo Tolerante é possível observar que o reparo se deu de forma homogênea e a lesão está nivelada com a pele normal, enquanto que a área da lesão do grupo Lesão encontra-se em uma depressão.

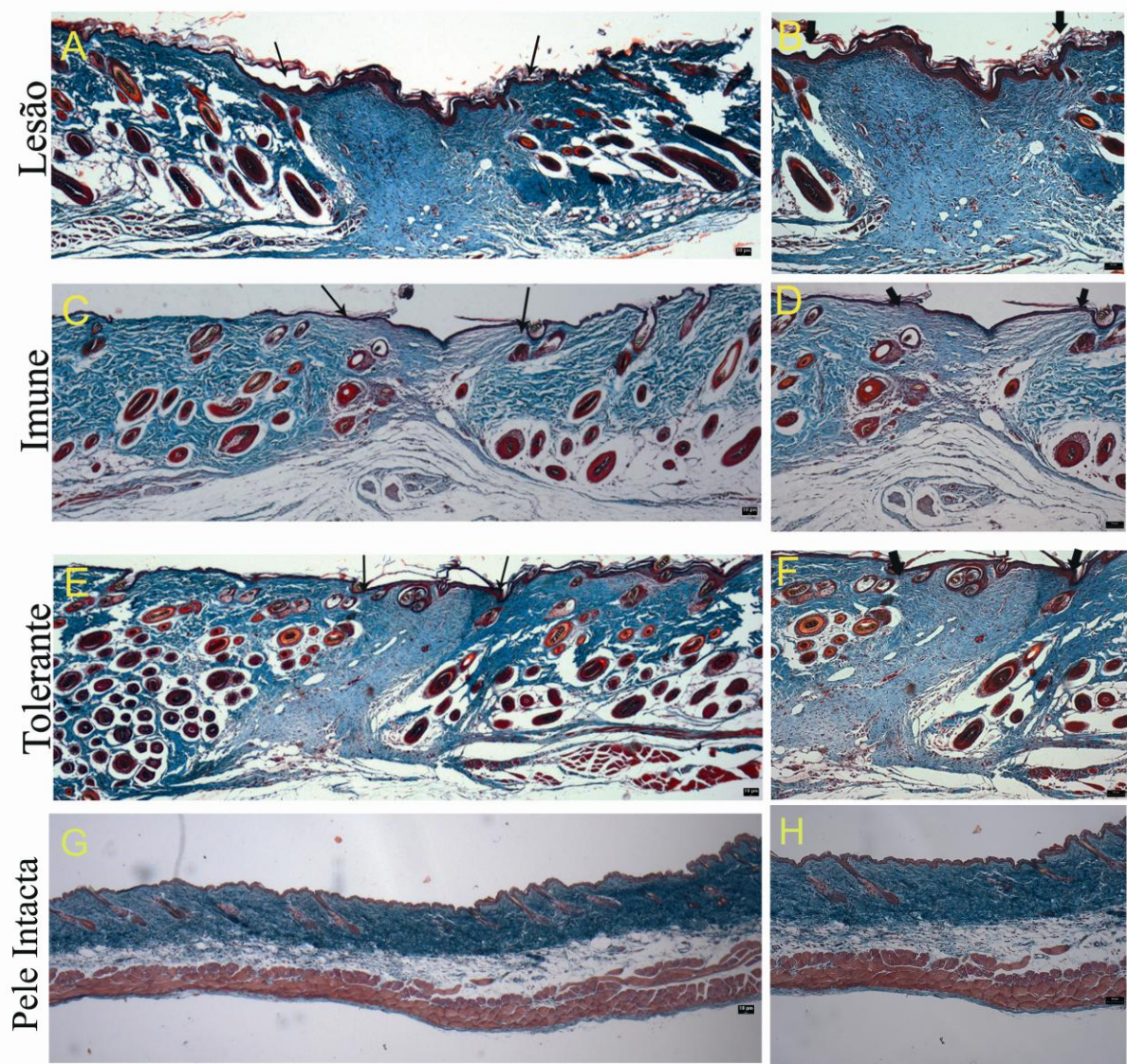


Fig. 18 - Melhora do reparo da lesão pelos efeitos indiretos da tolerância oral. Matriz depositada na área da lesão após 14 dias. A, C e E: aumento das fotos de 40x, escala da barra: 10µm; setas indicam a área da lesão. Área da lesão ampliada em **B, D e F:** aumento das fotos 100x, escala da barra: 50µm. Setas grossas indicam a área da lesão. A matriz depositada na área da lesão é mais uniforme e menos compacta em **F** quando comparada com **B**. O epitélio em **F** apresenta menor deformidade quando comparado com **B e D**. Coloração de tricromático de Gomori. Em **G**, pele intacta, aumento 40x, escala de barra 10 µm; em **H** foto em maior aumento da pele intacta, aumento de 100x e escala de barra 50 µm;

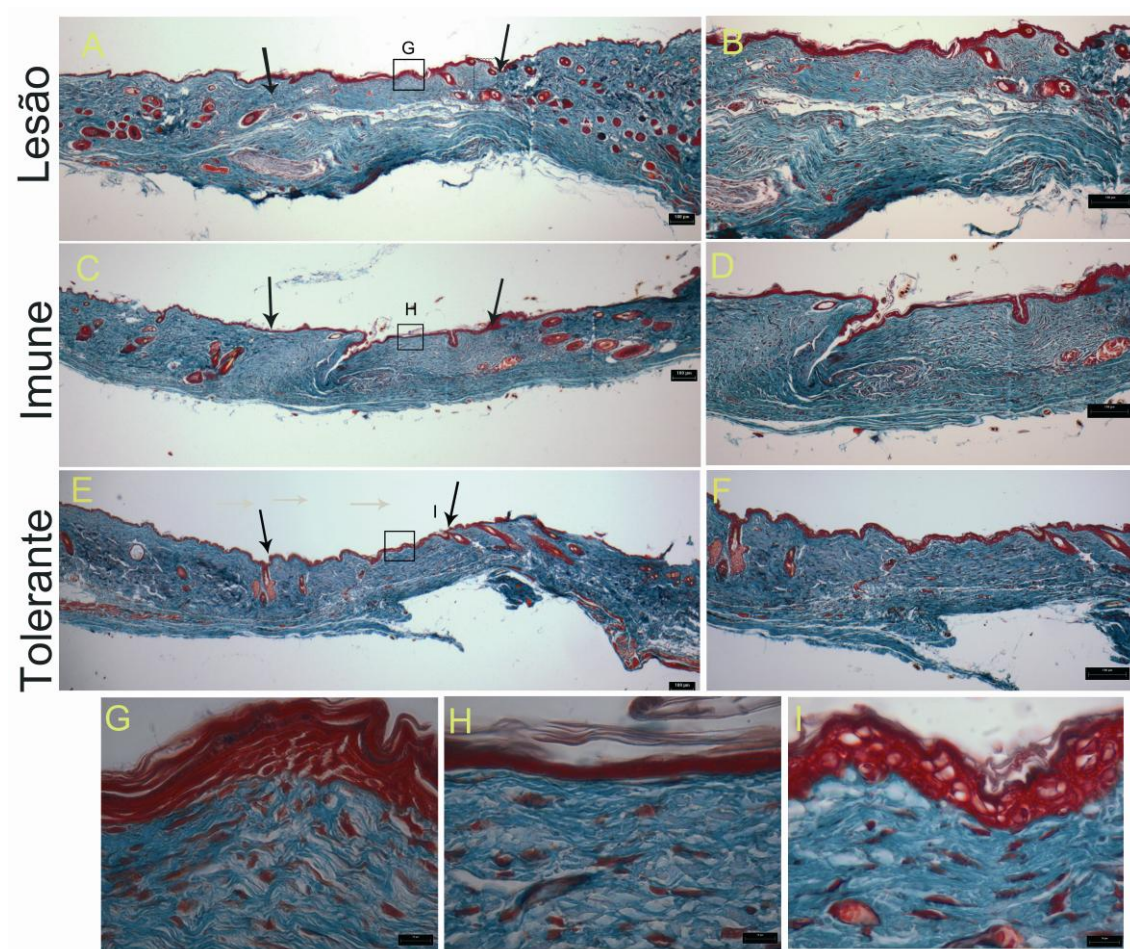


Fig. 19 - Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram a deposição de matriz na área da lesão após 40 dias. A, C e E : aumento das fotos de 40X, escala da barra = 100µm; setas indicam a área da lesão. Área da lesão ampliada em **B, D e F :** aumento das fotos: 100X, escala da barra: 100µm. A disposição das fibras é semelhante à de uma pele normal no grupo tolerante (**E e F**). Em **G (Lesão), H (Imune) e I (Tolerante)** aumento de 1000x na região do epitélio neoformado, escala da barra: 10 µm. É possível observar em **I** várias camadas do epitélio. Coloração com tricromático de Gomori.

Após 40 dias de lesão (Fig. 19) o epitélio está formado em todos os grupos com uma espessura normal, mas, o epitélio formado na área da lesão dos animais do grupo Tolerante encontra-se com camadas (Fig. 19 G-I).

Ainda com 40 dias, em todos os grupos há uma grande quantidade de células na área da lesão o que sugere que a matriz ainda não está totalmente formada e que seu processo de deposição e remodelamento não está terminado. No grupo Lesão, a matriz está compactada e achatada com fibras alongadas e finas, enquanto que no grupo Tolerante a matriz, apesar de menos densa, apresenta fibras mais espessas e a sua organização é semelhante à da pele intacta.

Utilizamos também a técnica de imunofluorescência para fazer a diferenciação dos tipos de colágenos presentes na matriz depositada na área da lesão e, assim, melhor estudarmos e entendermos o processo de reparo na área da lesão. Realizamos marcações com anticorpos anti-colágeno I (Fig. 20 e Fig. 22) e anti-colágeno III (Fig. 21 e Fig. 22), pois estes são os principais tipos de colágenos presentes na pele e sua deposição ocorre em momentos e formas distintos durante o processo de reparo.

Os resultados foram obtidos através de intensidade de fluorescência por μm^2 como descrito anteriormente. A intensidade de fluorescência para colágeno I na área de reparo não foi diferente entre os grupos (Fig. 20 e Fig. 22). É possível, porém, notar diferenças na disposição, alinhamento e espessura das fibras quando comparado os animais do grupo Tolerante com os do grupo Lesão - o que já havia sido observado com a coloração de Tricromático de Gomori.

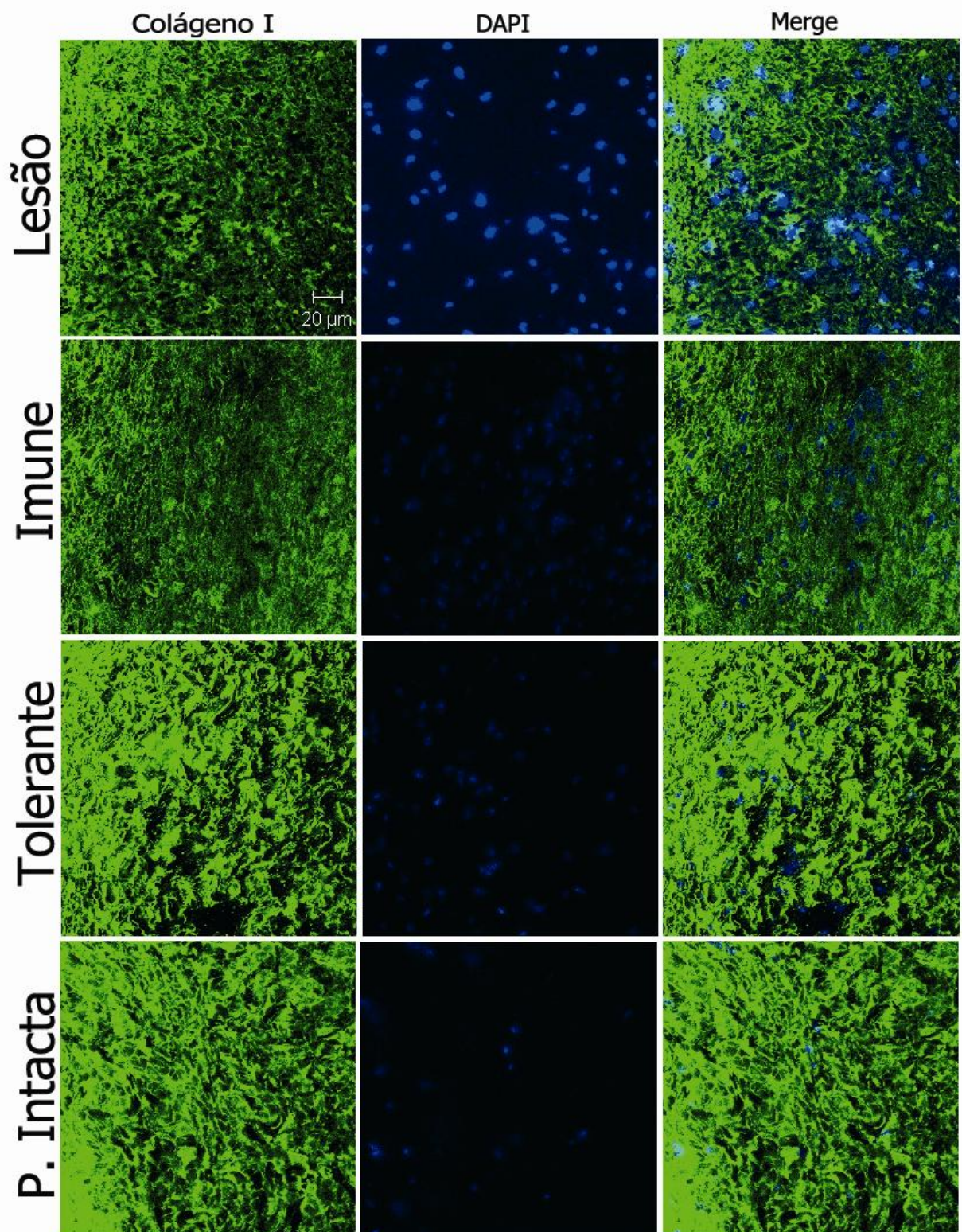


Fig. 20 – Efeitos indiretos da tolerância oral alteram o padrão de deposição das fibras de colágeno I depositadas na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpos anti-colágeno I. Escala da barra das imagens: 20μm (todas as imagens possuem o mesmo aumento). Primeira coluna mostra colágeno I marcado com anticorpo, segunda coluna : DAPI mostra o núcleo das células presentes na mesma área da 1ª coluna (marcação específica para núcleo) e terceira coluna: MERGE mostra a sobreposição destas outras

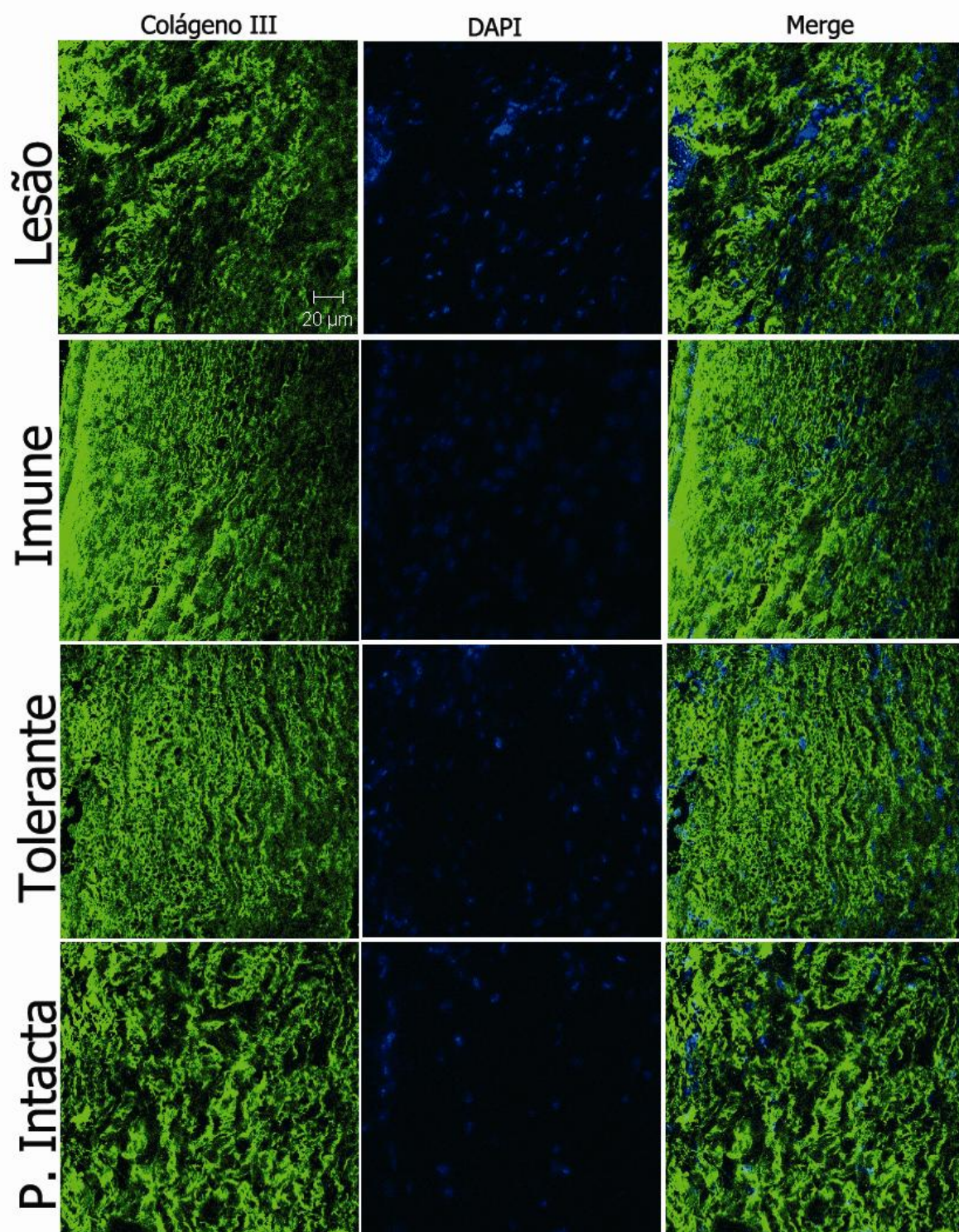


Fig. 21 – Efeitos indiretos da tolerância oral alteram o padrão de deposição das fibras de colágeno III na área da lesão. Imunofluorescência com anticorpos anti-colágeno III. Escala da barra das imagens: 20μm (todas as imagens possuem o mesmo aumento). Primeira coluna mostra colágeno III marcado com anticorpo, segunda coluna : DAPI mostra o núcleo das células presentes na mesma área da 1ª coluna (marcação específica para núcleo) e terceira coluna: MERGE mostra a sobreposição destas outras imagens.

Intensidade de Fluorescência colágeno na área da lesão

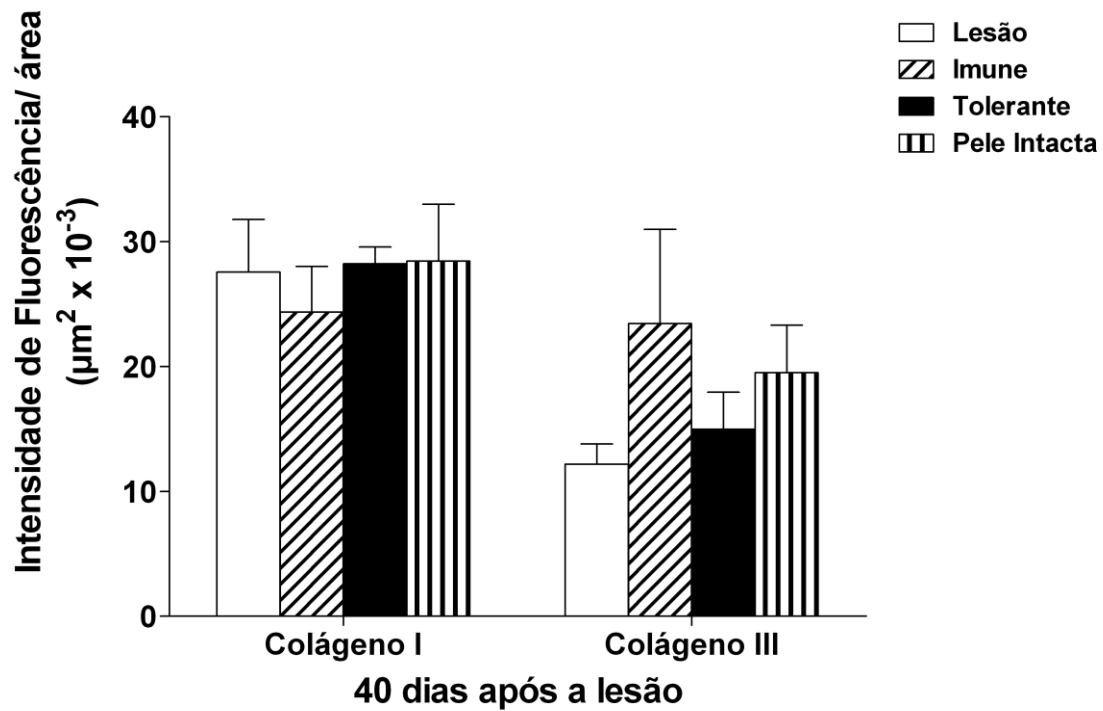
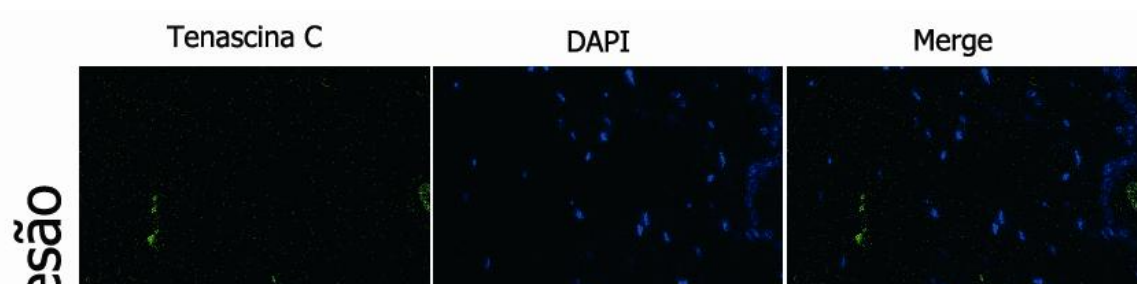


Fig. 22 – Os efeitos indiretos da tolerância oral não interferem na intensidade de fluorescência das fibras de colágeno I e III depositadas na área da lesão. Gráfico representa a intensidade de fluorescência de colágeno I e III medidos na área da lesão 40 dias após a ferida. Gráfico referente às imagens de colágeno I e III. Não há diferença entre os grupos.



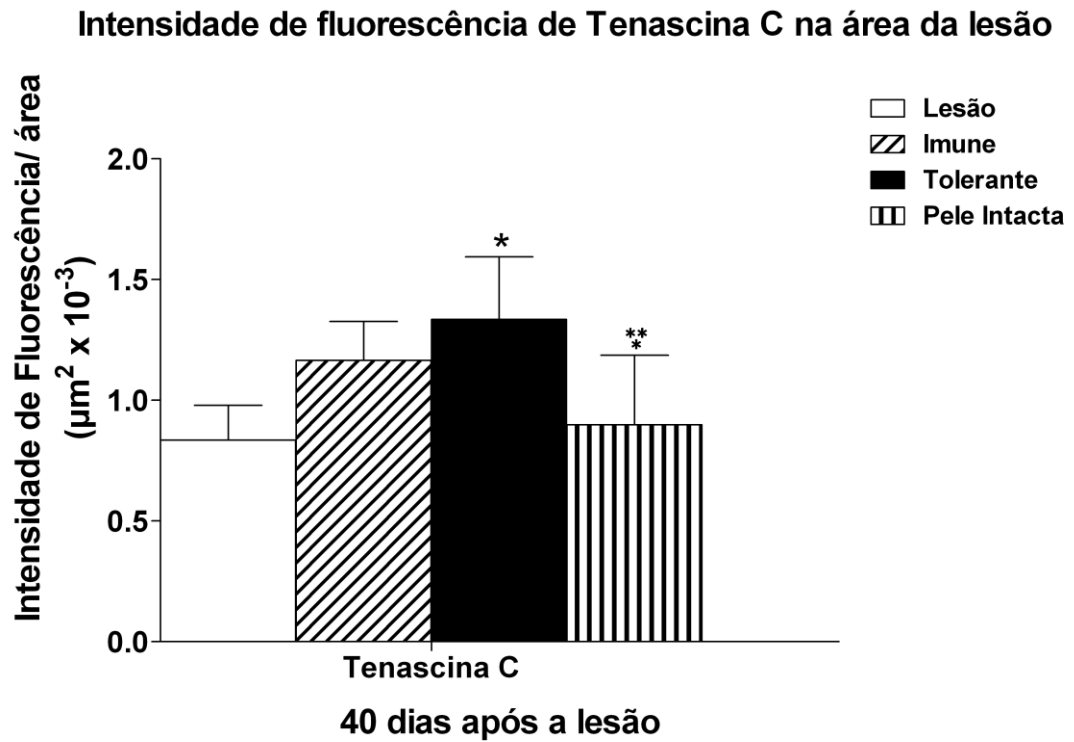


Fig. 24 – Os efeitos indiretos da tolerância oral interferem na deposição de Tenascina C na área da lesão. Avaliação da intensidade de fluorescência de tenascina C marcada na área da lesão após 40 dias. Asterisco representa diferença significativa em comparação com o grupo lesão e três pontos diferença da pele intacta em comparação com o grupo tolerante. ($p \leq 0,05$).

A intensidade de fluorescência de colágeno III (Fig. 21 e Fig. 22) é também semelhante entre os grupos e a disposição destas fibras na área da lesão do grupo Tolerante é semelhante à do grupo imune e diferente da Pele Intacta.

Fizemos também a marcação com anticorpo anti-tenascina-C uma vez que esta é uma proteína de matriz que pode influenciar a adesão, diferenciação, crescimento e migração celular, além de estar presente em tecidos que se regeneram.

Os animais do grupo Tolerante apresentam maior intensidade de Tenascina-C (Fig. 23 e Fig. 24) em relação ao grupo Lesão e também em relação à Pele Intacta. Mostrando que a matriz destes animais, possivelmente, ainda se encontra em fase de remodelamento.

5 DISCUSSÃO

Explicar as diferenças na capacidade regenerativa entre os animais tem sido um desafio para todos os cientistas desta área. Por exemplo, a capacidade de regenerar diversos tecidos e partes do corpo está presente em anfíbios urodelos enquanto que os anuros só a possuem antes da metamorfose (Harty et al., 2003; Nescher and Neff, 2004). Para Mescher e Neff (2004) isto pode ser explicado como aspecto da filogênese e ontogênese do sistema imune uma vez que existem diferenças significativas na atividade imunológica dos anuros e urodelos, como exemplo, a rejeição de enxertos. Apesar de importante na defesa anti-infecciosa o processo inflamatório, em excesso, pode ser prejudicial para o reparo de lesões aos tecidos e, uma possível causa da fibrose excessiva no local da lesão (Mory et al., 2008).

A fase inicial do processo de reparo das lesões é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias que produzem e secretam inúmeros fatores que por sua vez, recrutam mais células inflamatórias para o local lesado. A importância de diferentes tipos de células inflamatórias no processo de fechamento e reparo da lesão ainda não está bem definida uma vez que a inflamação é importante para o processo de "limpeza" da área lesada e importante para o início do processo de reparo propriamente dito, mas a inflamação excessiva pode atrasar o fechamento da lesão e gerar uma cicatriz maior (Martin, 1997; Ferguson & O'Kane, 2004; Eming, 2007a). Vários estudos mostram que a eliminação de um ou mais tipo de células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos e plaquetas, não impede o fechamento das lesões de pele e em alguns casos resulta em cicatrizes menores (revisto por Martin e Leibovich 2005).

Em experimentos com camundongos knockdown para osteopontin, uma glicoproteína relacionada com a matriz óssea mas que também ocorre em locais inflamados, Mori et al. (2008) observaram que feridas excisionais nestes animais se fecham mais depressa nos primeiros dias de reparo, indicando que um processo inflamatório menos intenso no local da lesão, beneficia o processo de reparo.

Em nosso laboratório, mostramos anteriormente a possibilidade de interferir na resposta inflamatória pela exposição parenteral a antígenos aos quais se induziu previamente a tolerância oral (Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 2002; Rodrigues et al., 2006; Ramos et al., 2008). Em seguida, a mesma metodologia (exposição de animais tolerantes ao antígeno tolerado) foi utilizada em modelos de lesão incisional na pele de camundongos para analisar o efeito da diminuição do processo inflamatório na área da lesão sobre seu processo de fechamento e reparo. Observamos que os efeitos indiretos da imunização com a proteína tolerada melhoram o reparo das lesões incisionais, que cicatrizam por primeira intenção, com redução da cicatriz e melhora na deposição de colágeno no local da lesão (Costa et al, 2011). No presente trabalho, avaliamos se o mesmo ocorreria com feridas excisionais na pele do dorso de camundongos, cujo processo de cicatrização se dá por segunda intenção. Os resultados apresentados aqui corroboram com achados anteriores que mostram que a imunização parenteral com a proteína previamente tolerada diminui o processo inflamatório desencadeado por antígenos não especificamente relacionado (Carvalho et al, 2002; Rodrigues et al, 2005; Ramos et al, 2008; Costa et al, 2011;).

A ferida excisional, com cicatrização por segunda intenção, passa por um processo de reparo diferente do observado na ferida incisional. Por ser maior e não ter as bordas aproximadas o fechamento requer a contração do próprio tecido lesado havendo, portanto, necessidade de maior proliferação celular, formação de tecido de granulação e deposição de matriz na área da lesão.

Os mastócitos estão entre as primeiras células a se aproximar da área da lesão uma vez que já estão presentes na derme e, possivelmente, interferem no reparo da lesão pelo recrutamento de neutrófilos (Egozi et al, 2003), na ativação de células endoteliais pela liberação de VEGF, na ativação dos fibroblastos e consequente deposição e remodelamento do colágeno depositado (Ng, 2010; Nishikori Y, 1998). Em experimentos com feridas na pele em camundongos deficientes de mastócitos, Egozi et al. (2003) mostraram que

a ausência de mastócitos interfere na migração de neutrófilos para o local da lesão nos primeiros dias de lesão. De acordo com Ng (2010), a presença de mastócitos na área de lesão tem sido relacionada com a formação de cicatrizes hipertróficas. Em nossos experimentos, os animais do grupo Tolerante mostravam menos mastócitos na área da lesão em ambos os dias analisados (1 e 3 dias, Fig. 10). Fizemos a análise quantitativa de granulócitos na área da lesão através da técnica de imunofluorescência e observamos que os animais do grupo Tolerante apresentavam menor intensidade de fluorescência para estas células por mm^2 na área da lesão no dia 3 (Fig. 12B e Fig. 13). Tal resultado vem ao encontro dos achados por Egozi et al. (2003), que sugeriram que a redução do número de mastócitos na lesão reduz ativação de células endoteliais resultando, temporariamente, em uma menor migração de neutrófilos para o local. Assim podemos inferir que os granulócitos de modo geral também encontram-se reduzidos na área da lesão.

Com 5 dias observamos a presença de muitos vasos sanguíneos no grupo Tolerante (Fig. 7C). Martin et al. (2003) também verificaram o aumento da vascularização do tecido no local da lesão nos animais com menor processo inflamatório. Isto sugere que a inflamação em demasia é prejudicial à angiogênese. Diferente de nossos dados, no entanto, Martin et al. (2003) utilizaram marcadores para angiogênese, enquanto que nosso achado a esse respeito é somente morfológico.

Embora o número de células inflamatórias seja menor nos animais Tolerantes, com 7 dias após a lesão pôde-se observar o tecido de granulação bem formado, porém, menos celularizado neste grupo (Fig. 8 letra C). O grupo Tolerante apresentou também menor quantidade de fibroblastos na área da lesão desde o início do processo de reparo (Fig. 9B). Para identificar miofibroblastos fizemos também a análise da intensidade de fluorescência de α -SMA na área da lesão após 7 dias (Fig. 16 e Fig. 17). Os miofibroblastos, células que se diferenciam no tecido conjuntivo quando este sofre algum tipo de trauma, possuem características de fibroblastos, mas apresentam em seu citoplasma grande quantidade de actina e miosina de musculatura lisa o que lhes confere a capacidade contrátil importante para o fechamento da lesão

(Junqueira, 9ª edição, pp 81). Animais do grupo Tolerante apresentaram menor intensidade de fluorescência para alfa-SMA indicando poucos miofibroblastos e sugerindo que o processo de contração da ferida neste grupo não ocorre como nos outros grupos. No entanto, foi também possível observar que o grupo Tolerante apresentou fechamento da área da lesão maior que o grupo Lesão até o quinto dia após a lesão (Fig. 5) sugerindo que o grupo Tolerante apresenta processo de contração mais rápido. Além disso, foi observado que o epitélio formado no grupo Tolerante era mais parecido ao da pele intacta tanto com 14 dias após a lesão como com 40.

A análise macroscópica da lesão também mostra diferenças significativas entre os grupos. A crosta formada na área da lesão do grupo Tolerante era mais delgada mostrando que houve menor deposição de fibrina para sua formação (Fig. 5 C e F); além disso, no dia 3 após a lesão não se encontrava edemaciada como a dos demais grupos (Fig. 6C) e não apresentava áreas necrosadas e edemaciadas ao redor da lesão como ocorreu nos grupos Lesão e Imune. A injeção de OVA+Al(OH)₃ em animais não tolerantes (grupo Imune) também apresenta efeitos no processo de reparo. Nos animais imunes o fechamento da lesão também é maior. No entanto, os aspectos macroscópicos e microscópicos são diferentes e a deposição das fibras de colágeno nos animais Tolerantes é mais semelhante ao da pele intacta, resultando em uma cicatriz menor. De acordo com Ng (2010), a presença de mastócitos na área de lesão pode estar relacionada com a formação de cicatrizes hipertróficas. Em nossos experimentos, os animais imunes apresentaram um maior número de mastócitos no primeiro dia após a lesão, o que poderia estar relacionado com as diferenças na deposição de matriz extracelular entre os animais Imunes e Tolerantes.

Depois de observada uma melhora qualitativa evidente nos animais do grupo Tolerante fizemos uma análise quantitativa por imunofluorescência das fibras de colágeno I e III existentes na área da lesão (Fig. 20, 21 e 22). Durante o processo de reparo, primeiramente, há a deposição de fibras de colágeno III e está passa por processo de remodelamento e em seu lugar é depositado colágeno I. As fibras de colágeno III são fibras mais finas quando comparadas

às de colágeno I e portanto não confere ao tecido a rigidez necessária para a formação da pele. Já a fibra de colágeno III por apresentar uma estrutura mais espessa é responsável por esta rigidez e firmeza.

Apesar de não haver diferença significativa na intensidade de fluorescência destas fibras de colágeno I entre os diferentes grupos (Fig. 22) foi possível observar que elas apresentam-se, no animal do grupo Tolerante, depositadas de maneira semelhante às mesmas fibras da pele intacta no que se diz respeito a sua deposição, espessura e organização (Fig. 20).

Ao analisarmos as fibras de colágeno III presentes na área da lesão o que encontramos foi que não havia diferenças estatísticas na sua intensidade entre os grupos (Fig. 22). Já a deposição e espessura são diferentes da pele intacta, o que nos mostra que o tecido presente na área da lesão encontra-se em fase de remodelamento (Fig. 21).

Fizemos ainda a marcação específica com anticorpo anti-Tenascina C, outra proteína que é componente da matriz extracelular e está presente nos locais onde há migração ou proliferação celular durante o reparo de lesões e também durante a embriogênese. Sendo também encontrada em maior quantidade na pele de animais que regeneram, do que nos que não o fazem. Além disso ela é uma proteína capaz de prevenir a contração prematura de matriz e permite a deposição adequada de colágeno (Clarck, 1996). Em nossos resultados, a Tenascina C estava presente em todos os grupos e em maior quantidade no grupo Tolerante, aos 40 dias após a lesão (Fig. 23 e Fig. 24). Neste dia (Fig. 19), também em todos os grupos havia muitas células no local da lesão. Estas características sugerem, mais uma vez, que o tecido ainda esteja em fase de remodelamento.

Apesar da matriz depositada na área da lesão no grupo Tolerante e o epitélio formado serem semelhantes aos da pele intacta (Fig. 19 G, H e I) não observamos de forma clara a ocorrência de regeneração de músculo e folículos pilosos embora estas estruturas tenham sido observadas em alguns animais do grupo Tolerante. Não podemos, no entanto, afirmar que houve regeneração

genuína destas estruturas uma vez que não estudamos especificamente a miogênese e a foliculogênese .

De acordo com Ito et al. (2007), a regeneração de folículos é possível em feridas excisionais de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro (Chuong 2007). Como nossas feridas tinham o diâmetro de 6,5 mm (0,65 cm) estas estruturas poderiam se formar. No entanto, nossos resultados são similares aos encontrados por Mori et al. (2008) que observaram uma melhora na deposição de colágeno na área da lesão do grupo sem Osteopontin aos 14 dias após lesão não visualizando, como nós, a formação dos anexos da pele.

Em resumo, nossos resultados demonstram que a imunização com proteína para qual o animal é previamente tornado tolerante, melhora o reparo de lesões excisionais na pele e reduz a cicatriz formada.

A literatura imunológica recente destaca influências da imunidade “inata”, por exemplo, a ação de macrófagos, sobre a imunidade dita “adaptativa” ou dependente de linfócitos. Nossas investigações sobre a exposição de animais tolerantes a antígenos tolerados seguem no sentido oposto, ou seja, mostram como a atividade específica de linfócitos pode afetar a inflamação, isto é, a imunidade “inata” e, através de tais efeitos, fenômenos básicos como a formação de granulomas e a cicatrização de feridas incisionais e excisionais.

Interessantemente, ao analisarmos a presença de linfócitos T (CD3+) encontrados na área da lesão verificamos que o grupo Tolerante apresentava maior quantidade destas células no 5º dia após a lesão (Fig. 14 e Fig. 15). No entanto, a marcação para linfócitos T CD4+ mostrou uma intensidade de fluorescência muito reduzida. Da mesma forma, a intensidade de fluorescência de linfócitos T CD8+ foi muito pequena quando comparada com a intensidade de marcação de células CD3+ embora o grupo Tolerante tenha apresentado uma menor intensidade de fluorescência CD8+. Estes estudos precisam ser confirmados, mas a princípio, sugerem que as células CD3+ detectadas podem ser linfócitos T $\gamma\delta$ e/ou NKT.

Linfócitos T $\gamma\delta$ compõem a maior parte da população de linfócitos T no tecido epitelial. Eles proliferam e produzem citocinas em resposta a lesões ou estresse em queratinócitos. Jameson et al. (2002) mostraram com ratos deficientes para linfócitos T $\gamma\delta$ que estas células são importantes para a proliferação de queratinócitos e para a reepitelização durante o processo de reparo. Agaiby et al. (1999) em experimentos com ratos Wistar, mostraram que linfócitos NKT estão presentes na área da lesão. Tais células são vistas desde as primeiras horas de injúria tendo o seu número elevado entre os dias 5 e 7 após a lesão. Em interação com os queratinócitos os linfócitos T podem ser importantes no processo de reparo e para a regeneração da epiderme. Enquanto os linfócitos T $\gamma\delta$ estão presentes no epitélio e podem ser ativados após a lesão dos queratinócitos, os linfócitos NKT são recrutados para a área da lesão mediante a liberação de fatores de atração produzidos pelos queratinócitos no momento de ruptura do epitélio.

Além do interesse teórico, por permitir a união de uma mesma área de investigação, as imunidades adaptativa e inata e, além disso, a cicatrização de feridas, a ampliação desta investigação inclui promessas de aplicação clínica e cirúrgica da maior importância.

6 CONCLUSÕES

- Os efeitos indiretos da imunização parenteral com uma proteína tolerada (Ovalbumina) :

- a) reduzem o infiltrado inflamatório na área da lesão excisional;
- b) apesar de reduzir o infiltrado inflamatório, eleva o número de células CD3+ (linfócitos T) na área da lesão;
- c) melhora o reparo e reduz a cicatriz formada pela deposição de uma matriz extracelular de estrutura mais similar à pele normal.

7 Referências Bibliográficas

AARABI S, LONGAKER MT, GURTNER GC (2007) **Hypertrophic Scar Formation Following Burns and Trauma: New Approaches to Treatment** *PLos Medicine* Vol 4 Issue 9 e234

AGAIBY AD AND DYSON M (1999) **Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound Healing** *J. Anat.* (1999) **195**, pp. 531±542.

ARMSTRONG JR AND FERGUSON MWJ (1995) **Ontogeny of skin and the transition from Scar-free to scarring phenotype during wound healing in the Pouch Young of a Marsupial, *Monodelphis domestica*.** *Developmental Biology* **169**, 242-260

CARVALHO CR, VERDOLIN BA, VAZ NM (1997) **Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed by Bystander Suppression.** *Scand J Immunol.* **45**, 276-281

CARVALHO CR, LENZI HL, CORREA-OLIVEIRA R AND VAZ NM (2002) **Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs.** *Braz J Med Biol Res* (35) **10**, 1195-1199

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

CHUONG C-M (2007) **New hair from healing wounds** *Nature* **447**, 265-266
Kinsey GS, Prendergast BJ, Nelson RJ (2002) **Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters** *Physiology and Behavior* **78**, 205-211

CLARCK RAF (1996) **The molecular and cellular biology of wound repair.** 2^o Edition

COSTA RA, RUIZ-DE-SOUZA V, AZEVEDO-JR GM, GAVA E, KITTEN GT, VAZ NM, CARVALHO CR (2011) **Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin.** *Wound Repair and Regeneration*, Jun 7. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00700.x.

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

CRIVELLATO E AND RIBATTI D (2005) **Involvement of mast cell in angiogenesis and chronic inflammation.** *Current Drugs Targets – Inflammation and Allergy*, **4**, 9-11

EGOZI EI, FERREIRA AM, BURNS AL, GAMELLI RL, DIPIETRO LA (2003) **Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wound** *Wound Rep Reg* **11**, 46-54.

EMING AS, KRIEG T, DAVIDSON JM (2007) **Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanism.** *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 514–525

EIMING SA, WERNER S, BUGNON P, WICKENHAUSER C, SIEWE L, UTERMÖHLEN O, KRIEG T AND ROERS A (2007) **Accelerated wound closure in mice deficient for Interleukin-10.** *The American Journal of Pathology* Vol 170, No 1, 188-202

FARIA AMC AND WEINER HL (2006) **Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune disease.** *Clinical & Developmental Immunology*, 13(2-4): 143-157

FERGUSON MWJ AND O'KANE S (2004) **Scar-free healing: from embrionic mechanism to adult therapeutic intervention.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359, 839-850

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

HANSON DG, VAZ NM, RAWLINGS LA, LYNCH JM. (1979) **inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens II. Effects of Prior Passive and Active Immunization.** *The Journal Of Immunology*, 122, 2261-2269

HARTY M, NEFF AW, KING MW, MESCHER AL (2003) **Regeneration and scarring: An immunologic perspective.** *Developmental Dynamics*, 226, 268-278

ITO M, YANG Z, ANDI T ET AL. (2007) **Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult skin after wound.** *Nature*, 447, 316-320.

JAMESON J, UGARTE K, CHEN N, YACHI P, FUCHS E, BOISMENU R, HAVRAN WL (2002) **A Role for Skin gd T Cells in Wound Repair** *Science* 296, 747.

JUNQUEIRA E CARNEIRO, **Histologia Básica**, 9ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. , 1999. N° pp: 427

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

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

MANN A, NIEKSCH K, SCHIRMACHER P AND BLESSING M (2006) **Granulocyt-macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing.** *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* Vol 11, 87-92

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

MARTIN P AND FENG Y (2009) **Wound healing in zebrafish.** *Nature*, **459**, 921-922

MARTIN P AND LEIBOVICH SJ (2005) **Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly.** *Trends in Biology Cells*, Vol **15**, No 11, 599-607

MARTIN P, D'SOUZA D, MARTIN J, GROSE R, COOPER L, MAKI R AND MCKERCHER SR (2003) **Wound healing in PU.1 null mouse – Tissue repair is not dependent on inflammatory cells.** *Current Biology*, **13**, 1122-1128

MENDONÇA JR E COUTINHO-NETO J (2009) **Aspectos celulares da cicatrização.** *An Bras Dermatol*, **84** (3):257-62.

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

MESCHER AL, NEFF AW (2004) **Loss of regenerative capacity: A trade-off for immune specificity?** *Cellscience Review* Vol **1** No.2, 1-7

MILLER A, LIDER O, WEINER HL. (1991) **Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens.** *J Exp Med*. Oct 1;174(4):791–798.

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

NG MFY (2010) **The role of mast cell in wound healing** *Int Wound J* **7**, 55-61.

NISHIKORI Y, KAKIZOE E, KOBAYASHI Y, SHIMOURA K, OKUNISHI H, DEKIO S (1998) **Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of Chitinase** *Arch Dermatol Res* **290**, 553-560.

PERANTEAU WH, ZHANG L, MUVARAK N, BADILLO AT, RADU A, ZOLTICK PW, LIECHT KW (2008) **IL-10 Overexpression Decreases Inflammatory Mediators and Promotes Regenerative Healing in an Adult Model of Scar Formation.** *Journal of Investigative Dermatology*, **128**, 1852-1860

RAMOS GC, RODRIGUES CM, AZEVEDO JR GM, PINHO V, CARVALHO CR, VAZ NM (2008) **Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unespecific inflammation blocked by oral tolerance proteins.** *Immunology* **126**, 345-362

RODRIGUES CM, MARTINS-FILHO OA, VAZ NM, CARVALHO CR (2006) **Syztemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis.** *Immunology*, **177**, 517-525

STAPPENBEK TS AND MYIOSHI H (2009) **The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair.** *Science* **324**, 1666-1669

TSENG A.-S AND LEVIN M (2008) **Tail Regeneration in *Xenopus laevis* as a Model for Understanding Tissue Repair**, **87**, 806-816

VAZ NM, RAMOS GC, PORDEUS V, CARVALHO CR (2006) **The conservative physiology of the immune sistem. A non-methaphoric approach to immunological activity.** *Clynical and developmental Immunology* **13(2-4)**, 133-142

WANG X-J, HAN G, OWENS P, SIDDIQUI Y AND LI AG (2006) **Role of TGF- β -Mediated inflammation in cutaneous wound healing.** *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **11**, 112-117