

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JERANICE SILVA BARBOSA

Atuação da rP21 no reparo cutâneo de camundongos Balb/C

UBERLÂNDIA
2018

JERANICE SILVA BARBOSA

Atuação da rP21 no reparo cutâneo de camundongos Balb/C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Dr^a. Tatiana Carla Tomiosso
Co-orientador: Dr. Claudio Vieira da Silva

UBERLÂNDIA
2018

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B238 Barbosa, Jeranice Silva, 1982-
2018 Atuação da rP21 no reparo cutâneo de camundongos Balb/C
[recurso eletrônico] / Jeranice Silva Barbosa. - 2018.

Orientadora: Tatiana Carla Tomiosso.

Coorientador: Claudio Vieira da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.204>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Tomiosso, Tatiana Carla ,1978-, (Orient.). II. Silva,
Claudio Vieira da,1972-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 004/2018 do PPGBC

Data: **06 de Abril de 2018**

Discente: **Jeranice Silva Barbosa**

Matrícula nº 11522BCE005

Título do Trabalho: "**Atuação da rP21 no reparo cutâneo de camundongos Balb/C**"

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

Projeto de Pesquisa vinculado:

Às nove horas do dia seis de abril do ano de 2018 no Auditório do Bloco 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Flávia de Paoli – UFJF; Tales Faleiros Nascimento Júnior – UFU e Tatiana Carla Tomiosso orientadora da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso - apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Jeranice Silva Barbosa** Aprovada. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho:

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 20 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Flávia de Paoli

Profa. Dra. Flávia de Paoli
UFJF

Tales Faleiros

Prof. Dr. Tales Faleiros Nascimento Júnior
UFU

Tatiana C Tomiosso

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso - **Orientadora**
UFU

Dedico este trabalho a Mateus, meu companheiro e parceiro,
à Daiane, irmã e maior incentivadora, e minha orientadora
Prof.^a Dr.^a Tatiana, que me acolheu, dando-me a oportunidade
de realizar este trabalho.

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Tatiana Carla Tomiosso pela oportunidade, credibilidade, apoio e compreensão nesse momento crucial, em que pleiteei o título de mestre e o de mãe. Os dois juntos não seriam possíveis sem seu apoio e suporte.

Ao professor e co-orientador Claudio, gostaria de agradecer por compartilhar os frutos de muitas pesquisas e pela credibilidade em dar sequência aos estudos já realizados por seus alunos.

A todos os alunos do LATRI, gostaria de agradecer imensamente as inúmeras vezes que me apoiaram, tirando dúvidas, ajudando na síntese da proteína ou mesmo acompanhando em um café.

Gostaria de agradecer em especial a Flávia Alves Martins e a Francielle, pela imensa ajuda e apoio, pelo compartilhamento de conhecimento, pelos momentos de descontração e de boas risadas, tão importantes para aliviar as tensões do dia a dia.

Aos funcionários e alunos da histologia e microscopia, sempre solícitos nas nossas necessidades diárias e dúvidas inerentes ao uso do setor.

Aos professores Alberto, Fernanda e Daniela, que contribuíram com conhecimento, empréstimo de equipamento, aquisição de reagentes e na solução de problemas para a conclusão deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, Elusca, Zé e Bruno, gostaria de agradecer pelo companheirismo e por aguentarem meu jeito enjoado.

A minha irmã Daiane Silva Barbosa, pelas discussões, por aquele apoio de sempre em mais esse desafio, você sempre será meu esteio, a pessoa a quem ligar nas mais diversas situações. E a recíproca é e sempre será verdadeira.

Ao meu marido Mateus Moreira de Carvalho, por seu estranho apoio e por ser meu maior crítico. Você sempre me desafia a fazer as coisas, ao mesmo tempo em que me apoia, me cobra, me dá suporte e se alegra comigo. Obrigada por tentar me fazer ser sempre uma pessoa melhor.

A minha Vó Benedita (*in memoriam*) e meus tios e minha mãe (*in memoriam*) que me ensinaram que para crescer e adquirir qualquer coisa, antes temos que almejar conhecimento.

RESUMO

A busca por novos produtos que possam otimizar o processo de reparo, ou mesmo suprir deficiências cicatriciais inerentes de certos indivíduos, vem motivando diversos estudos e a criação de protocolos para tratar os diferentes tipos de ferimentos. No presente trabalho, a rP21 foi testada, pois possui perfil pró-inflamatório atuando no recrutamento de células do sistema imune, no citoesqueleto celular induzindo a polimerização, além de atuar na angiogênese. Com o objetivo de verificar a atuação dessa proteína no reparo tecidual, foram utilizados 48 camundongos machos, da linhagem Balb/C, divididos em quatro grupos de tratamento e dois grupos controle, após foi utilizado rP21 purificada e incorporada a gel de carbopol, de modo que cada lesão fosse tratada com 1 e 50 µg da proteína durante três e sete dias. Em seguida, os animais foram eutanasiados e as regiões de lesões cutâneas coletadas para análises histológicas e bioquímicas. Nossos resultados demonstraram que a rP21 foi capaz de melhorar o recrutamento de mastócitos e macrófagos, melhorou também o recrutamento de neutrófilos após três dias de tratamento e após sete dias as atividades dessa última célula foram diminuídas. Com relação a angiogênese, foi observado perfil anti angiogenico da proteína. Os resultados demonstram ainda uma maior deposição de colágenos dos tipos I e III. O aumento de colágeno reforça a resistência da matriz, promove a migração e proliferação de células, essenciais para a resolução da ferida. A rP21 se mostrou eficaz no reparo em feridas cutâneas, reduzindo a atividade de neutrófilo apresentando efeito anti-inflamatório, além de aumentar a deposição de colágeno total. A maior deposição de colágeno reforça e confere resistência a matriz, além de promover a migração e proliferação de células essenciais para a resolução da ferida. O fechamento de ferida foi avaliado por meio de medidas diárias do local, verificando-se que ela promoveu melhora no fechamento da área lesionada. Incluímos a partir dos dados obtidos que a proteína rP21 tem potencial terapêutico no reparo tecidual, merecendo estudos direcionados.

Palavras-Chaves: Reparo. Pele. P21 recombinante.

ABSTRACT

The search for new products that can optimize the repair process, or even address the inherent scar deficiencies of certain individuals, has motivated several studies and the creation of protocols to treat different types of injuries. In the present study, rP21 was tested because it has a proinflammatory profile acting in the recruitment of cells of the immune system, in the cellular cytoskeleton inducing polymerization, besides acting in angiogenesis. In order to verify the role of this protein in tissue repair, 48 male Balb / C mice were divided into four treatment groups and two control groups, after which purified rP21 was incorporated and carbopol gel was incorporated. Each lesion was treated with 1 and 50 μg of the protein for three and seven days. Then, the animals were euthanized and the skin lesion regions collected for histological and biochemical analysis. Our results demonstrated that rP21 was able to improve mast cell and macrophage recruitment improved neutrophil recruitment after three days of treatment and after seven days the activities of this last cell were decreased. Regarding angiogenesis, anti-angiogenic protein profile was observed. The results also show a greater deposition of collagen types I and III. Collagen augmentation enhances matrix resistance, promotes cell migration and proliferation, essential for wound resolution. RP21 was effective in repairing skin wounds, reducing neutrophil activity with anti-inflammatory effect and increasing total collagen deposition. Increased collagen deposition strengthens and confers matrix resistance, and promotes migration and proliferation of cells essential for wound resolution. Wound closure was assessed by daily site measurements, and it was found to improve wound closure. We include from the data obtained that the rP21 protein has therapeutic potential in tissue repair, deserving targeted studies.

Keywords: Repair. Skin. P21 recombinant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia da pele	16
Figura 2 - Camadas da epiderme	18
Figura 3 - Células da epiderme.....	19
Figura 4 - Componentes celulares dérmicos	22
Figura 5 - Fases do processo de cicatrização: Inflamação, proliferação e remodelação	23
Figura 6 - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis utilizando como detergente Sodium Dodecyl Sulfate (SDS Page) demonstrando a presença de proteína com peso molecular de 18 kDa.l. .	31
Figura 7 - Imagem ilustrativa da indução das feridas no dorso de camundongo	32
Figura 8 - Foto do animal no dia do sacrifício demonstrando a ferida destinada a histologia.	34
Figura 9 - Acompanhamento do fechamento de ferida	39
Figura 10 - Gráfico demonstrando o fechamento de ferida durante os sete dias de tratamento para o controle e nas concentrações de 1µg e 50µg.....	40
Figura 11 - Gráfico demonstrando a média de mastócitos corados com Azul de Toluidina por área nos tempos de três e sete dias no grupo controle e os tratamentos com a proteína rP21 nas concentrações de 1µg e 50µg	40
Figura 12 - Fotomicrografias demonstrando as áreas de lesões cutâneas coradas	41
Figura 13 - Gráfico demonstrando a atividade de macrófagos encontrados nos tempos três e sete dias para o grupo controle e as concentrações, 1µg e 50µg	42
Figura 14 - Gráfico demonstrando a atividade de neutrófilos nos tempos 3 e 7 dias para o controle e as concentrações de 1µg e 50µg	43
Figura 15 - Gráfico demonstrando a quantidade de hemoglobina nos tempos três e sete dias para controle e concentrações de 1µg e 50µg	44
Figura 16 - Gráfico demonstrando a quantidade de vasos nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg	44
Figura 17 - Fotomicrografias de amostras de tecido cutâneo ferido coradas com Tricômico de Gomori	45
Figura 18 - Gráfico demonstrando a quantidade de colágeno solúvel nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg.....	46

Figura 19 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno total nos tempos três e sete dias, para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg.....	47
Figura 20 - Imagens de lâminas de tecido cutâneo coradas com picrocilius red P.C visualizadas em microscópio sem polarização aumento de 20x ilustrando a deposição de colágeno total. .	47
Figura 21 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno tipo I nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg.....	48
Figura 22 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno tipo III nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg.....	49
Figura 23 - Imagens de lâminas de tecido cutâneo coradas com picrocilius red P.C visualizadas em microscópio de polarização com aumento de 20x	49
Tabela 1 - Desenho experimental do tratamento nas diferentes concentrações e tempo.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
µg	micrograma
µl	microlitro
CXCR4	receptor de quimiocina CXC tipo 4
AT	azul de Toluidina
EGF	fator de crescimento epidérmico
FGF	fator de crescimento dos fibroblastos
GAGs	glicosaminoglicanas
H.E	Hematoxilina e Eosina
KGF	fator de proliferação de queratinócitos
MEC	matriz extracelular
MMPs	metaloproteinases
MPO	mieloperoxidase
NAG	N-acetil-β-D glicosaminidase
P.C	picrosirius red
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PGC	proteoglicanos
PMN	polimorfonucleadas
RDC	resolução da Diretoria Colegiada
T.G	Tricômico de Gomori
TFG-β	fator transformador do crescimento beta
UV	ultravioleta
VCAM-1	molécula de adesão de células vascular
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
P21	proteína P21
rP21	proteína P21 recombinante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
4.1	Pele	16
4.2	Epiderme.....	16
4.3	Derme	19
4.4	Componentes celulares dérmicos	20
4.5	Hipoderme	22
4.6	Cicatrização de feridas.....	22
4.6.1	<i>Homeostase</i>	24
4.6.2	<i>Inflamação</i>	24
4.6.3	<i>Proliferação</i>	25
4.6.4	<i>Remodelação</i>	27
4.7	Proteína P21.....	28
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	Animais.....	30
5.2	Purificação da rP21.....	30
5.3	Obtenção do gel com p21	31
5.4	Procedimento cirúrgico e tratamento.....	32
5.5	Tratamento.....	33
5.6	Fechamento da ferida.....	33
5.7	Coleta das amostras	34

5.8	Avaliações histológicas e bioquímicas	35
5.8.1	<i>Avaliação morfológica</i>	35
5.8.2	<i>Conteúdo de hemoglobina</i>	35
5.8.3	<i>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	36
5.8.4	<i>Atividade da N- Acetil- β- D- Glicosaminidase (NAG)</i>	36
5.8.5	<i>Dosagem de colágeno solúvel</i>	37
5.9	Análise estatística	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Fechamento de ferida.....	39
6.2	Quantificação de mastócitos.....	40
6.3	Atividade de macrófagos pela dosagem de NAG.....	42
6.4	Avaliação da atividade de neutrófilos	42
6.5	Dosagem de hemoglobina	43
6.6	Quantidade de vasos sanguíneos	44
6.8	Colágeno total.....	46
6.9	Colágeno tipo I e III	48
7	DISCUSSÃO.....	50
8	CONCLUSÃO.....	55
	REFERENCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A integridade da pele bem como a manutenção da homeostase, são vitais ao organismo, por isso a importância da restauração dos mesmos após uma injúria (LUCAS et al., 2010). A Pele Possui função de barreira protetora contra danos acidentais e intencionais que poderiam comprometer as funções do organismo (BUENO et al., 2016).

O processo de restabelecimento da integridade do tecido ocorre por meio do processo de cicatrização, logo após o dano (GUO; DIPIETRO, 2010). Este processo está subdividido em quatro fases integradas que se sobrepõem: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GREAVES et al., 2013).

Durante as etapas deste processo é observado constrição vascular, formação de um coágulo e uma matriz temporária no local da ferida. Ocorre também, migração de células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos, liberação de mediadores tais como as citocinas e produção de componentes da matriz extracelular como colágeno I e III, proteoglicanos e glicoproteínas (JUHASZ et al., 1993; MACKIE; HALFTER; LIVERANI, 1988; RASMUSSEN et al., 1992; SINGH et al., 2004).

Os diversos tratamentos têm como intuito otimizar a cicatrização promovendo o reparo, atuando nos diversos componentes envolvidos neste processo (FERREIRA et al., 2008; KUMAR et al., 2007).

Pesquisando a invasão celular por *Trypanosoma cruzi*, descobriu-se uma proteína ubiquitinada secretada e expressa em todas as fases do desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 2009). Em estudos posteriores utilizando a forma recombinante, rP21, verificou-se que a mesma aumenta a fagocitose de partículas de zymosan e de parasitas intracelulares, por macrófagos peritoneais inflamatórios, devido à indução da via da PI3-kinase por esta proteína e, conseqüentemente, atua na polimerização de actina (RODRIGUES et al., 2012). Um estudo recente mostrou que a rP21 promoveu maior recrutamento de granulócitos, linfócitos e monócitos, atuando também na diminuição da angiogênese (TEIXEIRA et al., 2015).

Experimentos *in vivo* utilizando modelo de implantação de esponja demonstraram quantidade de hemoglobina significativamente reduzida em grupo tratado, sugerindo ação antiangiogênica, reduzindo a formação de vasos sanguíneos (TEIXEIRA et al., 2015). Verificou-se também maior recrutamento de células do sistema imunológico como neutrófilos e macrófagos, por meio da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e

Nacetilglicosamina (NAG), que se mostraram mais ativas nos grupos tratados com a rP21 (TEIXEIRA et al., 2015).

Mediante o conhecimento do processo de reparo e os resultados obtidos em pesquisa anteriores sobre a atuação da rP21 nos diversos mediadores que atuam no reparo tecidual, o objetivo do presente trabalho é esclarecer como esta proteína atua no reparo, analisando o efeito da rP21 no comportamento de alguns de seus mediadores durante o processo.

2 JUSTIFICATIVA

A capacidade funcional de cada indivíduo é definida como a ausência de dificuldades no desempenho das atividades cotidianas. Pacientes com lesões cutâneas apresentam comprometimento da capacidade funcional devido o surgimento de lesões que também acarretam prejuízo laboral, repercutindo negativamente também no financeiro (NEWBERN, 2018).

Patologias relacionadas às deficiências na cicatrização constituem grave problema mundial, sendo o tratamento de feridas um desafio que ocorre desde a antiguidade. (BUSILACCHI et al., 2013). Atualmente existem vários protocolos que foram estabelecidos visando acelerar esse processo que sofre a interferência de uma série de fatores como: coagulação do sangue, inflamação, fibroplasia, deposição de colágeno e contração da ferida (BUSILACCHI et al., 2013).

Apesar dos esforços e anseios coletivos, terapias profiláticas definitivas no tratamento das injúrias cutâneas são inexistentes, carecendo de um tratamento rápido, sem contaminação e livre de complicações (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; MOREIRA et al., 2009).

Os protocolos convencionais são feitos com tratamentos demorados e custos elevados, o que torna necessário a demanda por novos tratamentos capazes de interagir com o tecido lesado, acelerando o processo de cicatrização (MENDONÇA; NETO, 2009).

Diversos grupos de pesquisa dedicam-se ao estudo do reparo das injurias cutâneas, tentando otimizar as diversas fases deste processo, obtendo assim uma diminuição no tempo de tratamento e rápida melhora das feridas. Dessa forma, busca-se novos compostos que possam de alguma maneira otimizar e promover uma melhora na cicatrização.

Trabalhos utilizando a proteína recombinante P21, oriunda de *T.cruzi*, mostrou que a mesma promove o recrutamento de macrófagos e ativa a polimerização de actina, utilizando a via de sinalização PI3-quinase (RODRIGUES et al., 2012). A rP21 promove maior recrutamento de granulócitos, linfócitos e monócitos, e atua na diminuição da angiogênese (TEIXEIRA et al., 2015). Todos os elementos estão relacionados a etapas cruciais para o reparo tecidual. Portanto, este trabalho possibilitará avaliar e elucidar a atuação da rP21 no tratamento de feridas cutâneas, avaliando também seu possível potencial terapêutico, tornando o processo de reparo cutâneo mais eficiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar possível potencial terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas através de métodos morfológicos e bioquímicos;

3.2 Objetivos específicos

- (i) Verificar as fases do reparo tecidual através de análises histológicas;
- (ii) Avaliar a ação da rP21 na formação de novos vasos (angiogênese);
- (iii) Quantificar o infiltrado celular (inflamação) e a presença de neutrófilos e macrófagos no local da ferida;
- (iv) Verificar a organização de colágeno na matriz extracelular.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Pele

A pele é um órgão que possui importantes funções, dentre as quais estão as sensoriais, metabólicas e termorreguladora, proteção contra radiação ultravioleta, reservatório para eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas. Atua na excreção de substâncias através de glândulas sudoríparas e na proteção do corpo contra meios adversos, criando uma barreira física contra traumas, invasão de bactérias e outros patógenos (TOFETTI; OLIVEIRA, 2006).

Esta estrutura é formada por duas camadas distintas, a epiderme e a derme, que se encontram unidas entre si e sustentadas pela hipoderme ou tecido subcutâneo (Figura 1) (GUIRRO, 2002). A epiderme é a camada mais externa onde podem ser encontrados diversos tipos celulares, dentre eles os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (SOUTO et al., 2006; KHAN et al., 2012).

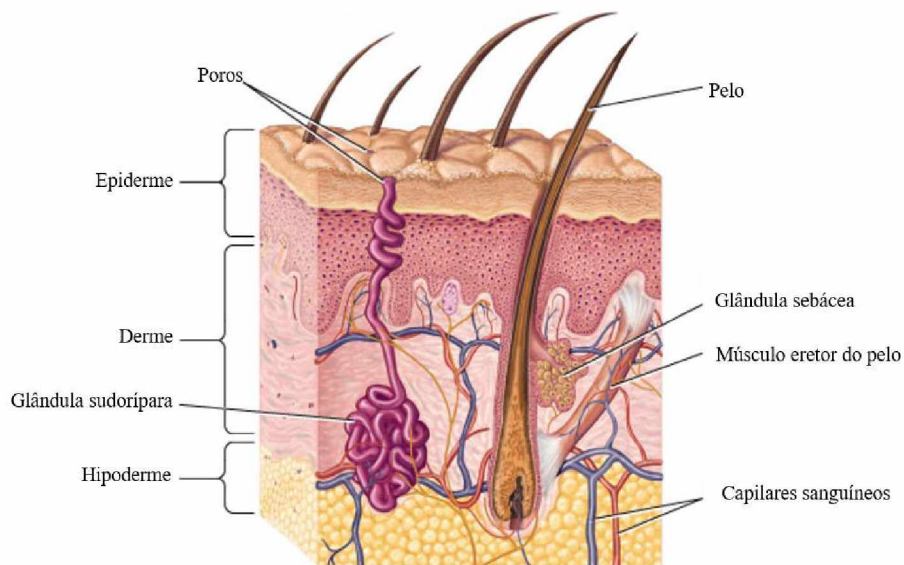


Figura 1 - Anatomia da pele. Fonte: Adaptada (Acervo digital da plataforma tes teach: structures of the integumentary system, 2018).

4.2 Epiderme

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado que se subdivide em cinco camadas distintas. Apresenta estratos que recebem o nome de acordo com o formato de suas células, sendo classificados da derme em direção ao meio externo (epiderme) como estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo (LUCAS, 2004).

A camada basal ou germinativa é rica em células tronco da epiderme e por isso a denominação germinativa. As células são pouco diferenciadas e com intensa atividade mitótica, dando origem às demais células epidérmicas formando os estratos subsequentes. A medida que estas células são produzidas elas ocupam o lugar das pré-existentes (SAMUELSON, 2011).

A camada espinhosa é formada por um número variável de camadas com células cúbicas, ou ligeiramente achatadas, com expansões citoplasmáticas contendo feixes de filamentos de queratina. O aspecto espinhoso observado nessa camada é devido as expansões dos citoplasmas que se aproximam, unindo as células vizinhas por meio de desmossomos. Os filamentos de queratina e os desmossomos são responsáveis pela coesão das células da epiderme e a resistência ao atrito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A Camada granulosa é formada por células poligonais achatadas, que possuem grânulos, os quais se desenvolveram no estrato espinhoso e foram eliminados para o interior das células do estrato granuloso. Nesse estrato encontram-se grânulos lamelares, que são discos lamelares formados por bicamada lipídica e revestidos por membranas. Ao se fundirem com a membrana plasmática, o conteúdo dos grânulos é liberado para o espaço intercelular da camada granulosa, onde o lipídio se deposita conferindo impermeabilidade à pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A camada lúcida é observada apenas nas regiões palmares e plantares, é formada por uma delgada camada de células achatadas eosinófilas e translúcidas que perderam as organelas e o núcleo, que foram digeridos por enzimas lisossômicas. No citoplasma dessas células encontram-se numerosos filamentos de queratina e entre as células ainda se pode observar desmossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Camada córnea é a camada mais externa, composta por células achatadas, mortas e anucleadas. O citoplasma destas células está repleto de queratina (ALVES, 2015).

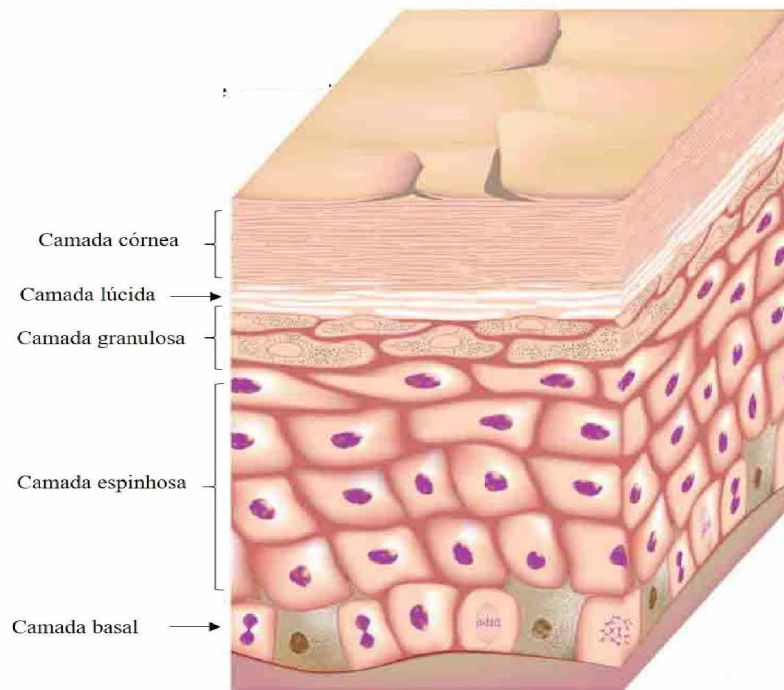


Figura 2 - Camadas da epiderme. Fonte: Adaptada (Acervo digital da plataforma hairtransplantmentor: what is the epidermis, 2018).

A epiderme é camada mais externa da pele, não é vascularizada, o oxigênio e os nutrientes chegam até ela por difusão a partir dos vasos sanguíneos da derme (IRION, 2005). É constituída por quatro tipos celulares, queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (Figura 3). A quantidade de cada uma dessas células é variável, a mais abundante são os queratinócitos, que chegam a aproximadamente 85% (BANKS, 1992). Os queratinócitos tem origem das células tronco da camada basal e após diferenciação se transformam nos corneócitos da camada córnea. Estas células são responsáveis pela produção de proteínas, dentre elas a queratina, principal proteína da camada córnea. Os melanócitos são responsáveis pela produção de pigmento da pele e são encontrados na camada basal da epiderme. Seu citoplasma contém vários grânulos de pigmentos denominados melanossomas, que contém melanina. Os melanossomas são transferidos aos queratinócitos da epiderme, conferindo ao núcleo dessas células proteção contra a luz ultravioleta e coloração a pele. Esse processo de transferência de melanina corre continuamente com a renovação da epiderme, mas pode ser acelerado com a exposição a luz ultravioleta. As células de Langerhans são células dendríticas que fazem parte do sistema imune, são a célula apresentadora de antígeno da pele (VICKETT; VISSCHER, 2006).

As células de Merkel são encontradas em maior quantidade na pele espessa da palma da mão e planta dos pés, principalmente na ponta dos dedos. Essas células são mecanorreceptores, estão em contato com as fibras nervosas do sistema nervoso que conduzem os impulsos nervosos para o sistema nervoso central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

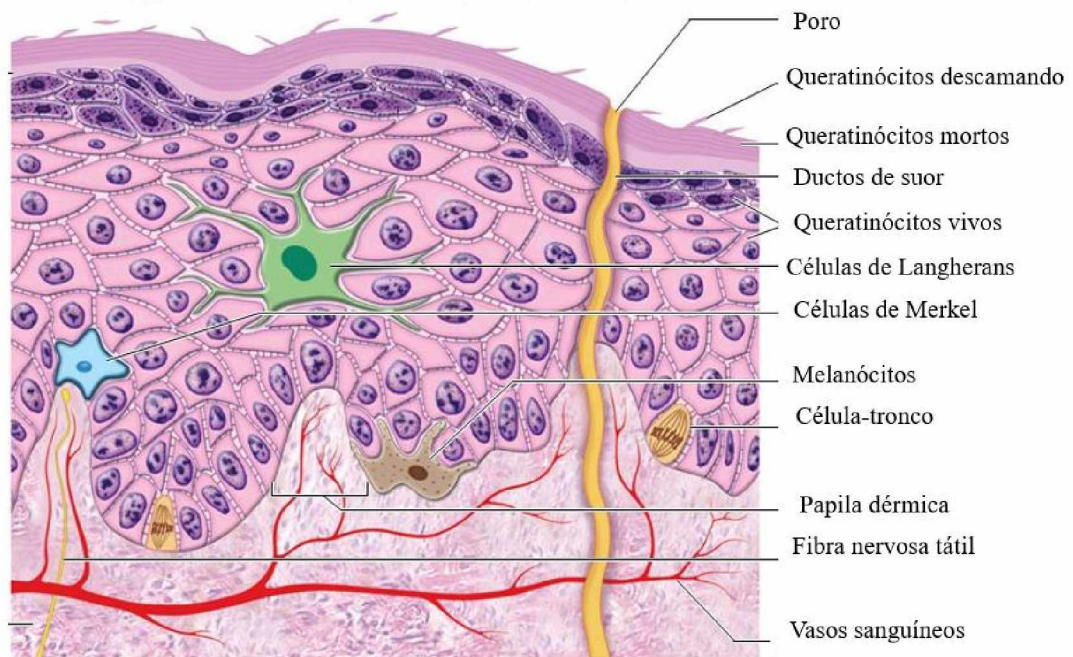


Figura 3 - Células da epiderme. Fonte: Adaptada (Acervo digital da plataforma slideplayer: Cell Types and Layers of the of the Epidermis, 2018).

4.3 Derme

A derme tem origem no folheto mesodérmico, é formada por tecido conjuntivo sobre qual a epiderme se apoia, unindo-a à hipoderme. Sua espessura é variável e atinge um máximo de 3 mm na planta dos pés (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Ao contrário do que ocorre na epiderme, a derme é vascularizada, estando presente vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e músculos (músculo eretor do pelo) (BANKS, 1992).

A derme está separada da epiderme pela membrana basal e nos animais pode ser dividida em camada papilar (ou superficial) e camada reticular (ou profunda) (BANKS, 1992). A camada papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas

dérmicas, que são saliências que acompanham reentrâncias presentes na epiderme. Nesta camada fibrilas de colágeno estão em contato de um lado com a membrana basal e do outro com a derme, prendendo às firmemente. A camada reticular é formada por tecido conjuntivo denso, é mais espessa e também contém fibras elásticas. Essas fibras da derme contribuem para a elasticidade da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Diferente da epiderme, a derme não possui uma organização regular, sendo constituída por componentes celulares dérmicos e componentes intersticiais, contendo material transparente e amorfo com proteoglicanas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas adesivas e fibras colágenas e elásticas (SHIMIZU, 2017). As fibras colágenas são sintetizadas pelos fibroblastos e são o componente principal da derme. O colágeno representa 30% do total das proteínas existentes, sendo a proteína mais abundante do corpo humano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

4.4 Componentes celulares dérmicos

Os principais elementos celulares encontrados na derme são os fibroblastos e fibrócitos. Na derme também podem ser encontradas outras células como macrófagos, mastócitos e células imuno competentes, como por exemplo, os neutrófilos, que normalmente não são encontrados na pele normal (SHIMIZU, 2017).

OS fibroblastos são células de origem mesenquimal versáteis, podem sintetizar diversos componentes fibrilares como colágeno e elastina e não fibrilares como glicoproteínas e proteoglicanos, podem também na sua forma imatura, se diferenciar em diversos tipos celulares, formando diversos tipos de tecido (ALBERTS et al., 2017).

Os fibroblastos possuem diversas funções e atuam de diversas formas. Eles atuam na modulação da matriz que por sua vez, irá atua nos tecidos (SAPPINO; SCHÜRCH; GABIANI, 1990).

Essas células são essências no processo de formação e remodelamento dos tecidos, participando ativamente no processo de cicatrização (KOUMAS et al., 2001).

Quando as fibras da matriz extracelular já foram sintetizadas e a derme está completamente formada, os fibroblastos cessam suas atividades diferenciando-se em fibrócitos. Nesse processo ocorre uma redução no tamanho do núcleo e na quantidade de retículo endoplasmático (SHIMIZU, 2017). A diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos ou fibrócitos e sua deposição ou degradação da matriz extracelular é regulada por citocinas e

fatores de crescimento. O equilíbrio desse mecanismo de regulação é importante para a manutenção da organização funcional dos tecidos (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Os macrófagos são células derivadas da medula óssea, se desenvolvem através de um processo de diferenciação das células-tronco hematopoiéticas que dão origem a linhagem de células sanguíneas do tipo miéloide (fagócito mononucleares). Após a sua diferenciação, essas células circulam pela corrente sanguínea onde recebem a denominação de monócitos. Quando vão para os tecidos recebem nomes específicos de acordo com a sua localização. Na pele e no tecido conjuntivo (derme), são também denominados histiócitos (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Os histiócitos possuem uma intensa atividade fagocítica, sendo considerados fagócitos profissionais. Desempenham importantes funções na reação inflamatória, como a proliferação e migração para os locais da inflamação e secreção de moléculas (citocinas) que irão auxiliar na resposta imunológica. Essas células também têm a capacidade de expor em suas superfícies fragmentos de moléculas derivadas de sua ação fagocitária, apresentando-as aos linfócitos T. Devido a esta função os macrófagos recebem também o nome de células apresentadoras de antígenos (SHIMIZU, 2017).

Os mastócitos também são originados de células-tronco hematopoiéticas, do tipo miéloide, mas diferentes das outras células, não completa sua maturação na medula. A célula precursora de mastócito deixa a medula e completa sua maturação nos tecidos (CARVALHO; BUZATO, 2005). Este tipo celular é encontrado na derme em torno dos capilares e na periferia dos tecidos subcutâneos. Possuem grânulos no citoplasma contendo principalmente histamina e heparina, que são liberados após vários estímulos, como em reações alérgicas. Os grânulos dos mastócitos também liberam outras substâncias, como enzimas, fatores quimiotáticos de neutrófilos, fator de necrose tumoral e substâncias envolvidas no processo inflamatório como prostaglandinas, leucotrienos e fatores de ativação das plaquetas (SHIMIZU, 2017). O papel dos mastócitos na reação alérgica é muito conhecido, mas esta célula também está envolvida em outros processos patológicos e fisiológicos, como a cicatrização de feridas (CARVALHO; BUZATO, 2005).

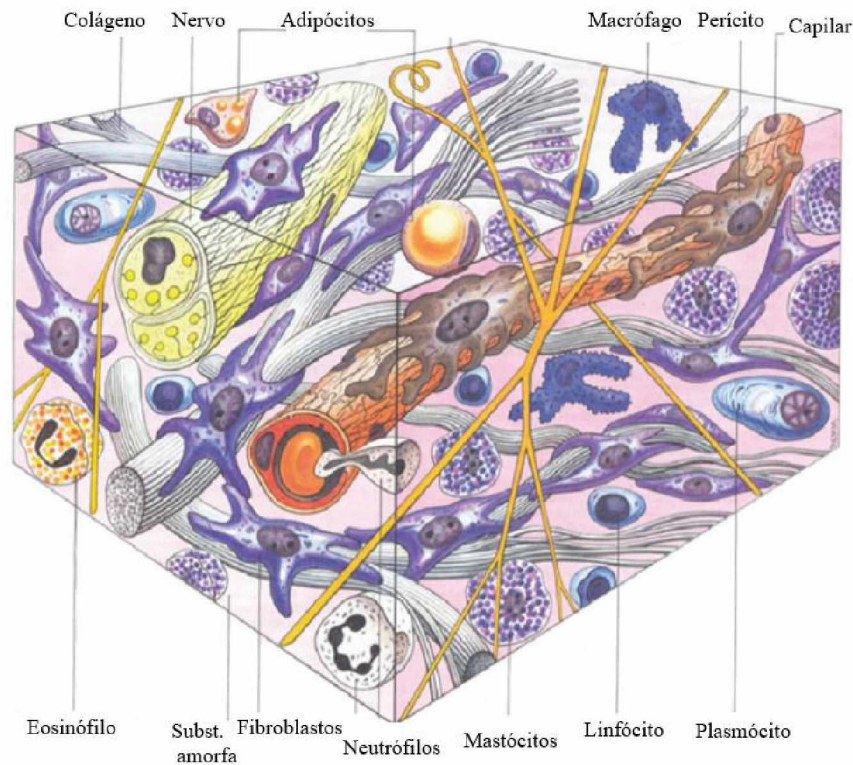


Figura 4 - Componentes celulares dérmicos. Fonte: adaptada (Isaac et al., 2010).

4.5 Hipoderme

A hipoderme ou tecido subcutâneo é formado por tecido conjuntivo frouxo, ele está entre a derme e os órgãos subjacentes. Sua espessura é variável e composta de células adiposas e atua como isolante térmico, protetor mecânico contra traumas (SHIMIZU, 2017).

4.6 Cicatrização de feridas

Todos os organismos vivos têm capacidade autorregenerativa. Nos organismos unicelulares e pluricelulares, a renovação de estruturas como citoesqueleto, membranas, paredes celulares e até moléculas complexas como RNAs e DNA se dá por meio de enzimas especializadas. Em organismos superiores, também encontramos a reparação tecidual, que pode ocorrer através da regeneração ou pela cicatrização do tecido lesionado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A regeneração é o tipo ideal de cicatrização, onde ocorre uma perfeita restauração

da arquitetura do tecido pré-existente e não há formação de cicatriz. Mas, ela é observada apenas no desenvolvimento embrionário, em organismos inferiores e em determinados tecidos como ossos e fígado. Na cicatrização de feridas a perfeição da regeneração é trocada pelo reparo, um esforço dos tecidos para restaurar a estrutura e função da pele lesionada (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Tazima e outros (2008), conceituou ferida como qualquer lesão que leve a uma descontinuidade cutânea, que pode decorrer de uma lesão por agentes mecânicos, térmicos, químicos e bacterianos. Após o rompimento do tecido se inicia o processo de reparo ou cicatrização, que envolve uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado. Este processo é bastante complexo e envolve a quimiotaxia, neovascularização, depósito e remodelamento da matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesionado (MENDONCA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Devido a sua complexidade, o processo de cicatrização costuma ser didaticamente dividido em fases que se sobrepõem de forma contínua: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

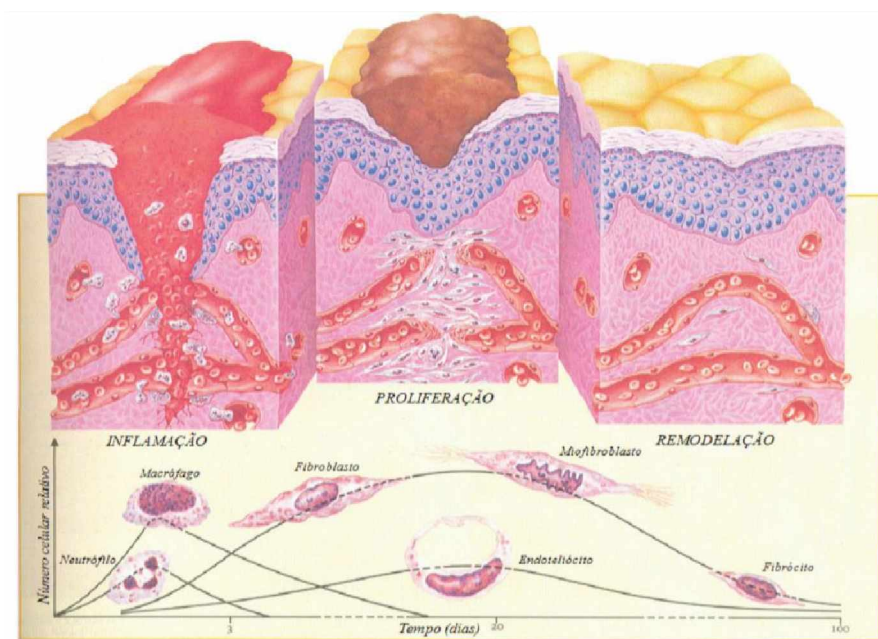


Figura 5 - Fases do processo de cicatrização: Inflamação, proliferação e remodelação. Fonte: Acervo digital da plataforma plasticaplexus: Cicatrização, 2018.

4.6.1 Homeostase

Esta fase inicia-se após a ocorrência do ferimento, onde o extravasamento sanguíneo provocado pela lesão dos vasos ativa as plaquetas, dando início a agregação plaquetária.

A cascata de coagulação resulta em um coágulo, que forma um tampão homeostático, impedindo a perda de sangue (ISAAC et al., 2010). O coágulo formado serve para selar as bordas das feridas e também para cruzar a fibronectina, formando uma matriz provisória, que fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos utilizam para entrar na ferida (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Essa matriz ainda funciona como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes da cicatrização (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

4.6.2 Inflamação

A lesão dos tecidos acarreta a liberação de histamina, serotonina e bradicinina que levam ao aparecimento de sinais inflamatórios, como calor e rubor, que são provenientes da vasodilatação e do aumento sanguíneo no local. No local da lesão observa-se também um edema, que é provocado pelo aumento da permeabilidade capilar e extravasamento de líquidos para o espaço extracelular. A resposta inflamatória dura aproximadamente 3 dias, onde há migração de células para o local ferida, facilitadas por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular. A histamina e a serotonina são mediadores de ação curta, já a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina tem ação duradoura. A prostaglandina favorece a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos, sendo um dos mediadores mais importantes no processo de cicatrização (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Além de inúmeros mediadores químicos, a inflamação é marcada pela ação de células inflamatórias, como os macrófagos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Os neutrófilos e os monócitos são os primeiros elementos celulares a alcançar o local da ferida, eles têm a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas antigênicas e corpos estranhos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Os macrófagos são as células inflamatórias mais importantes dessa fase, podendo ser encontradas do terceiro ao décimo dia (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003), onde atuam degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Os macrófagos secretam

fatores quimiotáticos, responsáveis pela atração de outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, agindo na permeabilidade dos microvasos. Os macrófagos ainda produzem vários fatores de crescimento, como PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e VEGF, principais citocinas envolvidas na formação do tecido de granulação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009), e células endoteliais, que são elementos celulares importantes para a próxima etapa da cicatrização (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais sintetizam a fibronectina, que também tem papel importante na fase inflamatória. Ela se associa simultaneamente à fibrina, ao colágeno e outros elementos celulares, aderindo a matriz extracelular. Essa estrutura formada pela fibronectina, o coágulo de fibrina e as células formam uma base para a matriz extracelular, e ainda possuem atividades quimiotáticas, levando a opsonização e a fagocitose de corpos estranhos e bactérias (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

4.6.3 Proliferação

A proliferação é a fase que sucede o período inflamatório e é composta por três eventos importantes: fibroplasia, angiogênese e reepitelização. A fibroplasia é marcada pela migração e proliferação de fibroblastos e síntese de novos componentes da matriz extracelular (ISAAC et al., 2010).

A migração e ativação dos fibroblastos nesta fase se deve principalmente a presença de macrófagos no local que liberam mediadores químicos. Os fibroblastos ativados, orientados pelo gradiente químico, migram das margens da ferida, através da matriz provisória. Estas células produzem colágeno, que altera a matriz extracelular para um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Este tecido se forma por volta do quarto dia, é denominado tecido de granulação e compõem-se de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A deposição de colágeno na ferida é realizada também por fibroblastos diferenciados em miofibroblastos, os quais tem capacidade de contração e expansão, movimentam-se dessa forma pela ferida (BAGALAD; KUMAR; PUNEETH, 2017). Ao se movimentar, os miofibroblastos depositam a fibronectina sobre a fibrina, formando uma nova estrutura denominada fibronexus. A deposição do colágeno ocorre com a sua ligação à fibronectina em

um sítio diferente da fibrina. Na matriz dérmica são encontrados os colágenos do tipo I e III, o primeiro é constituído por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ e apresenta um diâmetro total 1 a 20 μm . Já o segundo, constitui-se de três cadeias $\alpha 1$ e o seu diâmetro é de 0,5 a 2 μm . A proporção de colágeno na ferida é diferente da encontrada na pele íntegra, onde os miofibroblastos estão ligados e alinhados às fibras de colágeno de maior espessura, o que leva a contração da ferida (ISAAC et al., 2010).

Além de produzir colágeno, o fibroblasto também produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Paralelamente aos fenômenos citados acima, haverá a formação de novos vasos sanguíneos e vascularização do local. Esse processo, denominado angiogênese, é fundamental para processo de cicatrização. Os novos vasos participarão da formação do tecido de granulação provisório e levarão nutrientes e oxigênio para o tecido em crescimento. Novos vasos sanguíneos são formados a partir dos adjacentes à ferida (MENDONCA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Macrófagos ativados liberam bradicinina, prostaglandina e outros mediadores químicos, que estimulam a migração e a mitose das células endoteliais (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). A angiogênese é estimulada pelos fatores de crescimento FGF, o VEGF e o TGF- β (ISAAC et al., 2010) e também pela baixa tensão de oxigênio no centro da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Estimuladas por fatores de crescimento e outros mediadores, as células endoteliais secretam colagenases e ativador do plasminogênio, que proporcionam aberturas na membrana basal dessas células. Assim, elas podem atravessar a parede do vaso e utilizando a matriz extracelular provisória como substrato, chegam até o local lesionado. Quando essas células chegam na extremidade vaso passam por um processo de diferenciação, onde são capazes de formar novos capilares. Essas células migratórias formam um broto no exterior do capilar que tem a capacidade de se unir ao capilar de origem, restabelecendo o fluxo sanguíneo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Esses novos vasos são característicos do tecido de granulação e sua função é levar nutrientes e oxigênio para o tecido em crescimento (ISAAC et al., 2010). Além de ser responsável pela nutrição do tecido em crescimento, a angiogênese também garante o acesso de células, como macrófagos e fibroblastos, até o local da ferida (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A reepitelização tem início logo após a lesão, quando as células da epiderme saem do estado de latência. Células primitivas da camada basal têm um potencial mitótico latente, que

em tecidos normais é inibido pelo contato que existe entre as células adjacentes, esse mecanismo é denominado “inibição por contato”. A lesão desfaz esse mecanismo, fazendo com que as células entrem imediatamente em mitose. Devido a inexistência de um substrato adequado para o crescimento celular na região da ferida, dificilmente se observa o processo mitótico nas etapas iniciais da cicatrização. Isso apenas é possível quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A função da reepitelização é recompor as funções da epiderme perdidas com a lesão. Para isto ela precisa reorganizar o epitélio, com suas camadas: basal, espinhosa, lúcida e córnea (ISAAC et al., 2010).

Quando as células da epiderme são ativadas, ocorre a dissolução dos desmossomas intercelulares e filamentos de actina se formam na região periférica intracelular. Esse processo proporciona o seu desprendimento da membrana basal e das células epiteliais adjacentes, permitindo sua movimentação em direção ao centro da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os queratinócitos, da camada basal da epiderme ou de apêndices dérmicos profundos, migram para recobrir a ferida. As células epiteliais movimentam-se, saltando desordenadamente, até as bordas, unindo-as. A epitelização compreende uma sequência de alterações nos queratinócitos da ferida: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

À medida que a lesão vai sendo recoberta pelas células da epiderme o potencial de latência mitótica é acionado, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos. Após essa etapa a lesão está totalmente coberta pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida através da angiogênese e a rede linfática está se regenerando. Aos poucos o tecido de granulação é preenchido com mais fibras colágenas, dando ao local da lesão a aparência de cicatriz, em consequência do acúmulo de massa fibrosa (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

4.6.4 Remodelação

A fase de remodelação tem como objetivo a recuperação da estrutura tecidual normal, ocorre a maturação dos elementos, alterações na matriz extracelular e depósito de proteoglicanas e colágeno (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Um dos principais eventos dessa etapa se refere ao colágeno, principal componente da derme, este sofre modificação na sua composição e disposição. Inicialmente, predomina o colágeno tipo III, mas com o decorrer do tempo ele será degradado e substituído pelo colágeno tipo I, que terá sua produção aumentada pelos fibroblastos. O colágeno também altera sua organização, passando de fibras paralelas dispostas aleatoriamente, para entrelaçadas e organizadas (IZAAC et al., 2010).

Mais adiante, os fibroblastos do tecido de granulação se diferenciam em miofibroblastos, assumindo uma característica contrátil a região. Paralelamente, ocorre reorganização da matriz extracelular, que se transforma de provisória em definitiva (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Durante o processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida, através de processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular. Esses eventos levam a formação de cicatriz com reduzido número de células, mas se as mesmas persistirem no local, ocorrerá a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados na tentativa de se identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo de injúrias cutâneas. A identificação de substâncias que possam otimizar as etapas do processo de cicatrização é escassa ou ineficientes. A descoberta de novos compostos que atuem como potencializadores de migração de neutrófilos, da atividade angiogênica ou nos demais eventos do processo de reparo tecidual teriam grande aplicação clínica.

4.7 Proteína P21

A P21 é uma proteína secretada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, que devido ao fato de ser o agente etiológico da Doença de Chagas é alvo de diversas pesquisas em várias partes do mundo. Ela foi descoberta por Silva e colaboradores, que investigavam componentes da superfície desse parasita envolvido na invasão de células hospedeiras. Descobriram que a P21 é uma proteína ubíqua de 21kDa que está envolvida na entrada das amastigotas e tripomastigotas metacíclicos nas células (SILVA et al., 2009).

As formas tripomastigotas possuem uma interação com os macrófagos e outros tipos celulares, nos quais o *T. cruzi* se multiplica. As amastigotas são originadas da diferenciação de tripomastigotas e normalmente são encontradas no interior de células infectadas (BRENER,

1997). Mas também podem ser provenientes de tripomastigotas extracelulares, sendo capazes de invadir efetivamente células de mamíferos (FERNANDES et al., 2013).

Em experimentos, a forma recombinante (P21-His6) aderiu às células HeLa de maneira dependente da dose. O pré-tratamento de células hospedeiras com P21-His6 inibiu a invasão celular por amastigotas extracelulares de cepas G e CL (SILVA et al., 2009).

Pesquisas demonstraram que macrófagos peritoneais inflamatórios, tem sua capacidade fagocítica aumentada (RODRIGUES et al., 2012). Resultado da polimerização de actina mediante indução da via da PI3-kinase pela proteína. (RODRIGUES et al., 2012). Outros estudos conduzidos em laboratório indicaram o receptor de quimiocina CXCR4 como receptor da rP21 na célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2012). Verificou-se também que a rP21 solúvel possui as mesmas características e funções biológicas que a rP21 na sua forma insolúvel (SANTOS et al., 2014).

Em outros estudos, infectando camundongos Balb/C com *Leishmania Amazonense* tratando localmente com rP21, verificou-se aumento da carga parasitária e inflamação local, presumidamente devido ao recrutamento de células fagocíticas (TEIXEIRA et al., 2015).

Em experimentos com a utilização de implante de espoja, foi detectada quantidade de hemoglobina reduzida no grupo onde foi administrada rP21, sugerindo função anti angiogênica, pois a mesma estaria reduzindo a formação de vasos sanguíneos. Verificou-se também por meio da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosamina (NAG), que estas enzimas estavam mais ativas no grupo tratado, indicando o recrutamento de células como neutrófilos e macrófagos, pertencentes ao sistema imune (TEIXEIRA et al., 2015).

Portanto, temos evidências da atuação da proteína no citoesqueleto de actina, recrutamento de células do sistema imune, e função anti angiogênica. Todas essas atribuições podem interferir de alguma maneira no reparo tecidual.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Os animais foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA), após submissão e aprovação no comitê de ética com registro de número 046/17 (Anexo 1). Quarenta e oito camundongos da linhagem Balb/C. Após foram transferidos e mantidos no depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas- UFU. Os animais foram submetidos a processo de adaptação até obterem peso de aproximadamente 27 g e completarem 9 semanas.

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno 30 x 19 x 12 cm, contendo quatro animais em cada caixa e mantidos em gabinetes com controle de temperatura, ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso a água e ração até o dia da cirurgia. Os animais foram mantidos em caixas individuais nas mesmas dimensões após o procedimento cirúrgico para realização das feridas, evitando interferências externas que pudessem comprometer os resultados.

5.2 Purificação da rP21

A obtenção da proteína foi realizada através da técnica de cromatografia de afinidade, por meio de uma coluna de níquel e diálise contra PBS, procedimento descrito por Silva e outros (2009). Depois da purificação, foi realizada corrida em gel de poliacrilamida com o intuito de averiguar possíveis contaminações e identificação da proteína em questão. Ressaltamos que foi detectado banda correspondente à proteína de 21kDa.

A concentração foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A dosagem da proteína foi comparada à curva padrão e assim determinada a concentração de proteína presente ao fim das purificações.

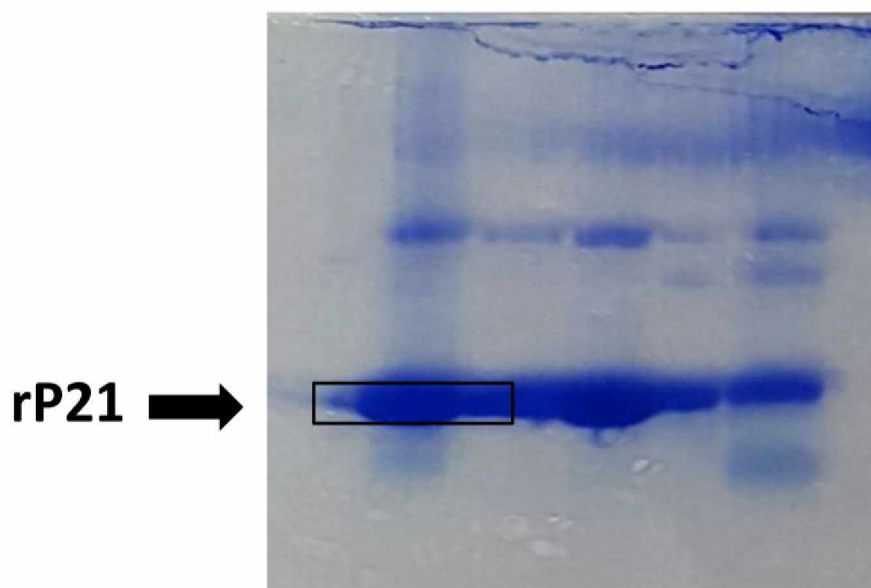


Figura 6 - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis utilizando como detergente Sodium Dodecyl Sulfate (SDS Page) demonstrando a presença de proteína com peso molecular de 18 kDa.l. Fonte: Própria, 2017.

5.3 Obtenção do gel com p21

Para veículo da rP21 foi escolhido o gel de carbopol, bastante utilizado pela indústria farmacêutica (Acofarma), A escolha foi baseada em requisitos como formulação aquosa, densidade e viscosidade.

No cálculo do excipiente multiplicou-se a quantidade de dias de tratamento pela quantidade de animais a serem tratados. Para o cálculo de substância medicamentosa a ser testada, foi utilizada a concentração da proteína obtida após purificação e submetida a análise em nanodrop.

Após a homogeneização, o gel foi então acondicionado em seringas volumétricas para facilitar a aplicação e mantido em geladeira garantindo assim a estabilidade da formulação.

Avaliando a área a ser tratada, foi definida que a quantidade necessária de gel suficiente para tratar a ferida seria de 250 μg . Assim temos 1 μg de proteína rP21 em cada 250 μg para a concentração de 1 μg e temos 50 μg de proteína rP21 a cada 250 μg na concentração de 50 μg , assegurando que cada ferida seria tratada com a concentração correta.

5.4 Procedimento cirúrgico e tratamento

Os animais foram submetidos a anestesia utilizando solução de 10mg/kg – xilazina e 100mg/kg – cetamina via intraperitoneal. Em seguida foram identificados e tricotomizados na região dorsal. A assepsia foi realizada com álcool 70% e em seguida induzida ferida utilizando instrumento cirúrgico (punch 5 mm), obtendo quatro feridas no dorso dos animais (Figura 7).



Figura 7 - Imagem ilustrativa da indução das feridas no dorso de camundongo. Fonte: Própria, 2017.

Após a cirurgia foi administrado solução salina 0,9% nos olhos dos animais com a finalidade de evitar o ressecamento. Os mesmos foram mantidos sob fonte de luz amarela para aquecê-los até que retomassem consciência, em seguida foram alojados em caixas individuais e identificadas.

5.5 Tratamento

Após a cirurgia, as lesões cutâneas foram tratadas com a rP21 no gel de carbopol. Cada ferida recebeu 250µg, totalizando 1ml as 4 feridas. O gel foi administrado com o auxílio de seringa volumétrica com o intuito de facilitar e assegurar a aplicação correta da dose.

Os animais foram divididos em 6 grupos, conforme tabela abaixo:

Tabela 1 - Desenho experimental do tratamento nas diferentes concentrações e tempo.

Grupo	Concentração (µg/250µg)	Tempo (dias)	Número de animais
1	0 (controle)	3	8
2	0 (controle)	7	8
3	1	3	8
4	1	7	8
5	50	3	8
6	50	7	8

Fonte: Própria, 2017.

5.6 Fechamento da ferida

O acompanhamento do fechamento da ferida foi realizado todos os dias e para a mensuração da mesma, foi realizada medição com o uso de paquímetro e os animais foram fotografados diariamente. A área foi calculada da seguinte fórmula:

(Diâmetro menor/2) * (Diâmetro maior/2) * valor de PI: 3,14

Após a obtenção do valor da área nos dias de tratamento, a porcentagem de fechamento foi calculada a partir da seguinte fórmula:

Medida da área em %: área da ferida no dia atua/ área da ferida no dia 0 X 100.

5.7 Coleta das amostras

Após tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com Tiopental (100 mg/ Kg). A pele da região onde se localizavam as feridas foram retiradas com o auxílio de instrumento cirúrgico (punch) de 5mm e de 8 mm.

A lesão referente a parte posterior do lado direito do animal, foi removida com punch de 8 mm (Figura 8), e destinada a histologia, enquanto que as demais destinadas a bioquímica foram retiradas com a utilização do punch de 5mm. O processamento histológico seguiu imediatamente com a fixação em solução de metacar preparada no dia e demais procedimentos.

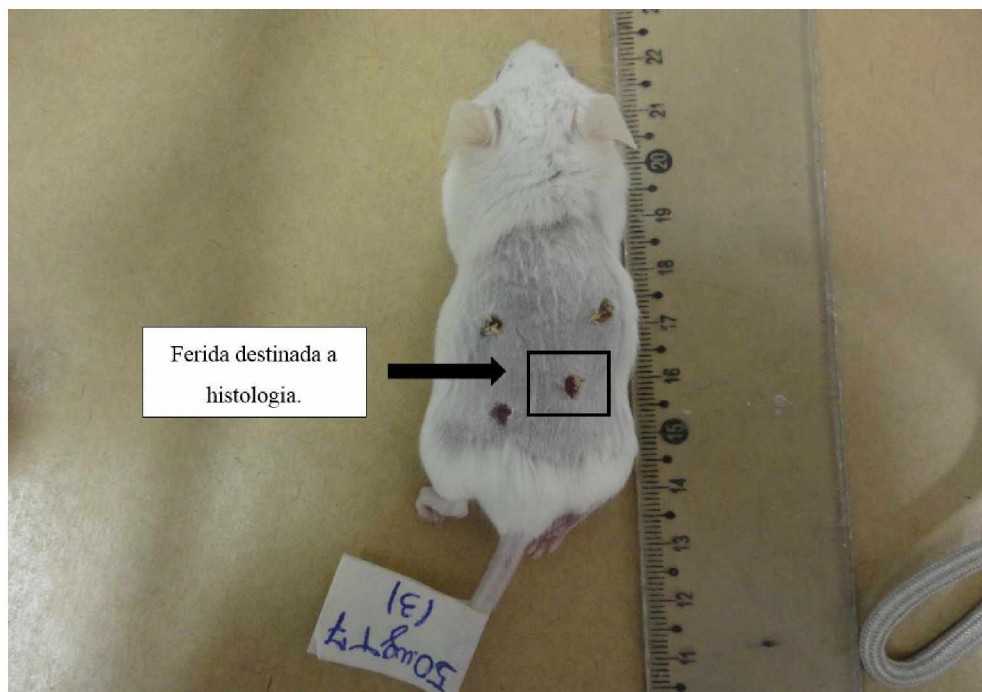


Figura 8 - Foto do animal no dia do sacrifício demonstrando a ferida destinada a histologia. Fonte: Própria, 2017.

As demais feridas destinadas a bioquímica, foram retiradas com punch de 5mm de congeladas em ultrafreezer e mantidas na temperatura de -80 aguardando as análises bioquímicas.

5.8 Avaliações histológicas e bioquímicas

5.8.1 Avaliação morfológica

Após o processo de fixação em metacar, utilizamos protocolo de fixação em parafina, utilizado pelo setor de histologia da UFU. Foi utilizado micrótomo rotativo (MICROM/HM-315) para obter cortes longitudinais de 5mm de espessura. Os cortes foram corados com azul de toluidina (AT) 0,025 % em tampão MacIlvaine pH 4,0 para quantificação dos mastócitos, Picrocilium Red MacIlvaine para colágeno total e colágeno I e III, e Tricômico de Gomori (T.G) para a quantificação de vasos sanguíneos.

A avaliação, diferenciação e quantificação de colágeno do tipo I e III foram realizadas em 10 áreas aleatórias utilizando-se uma objetiva de 20x, fotografadas ao microscópio Nikon eclipse Ti, câmera optacam com filtro de polarização. Após obtidas as imagens e quantificações, as mesmas foram mensuradas e quantificadas através do programa Image J e as médias dos 10 campos avaliados foram utilizadas para a estatística. Para as demais análises, foram obtidas 10 imagens de 10 áreas aleatórias utilizando o aumento de 400x (objetiva 40x) em câmera acoplada, do tipo Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Alemanha. Essas imagens foram avaliadas e usadas para a análise estatística.

5.8.2 Conteúdo de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina nas amostras de ferida foi realizada utilizando o método de Drabkin. Nesta avaliação, as amostras utilizadas correspondiam a metade de uma ferida, inicialmente pesada em balança de quatro casa decimais (Chimadzu AUY 220). Em seguida procedeu-se a homogeneização com o auxílio do Ultra-turrax em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest), durante 10 segundos em tubos de ensaio. Após a homogeneização, 500µL das amostras foram centrifugadas por 40 minutos, a 10.000g a 4°C e filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Uma alíquota de 200µL de cada amostra foi adicionada a uma placa de 96 poços, em duplicata, para leitura em espectrofotométrica com comprimento de onda de 540nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados

foram expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido da ferida.

5.8.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase pode ser detectada utilizando-se a enzima mieloperoxidase (MPO) como um marcador quantitativo da atividade de neutrófilos e macrófagos, células características e importantes no processo inflamatório. A análise foi realizada através da técnica de Bradley (BRADLEY; PRIEBAT; CHRISTENSEN, 1982).

Utilizando balança de precisão (Chimadzu AUY 220), uma ferida foi pesada e homogeneizada em 2,0mL de tampão fosfato de sódio, 80 mM em pH=6 por 15 segundos. Foi transferido 300µL da amostra para eppendorf e ao mesmo foram acrescentados 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,75% p/v e diluído em tampão fosfato pH 6. Seguiu-se com a sonicação das amostras por 10 segundos e, em seguida prosseguiu-se com a centrifugação à 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Retirou-se (200µL) do sobrenadante, e este foi utilizado no ensaio enzimático. Seguimos a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%; 100µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck) colocados ao mesmo tempo e cronometrado por 1 minuto. Adicionamos 100µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) a 4M com o intuito de interromper a reação. Seguiu-se adicionando 200µL à placa de 96 poços e foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 450nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido da amostra).

5.8.4 Atividade da N- Acetil- β- D- Glicosaminidase (NAG)

Utilizamos a técnica de Bailey, (1988), que se baseia na hidrólise do p-nitrofenilN-acetil-β-D-glicosamina (substrato) pelo N-acetil-β-D-glicosaminidase e liberação de p-nitrofenol. A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A enzima NAG foi utilizada como um índice da atividade destas células no sítio inflamatório, assim nós a usamos como um marcador da presença de macrófagos ativados.

Utilizamos amostra correspondente a metade de uma ferida, que foi pesada em balança de precisão (Chimadzu AUY 220), homogeneizada por 40 segundos em 2,0mL de solução

salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). O homogeneizado foi centrifugado à 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C, coletamos o sobrenadante e adicionamos 150 µL deste em 150 µL de tampão citrato/fosfato. Neste ensaio, foram adicionados 100µL/poço, das amostras diluídas (em duplicata) à placa de ELISA de 96 poços. Seguimos adicionando 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase-Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato, pH 4,5, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Adicionamos 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6 nas amostras e na curva. Utilizamos espectrofotometria em leitor de Elisa para verificar a absorbância, em comprimento de onda de 400nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). A atividade de NAG foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol que foi avaliada paralelamente. Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL⁻¹/mg de peso úmido da amostra.

5.8.5 Dosagem de colágeno solúvel

O colágeno solúvel total nas amostras foi avaliado utilizando ensaio colorimétrico, pela reação do Picrosirius Red (P.R). Utilizamos metade de uma ferida que foi pesada em balança de precisão (Chimadzu AUY 220), homogeneizada com tampão (salina 0.1% Triton X-100) (30 segundos) e posteriormente centrifugadas a 6000g, por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C. Utilizamos 50µL do sobrenadante e 50µL do reagente P.R.

Incubamos as amostras com P.R. por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). O complexo formado, colágeno-picrosirius red foi separado por meio de centrifugação a 10,000g, durante 10 minutos a temperatura de 4°C. Em seguida descartamos o sobrenadante, vertendo o tubo sobre papel absorvente, retirando o máximo possível de líquido. Lavamos o sedimento com 500µL de etanol (PA) e livre de metanol, vertendo delicadamente na parede do tubo para não remover o pellet, e então, todo etanol foi removido, vertendo-se com cuidado em papel absorvente. Foi adicionado ao sedimento 1mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M).

A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (E max, molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) onde 200 µL das amostras foram transferidos, e esse processo foi realizado em duplicata. Foi utilizada uma curva padrão de colágeno (Merk) para determinar a quantidade de colágeno em cada amostra e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de amostra.

5.9 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão, seguido pelo teste estatístico ANOVA- one-way e pós-teste Bonferroni para múltiplas comparações. Foi considerada diferença significativa $p \leq 0,05$. Os gráficos e avaliações estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

6 RESULTADOS

6.1 Fechamento de ferida

Para acompanhar o processo de cicatrização, as feridas dos animais foram medidas e fotografadas todos os dias, para acompanhamento do fechamento de ferida (imagem 24). As análises do fechamento da ferida mostraram que a proteína rP21, na concentração de 50 μ g diferiu significativamente em relação ao controle a partir do quarto dia de tratamento. Essa diferença aumentou, tornando-se mais expressiva no sexto e sétimo dia de tratamento. Na concentração de 1 μ g, o tratamento com rP21 influenciou significativamente o fechamento da ferida a partir do sexto dia, continuando no sétimo dia. Ambas as concentrações quando comparadas ao controle, mostraram-se eficazes no fechamento de feridas, otimizando o processo (Figura 23).

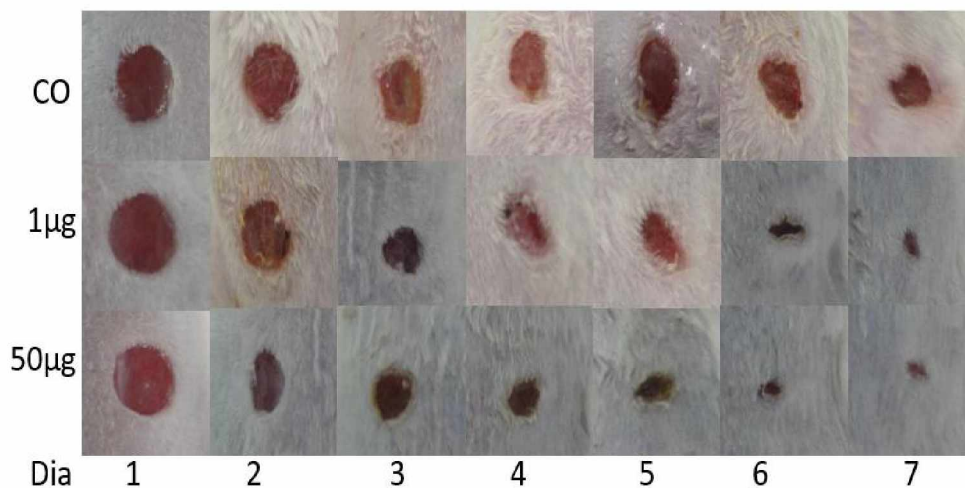


Figura 9 - Acompanhamento do fechamento de ferida. Fonte: Própria, 2017.

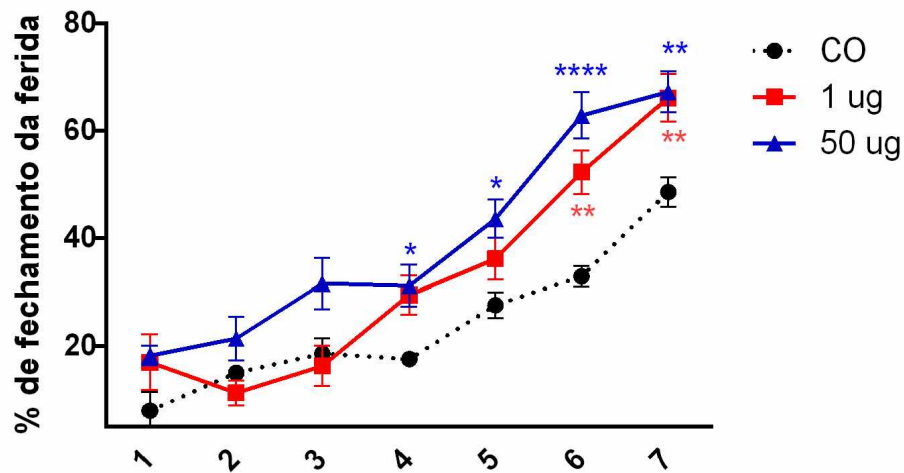


Figura 10 - Gráfico demonstrando o fechamento de ferida durante os sete dias de tratamento para o controle e nas concentrações de 1µg e 50µg. Fonte: Própria, 2017.

6.2 Quantificação de mastócitos

A figura 11 demonstra as análises quantitativas de mastócitos. Observa-se maior número de mastócitos nos grupos tratados com a proteína rP21 em ambas as concentrações e nos dois intervalos tempo. A média de mastócitos por campo nos dois intervalos de tempo, (3 e 7 dias) e em ambas as concentrações, 1 e 50µg, diferiu significativa em relação ao grupo controle. Essa diferença foi mais acentuada no tratamento de sete dias (Figura 11).

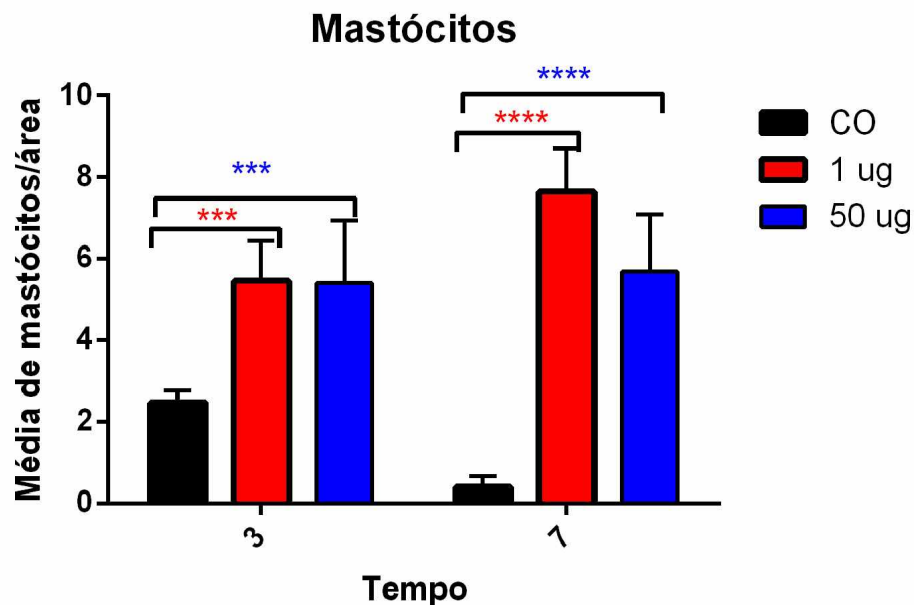


Figura 11 - Gráfico demonstrando a média de mastócitos corados com Azul de Toluidina por área nos tempos de três e sete dias no grupo controle e os tratamentos com a proteína rP21 nas concentrações de 1µg e 50µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

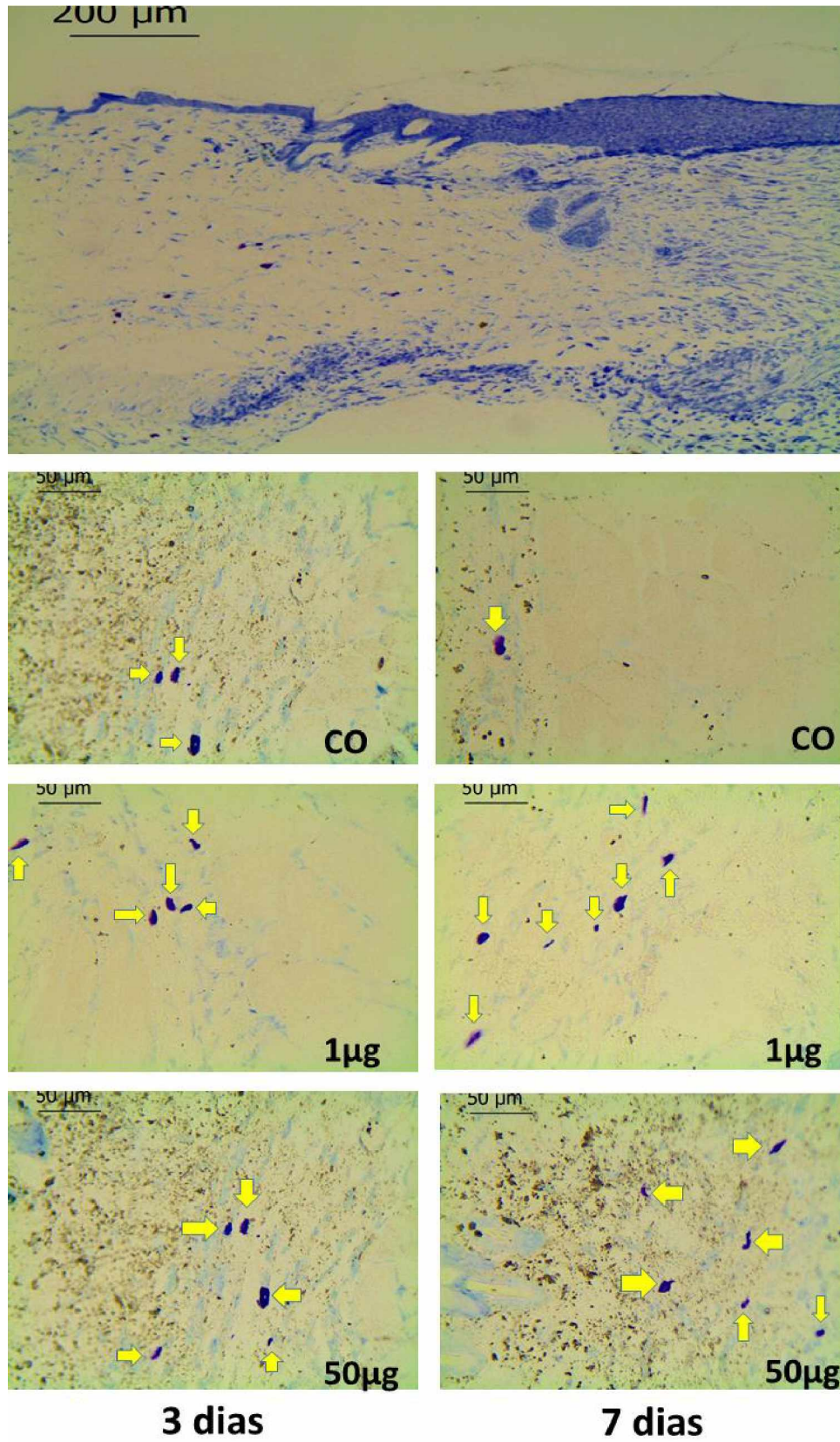


Figura 12 - Fotomicrografias demonstrando as áreas de lesões cutâneas coradas. A demostra visão geral do tecido ferido, B e C grupo controle. Tempos 3 e 7 respectivamente, D e E concentração de 1µg, tempos 3 e 7. F e G concentração de 50µg nos tempos 3 e 7.

6.3 Atividade de macrófagos pela dosagem de NAG

A atividade de macrófagos foi avaliada através da atividade da enzima NAG, que mostrou uma atividade significativa de macrófagos no local da lesão, nas duas concentrações, mas apenas no sétimo dia (Figura 13).

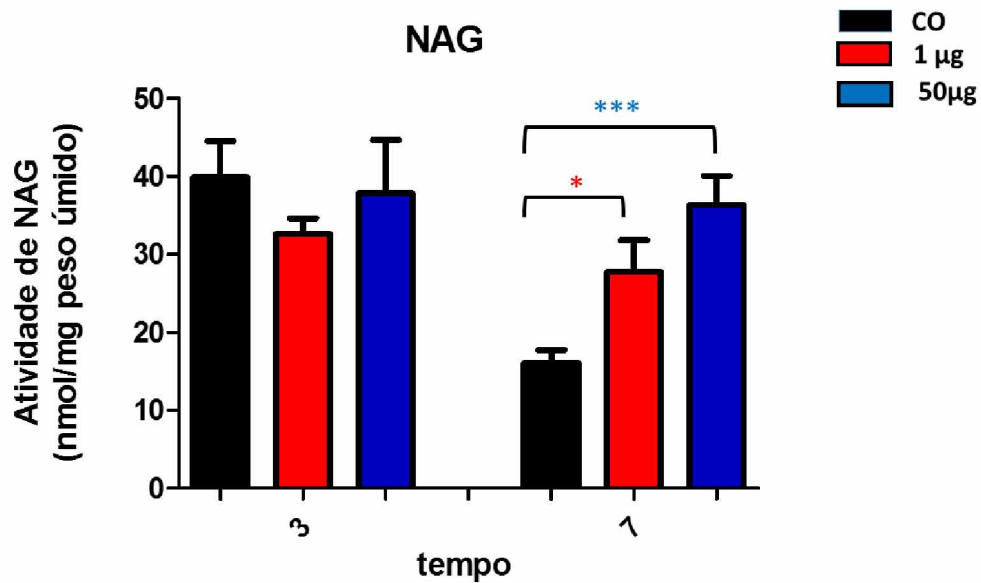


Figura 13 - Gráfico demonstrando a atividade de macrófagos encontrados nos tempos três e sete dias para o grupo controle e as concentrações, 1 µg e 50 µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

6.4 Avaliação da atividade de neutrófilos

A atividade de neutrófilos foi avaliada através da ação enzimática de MPO, que no tratamento de 3 dias, foi significativa apenas na concentração de 50 µg de proteína. Já no tratamento de 7 dias, as duas concentrações (1 e 50 µg) diferiram significativamente em relação ao controle, demonstrando menor atividade (Figura 14).

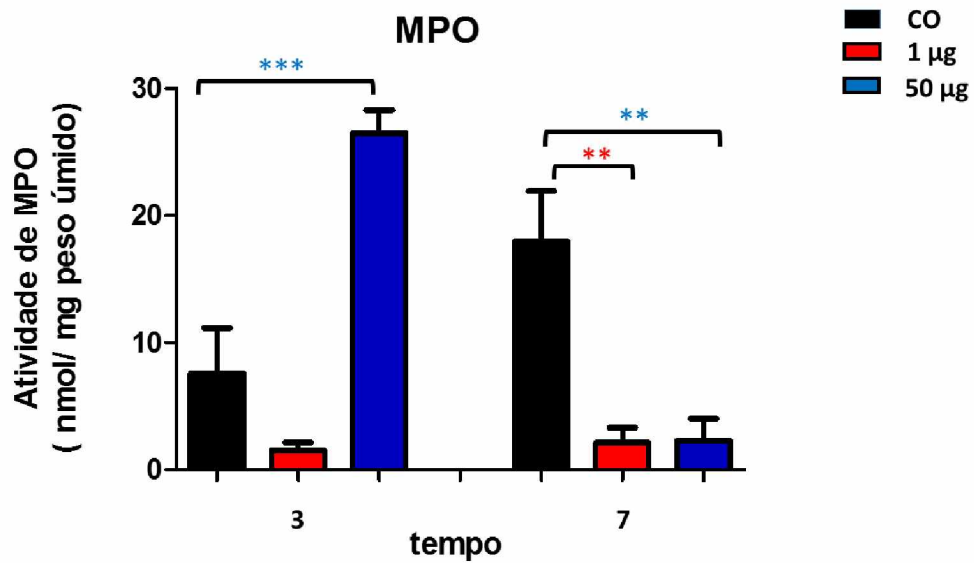


Figura 14 - Gráfico demonstrando a atividade de neutrófilos nos tempos 3 e 7 dias para o controle e as concentrações de 1µg e 50µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

6.5 Dosagem de hemoglobina

Nossas análises mostraram que no tratamento de três dias, houve um aumento significativo de hemoglobina, na concentração de 50 µg. A hemoglobina também foi significativamente aumentada no tratamento de sete dias em relação ao controle na concentração de 50µg. Mas, quando comparamos os dois grupos de tratamentos, observou-se que no tratamento de 7 dias, na concentração de 50 µg houve uma diminuição da hemoglobina em relação ao tratamento de 3 dias (Figura 15).

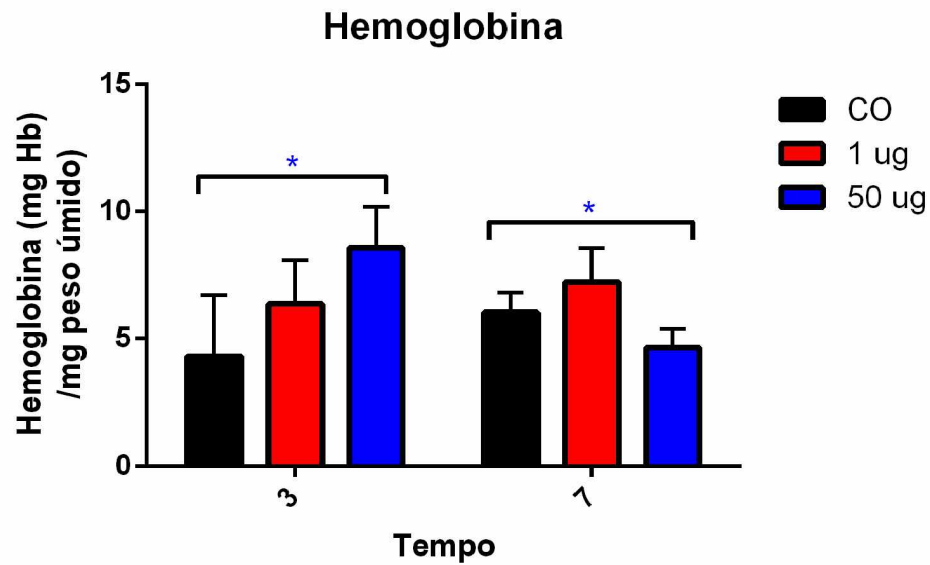


Figura 15 - Gráfico demonstrando a quantidade de hemoglobina nos tempos três e sete dias para controle e concentrações de 1 μ g e 50 μ g. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

6.6 Quantidade de vasos sanguíneos

Para a quantificação de vasos sanguíneos, utilizamos cortes histológicos, dispostos em lamínas e corados com T.G (Figura 17). Calculamos a média de vasos fotografados por campo nos dois tratamentos (3 e 7 dias). O aumento do número de vasos sanguíneos foi observado após 3 dias de tratamento em ambos os grupos tratados com a proteína Rp21 (1 μ g e 50 μ g). Após 7 dias de tratamento, não foi observado diferença estatística entre os tratamentos (Figura 16).

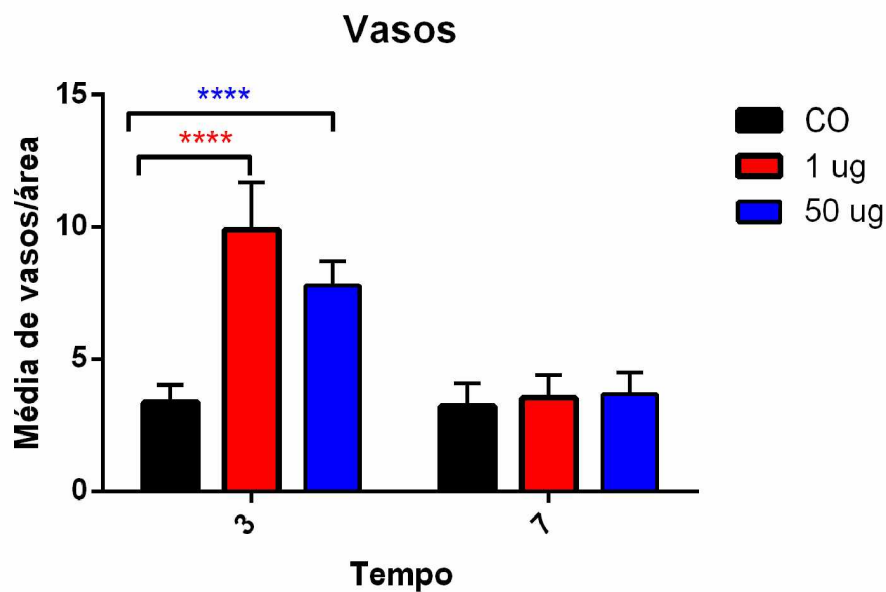
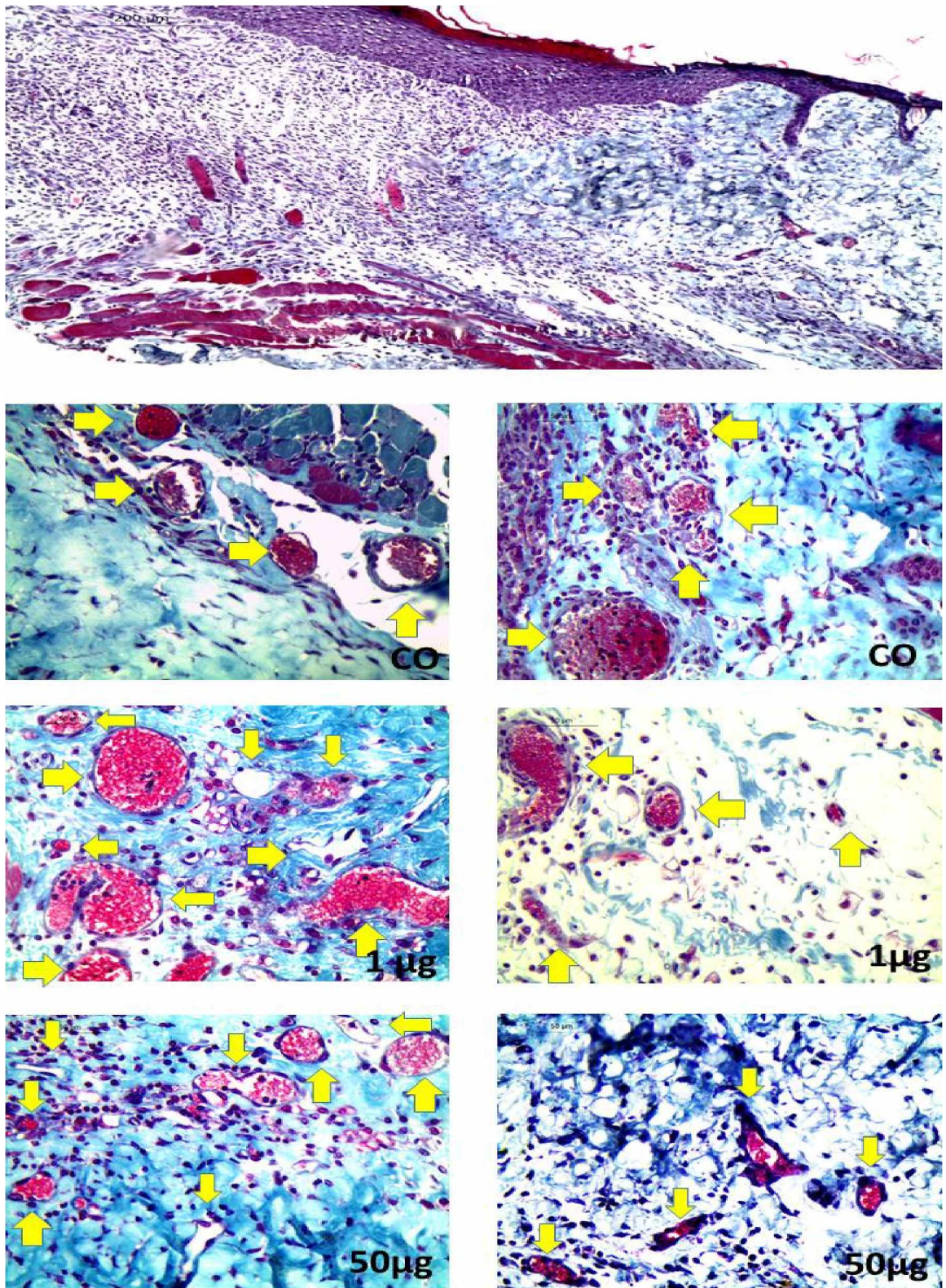


Figura 16 - Gráfico demonstrando a quantidade de vasos nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1 μ g e 50 μ g. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.



3 dias

7 dias

Figura 17 - Fotomicrografias de amostras de tecido cutâneo ferido coradas com Tricômico de Gomori. A imagem superior demonstra visão geral do tecido lesado (aumento de 20x). Demais imagens correspondem a fotos retiradas do local onde se encontrava tecido lesionado do grupo controle e nas concentrações de 1µg e 50µg nos tempos 3 e 7 dias (aumento de 40x).

6.7 Colágeno Solúvel

A quantificação de colágeno solúvel foi realizada através de análises bioquímicas utilizando ensaio colorimétrico, pela reação do (P.R). Nos animais submetidos a tratamento de três dias, diferiram significativamente do controle na concentração de 50µg. Nos submetidos a sete dias de tratamento, os resultados não apresentaram diferença significativa (Figura 18).

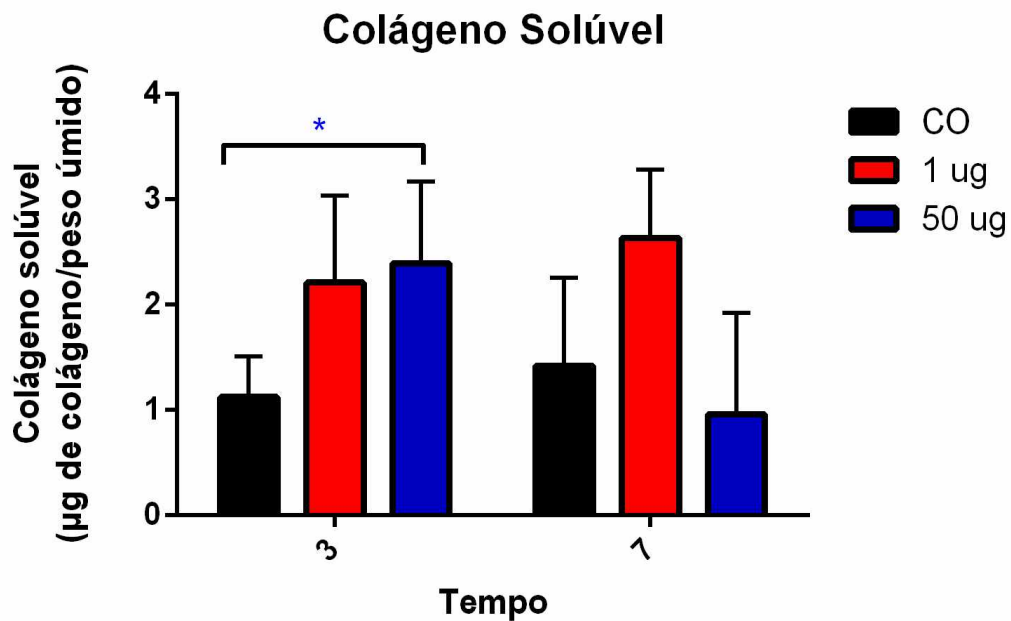


Figura 18 - Gráfico demonstrando a quantidade de colágeno solúvel nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

6.8 Colágeno total

Para a quantificação de colágeno total, as lâminas foram coradas com P.C. No tratamento de três dias, o colágeno total apresentou aumento significativo em relação ao controle, em ambas as concentrações. Já no tratamento de sete dias, a deposição de colágeno não foi significativa (Figuras 19 e 20).

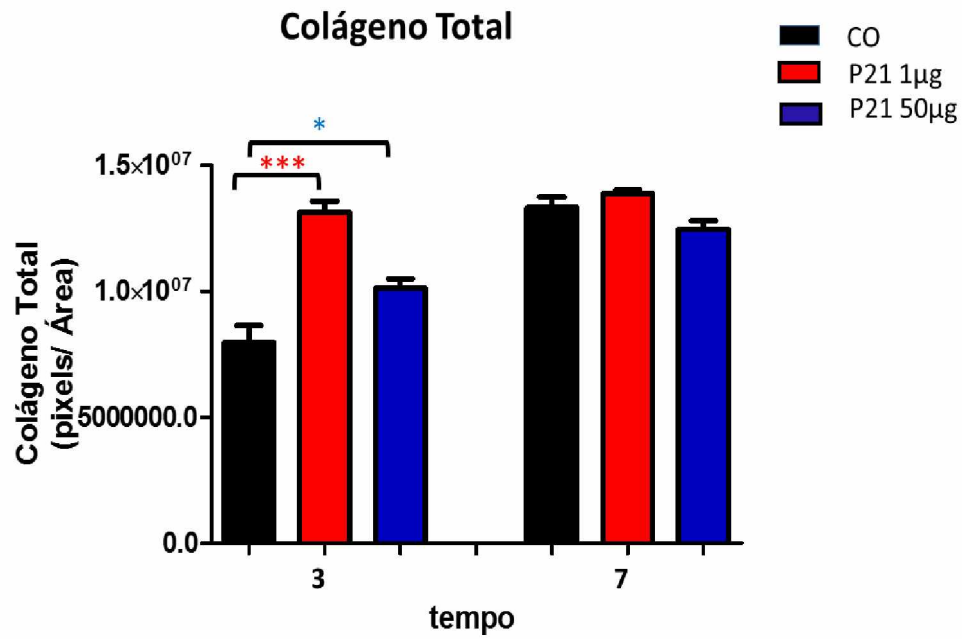


Figura 19 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno total nos tempos três e sete dias, para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

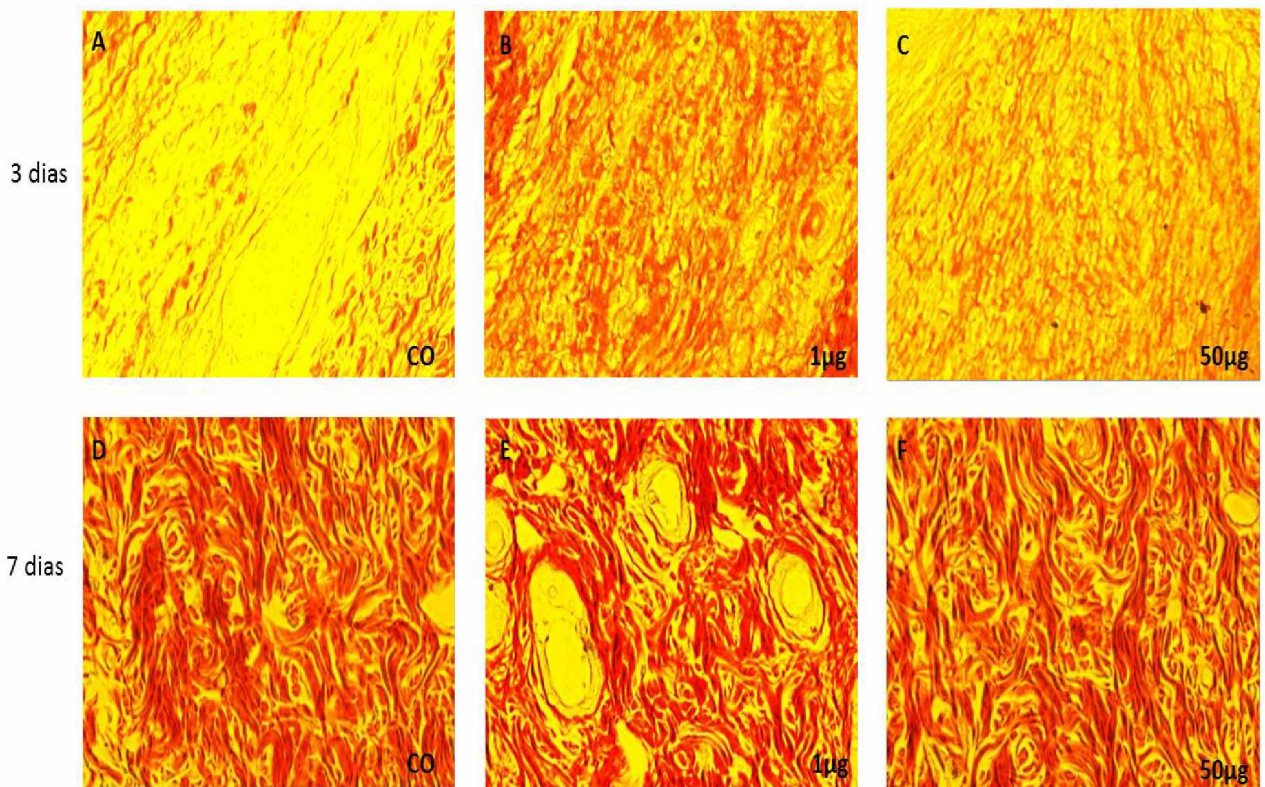


Figura 20 - Imagens de lâminas de tecido cutâneo coradas com picrosirius red P.C visualizadas em microscópio sem polarização aumento de 20x ilustrando a deposição de colágeno total.

6.9 Colágeno tipo I e III

Para a quantificação de colágenos dos tipos I e III, as lâminas foram coradas com P.C e avaliadas com filtro de polarização. No tratamento com rP21 durante três dias, o colágeno tipo I aumentou significativo em relação ao controle, apenas na concentração 1 μ g. Já no tratamento de sete dias, a deposição de colágeno foi significativa, em ambas as concentrações (1 μ g e 50 μ g) (Figura 21).

Para o colágeno do tipo III o grupo 1 μ g teve a deposição de colágeno aumentada após 3 de tratamento. Após 7 dias foi observado aumento no grupo de animais tratados com rP21 nas concentrações de 1 μ g e 50 μ g (Figura 22).

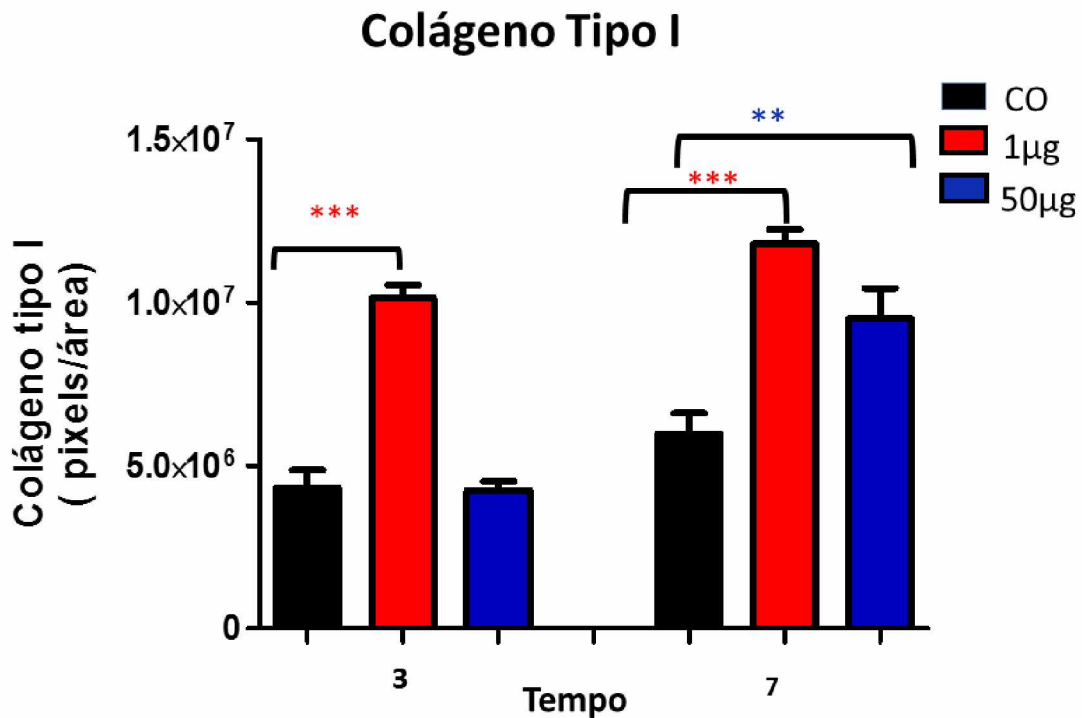


Figura 21 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno tipo I nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1 μ g e 50 μ g. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

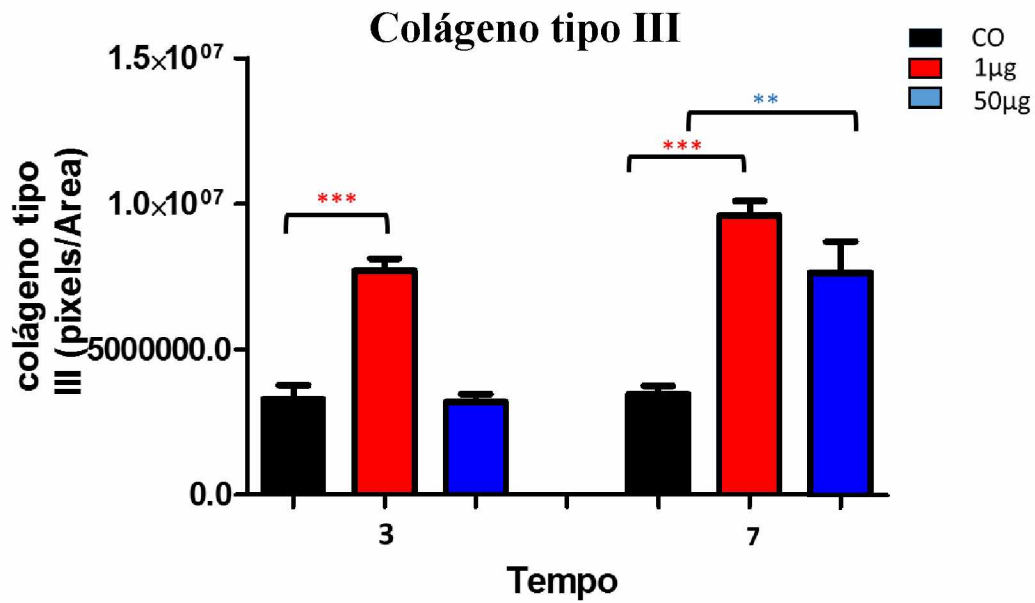


Figura 22 - Gráfico demonstrando a deposição de colágeno tipo III nos tempos três e sete dias para controle e nas concentrações de 1µg e 50µg. (*) representam diferença estatística em relação ao controle. $P \leq 0,05$.

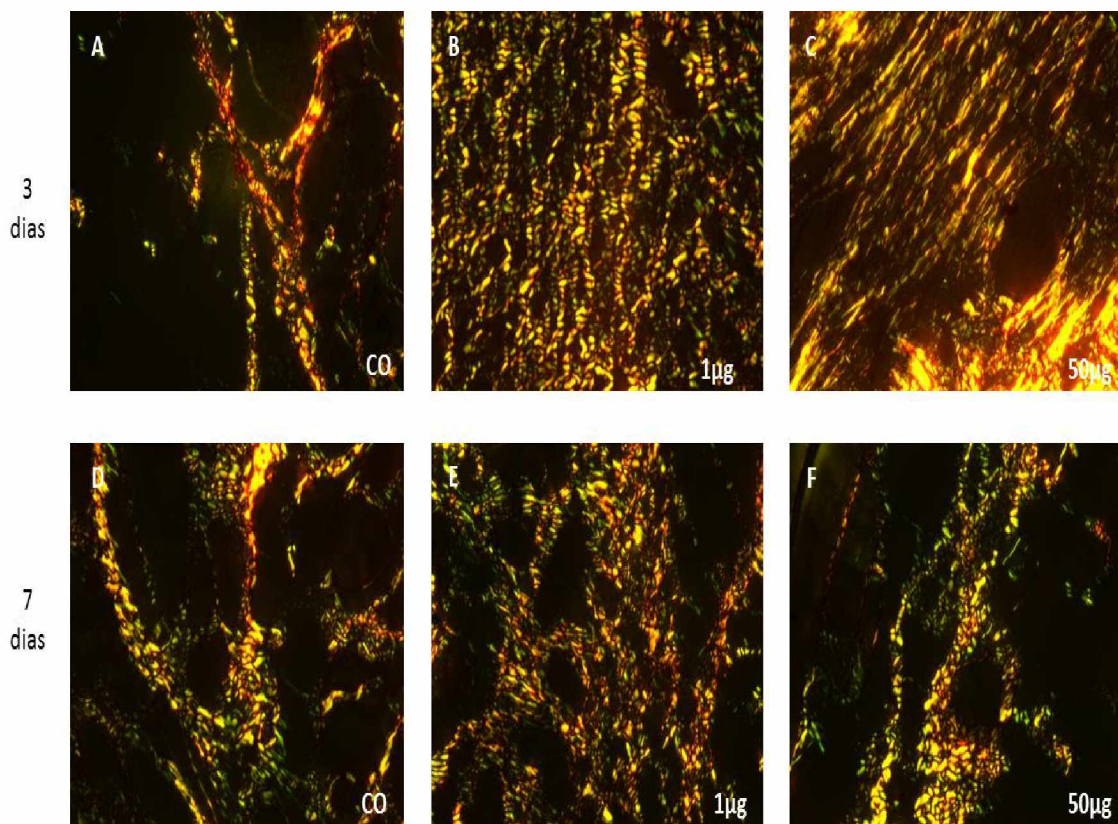


Figura 23 - Imagens de lâminas de tecido cutâneo coradas com picrosirius red P.C visualizadas em microscópio de polarização com aumento de 20x. Verde corresponde ao colágeno do tipo III e vermelho corresponde ao colágeno do tipo I. Amarelo é a sobreposição dos dois tipos.

7 DISCUSSÃO

Células, tecidos e órgãos após passarem por traumas, tendem a voltar ao equilíbrio, recompondo-se e desempenhando as funções fisiológicas outrora desempenhadas. Este mecanismo eficiente de resposta a agressões sofridas é desencadeado por meio do processo inflamatório (STRONCEK; REICHERT, 2008). Após o organismo iniciar a inflamação, ele irá recrutar diferentes tipos de células para atuarem na resposta inflamatória (LIMA et al., 2007).

Durante este processo, mastócitos, neutrófilos e macrófagos assumem papel fundamental na destruição e neutralização de micro-organismos e outras partículas e substâncias estranhas. Também atuam na resolução do coágulo de fibrina e da matriz extracelular provisória, liberando inúmeras citocinas e fatores de crescimento, e induzindo a angiogênese e reepitelização do tecido (SHAW; MARTIN, 2009).

A reepitalização ou cura epidérmica é uma das maiores preocupações no que se refere ao reparo de feridas, ela nada mais é que a renovação celular da pele danificada, restituindo a integridade do tecido e fazendo com que o mesmo possa desenvolver suas atribuições outrora desempenhas, voltando a atuar como barreira protetiva (RITTIÉ, 2016).

O fechamento da ferida é a parte final do processo de cicatrização e ele reflete todo o processo, este se faz necessário frente a necessidade de evitar exposição do organismo a invasões e contaminações externas. Um fechamento otimizado demonstra eficiência no processo, assim indivíduos acometidos por lesões cutâneas não têm sua capacidade laboral comprometida.

Análises do fechamento da ferida mostraram que a proteína rP21, na concentração de 50µg, influenciou significativamente o fechamento da ferida. Essa influência foi observada a partir do quarto dia, tornando se mais expressiva no sexto dia, permanecendo no sétimo dia. Com a proteína na concentração de 1µg essa influência só foi significativa a partir do sexto dia, permanecendo no sétimo dia. Ambas as concentrações quando comparadas ao controle, mostraram-se eficazes no fechamento de feridas, otimizando o processo.

Quanto à escolha da melhor dosagem, ambas apresentaram desempenho parecido quando avaliadas no sétimo dia, sendo que a concentração de 50µg apresenta melhor resultado, porém a diferença em relação a concentração de 1µg não foi significativa.

Comparado os resultados obtidos no fechamento de ferida em outros trabalhos, observou-se uma redução de tempo quando utilizado a rP21, dessa forma, nota-se que o tempo necessário para o fechamento da ferida foi otimizado (UPADHYAY et al., 2014; JIANG et al., 2016).

Diante dos primeiros resultados obtidos com rP21 no fechamento de feridas, discutiremos os eventos sucedidos durante o processo de reparo tecidual, ocorridos em camundongos Balb/C tratados com a proteína rP21, visando deslumbrar que efeitos da mesma no organismo levaram a otimização do processo de reparo.

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo, dando início ao processo inflamatório e impedindo que microrganismos invadam a área lesada, promovendo proteção até que ocorra o recrutamento de macrófagos. Entretanto estudos revelaram que essa presença somente é benéfica no início do processo inflamatório, e que a eliminação destas células provavelmente por macrófagos é benéfica para a aceleração do processo de reparo (DOVI; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2004).

No reparo de tecido de camundongos Balb/c utilizando a proteína rP21, verificamos que a mesma nas concentrações de 50 µg aumentou significativamente a concentração de neutrófilos no tratamento de três dias. Entretanto, diminui a concentração de neutrófilos no tratamento de sete dias em ambas as concentrações. A causa da diminuição do número de neutrófilos é provavelmente devido ao maior recrutamento de macrófagos, resultado também observado no presente estudo. A avaliação da quantidade de macrófagos no reparo tecidual, demonstraram que a proteína promoveu maior recrutamento do mesmo no intervalo de sete dias. No tratamento de três dias não se observou diferença significativa, resultado esperado pois a literatura reporta o recrutamento de macrófagos no local da ferida a partir do terceiro dia após a injúria (REINKE; SORG, 2012).

Estudos avaliando a atuação dos macrófagos no reparo tecidual, demonstraram importante função no processo de degradação da matriz extracelular. Tais descobertas reportam participação dessas células no processo de degradação e remodelação da matriz com efeitos benéficos (JOLENE et al., 2009).

Macrófagos são também responsáveis por realizar fagocitose de células mortas e bactérias, liberando fatores de crescimento, como PDGF e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que atuarão na promoção da criação de tecido de granulação (SINGER; CLARK, 1999).

Mastócitos atuam como parâmetro de avaliação no processo de reparo pois estas células inflamatórias atuam nas três fases do mesmo, promovendo a liberação de mediadores vasoativos, e ao término do processo de reparação tecidual atuam na remodelação do colágeno (AZEVEDO et al., 2009). Maior ativação dos mastócitos promove aumento de fibras colágenas (CHENG et al., 2017).

Mastócitos são importantes no processo de cicatrização devido a liberação de grânulos contendo enzimas, histamina, quimases e outras aminas ativas responsáveis por sinalizar o local danificado (ARNOLD; WEST, 1991). Quimases e as aminas ativas contribuem para o aumento de neutrófilos no sítio da lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004; OSKERITZIAN, 2012). Aminas ativas tornam os vasos próximos ao local danificado mais permeável a passagem de células mononucleares, como os neutrófilos (DIEGELMANN; EVANS, 2004; NATHAN, 2006). As quimases, por sua vez, atuam no recrutamento de neutrófilos (OSKERITZIAN, 2012).

Teixeira e outros (2015) já haviam identificado o impacto da rP21 sobre a progressão do processo inflamatório, envolvidas na invasão de célula hospedeira utilizando modelo de inflamação induzida. Os Resultados indicaram que rP21 possui perfil pró inflamatório, capaz de recrutar células do sistema imunológico (TEIXEIRA et al., 2015). Este processo é essencial para o fornecimento de fatores de crescimento e sinais de citocina que são responsáveis pelo recrutamento de células e movimento de tecidos, cruciais para o mecanismos de reparo, havendo evidências de que a intensidade do processo inflamatório irá refletir na extensão e formação da cicatriz (REINKE; SORG, 2012).

Analizou-se a quantidade de mastócitos nos dois tratamentos (3 e 7 dias), nas duas concentrações de proteína rP21 (1 μ g e 50 μ g), e foi observado um recrutamento significativo dessas células em relação ao controle, demonstrando que a proteína rP21 manteve seu perfil pró- inflamatório no reparo cutâneo,

O processo no qual a rP21 consegue recrutar células do sistema imune pode ser elucidado pela reconhecida capacidade da rP21 em induzir a produção da citocina IL-4, intimamente associada aos processos de maturação, sobrevivência, proliferação e migração de mastócitos (KALESNIKOFF; GALLI, 2008; OLSSON; TAUB; NILSSON, 2004; TEIXEIRA et al., 2018).

O tratamento com a rP21 na concentração de 50 μ g foi capaz de aumentar o conteúdo de macrófagos junto ao tecido em todos os tempos analisados. O aumento desse tipo celular pode ser em parte explicada pela ligação da rP21 ao receptor de quimiocina CXCR4, com ativação da via PI3-quinase e consequente polimerização do citoesqueleto de actina, aumentando a migração celular e a fagocitose por este tipo de célula (RODRIGUES et al., 2012). A capacidade da rP21 em promover o aumento de macrófagos locais também foi observada no processo de inflamação crônica utilizando-se como modelo um implante subcutâneo de esponjas (TEIXEIRA et al., 2015).

A atividade reduzida de neutrófilos após o tratamento com a rP21 pode estar associada a uma maior fagocitose destas células pelos macrófagos recrutados para o sítio inflamatório. Por sua vez, a fagocitose dos corpos apoptóticos dos neutrófilos e dos debris teciduais são responsáveis por desencadear alterações fenotípicas essenciais para a transição entre macrófagos classicamente ativados (M1) à macrófagos alternativamente ativados (M2) (KRZYSZCZYK et al., 2018; KUMAR et al., 2007). Este fenômeno é necessário para a resolução do processo inflamatório, uma vez que os macrófagos M2 são a principal fonte de mediadores anti-inflamatórios envolvidos com o reparo (KRZYSZCZYK et al., 2018).

Apesar de sua reconhecida importância no desenvolvimento de respostas alérgicas, os mastócitos também desempenham papel fundamental em diferentes processos fisiopatológicos, incluindo o reparo tecidual. Os mastócitos são importante fonte de mediadores liberados diretamente no meio extracelular ou estocados em seus grânulos, correspondem a cerca de 8% da população celular encontrada na derme (KOMI et al., 2019; MUKAI et al., 2018).

Nossos resultados demonstram um aumento do número de mastócitos em todos tratamentos com a rP21 (3 e 7 dias). Isso pode ser explicado pela capacidade já reconhecida da rP21 em induzir a produção da citocina IL-4, intimamente associada aos processos de maturação, sobrevivência, proliferação e migração de mastócitos (KALESNIKOFF; GALLI, 2008; OLSSON; TAUB; NILSSON, 2004; TEIXEIRA et al., 2018). Os mediadores produzidos pelos mastócitos estão envolvidos em uma série de processos associados com as diferentes fases do processo de reparo, atuando desde o recrutamento de células inflamatórias, na promoção da angiogênese e na síntese e deposição de uma nova matriz (KOMI et al., 2019).

A angiogênese, processo em que novos vasos são formados a partir dos preexistentes, constitui etapa crucial para o processo de reparo, pois os novos vasos irão participar na formação do tecido de granulação e irão suprir o tecido em crescimento de oxigênio e nutrientes (MENDONCA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Devido a esta função tão importante, algumas pesquisas de reparo tecidual focam sua atenção no estudo da angiogênese, visando interferir positivamente com uso de fatores para melhorar o processo em casos em que o indivíduo possui alguma deficiência (PHILIP et al., 2008).

A formação de novos vasos nas feridas tratadas com rP21 foi identificada através da quantificação da hemoglobina e da contagem de vasos sanguíneos. Os resultados mostraram uma diferença significativa de hemoglobina nas lesões tratadas com 50µg da proteína nos dois intervalos de tratamento (3 e 7 dias). Mas o resultado encontrado no tratamento de 3 dias foi

oposto ao encontrado no de 7 dias, havendo um aumento no número de vaso sanguíneos no primeiro e um decréscimo dos mesmos no segundo.

Resultado semelhante foi observado por Rodrigues e outros (2012) avaliando o potencial anti angiogênico da rP21, que com 9 dias de tratamento foi capaz de diminuir a quantidade de vasos (RODRIGUES et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, no início do processo de cicatrização, se faz necessário um aumento na vascularidade, evento observado nos tratamentos utilizando a proteína rP21. Entretanto para melhor resolução do processo de cicatrização, se faz necessária a regressão da capilaridade (BAUM; ARPEY, 2005). Este resultado também foi observado na utilização da proteína rP21.

Outro parâmetro investigado foi a disposição de colágeno. Estudos têm avaliado a deposição de colágeno e correlacionando a sua maior deposição a uma melhora no reparo tecidual (UPADHYAY et al., 2014). Uma maior dissociação de colágeno também contribui para uma melhora na migração celular, que desempenha papel essencial nas fases proliferativa e de remodelação (BAUM; ARPEY, 2005; GREENHALGH, 1998).

Os resultados de colágeno solúvel mostraram um aumento significativo no tratamento de três dias, com a proteína na concentração de 50 μ g.

O colágeno tipo I e III também tiveram um aumento significativo na sua deposição. Esse resultado foi observado no tratamento de três dias, apenas quando tratados com rP21 na concentração de 1 μ g.

Enquanto que no tratamento de sete dias, esse aumento foi observado para ambas as concentrações (1 μ g e 50 μ g). O colágeno total também foi avaliado e este apresentou um aumento significativo nas duas concentrações no tratamento de três dias.

Trabalhos anteriores realizados com a proteína rP21 demonstraram um aumento na polimerização do citoesqueleto de actina, através da via de sinalização da PI3-quinase, verificando também maior deposição de colágeno (RODRIGUES et al., 2012).

O aumento na deposição de colágeno, é possivelmente fruto do aumento de mastócitos também observado em nossas análises. Estudos com mastócitos demonstraram que os mesmos contribuem para a maior deposição de fibras colágenas. A ativação de mastócitos ocasiona sua degranulação, resultando na liberação de mediadores profibróticos (CHENG et al., 2017).

8 CONCLUSÃO

É possível concluir que, a proteína rP21 quando utilizada como mediador no processo de reparo tecidual, favorece o processo inflamatório recrutando células do sistema imunológico. Após alguns dias de tratamento, ela atua de forma anti angiogênica, e influencia na maior deposição de colágeno. Todos esses eventos resultam em uma melhora e aceleração do processo de fechamento de ferida, fazendo com que o organismo fique menos exposto a agentes infecciosos externos. Podemos incluir que a rP21 é um potencial alvo terapêutico, merecedor de estudos direcionados.

REFERENCIAS

1. ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
2. ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. **Revista Amazônia Science & Health**, v.3, n.4, p. 36-43, 2015. <https://doi.org/10.18606/2318-1419/amazonia.sci.health.v3n4p36-43>
3. ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology e therapeutics**, v.52, n.3, p. 407-422, 1991. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90034-J](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90034-J)
4. AZEVEDO, L. H. et al. Mast cell concentration in the wound healing process of incisions made by different instruments. **Lasers Medicais Science**, v. 24, p. 585-590, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0616-5>
5. BAGALAD, B. S.; KUMAR, K. P.; PUNEETH, H. K. Myofibroblasts: Master of disguise. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 21, n. 3, p. 462-463, 2017. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_146_15
6. BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100004>
7. BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, 1992.
8. BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol Surg**, v.31, n. 1, p.674 – 686, 2005. <https://doi.org/10.1097/00042728-200506000-00011>
9. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n.1, p. 24854, 1976.
10. BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 1, p. 206-209, 1982. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>
11. BRENER, Z. **Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo**. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.
12. BROUGHTN, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 1, p. 12-34, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>

13. BUENO, F.G. et al. Enhanced Cutaneous Wound Healing In Vivo by Standardized Crude Extract of *Poincianellapluviosa*. **PLoS ONE**, v.11, n.3, p. e0149223, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149223>
14. BUSILACCHI, A. et al. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. **CarbohydrPolym**, v. 98, n.1, p.665-676, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.044>
15. CARVALHO, H. F.; BUZATO, C.B. **Células: Uma Abordagem Multidisciplinar**. São Paulo: Editora Manole, 2005.
16. CHENG, Y. et al. Large Accumulation of Collagen and Increased Activation of Mast Cells in Hearts of Mice with Hyperlipidemia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.109, n.5, p.404-409, 2017. <https://doi.org/10.5935/abc.20170143>
17. DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: on overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p.283-289, 2004. <https://doi.org/10.2741/1184>
18. DOVI, J. V.; SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Neutrophil function in the healing wound: Adding insult to injury? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 92, n. 2, p. 275-280, 2004. <https://doi.org/10.1160/TH03-11-0720>
19. EDUCATION, A.D.A.M. **Acervo digital da plataforma hairtransplantmentor: what is the epidermis**. Disponível em: <<https://www.hairtransplantmentor.com/what-is-the-epidermis/>>. Acesso em: 12 Out. 2017.
20. FERNANDES, M. C. et al. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 977–991, 2013. <https://doi.org/10.1111/cmi.12090>
21. FERREIRA, A. S. et al. Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats. **Revista Brasileira Fisioterapia**, v.12, n.5, p.351-358, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1413-35552008000500003>
22. GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N.A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da Fisioterapia. **RevBras Fisioterapia**, v.3, ed.1, p.5-13, 1998.
23. GREAVES, N. S. et al. Current understandings of molecular and cellular mechanisms in fibroplasias and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of dermatological science**, v.72, n.3, p.206-217, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>
24. GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **The international journal of biochemistry e cell biology**, v. 30, n. 9, p.1019-1030, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00058-2)

25. GUIRRO, E. C.O. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.
26. GUO, S.A.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
27. HILL, M.G. **Acervo digital da plataforma slideplayer: Cell Types and Layers of the of the Epidermis**. Disponível em: <<http://slideplayer.com/slide/8856810/>>. Acesso em: 16 Out. 2017.
28. IRION, G. L. **Feridas, novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
29. ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina, São Paulo**, v. 89, n. 3/4, p.125-31, 2010. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p125-131>
30. JIANG, W. et al. Heparin-Based Coacervate of FGF2 Improves Dermal Regeneration by Asserting a Synergistic Role with Cell Proliferation and Endogenous Facilitated VEGF for Cutaneous Wound Healing. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 6, p.2168-2177, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00398>
31. JOLENE, E. V. et al. Macrophage Participation in the Degradation and Remodeling of Extracellular Matrix Scaffolds. **Tissue Eng Part A**. v.15, n.7, p. 1687–1694, 2009. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0419>
32. JUHASZ, I. et al. Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo. **The American journal of pathology**, v. 143, n. 5, p. 1458, 1993.
33. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
34. KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nature immunology**, v. 9, n. 11, p. 1215 - 1223, 2008. <https://doi.org/10.1038/ni.f.216>
35. KHAN, B. A. et al. Human skin, aging and antioxidants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1427>
36. KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical reviews in allergy & immunology**, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>
37. KOUMAS, L. et al. Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts. **AmJPathol.**, v.159, n.3, p. 925-35, 2001.

38. KRZYSZCZYK, P. et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. **Frontiers in physiology**, v. 9, n.1, p. 419, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>
39. KUMAR, B. et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing – exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n. 2, p.103-113, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.010>
40. LIMA, R. O. A. et al. Study on themutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **FoodandChemicalToxicology**, v. 41, n.2, p.189-192, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00208-9)
41. LUCAS, T. et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3964-3977, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
42. MACKIE, E. J.; HALFTER, W.; LIVERANI, D. Induction of tenascin in healing wounds. **The Journal of cell biology**, v. 107, n. 6, p. 2757-2767, 1988. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2757>
43. MANDELBAUM, S. H.; DI-SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais brasileiros Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>
44. MENDONÇA, R. J. D.; NETTO, C. J. Cellular aspects of wound healing. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300007>
45. MORAIS, S. M.; GIRÃO,V. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Involvement of mast cells, CD68+ and VEGF+ expressions in response to *Himatanthus drasticus* commercial latex in mice wound healing model.**Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n. 3, p. 513-522, 2017 . <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9163>
46. NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1785>
47. NEWBERN, S. Identifying pain and effects on quality of life from chronic wounds secondary to lower-extremity vascular disease: An integrative review. **Advances in skin & wound care**, v. 31, n. 3, p. 102-108, 2018. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000530069.82749.e5>

48. NOGUEIRA, R. et al. Conduitas De Enfermeiros No Tratamento De Feridas Numa Unidade De Terapia Intensiva. **NURSING JOURNAL**, v. 10, n. 3, p. 83-89, 2009.
49. OLIVEIRA, A. C. et al. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de enfermagem**. v.32. n.2. 10, 2019. <https://doi.org/10.1590/1982-0194201900027>
50. OLSSON, N.; TAUB, D. D.; NILSSON, G. Regulation of Mast Cell Migration by TH1 and TH2 Cytokines: Identification of Tumour Necrosis Factor- α and Interleukin-4 as Mast Cell Chemotaxins. **Scandinavian journal of immunology**, v. 59, n. 3, p. 267-272, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01397.x>
51. ORPIT. **Acervo digital da plataforma plasticaplexus: Cicatrização**. Disponível em: <<http://www.plasticaplexus.com.br/new/cicatrizacao.php#sthash.YGf8MYvi.dpbs>>. Acesso em 26 Out. 2017.
52. OSKERITZIAN, C. A. Mast cells and wound healing. **Advances in wound care**, v. 1, n. 1, p. 23-28, 2012. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0357>
53. PHILIP, B. et al. **The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing**. Semiologia médica. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
54. RASMUSSEN, L. H. et al. Collagen types I and III propeptides as markers of healing in chronic leg ulcers. A noninvasive method for the determination of procollagen propeptides in wound fluid--influence of growth hormone. **Annals of surgery**, v. 216, n. 6, p. 684, 1992. <https://doi.org/10.1097/00000658-199212000-00011>
55. REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res.**, v. 49, n.1, p. 35-43, 2012. <https://doi.org/10.1159/000339613>
56. RITTIÉ, L. Celular mechanisms of skin repair in humam and other mammals. **Jornal of cell communication and signaling**. v.10, n. 2, p. 103-120, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0330-1>
57. RODRIGUES, A. A. et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. Sturtevant J, ed. **PLoS ONE.**, v.7, n.12, p.141-144, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>
58. SAMUELSON, P. **Tratado de histologia veterinária**. Elsevier Health Sciences, 2011.
59. SANTOS, J. A. A. et al. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014. https://doi.org/10.1590/1983-084x/12_120

60. SAPPINO, A. P. Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations **PubMed**, v. 63, n.2, p.144-61, 1990.
61. SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. **Journal Cell Science**, v.15, n. 122, p. 3209-3213, 2009. <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>
62. SHIMIZU, H. **Shimizu's dermatology**. 2.ed, Wiley-Blackwell: Ja-kubu, 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119099086>
63. SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21 KDa protein from Trypanosoma cruzi associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>
64. SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n.1, p.738–746, 1999. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
65. SINGH, P. et al. The spatial and temporal expression patterns of integrin $\alpha 9\beta 1$ and one of its ligands, the EIIIA segment of fibronectin, in cutaneous wound healing. **Journal of investigative dermatology**, v. 123, n. 6, p. 1176-1181, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23485.x>
66. SOUTO, L. R. M. et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med J**, v. 124, n. 1, p. 71-6, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802006000200005>
67. SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.
68. STRONCEK, J. D.; REICHERT, W. M. Overview of wound healing in different tissue types. In: Reichert WM, editor. Indwelling neural implants: strategies for contending with the in vivo environment. **Boca Raton, FL: CRC Press**, v. 159, n. 3, p. 1009–1020, 2008. <https://doi.org/10.1201/9781420009309.pt1>
69. TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina: Ribeirão Preto**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v41i3p259-264>
70. TEIXEIRA, T. L. et al. Experimental evidences that P21 protein controls Trypanosoma cruzi replication and modulates the pathogenesis of infection. **Microbial pathogenesis**, v. 135, n. 1, p. 103618, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103618>

71. _____. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 16877, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16877>
72. TEIXEIRA, T. L. et al. **Papel da proteína P21 de Trypanosoma cruzi na inflamação e na infecção crônica experimental in vivo**. 2018. 93f. Tese (Doutorado em em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia, 2018.
73. TEVES, D. C. et al. Aspectos morfológicos do aspecto de cicatrização em ratos albinos sob ação da colagenase. **Folha Med.**, v. 98, n. 1, p. 191-194, 1989.
74. TOFETTI, M. H. F. C.; OLIVEIRA, V. R. A importância do uso do filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. **Revista Científica da Universidade de Franca**. v. 6, n.1, p. 59–66, 2006.
75. UPADHYAY, A . et al. Topical Application of *Cleome viscosa* Increases the Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Type III Collagen in Rat Cutaneous Wound. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, v. 214, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/680879>
76. VERA, B. **Acervo digital da plataforma tes teach: structures of the integumentary system**. Disponível em: <<https://www.tes.com/lessons/imDtMEz47WCs0Q/structures-of-the-integumentary-system> >. Acesso em: 11 Out. 2017.
77. VICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **Am. J. Infect. Control**, v. 34, n. 1, p.98-110, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>

ANEXO

Anexo 1 - Certificado de aprovação no comitê de ética



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Atuação da r P21 no reparo cutâneo", protocolo nº 046/17, sob a responsabilidade de **Tatiana Carla Tomiosso** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **09 de junho de 2017**.

(We certify that the project entitled "Atuação da r P21 no reparo cutâneo", protocol 046/17, under the responsibility of Tatiana Carla Tomiosso - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 09th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 28/08/17 Término: 28/08/19
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos Balb/c
Número de animais	84
Peso / Idade	27 kg / 9 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU