



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Helena Ribeiro Souza

**Heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína
Anexina A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau**

**Dissertação apresentada
para obtenção do Título
de Mestre em Genética**

**São José do Rio Preto - SP
2016**

Helena Ribeiro Souza

Heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina
A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Girol
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto
2016

Souza, Helena Ribeiro.
Heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína
Anexina A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau / Helena
Ribeiro Souza. -- São José do Rio Preto, 2016
141 f. : il.

Orientador: Ana Paula Girol
Coorientador: Sonia Maria Oliani
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Proteínas - Estrutura. 3. Anexina A1. 4. Mastócitos.
5. Agentes anti-inflamatórios. 6. Queimaduras. 7. Cicatrização de
ferimentos. I. Girol, Ana Paula. II. Oliani, Sonia Maria. III. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Helena Ribeiro Souza

Heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina
A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dra. Ana Paula Girol
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dra. Ana Cláudia Polli Lopes
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dra. Wanessa Silva Garcia Medina
FIPA – Catanduva

São José do Rio Preto
29 de julho de 2016

Dedico este trabalho à mulher que me inspira a agir com honestidade e responsabilidade, minha mãe, Sra. Maria Helena Denadai, como uma singela homenagem por todos os anos de carinho, cuidado, paciência e amor que teve comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Prof^a Dra. Cláudia Márcia Carareto, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), e aos demais professores do programa, principalmente aqueles que foram responsáveis pelas disciplinas que participei, pela contribuição à minha formação acadêmica.

À minha co-orientadora, Prof^a Dra. Sonia Maria Oliani, pela valiosa participação nesse trabalho.

Às Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), onde trabalho e pude desenvolver parte do meu projeto de pesquisa nos seus laboratórios, principalmente o Laboratório Multidisciplinar e o Laboratório de Histopatologia.

À Unidade Didática e de Pesquisas Experimentais (UDPE), das FIPA, que forneceu gentilmente os animais utilizados nos experimentos deste trabalho, e de onde também fiz uso das instalações.

Aos Professores e Professoras que participaram de toda a minha formação escolar e acadêmica.

Ao Professor e Técnico Mairto Roberis Geromel, que me auxiliou na microtomia do material utilizado na minha pesquisa e pelos ensinamentos nas práticas laboratoriais.

À Técnica Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon, que também me auxiliou neste e em outros trabalhos e também pelo seu companheirismo no ambiente de trabalho.

Aos colegas, também alunos do Programa de Pós-graduação em Genética, Lucas Azevedo, Lucas Possebon e Sara de Souza Costa, pelos auxílios prestados durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha família, minha mãe Maria Helena e meus irmãos Renata e Thiago pelo apoio. Também à minha pequena sobrinha Maria Cecília, pela alegria que despertou em meu coração com a sua chegada.

Às amigas e aos amigos que de várias maneiras me apoiaram e me incentivaram, sou grata pelas risadas e pelos momentos difíceis que estivemos juntos. Não cito nome algum para não cometer a injustiça de esquecer alguém e, por distração minha, não ser lembrado.

Enfim, a tantos outros que de alguma maneira colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Principalmente, agradeço à Prof^a Dra. Ana Paula Girol, pela sua orientação nesse trabalho e por seus ensinamentos que tive o prazer de ter em todos os anos da minha vida acadêmica. Não posso deixar de agradecer pelo companheirismo nesses anos em que trabalhamos juntas e também pela sua amizade.

“Antes de tudo, o trabalho é um processo de que participam o Homem e a natureza, processo em que o ser humano com sua própria ação impulsiona, regula e controla seu intercâmbio material com a natureza... Põe em movimento as forças naturais de seu corpo, braços e pernas, cabeça e mãos, a fim de apropriar-se dos recursos da natureza, imprimindo-lhes forma útil à vida humana. Atuando assim sobre a natureza externa e modificando-a, ao mesmo tempo modifica sua própria natureza.... Não se trata aqui das formas instintivas, animais, de trabalho... Pressupomos o trabalho sob forma exclusivamente humana. Uma aranha executa operações semelhantes às do tecelão, e a abelha supera mais de um arquiteto ao construir sua colmeia. Mas o que distingue o pior arquiteto da melhor abelha é que ele figura na mente sua construção antes de transformá-la em realidade. No fim do processo do trabalho aparece um resultado que já existia antes idealmente na imaginação do trabalhador. Ele não transforma apenas o material sobre o qual opera; ele imprime ao material o projeto que tinha conscientemente em mira...”

Karl Marx (1818-1883)

“...só o que podem fazer os animais é utilizar a natureza e modificá-la pelo mero fato de sua presença nela. O Homem, ao contrário, modifica a natureza e a obriga a servir-lhe, domina-a. E aí está, em última análise, a diferença essencial entre o homem e os demais animais, diferença que, mais uma vez, resulta do trabalho. Contudo, não nos deixemos dominar pelo entusiasmo em face de nossas vitórias sobre a natureza. Após cada uma dessas vitórias, a natureza adota sua vingança. É verdade que as primeiras consequências dessas vitórias são as previstas por nós, mas em segundo e em terceiro lugar aparecem consequências muito diversas, totalmente imprevistas e que, com frequência, anulam as primeiras... Assim... nosso domínio sobre a natureza... não é o domínio de alguém situado fora da natureza, mas que nós, por nossa carne, nosso sangue e nosso cérebro, pertencemos à natureza, encontramos-nos em seu seio, e todo o nosso domínio sobre ela consiste em que, diferentemente dos demais seres, somos capazes de conhecer suas leis e aplicá-las de maneira adequada. Com efeito, aprendemos cada dia a compreender melhor as leis da natureza e a conhecer tanto os efeitos imediatos como as consequências remotas de nossa intromissão no curso natural de seu desenvolvimento. Sobretudo depois dos grandes progressos alcançados neste século pelas ciências naturais, estamos em condições de prever e, portanto, de controlar cada vez melhor as remotas consequências naturais de nossos atos na produção, pelo menos das mais correntes. E quanto mais isso seja uma realidade, mais os Homens sentirão e compreenderão sua unidade com a natureza, e mais inconcebível será essa ideia absurda e antinatural da antítese entre o espírito e a matéria, o homem e a natureza, a alma e o corpo...”

Friedrich Engels (1820-1895)

APRESENTAÇÃO

Acidentes com queimaduras são um problema de saúde pública mundial. Somente no Brasil, anualmente, ocorrem inúmeros casos de queimaduras, geralmente associados a inflamações e infecções, sendo, ainda, causas de invalidez e morte. Mesmo com progressos nos tratamentos, não são raras as cicatrizes hipertróficas, deformações e outros danos teciduais nas áreas afetadas do corpo do paciente.

Alguns estudos associam os mastócitos à formação de cicatrizes patológicas, enquanto, a proteína Anexina A1 é grandemente relacionada a funções anti-inflamatória e antiproliferativa e, mais recentemente, segundo pesquisas com diferentes modelos de fibrose, apresenta também efeitos antifibróticos. Nesta investigação, buscamos aprofundar o conhecimento sobre o comportamento dos mastócitos em aspectos variados, bem como analisar a expressão e possíveis ações da proteína Anexina A1 durante as distintas fases do processo de reparo tecidual em lesões de origem térmica. Para isso, utilizamos um modelo de queimadura de segundo grau em ratos, na busca de subsídios para o desenvolvimento de novas terapias relacionadas ao tratamento de pacientes com queimaduras.

Os dados obtidos neste trabalho foram compilados no manuscrito intitulado "*Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in second degree thermal injury model treated with Silver Sulfadiazine*", que foi submetido à revista indexada internacional *Experimental Dermatology* (ISSN: 1600-0625).

Paralelamente ao desenvolvimento deste projeto de mestrado, utilizamos o mesmo modelo de lesão térmica de segundo grau em um trabalho de iniciação científica de alunos do curso de medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), também sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula Girol e auxílio da mestrandia Helena Ribeiro Souza. Neste trabalho, investigamos os efeitos do tratamento de óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) puro

ou associado ao extrato da planta medicinal conhecida como bardana (*Arctium lappa*). O conjunto dos dados propiciaram a confecção do artigo “*Lavandula officinalis and Arctium lappa in a model of second degree burn*”, que foi submetido para a revista indexada internacional *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, ISSN (1551-5044).

Ainda, o trabalho de iniciação científica da mestranda Helena Ribeiro Souza, desenvolvido anteriormente durante o seu Bacharelado em Ciências Biológicas, sobre a influência do exercício aquático em modelo de osteoporose, com orientação do Prof. Dr. Maurício Ferraz de Arruda e colaboração da Profa. Dra. Ana Paula Girol, possibilitou a redação do artigo intitulado “*Biochemical analysis and bone remodeling in response to oophorectomy and aquatic training*”. Este trabalho foi aceito pela revista *Acta Ortopédica Brasileira* (ISSN 1809-4406), e será publicado no seu próximo volume (v.24, n.5, julho/agosto, 2016).

Um outro trabalho de iniciação científica, também com alunos do curso de medicina das FIPA, com orientação da Profa. Dra. Ana Paula Girol e participação da mestranda Helena Ribeiro Souza, recentemente foi publicado na revista do curso de Enfermagem das FIPA, a *CuidArte Enfermagem* (ISSN 1982-1166, v.10, n.1, janeiro/junho, 2016) com o título “*Expressão de metaloproteinases de matriz e anexina a1 em tumores de pele de diferentes graus de malignidade*”.

Os manuscritos e os artigos citados seguem anexados na íntegra.

RESUMO

O processo de reparo de lesões térmicas pode ser dividido nas fases de inflamação, proliferação e remodelação. No seu processo de desgranulação, os mastócitos (MCs) liberam fatores quimiotáticos, citocinas e proteases, como triptase e quimase, para o meio extracelular, contribuindo na degradação da matriz lesada e síntese de uma nova. Além disso, estudos indicam que os MCs armazenam a proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1), envolvida na inflamação, apoptose, crescimento e diferenciação celular. Contudo, não se conhecem relatos da expressão e função da AnxA1 no reparo de queimaduras. Diante disso, os objetivos desse estudo foram quantificar e avaliar a ativação, acúmulo de histamina e heterogeneidade para triptase e quimase dos MCs, bem como, verificar a expressão da AnxA1, quantificar macrófagos, e dosar as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e a quimiocina MCP-1 em modelo de queimadura de segundo grau em ratos *Wistar*. Para o desenvolvimento da lesão os animais foram anestesiados e submetidos à aplicação de um bloco metálico aquecido no dorso. Os animais foram divididos em grupos controles e tratados com pomada de sulfadiazina de prata a 1% (SDP 1%). As análises foram realizadas em 3, 7, 14 e 21 dias após injúria, e também em fragmentos de pele normal. Avaliações macroscópicas e histopatológicas da cicatrização confirmaram as características de queimadura de segundo grau e a melhor evolução da cicatrização nos animais tratados. A quantificação dos MCs mostrou grande quantidade de células intactas na pele normal e redução significativa dessas células nas fases de inflamação (dia 3) e de proliferação (dia 7). Nas fases de proliferação de matriz (dia 14) e remodelação (dia 21) foi verificada maior quantidade de MCs nos animais controles e essas células foram observadas, principalmente, desgranuladas no dia 14 e intactas no dia 21. Ainda, no grupo tratado aos 7 dias e em ambos os grupos aos 14 dias, foi encontrada diferença entre MCs com grande quantidade de histamina e MCs totais. A análise da heterogeneidade dos MCs revelou maior número de MCs positivos para triptase (MCT) do que para quimase (MCQ) na pele normal e

redução de MCTs e MCQs nas primeiras fases da cicatrização. Contudo, na fase de remodelação, muitos MCQs foram observados no grupo controle. A expressão da AnxA1 foi fraca na pele normal com aumento nas fases de inflamação e de proliferação. Aos 21 dias após lesão, a expressão da AnxA1 foi maior nos animais tratados com SDP 1%, no estroma e também em regiões epiteliais próximas à neogênese dos anexos cutâneos. As análises das citocinas mostraram aumento das pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e da citocina anti-inflamatória IL-10, nas fases iniciais do reparo, especialmente nos dias 3 e 7. O mesmo foi observado com relação a quimiocina MCP-1 e a quantificação de macrófagos. Nossos resultados evidenciaram diferenças no número de MCs e na imunomarcagem da AnxA1 entre os grupos estudados, moduladas pelo tratamento com a SDP 1% e indicam que essas células e proteínas podem ser alvos terapêuticos no processo de regeneração de queimaduras.

Palavras-chave: *queimaduras, cicatrização, mastócitos, triptase, quimase, anexina A-1, inflamação, interleucinas.*

ABSTRACT

The repair process of thermal injury can be divided into phases of inflammation, proliferation and remodeling. The mast cells (MCs) in their degranulation process, release chemotactic factors, cytokines and proteases, as tryptase and chymase, to the extracellular environment contributing to the degradation of damaged matrix and synthesis of a new one. Moreover, studies indicate that MCs store the antiinflammatory protein annexin A1 (AnxA1) which involved in inflammation, apoptosis, growth and cell differentiation. However, there are no known reports of the expression and function of AnxA1 in burns repair. Thus, the objectives of this study were to quantify, assess the activation, histamine accumulation and heterogeneity for tryptase and chymase of MCs, as well as, check the expression of AnxA1, associated with macrophages quantification and the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and MCP-1 in a second degree burn model in rats. For the development of the lesions, animals were anesthetized for applying a water-heated metal block in the dorso. The animals were divided into control and treated or not with the cream of silver sulfadiazine 1% (SDP 1%). The analyzes were performed on 3, 7, 14 and 21 days after injury, and also in normal skin fragments. Macroscopic and histopathological evaluations of healing confirmed the burning characteristics of second degree and the better progress of wound repair in treated animals. Quantification of MCs showed large amount of intact cells in normal skin and a significant reduction of these cells in the stages of inflammation (day 3) and proliferation (day 7). In the phases of matrix proliferation (day 14) and remodeling (day 21) it was observed increased amount of MCs, only in the control animals, and these cells were mainly degranulated on day 14, but intact on day 21. Also, in the treated group on day 7 and in both groups on day 14, it was found difference between MCs with large amounts of histamine and total MCs. The heterogeneity analysis revealed more MCs positives for tryptase (MCT) than for chymase (MCC) on normal skin and reduced MCTs and MCCs in the early stages of healing. However, in the remodeling phase, many MCCs were observed in the control

group. The expression of AnxA1 was low in normal skin and increased in the stages of inflammation and proliferation. On 21 days after injury, the expression of AnxA1 was higher in animals treated with SDP 1% in the stroma and epithelial cells especially in regions close to neogenesis of skin attachments. Analysis of the inflammatory mediators showed an increase pro-inflammatory TNF- α , IL-1 β and IL-6 and anti-inflammatory IL-10 cytokines in the early stages of the repair, especially on days 3 and 7. The same was observed for MCP-1 chemokine and quantification of macrophages. Our results showed differences in the number of MCs and AnxA1 expression between groups, that were modulated by treatment with the SDP 1%, indicating that these cells and protein can be used as therapeutic targets in burns regeneration process.

Keywords: burns, wound healing, mast cell, tryptase, chymase, annexin A1, inflammation, interleukins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fases do reparo de lesões cutâneas e principais tipos celulares envolvidos	22
Figura 2. Mediadores de MCs e suas funções no reparo em lesões.....	24
Figura 3. Estrutura da proteína anexina A1 (AnxA1).	26
Figura 4. Protocolos de indução da queimadura e tratamentos..	31
Figura 5. Análises macroscópicas e histopatológicas do processo de cicatrização de queimadura de segundo grau.....	36
Figura 6. Dosagem de citocinas e quantificação de macrófagos na cicatrização de queimaduras de segundo grau.....	38
Figura 7. Desgranulação e acúmulo de histamina nos MCs no processo de cicatrização da queimadura.....	41
Figura 8. Heterogeneidade dos MCs para triptase e quimase no processo de cicatrização da queimadura.....	43
Figura 9. Análise densitométrica da AnxA1 no citoplasma dos MCs.....	44
Figura 10. Expressão de AnxA1 em processo de cicatrização de queimadura de segundo grau.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celcius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin (alpha-actina de músculo liso)
A	Alanina
Ac2-26	Peptídeo mimético da região N-terminal da anexina-A1
Ag ⁺	Prata ionizada
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Proteína anexina A1
AnxA1 ^{-/-}	Animais deficientes de AnxA1
AzT	Azul de toluidina
BSA	Bovine serum albumin (soro de albumina bovina)
C	Grupo de animais controles
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CD	Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
cm	Centímetro
DAB	Substrato diaminobenzidina
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
E	Ácido glutâmico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
F	Fenilalanina
FcεR	Fragment crystallizable epsilon receptor (receptores Fc-epsilon)
FGF	Fibroblast growth factor (fator de crescimento de fibroblastos)
FPRs	Formyl peptide receptor (receptores de peptídeos formilados)
g	Gramas

HE	Hematoxilina-Eosina
I	Isoleucina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
K	Lisina
Kg	Kilograma
KGF	Keratinocyte growth factor (fator de crescimento de queratinócitos)
L	Litro
L	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Metionina
MC	Mastócitos
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (proteína quimioatrativa de monócitos-1)
MCQ	MC quimase positivo
MCT	MC triptase positivo
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	Matrix metalloproteinases (metaloproteinase de matriz)
N	Amostras de pele normal
n	Número de animais
P ou p	valor-p (significância do teste estatístico)
PBS	Phosphate buffered solution (solução tampão de fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
pg	Picograma
Q	Glutamina
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto

RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação de polymerase em cadeia quantitativa em tempo real)
S	Serina
SCF	Stem cell fator (fator de célula-tronco)
SDP	Grupo de animais tratados com Sulfadiazina de Prata a 1%
SDP 1%	Pomada a base de Sulfadiazina de Prata a 1%
S.E.M.	Standard error of mean = Erro padrão da média
S-O	Safranina-O
T	Treonina
TGF	Transforming growth factor (fator de transformação do crescimento)
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral- alpha)
UA	Unidades Arbitrárias
V	Valina
vs	Versus
W	Triptofano
WS1	Linhagem de fibroblastos de pele humana
Y	Tirosina

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	20
1.1 Pele e queimaduras	20
1.2 Processo de reparo de queimaduras	21
1.3 Mastócitos	23
1.4 Anexina A1	25
II. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Específicos	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Modelo experimental de queimadura e protocolos de tratamento	30
3.3. Análises histopatológicas	31
3.4. Análises quantitativas dos níveis de citocinas e quimiocina	31
3.5 Quantificação dos mastócitos	32
3.6. Análises Imuno-histoquímicas	33
3.6.1 Quantificação de Macrófagos	33
3.6.2 Heterogeneidade de MCs	33
3.6.3 Proteína AnxA1	33
3.7 Análises estatísticas	34
IV. RESULTADOS	35
4.1 Aspectos macroscópicos da evolução das lesões	35
4.2 Análises histopatológicas	35
4.3 Dosagem de citocinas e MCP-1 no sobrenadante do macerados das lesões e quantificação de macrófagos nos tecidos	37
4.4 Quantificação, análise de ativação e acúmulo de histamina dos MCs	40
4.5 Heterogeneidade dos MCs	42
4.6 Expressão da ANXA1 no citoplasma dos MCs, na epiderme e derme	43
V. DISCUSSÃO	47
VI. CONCLUSÕES	60

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICES	72
ANEXO A - Certificado de aprovação no CEUA (nº12/14)	72
APÊNDICE A – Artigo: “ <i>Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with Silver Sulfadiazine treatment</i> ”	73
APÊNDICE B – Artigo: “ <i>Lavandula officinalis and Arctium lappa in a model of second degree burn</i> ”	99
APÊNDICE C – Artigo: “ <i>Biochemical analysis and bone remodeling in response to oophorectomy and aquatic training</i> ”	129
APÊNDICE D – Artigo: “ <i>Expressão de metaloproteinases de matriz e anexina a1 em tumores de pele de diferentes graus de malignidade</i> ”	135

I. INTRODUÇÃO

1.1 Pele e queimaduras

O maior órgão do corpo humano, a pele, apresenta uma complexa estrutura formada pela epiderme, constituída principalmente de queratinócitos, e pela derme, composta principalmente de fibroblastos e uma densa matriz extracelular (MEC), rica em fibras de colágeno. Em continuidade à derme, aparece a hipoderme, tecido subcutâneo, com muitos adipócitos, constituindo um panículo adiposo. A pele é rica em vasos sanguíneos, terminações nervosas e anexos cutâneos, tais como pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Sua principal função é a cobertura e proteção dos órgãos internos, e, exatamente por estar em contato direto com o meio externo, é alvo de vários tipos de injúria, incluindo cortes e queimaduras. Uma vez rompida ou degenerada a barreira dérmica, variados mecanismos são desencadeados para restaurar essa proteção o mais rápido possível (YILDIRIMER, THANH, SEIFALIAN, 2012).

As queimaduras constituem um problema de saúde pública nacional e mundial. Somente no Brasil, ocorrem cerca de 1.000.000 de acidentes com queimaduras por ano (CRUZ, CORDOVIL, BATISTA, 2012). As lesões teciduais das queimaduras podem ser de origem térmica pela exposição a chamas, superfícies e líquidos aquecidos, frio extremo, produtos químicos, radiação ou fricção (EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010). A profundidade do trauma na pele e a extensão da superfície corporal afetada devem ser avaliadas com a maior precisão possível, pois são os principais fatores na repercussão sistêmica e na sobrevida do paciente (CRUZ, CORDOVIL, BATISTA, 2012).

A classificação das queimaduras em graus é feita de acordo com a gravidade e profundidade da lesão, sendo considerada de primeiro grau ou superficial, quando é restrita a epiderme, causando vermelhidão; de segundo grau superficial, quando atinge a derme superficial, ou de segundo grau profunda, quando se estende para a camada mais profunda da derme, ambas com hipersensibilidade e dor; e, de terceiro grau quando a lesão envolve a camada subdérmica, sem sensibilidade e de coloração esbranquiçada (MEYERHOLZ et al., 2009). Porém, as queimaduras mais superficiais podem progredir para lesões mais profundas em até 4 dias após a sua ocorrência (EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010).

As lesões por queimadura são acompanhadas por intensa inflamação, danos teciduais, infecções e, mesmo com melhores prognósticos e progressos nos tratamentos, ainda são causas importantes de invalidez e morte (SUMMER et al., 2007; PARIHAR et al., 2008). Além disso, a incidência de dor crônica e depressão associadas à necessidade de procedimentos operatórios múltiplos, hospitalização e reabilitação prolongadas, levam a altos custos de cuidados de saúde (RICHARDSON, MUSTARD, 2009).

Um dos tratamentos mais utilizados para as queimaduras é o uso da prata ionizada (Ag^+). As propriedades antimicrobianas da Ag^+ são conhecidas há séculos e foram largamente utilizadas em infecções, anteriormente à descoberta dos antibióticos, como gonorreia e tétano. A ação microbicida da Ag^+ é proveniente da sua capacidade de reagir com lipídeos de membrana, e em bactérias com a parede celular, e assim, ser absorvida pelas células. Similar à ação de outros metais, a Ag^+ intoxica enzimas da cadeia respiratórias comprometendo o transporte de elétrons, interage com DNA e interfere na síntese de RNA, além de interagir com os aminoácidos arginina e glutamato, danificando proteínas e levando a célula à apoptose (ATIYEH et al., 2007; MARX, BARILLO, 2014). Porém, a preferência por esse tratamento não é unânime. Alguns autores sugerem que os tratamentos com prata têm seus efeitos citotóxicos potencializados se o íon estiver em grandes quantidades. Mesmo assim, desde a década de 60, a Ag^+ , juntamente com a droga antibiótica Sulfadiazina, são usadas no tratamento de queimaduras (MARX, BARILLO, 2014).

1.2 Processo de reparo de queimaduras

A cicatrização de feridas é uma resposta bem ordenada a partir da lesão e o processo de reparo tecidual pode ser dividido em fases de inflamação, proliferação celular inicial e posteriormente da MEC, e, por fim, maturação ou remodelação do tecido (Figura 1), sendo que cada fase osquestra o desenvolvimento da fase seguinte (STRONCEK, REICHERT; 2007; GURTNER et al., 2008; YILDIRIMER, THANH, SEIFALIAN, 2012; EHRLICH; WONG, GURTNER, LONGAKER; 2013; TAKEO, LEE, ITO, 2015).

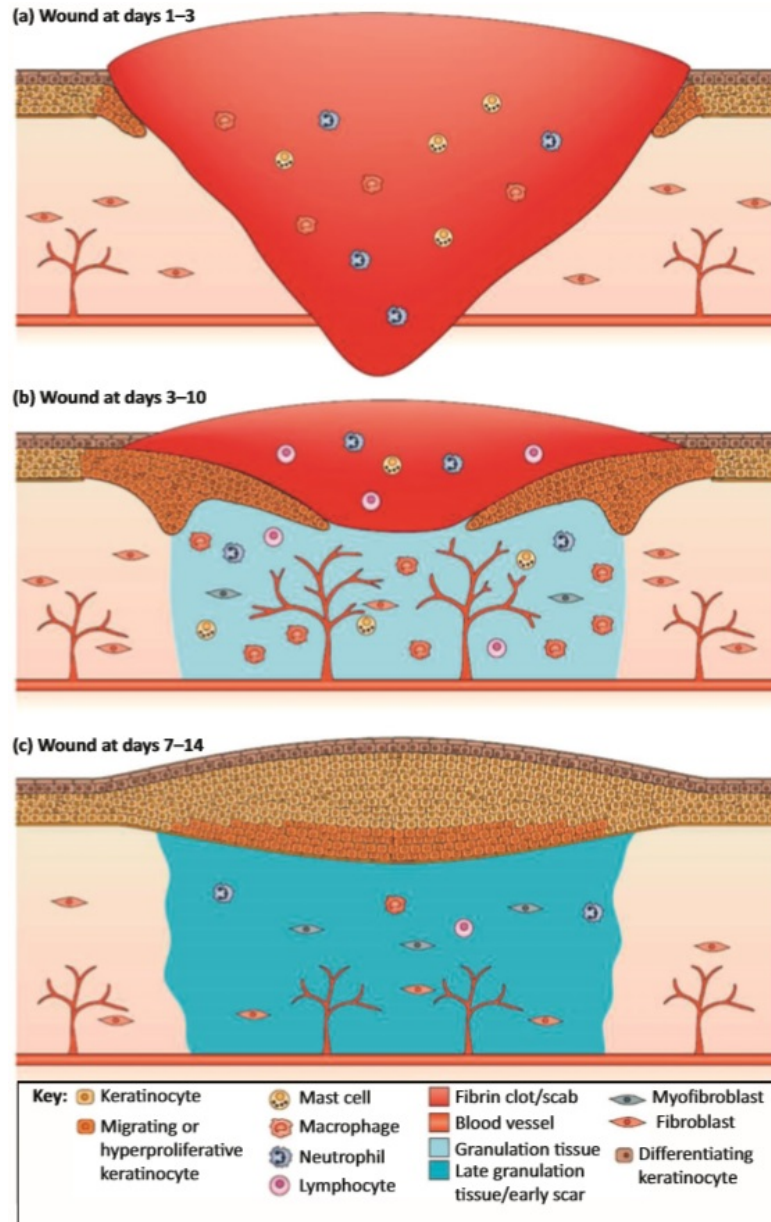


Figura 1. Fases do reparo de lesões cutâneas e principais tipos celulares envolvidos. A: Fase inicial de inflamação aguda, com infiltração de leucócitos. B: Fase de proliferação celular e síntese de matriz primária. C: Fase de maturação ou remodelação tecidual (YILDIRIMER, THANH, SEIFALIAN, 2012).

A inflamação é iniciada imediatamente após a lesão por meio da liberação de sinais moleculares pró-inflamatórios, que atraem leucócitos, e também sinais anti-inflamatórios, que controlam a resposta (STRONCEK, REICHERT, 2007). Investigações mostraram que dentre as citocinas envolvidas no complexo processo da modulação inflamatória na cicatrização de queimaduras, estão as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), $IL-6$ e fator de necrose tumoral alpha ($TNF-\alpha$), e a citocina anti-inflamatória $IL-10$, as quais apresentam diferenças na sua

expressão durante a evolução do processo cicatricial (GAUGLITZ et al., 2008; OPPELTZ et al., 2012; KUBO et al., 2014). Além das citocinas, a fase inflamatória envolve também liberação de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o de queratinócitos (KGF) o de transformação do crescimento (TGF), e também proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), que atrai macrófagos e também mastócitos (MC) (GILLITZER, GOEBELER, 2001; BARRIENTOS et al., 2008).

Durante a fase de proliferação ocorrem os processos de angiogênese, surgimento do tecido de granulação, deposição de colágeno e fibronectina que formam a matriz inicial, reepitelização, onde queratinócitos migram sobre a MEC recém sintetizada, e, ainda, pode haver contração da ferida (STRONCEK, REICHERT, 2007; EVERS, BHAVSAR MAILÄNDER, 2010). O tecido de granulação é indispensável à proliferação, diferenciação e migração celular, pois é responsável por fornecer nutrientes e oxigênio para as células envolvidas nesses processos e também por escoar os produtos do metabolismo celular (EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010; TAKEO, LEE, ITO, 2015). A fase final, de remodelação da matriz, é caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada e neogênese de anexos cutâneos, no entanto, cicatrizes patológicas podem se formar devido a síntese excessiva de colágeno (STRONCEK, REICHERT, 2007). Estudos indicam que um prolongamento da fase de inflamação pode induzir a formação de fibroses e cicatrizes hipertróficas (TAKEO, LEE, ITO, 2015).

Para avaliar as características morfológicas e fisiológicas, bem como a utilização de agentes terapêuticos na evolução de queimaduras foram estabelecidos modelos de queimadura termiais de segundo grau em ratos, facilmente reprodutíveis, e que mostram semelhanças clínicas e histopatológicas com as queimaduras de segundo grau em humanos na clínica médica (MEYERHOLZ et al., 2009).

1.3 Mastócitos

Os MCs são provenientes das células-tronco CD34+ (Cluster of Differentiation 34+) da medula óssea, são distribuídos nos tecidos conjuntivos do corpo através da circulação e terminam sua diferenciação após infiltração nos tecidos, adquirindo características especiais, tais como o desenvolvimento do conteúdo dos seus grânulos, ricos em histamina, glicosaminoglicanos e proteases específicas (ARTUC

et al., 1999; HERMES et al., 2000; DOUAIHER et al., 2014). Em murinos, a maturação dos MCs pode ser observada conforme a quantidade de histamina acumulada por essas células, evidenciada pela reação da histamina ao corante Safranina-O (WELLE, 1997; FEYERABEND et al., 2005; NAKAZAWA et al., 2014).

O conteúdo dos grânulos dos MCs pode ser liberado por meio da ativação com ligação da Imunoglobulina (Ig) E, aos receptores Fc-epsilon (FcεR), mas também, por ligação de IgG, ativação dos receptores *toll-like* por produtos microbianos (HARVIMA, NILSSON, 2011; SILVA, JAMUR, OLIVER, 2014), proteínas do sistema complemento C3a e C5a, neuropeptídeos, fator de célula-tronco (SCF) (ARTUC et al., 1999; HARVIMA, NILSSON, 2011; SILVA, JAMUR, OLIVER, 2014), TNF, IL-2, IL-8, prostaglandinas, leucotrienos (ARTUC et al., 1999), glicocorticoides, IL-1β, IL-6 (DOUAIHER et al., 2014), além de drogas e estímulos físicos (SILVA, JAMUR, OLIVER, 2014).

Os MCs são células que apresentam importantes funções tanto na fase aguda quanto na fase de remodelação da ferida após injúria por queimadura (Figura 2) (DONG et al., 2013; WILGUS, WULFF, 2014). No processo de desgranulação, os MCs liberam fatores quimiotáticos e proteases como triptase e quimase para o meio extracelular, contribuindo na degradação da MEC, promoção da angiogênese e remodelação tecidual por meio de proteólises seletivas na matriz e ativação de metaloproteinases (MMPs) (NISHIKORI et al., 1998; DOUAIHER et al.; WERNERSSON, PEJLER; 2014).

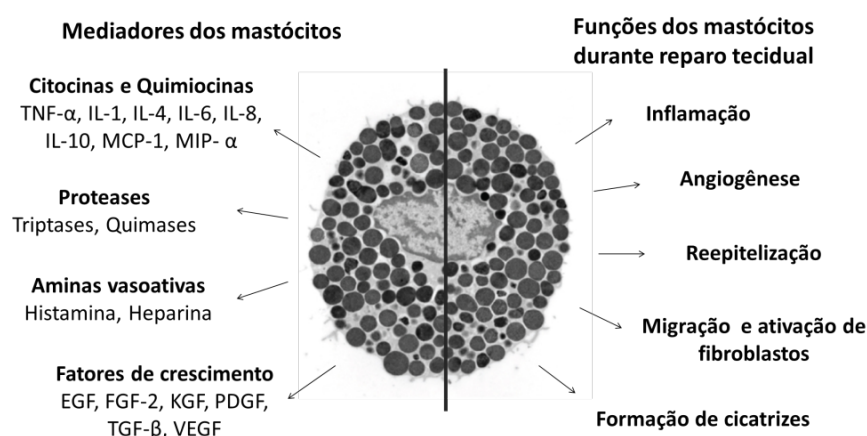


Figura 2. Mediadores dos mastócitos e suas funções no reparo em lesões. Os vários mediadores químicos liberados contribuem nas diferentes fases do reparo tecidual. (Modificado de WERNERSSON, PEJLER; WILGUS, WULFF; 2014).

A expressão variável das enzimas triptase, quimase e catepsina G, tem levado ao reconhecimento de diferentes subpopulações de MCs humanos e de murinos. MCs que expressam triptase e quimase são abundantes no tecido conjuntivo da pele, submucosa do trato gastrointestinal, parênquima mamário, miocárdio, linfonodos, conjuntiva e sinóvia. Enquanto, aqueles que expressam somente triptase são localizados, geralmente, na mucosa dos tratos respiratório e gastrointestinal. A terceira e menor população de MCs expressa somente quimase e catepsina G (WELLE, 1997; BISCHOFF, 2007).

Em MCs humanos são encontrados três tipos de triptases (α , β e γ) e um tipo de quimase, enquanto que nos MCs de murinos existem vários tipos de ambas as proteases (BISCHOFF, 2007; WERNERSSON, PEJLER, 2014). As triptases clivam proteínas em resíduos de tripsina e de serina (WELLE, 1997) e quimases em resíduos de serina (WELLE, 1997; DOUAIHER et al., 2014), além de serem proteínas pró-inflamatórias (HARVIMA; NILSSON, 2011). Além disso, ambas as proteases são responsáveis por clivar trechos terminais de proteínas para torná-las ativas. A triptase ativa a uroquinase (HARVIMA; NILSSON, 2011) e MMPs (WERNERSSON, PEJLER, 2014) e a quimase ativa além de MMPs (WERNERSSON, PEJLER, 2014), a IL-1 β , a TGF- β 1 (DONG, et al., 2014) a colagenase (SAARINEN et al., 1994) e converte angiotensina I para II (DONG, et al., 2013).

Embora existam poucos estudos de MCs em queimaduras, investigações anteriores indicaram a importância da quimase liberada por essas células no processo de cicatrização de feridas induzidas por queimadura em ratos, relacionada à densidade de capilares, acúmulo de colágeno e número de MCs (NISHIKORI et al., 1998; BAYAT et al., 2008).

1.4 Anexina A1

Além das proteases, estudos em outros modelos animais, indicaram que os grânulos dos MCs armazenam a proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1) (OLIANI et al., 2000). A AnxA1 foi o primeiro membro clonado da superfamília das anexinas, proteínas que se ligam a fosfolipídios dependentes de cálcio (Ca^{++}) com funções diversas (LIM, PERVAIZ, 2007; GAVINS; HICKEY, 2012). As anexinas são agrupadas de acordo com as suas características estruturais, incluindo, a presença

de um domínio central, constituído por quatro repetições de 60 a 70 aminoácidos cada, com alta afinidade ao Ca^{++} , ligado a uma sequência N-terminal, que confere especificidade de ação para cada membro da superfamília anexina (D'ACQUISTO, PERRETTI, FLOWER, 2008) (Figura 3). Além dos MCs, a expressão da AnxA1 também foi observada em outros tipos celulares, como nas células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos (OLIANI et al., 2001; GIL et al., 2006; GASTARDELO et al., 2009) queratinócitos e fibroblastos (SATO-MATSUMURA et al., 1996; NEYMEYER et al., 2015).

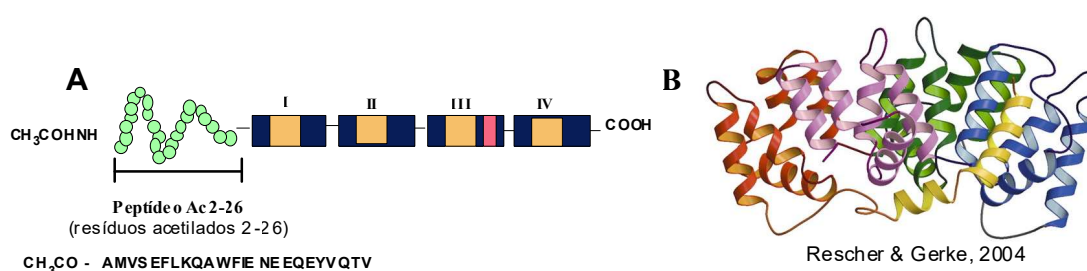


Figura 3. Estrutura da proteína anexina A1 (AnxA1). A: Representação esquemática da estrutura primária da AnxA1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). B: Ilustração do arranjo tridimensional da proteína (RESCHER; GERKE, 2004).

A AnxA1 apresenta múltiplas funções em diferentes sistemas relacionadas à inflamação (GIROL et al., 2013), crescimento celular (CÔTÉ et al., 2010), migração celular, transporte de membrana, proliferação, diferenciação celular e apoptose (LIM, PERVAIZ, 2007; GAVINS, HICKEY, 2012).

Nas células inativas, a AnxA1 apresenta, predominantemente, localização intracelular, sendo translocada após ativação para a superfície celular, onde interage com receptores transmembrana de sete passagens, acoplados à proteína G, os receptores de peptídeos formilados (FPRs) (PERRETTI, DALLI, 2009; GIROL et al., 2013; D'ACUNTO et al., 2014). Após a descoberta que atividade biológica da AnxA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros aminoácidos da porção N-terminal da proteína (peptídeo Ac2-26), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação (LIM, PERVAIZ, 2007; BIZZARRO et al., 2012; GIROL et al., 2013).

Na pele, em condições normais, a expressão da AnxA1 é reduzida (BASTIAN et al., 1993), mas a distribuição e expressão anormal da proteína foram observadas em inflamações e tumores de pele (BASTIAN et al., 1993; OLIANI et al., 2008;

BOUDHRAA et al., 2014a). A AnxA1 é fortemente expressada nas lesões cutâneas no lúpus (MENG et al., 2014), no espinocarcinoma diferenciado (BASTIAN et al., 1993) e no melanoma (BOUDHRAA et al., 2014a). Em cultura de células de melanoma, os níveis aumentados da AnxA1 foram correlacionados à capacidade metastática e a administração do peptídeo Ac2-26 estimulou a atividade da MMP2 após interação com FPR (BOUDHRAA et al., 2014b). A AnxA1 também foi indicada como o mediador chave na morte de queratinócitos, atuando por meio do FPR1, na síndrome Stevens-Johnson e na necrólise epidérmica tóxica, importantes reações medicamentosas cutâneas (SAITO et al., 2014).

Em pacientes infectados com *Leishmania braziliensis*, a expressão da AnxA1 foi mais forte nos macrófagos CD163+ e linfócitos CD4+ e CD8+ na pele infectada comparada a pele normal (SILVA et al., 2015). Análises imuno-histoquímicas, em modelo de inflamação granulomatosa, mostraram forte expressão da AnxA1 nos MCs nas fases inicial (7 dias) e tardia (28 dias) da reação inflamatória (OLIANI et al., 2008).

Estudos *in vitro* indicam que a AnxA1 está envolvida na migração da linhagem de fibroblastos WS1 de pele humana, por meio de receptores FPR. Ainda, o peptídeo Ac2-26 foi capaz de estimular a migração de células WS1 em cultura com níveis elevados de glicose, possivelmente devido ao aumento na expressão do receptor, observado nas condições de hiperglicemia (BIZZARRO et al., 2012).

Recentemente, os efeitos protetores da AnxA1 no transplante de pele foram verificados em modelo de aloenxerto em ratos (TEIXEIRA et al., 2016). O tratamento farmacológico com o peptídeo mimético da AnxA1 aumentou a sobrevivência do aloenxerto, relacionada a inibição da transmigração dos neutrófilos e da indução da apoptose, reduzindo o dano tecidual. Contudo, não se conhecem relatos da expressão e função da AnxA1 no reparo das queimaduras.

Diante do grande número de acidentes que envolvem queimaduras no Brasil e dos impactos físicos, psicológicos e socioeconômicos a eles relacionados (CRUZ; CORDOVIL; BATISTA, 2012), fica evidente a importância de estudos que busquem aprofundar o entendimento dos mecanismos envolvidos durante o reparo de lesões induzidas por queimadura. Como os MCs e a AnxA1 estão relacionados aos processos de angiogênese e remodelação tecidual, mas tem sido pouco explorados em queimaduras, analisamos a heterogeneidade dos MCs, quanto à expressão das proteases triptase e quimase, e avaliamos o papel da proteína AnxA1 em modelo de

queimadura de segundo grau tratadas ou não com Sulfadiazina de Prata em pomada a 1% (SDP 1%), considerado o tratamento padrão nas queimaduras de espessura parcial (ATIYEH et al., 2007; MARX, BARILLO, 2014).

Os resultados dessas análises poderão ser úteis para o melhor entendimento da ação da proteína no local da inflamação na pele e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento dos pacientes queimados.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Considerando a importância do entendimento das interações celulares e moleculares na cicatrização de feridas, induzimos queimaduras de segundo grau em ratos e procedemos a aplicações tópicas de soro fisiológico a 0,9% (controle) ou SDP 1% com os objetivos de acompanhar o comportamento dos MCs e a expressão da proteína AnxA1 na evolução do reparo das lesões em ambos os grupos.

2.2 Objetivos Específicos

Em fragmentos das lesões após 3, 7, 14 e 21 dias da indução da injúria, nos grupos controle, tratado com SDP 1% e também em pele normal:

- Quantificar e avaliar o estado de ativação dos MCs;
- Avaliar o processo de acúmulo de histamina dos MCs;
- Avaliar a heterogeneidade dos MCs em relação à triptase e quimase;
- Investigar a expressão da AnxA1 no citoplasma dos MCs e no tecido em regeneração;
- Quantificar dos sobrenadantes dos macerados das lesões, as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , e também a quimiocina MCP-1;
- Quantificar os macrófagos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos adultos da linhagem *Wistar* (n=40) pesando aproximadamente 250g foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (24° a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA-FIPA), Certificado de Aprovação nº 12/14.

3.2 Modelo experimental de queimadura e protocolos de tratamento

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,2mL/100g de ketamina e 0,05mL/100g de xilasina e submetidos à tricotomia na região dorsal para aplicação de um bloco metálico, com dimensão de 2,0 X 2,0 cm, aquecido com água a 100 °C, por 10 segundos (Figura 4A), configurando a queimadura de segundo grau (Figura 4C e D) (MEYERHOLZ et al., 2009). Imediatamente após o trauma, as lesões foram cobertas com gaze umedecida em soro fisiológico gelado (Figura 4B). Os animais receberam analgésico codeína (1mL/Kg), por gavagem, logo após a indução da lesão e, nos dias seguintes, o analgésico foi oferecido na água (30mg/L).

Os tratamentos tópicos tiveram início 24 horas após a indução das queimaduras (Figura 4E e F). Os animais do grupo controle (Grupo C) foram tratados com uma aplicação diária de soro fisiológico a 0,9% e os animais do grupo tratado receberam administrações tópicas (1x/dia) de SDP 1% (Grupo SDP) por 21 dias. Os animais foram eutanasiados, por dose excessiva de anestésico (isoflurano), para exérese das lesões, após 3, 7, 14 e 21 dias da injúria, para acompanhamento da evolução do processo cicatricial. Do dorso dos animais controles, também foram retiradas amostras de fragmentos de pele normal (Grupo N) (Figura 4G).

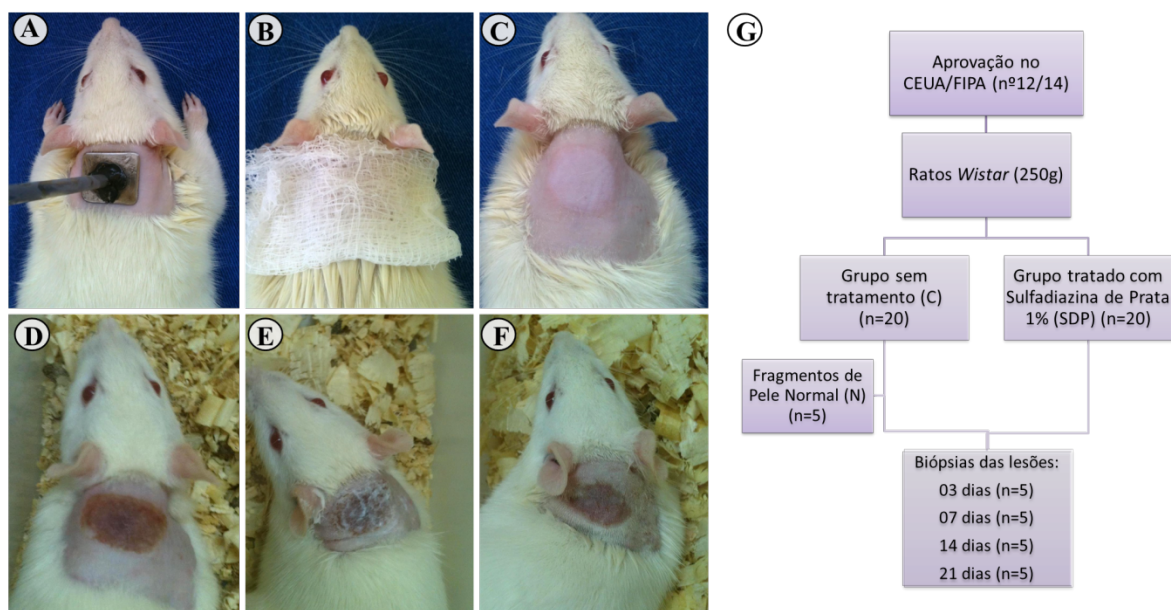


Figura 4. Protocolos de indução da queimadura e tratamentos. (A) Indução da lesão com bloco metálico. (B) Resfriamento da lesão com gaze embebida em soro fisiológico gelado. (C) Lesão logo após indução. (D) Lesão um dia após indução. (E) Tratamento com SDP 1%. (F) Animal do grupo não tratado. (G) Divisão dos animais por grupos.

3.3. Análises histopatológicas

Fragments de pele normal e das lesões nos diferentes períodos foram fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5 μm foram usadas para análises histopatológicas, quantitativas e imuno-histoquímicas. O processo de cicatrização da pele foi avaliado histopatologicamente pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e a presença de fibras colágenas no tecido conjuntivo foi evidenciada pelo método Picrossirius-Polarização.

3.4 Análises quantitativas dos níveis de citocinas e quimiocina

Fragments de peles normais e das lesões de todos os grupos foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em *ependorfs*, onde foram adicionados 650 μL da solução de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail Set 1, Millipore Corporation, USA*) e fosfatases (*PhosphoSafe, Novagen, Millipore Corporation, USA*). Para o preparo dessa solução, foram seguidas as instruções do fabricante. O material foi incubado por 20 minutos, a 4°C, sob agitação constante, e,

em seguida, centrifugado a 14.000 rotações por minuto (RPM), por 10 minutos, a 4°C, sendo os sobrenadantes coletados e imediatamente congelados a – 80 °C.

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, e a quimiocina MCP-1, foram quantificadas no sobrenadante do macerado dos tecidos, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*) do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto-SP. As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas. Foram adicionados 25 μ L dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. A seguir, 25 μ L de *assay buffer* foram adicionados às amostras, 25 μ L do meio apropriado aos padrões e, 25 μ L de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos em todos os poços (controles, padrões e amostras). Em seguida, a placa foi selada com adesivo próprio e incubada por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação no *shaker*.

Após, a placa foi lavada 2 vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubada com 25 μ L de anticorpo de detecção à temperatura ambiente, por 1 hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25 μ L de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada 2 vezes e incubada com 125 μ L do fluido (*Drive Fluid*) por 5 minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, a leitura da placa foi realizada no *LUMINEX xMAP MAGPIX*. A concentração dos analitos foi determinada pelo *software MAGPIX xPONENT* (*Millipore Corporation, USA*). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/mL).

3.5 Quantificação dos mastócitos

Os MCs foram corados pelo Azul de Toluidina (AZT) a 0,1% e avaliados de acordo com suas características morfológicas em intactos e ativos, o acúmulo de histamina pelos MCs foi evidenciado por meio da coloração com Safranina-O (S-O) a 2,5%. A quantificação dos MCs nos fragmentos de pele foi realizada em 10 imagens por lâmina, obtidas pela objetiva de 40X no microscópio *Leica* (DM500) do

Laboratório Multidisciplinar das FIPA. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software Leica Image Analysis*. Os dados foram expressos como média \pm S.E.M. do número de MCs por mm².

3.6. Análises Imuno-histoquímicas

Secções das diferentes amostras foram preparadas em lâminas gelatinizadas, e então, desparafinizadas, re-hidratadas e, após a recuperação antigênica (tampão citrato pH 6,0 a 96°C, durante 20 minutos) e o bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram lavadas em solução tampão de fosfato (PBS) e incubadas com o anticorpo primário diluído em soro albumina bovina (BSA) a 1%. No dia seguinte, foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*kit Zymed Invitrogen*), e a seguir, em substrato diaminobenzidina (DAB) (*kit Zymed Invitrogen*) para revelação. Logo após, as secções foram contracoradas com Hematoxilina. O controle negativo da reação foi obtido pela omissão do anticorpo primário do processo descrito acima.

3.6.1 Quantificação de Macrófagos

Para quantificação de macrófagos, estes foram evidenciados por imunomarcagem, descrita no item 3.6, com anticorpo *mouse monoclonal anti-rat monocyte/macrophages* (1:150; *Millipore Corporation, USA*) incubado em câmara úmida por 4 horas. A quantificação dos macrófagos foi realizada conforme o item 3.5.

3.6.2 Heterogeneidade de MCs

A reação de imuno-histoquímica para as proteases triptase e quimase dos MCs foi realizada conforme descrito no item 3.6. Em lâminas separadas, as secções foram incubadas em câmara úmida por 4 horas com os anticorpos primários *mouse monoclonal anti-chymase* (1:100; *Abcam, USA*) ou *mouse monoclonal anti-tryptase* (1:3000; *Millipore Corporation, USA*). A quantificação dos MCs positivos para triptase (MCT) ou quimase (MCC) nas secções de pele foi realizada conforme o item 3.5.

3.6.3 Proteína AnxA1

Para demonstrar a expressão da proteína AnxA1 no citoplasma dos MCs, utilizamos o anticorpo *policlonal mouse anti-AnxA1* (1:400; *Merck Millipore*

Corporation, USA) que permaneceu incubado nas secções dos distintos grupos em câmara úmida por 4 horas. A análise da expressão da AnxA1 nos MCs foi realizada por densitometria óptica (unidades arbitrárias de 0 a 255 - UA) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis*, em 10 células por lâmina de cada animal. Os dados foram expressos como média \pm S.E.M.

Para avaliar a expressão da AnxA1 no tecido, utilizamos o mesmo anticorpo, porém diluído a 1:700, com incubação em câmara úmida a 4°C *overnight*. A análise da expressão da proteína AnxA1 foi feita separadamente na epiderme e na derme dos fragmentos por densitometria ótica, conforme descrita anteriormente.

3.7. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos da dosagem de citocinas, da quantificação dos MCs nas diferentes colorações e imunomarcações, dos macrófagos, da densitometria óptica da imunomarcação da AnxA1 na epiderme e na derme do tecido e no citoplasma dos MCs, foram submetidos, previamente, à análise descritiva e determinação da normalidade, a seguir, comparados pela Análise de Variância (ANOVA-*two away*) e pós-teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

IV. RESULTADOS

4.1 Aspectos macroscópicos da evolução das lesões

Inicialmente, por meio das análises macroscópicas, confirmamos que o modelo de lesão térmica utilizado foi eficaz na indução de queimaduras de segundo grau (Figura 4), com a formação de edema e vermelhidão imediatamente após a indução da lesão, aparência esbranquiçada após alguns minutos (Figura 4C) e, posteriormente, crosta firmemente aderida (Figuras 4D, 5A1, B1, C1, D1). A evolução do processo cicatricial foi observada pela queda das crostas e restauração da pele e anexos cutâneos (Figura 5E1, F1, G1, H1).

Macroscopicamente, entre os animais dos grupos C e SDP, a cicatrização evoluiu melhor no grupo tratado com a SDP 1%, com a ocorrência mais rápida de queda das crostas e reaparecimento de pelos (Figura 5A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1).

4.2 Análises histopatológicas

As análises histopatológicas confirmaram as características de queimaduras de segundo grau, bem como, a melhor evolução das feridas nos grupos SDP (Figura 5A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2 E I1). Durante o processo de cicatrização das lesões, após 3 dias da indução da queimadura, foram observadas características comuns à fase aguda da inflamação, com intensa invasão de células inflamatórias, especialmente polimorfonucleados, aumento de adipócitos e formação de tecido de granulação (Figura 5A2 e B2). Após 7 dias, foram observados processos de reepitelização e proliferação de fibroblastos (Figura 5C2 e D2), características concomitantes ao processo de resolução da inflamação e início da fase de proliferação celular. Já aos 14 dias (Figura 5E2 e F2), foi evidente a proliferação da MEC, de maneira mais organizada em SDP14, e, após 21 dias da injúria (Figura 5G2 e H2), foi caracterizada a fase de remodelação ou maturação, com a reestruturação da epiderme e derme, e com formação dos anexos cutâneos, principalmente no grupo SDP21. Sendo assim, nos animais tratados com a pomada SDP 1%, foi verificada melhor cicatrização comparada aos controles.

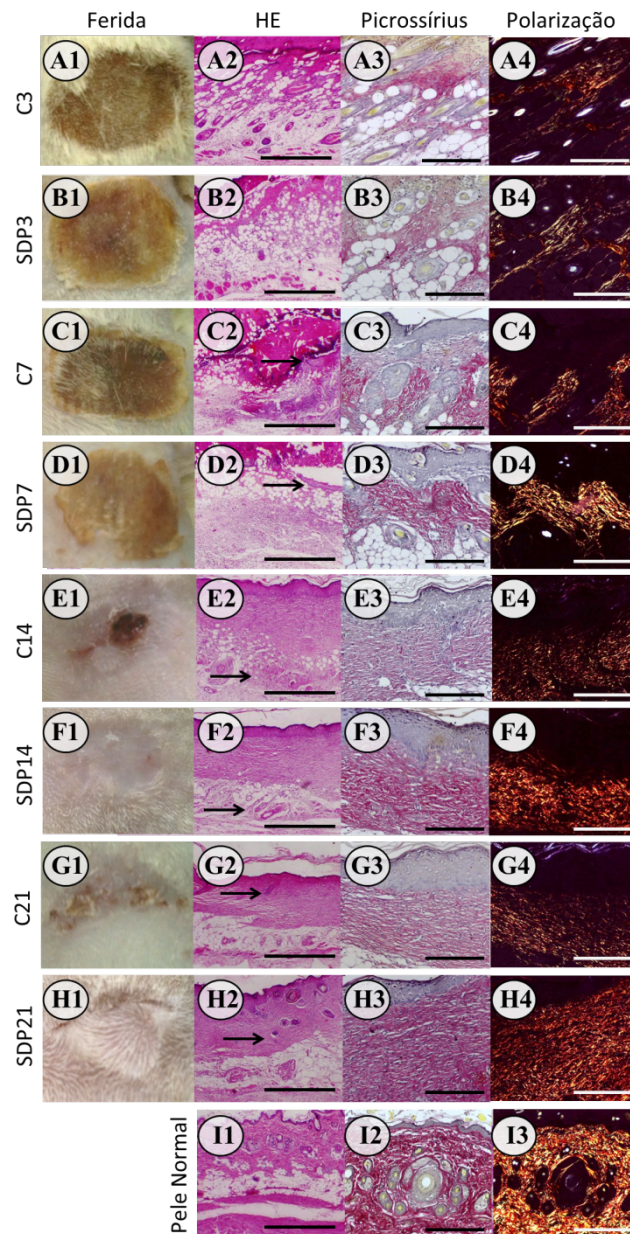


Figura 5. Análises macroscópicas e histopatológicas do processo de cicatrização de queimadura de segundo grau. (A) C3 e (B) SDP3, fase de inflamação e presença de adipócitos em ambos os grupos. (C) C7 e (D) SDP7, fase de proliferação, setas indicam reepitelização. Até 7 dias, as fibras de colágeno fracamente coradas (A3, B3, C3 e D3) e com baixa birrefringência na polarização (A4, B4, C4 e D4) na derme de ambos os grupos. (E) C14 e (F) SDP14, reepitelização completa e cicatrização mais rápida no grupo SDP (E1 e F1). Derme e hipoderme (E2, F2 - setas) mais organizadas e fibras de colágeno mais coradas no grupo tratado com SDP (E3, F3). (G) C21 e (H) SDP21, fase de remodelação, anexos cutâneos (G1, H1, G2, H2 - setas) mais numerosos e birrefringência maior nos grupos tratados com a SDP 1% (G4 e H4). Pele normal (I). (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 e H1) Análise macroscópica. (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2 e I1) Coloração: HE. Barras 500 μ m. (A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3 e I2) Coloração Picrossírius e (A4, B4, C4, D4, E4, F4, G4, H4 e I3) Polarização. Barras 200 μ m.

O processo de reparo das lesões, relacionado à reorganização das fibras colágenas na derme também foi verificado pelo método de polarização após a coloração com Picrossírius-Hematoxilina (Figura 5A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3 e I2) e polarização (Figura 5A4, B4, C4, D4, E4, F4, G4, H4 e I3). Uma vez que o corante picrossírius funciona como um intensificador da birrefringência das fibras colágenas, por ser uma molécula linear e aniônica capaz de emparelhar com as fibras alongadas e catiônicas do colágeno (LATTOUF et al., 2014), nesse trabalho, consideramos para análise das fibras de colágeno, a intensidade da birrefringência observada nas diferentes fases do processo de cicatrização em relação à pele normal.

Durante o processo de cicatrização foi possível observar mudanças nos padrões de birrefringência das fibras de colágeno, indicando processo de aumento e reorganização nas fibras. Entre os grupos, a reestruturação e distribuição organizada das fibras de colágeno na derme ocorreram de maneira mais acentuada nos animais tratados com SDP 1%, nos quais o padrão de distribuição das fibras colágenas após 21 dias da injúria foi semelhante ao da pele normal (Figura 7H3, H4, I2 e 3).

4.3 Dosagem de citocinas e MCP-1 no sobrenadante do macerados das lesões e quantificação de macrófagos nos tecidos

Todas as citocinas estudadas apresentaram baixas dosagens nos fragmentos de pele normal, (TNF- α : $7,78 \pm 2,29$; Figura 6A; IL-1 β : $224,22 \pm 21,21$; Figura 6B; IL-6: $0,49 \pm 0,02$; Figura 6C; IL-10: $15,67 \pm 12,76$; Figura 6D).

As dosagens de TNF- α nos fragmentos das lesões mostraram que, em 3 dias após a indução da lesão, ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) somente em C3 comparado a pele normal (C3: $52,13 \pm 18,92$; Figura 6A) e em 7 dias pós lesão, foram observados aumentos em ambos os grupos, com relação a C3 e a N (C7: $154,18 \pm 27,14$; $p < 0,001$ vs C3; SDP7: $143,98 \pm 31,91$; $p < 0,001$ vs SDP3; C7 e SDP7, ambos $p < 0,001$ vs N; Figura 6A). Contudo, nos fragmentos de 14 e 21 dias após a queimadura, foi observada redução da expressão de TNF- α , comparada às fases iniciais do processo de cicatrização (C14: $22,97 \pm 3,8$; SDP14: $16,64 \pm 7,47$; C21: $14,91 \pm 4,86$; SDP21: $15,92 \pm 3,79$; Figura 6A).

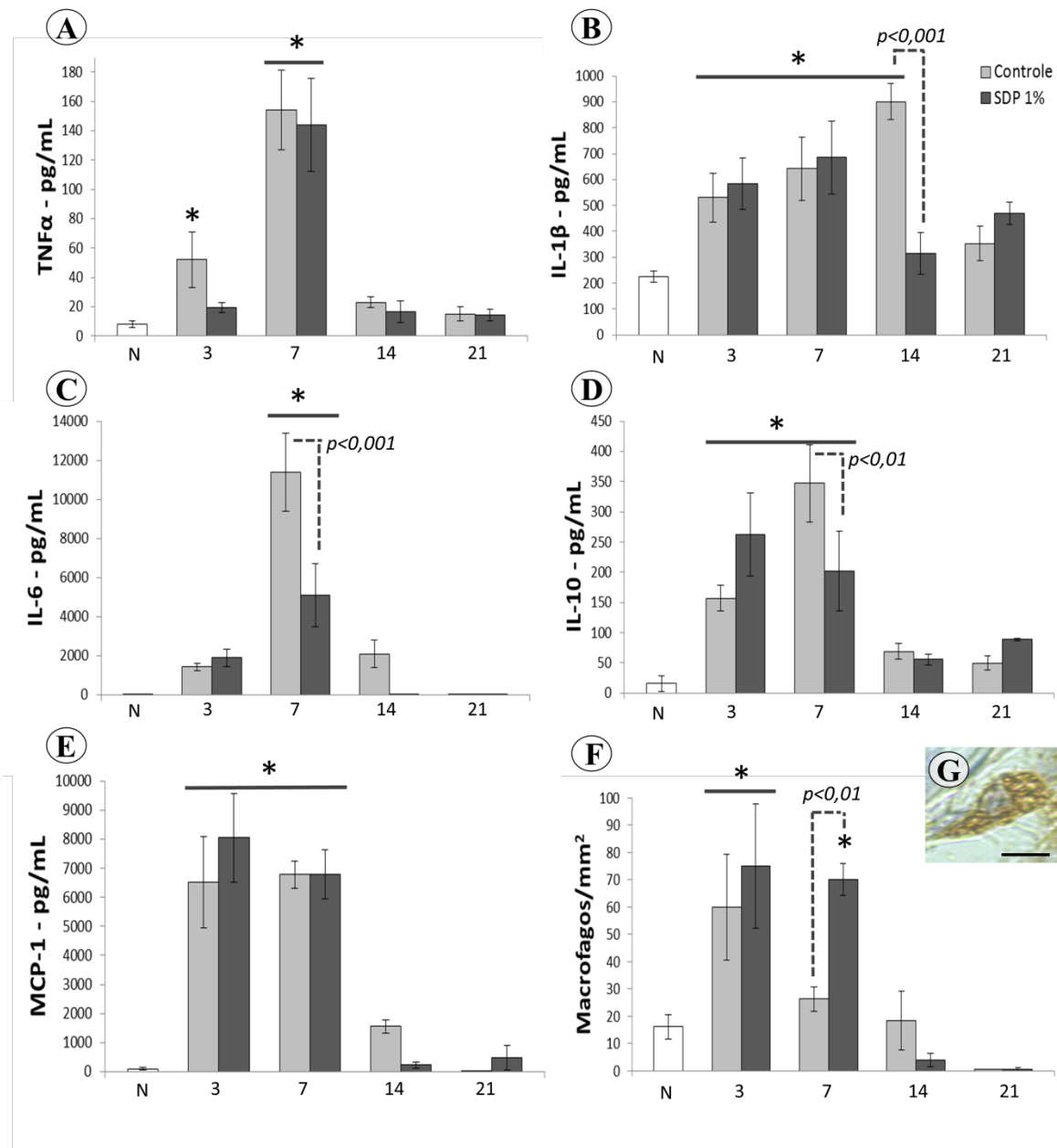


Figura 6. Dosagem de citocinas e quantificação de macrófagos na cicatrização de queimaduras de segundo grau. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (n=5/grupo). * $p < 0,05$ vs Pele Normal. (A) TNF- α : doses elevadas em C3 e em ambos os grupos após 7 dias da injúria. (B) IL-1 β : doses elevadas em ambos os grupos aos 3 e 7 dias e em C14. (C) IL-6: superexpressão em 7 dias, especialmente no grupo de controle. (D) IL-10: Altas dosagens em 3 e 7 dias em todos os grupos. (E) MCP-1: Altas dosagens em 3 e 7 dias em ambos os grupos. (F) macrófagos: muitos macrófagos aos 3 dias em ambos os grupos e em SDP7. (G): macrófago. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 2 μ m.

Com relação à IL-1 β foi observado aumento significativo da citocina ($p < 0,001$), em ambos os grupos, nas fases da inflamação aguda e proliferação celular comparada à pele normal (C3: $530,64 \pm 94,37$; $p < 0,05$; SDP3: $582,94 \pm 99,01$;

$p < 0,01$; C7: $641,79 \pm 122,76$; $p < 0,01$; SDP7: $684,68 \pm 140,04$; $p < 0,001$; Figura 6B). De maneira interessante, aos 14 dias do processo de cicatrização, foi observado aumento nos níveis da citocina no grupo controle comparado ao N ($p < 0,001$) e redução desses níveis no grupo tratado com SDP 1% que mostrou dosagens próximas àquelas encontradas na pele normal e reduzidas comparadas ao grupo controle (C14: $901,29 \pm 70,61$; SDP14: $314,39 \pm 79,83$; $p < 0,001$ vs C14; $p < 0,05$ vs SDP7; Figura 6B). Na fase mais avançada do processo, aos 21 dias de cicatrização, ambos os grupos apresentam valores reduzidos da IL-1 β , próximos aos de N (C21: $352,44 \pm 67,06$; SDP21: $468,51 \pm 43,78$; Figura 6B).

Nas análises da IL-6, foram observados níveis aumentados ($p < 0,001$) da citocina nos fragmentos coletados após 7 dias da lesão (C7: $9192,64 \pm 2743,42$; SDP7: $5100,97 \pm 1600,30$), comparados a N. Nesse mesmo período, entre os grupos, foi verificado menor dosagem de IL-6 em SDP 1% comparado ao controle ($p < 0,001$; Figura 6C).

A quantificação de IL-10 revelou valores aumentados da citocina com relação a N e nas fases de inflamação (C3: $157,19 \pm 21,29$; $p < 0,05$; SDP3: $262,90 \pm 68,59$; $p < 0,001$; Figura 6D) e proliferação celular (C7: $347,06 \pm 63,59$; $p < 0,001$; SDP3: $202,02 \pm 66,58$; $p < 0,01$; Figura 6D), e nessa última, com menores níveis em SDP comparado ao controle ($p < 0,05$; Figura 6D). A análise da citocina nos fragmentos a partir de 14 dias após a lesão, revelou valores reduzidos de IL-10, semelhantes ao de N (C14: $68,71 \pm 13,05$; SDP14: $55,48 \pm 9,31$; C21: $49,91 \pm 11,35$; SDP21: $88,84 \pm 1,93$; Figura 6D).

Nas dosagens da quimiocina MCP-1, foi verificado aumento ($p < 0,001$) em 3 e 7 dias do processo de cicatrização em relação às dosagens feitas na pele normal (N: $100,27 \pm 50,95$; C 3: $6525,44 \pm 1569,07$; SDP3: $8051,84 \pm 1520,58$; C7: $6774,98 \pm 467,06$; SDP7: $6796,24 \pm 845,05$; Figura 6E).

Similarmente, na quantificação de macrófagos, foi observado aumento ($p < 0,001$) do número dessas células, em ambos os grupos, em 3 dias após a lesão em relação à pele normal (N: $16,15 \pm 4,43$; C3: $60 \pm 19,41$; SDP3: $75 \pm 22,68$; $16,15 \pm 4,43$; Figura 6F e G). Entretanto, no dia 7 do reparo tecidual, somente no grupo tratado com SDP a 1%, foi verificado aumento significativo ($p < 0,001$) no número de macrófagos em comparação ao N (SDP7: $70 \pm 5,77$; Figura 6F) e consequente redução ($p < 0,01$) comparado ao grupo controle ($26,25 \pm 4,41$; Figura 6F).

4.4 Quantificação, análise de ativação e acúmulo de histamina dos MCs

Os MCs foram evidenciados pela metacromasia dos seus grânulos citoplasmáticos após coloração com AzT (Figura 7A-F).

A quantificação dos MCs mostrou grande número de células intactas na pele normal (N: $74,91 \pm 5,84$; Figura 7A e G). Nas lesões, na fase de inflamação aguda, 3 dias pós lesão, foi verificada redução significativa ($p < 0,001$) de MCs intactos em relação a N (C3: $16,2 \pm 4,23$; SDP3: $3,18 \pm 0,83$; Figura 7B, C, G), que se manteve até a fase de proliferação celular e da MEC, após 7 dias (C7: $2,42 \pm 1,93$; SDP7: $6,82 \pm 3,43$; Figura 7G) e aos 14 dias (C14: $16,11 \pm 4,12$; SDP14: $3,59 \pm 2,08$; Figura 7D, E e G). Entretanto, no grupo não tratado com SDP 1%, aos 21 dias da injúria, foram quantificados muitos MCs inativos como observado na pele normal (C21: $53,75 \pm 6,81$; Figura 7F; SDP21: $15,66 \pm 5,66$; Figura 7G).

Na quantificação de MCs desgranulados ocorreu aumento em relação à pele normal ($5,09 \pm 0,88$) aos 7 dias, somente no grupo tratado com SDP 1%, e aos 14 dias em ambos os grupos de tratamento (SDP7: $32,73 \pm 10,08$ $p < 0,01$ vs N; C14: $59,88 \pm 12,87$, Figura 7D; SDP14: $38,31 \pm 9,55$, Figura 7E; ambos $p < 0,001$ vs N; Figura 7H). Ainda, foi observada diferença ($p < 0,01$) de MCs desgranulados entre C14 e SDP14.

De modo geral, nas fases finais do reparo, a quantidade de MCs foi aumentada no grupo C em relação ao grupo SDP. Essas células foram observadas, em sua maioria, ativas ou desgranuladas aos 14 dias e inativas ou intactas aos 21 dias pós lesão.

Após a verificação de que o tratamento com a pomada de SDP 1% influencia na proliferação dos MCs, analisamos se o processo cicatricial e os tratamentos apresentaram efeitos sobre o acúmulo de histamina dessas células, processo evidenciado pela reação ao corante S-O (Figura 7J). Para isso, comparamos a quantificação dos MCs totais, incluindo aqueles em estado intacto e desgranulado, observados pela coloração de AzT com a dos MCs evidenciados pela S-O. As análises foram realizadas tanto nas secções de pele normal, quanto nas lesões (Figura 7I).

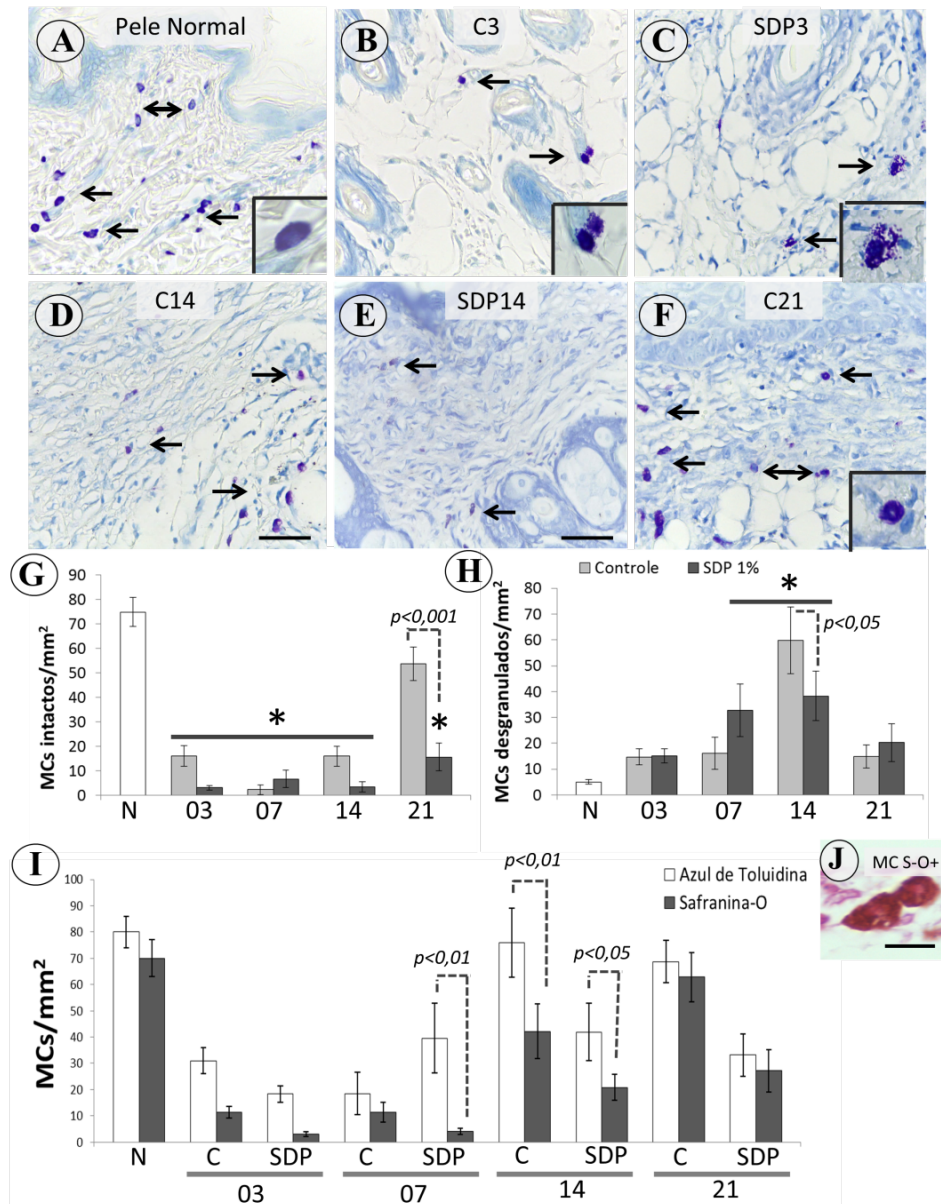


Figura 7: Desgranulação e acúmulo de histamina nos MCs no processo de cicatrização da queimadura: (A) muitos MCs (setas) intactos na pele normal. (B) C3 e (C) SDP3 com poucos MCs. (D) C14 (E) SDP14, MCs desgranulados, principalmente no grupo de controle. (F) C21, vários MCs intactos. Detalhes de MCs intactos (A e F) e desgranulados (B e C). Coloração: Azul de Toluidina. Barras de 50 μ m. Quantificação dos MCs: muitos MCs intactos (G) em N e C21 e muitos MCs desgranulados (H) em SDP7 e em ambos os grupos aos 14 dias. (I) Diferenças entre quantificação dos MCs positivos para azul de toluidina ou safranina-O, com menos MCs S-O+ em SDP7, C14 e SDP14 comparados com MCs AzT+. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (n=5/grupo). * $p < 0,05$ vs N. (J) MCs corados com safranina-O. Barras de 2 μ m.

Em N, foi encontrado grande número de células coradas com AzT e S-O, sem diferença entre as duas quantificações (AzT: $80,01 \pm 6,01$; S-O: $70 \pm 7,01$; Figura 7I). Nas primeiras fases do processo de cicatrização, em 3 dias após lesão, tanto em C

como em SDP, ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) do número tanto de MCs S-O positivos como de AzT positivos, sem significância entre esses (AzT: C3: $30,94 \pm 4,89$; SDP3: $18,28 \pm 3,08$; e S-O: C3: $11,25 \pm 2,20$; SDP3: 3 ± 2 ; Figura 7I).

Aos 7 dias, no grupo controle, ainda foram observados poucos MCs S-O positivos e AzT positivos (AzT: C7: $18,51 \pm 8,12$; S-O: $11,45 \pm 3,77$; Figura 7I). Entretanto, foi observada diferença significativa entre MCs corados com AzT e S-O aos 7 dias no grupo tratado (AzT: $39,55 \pm 13,29$ $p < 0,01$ vs S-O: $3,94 \pm 1,28$; Figura 7I), e aos 14 dias em ambos os grupos (C14: AzT: $76 \pm 13,14$ $p < 0,01$ vs S-O: $42,17 \pm 10,51$; SDP14: AzT: $41,9 \pm 11,01$ $p < 0,05$ vs S-O: $20,83 \pm 5$; Figura 7I). Essa diferença foi observada nos mesmos grupos em que foram encontrados muitos MCs em estado de desgranulação.

No dia 21 do reparo da lesão, não foram observadas diferenças na quantidade de MCs AzT positivos e S-O positivos (AzT: C21: $68,64 \pm 8,07$; SDP21: $33,12 \pm 8,12$; S-O: C21: $62,5 \pm 9,42$; SDP21: $27,15 \pm 8,13$; Figura 7I).

4.5 Heterogeneidade dos MCs

Os MCs também foram quantificados após a reação imuno-histoquímica para duas de suas proteases, triptase (Figura 8A) e quimase (Figura 8B), para análise da heterogeneidade dessas células durante a cicatrização. MCs triptase (MCT, Figura 8C) e quimase (MCQ, Figura 8D) positivos foram observados em todas as amostras estudadas.

Na pele normal, a maioria dos MCs foi triptase positiva (MCT: $33,3 \pm 4,79$; MCQ: $18,7 \pm 2,1$; $p < 0,05$; Figura 8A e B). No dia 3 do processo de reparo, foi observada redução ($p < 0,001$) tanto do número de MCTs (C3: $8,5 \pm 2,57$; SDP3: $1,5 \pm 0,61$; Figura 8A), como MCQs ($p < 0,05$) comparado à pele normal (C3: $4 \pm 1,27$; SDP: $0,87 \pm 0,52$; Figura 8B).

No dia 7 do processo de reparo tecidual, a quantificação mostrou que a diminuição dos MCTs permaneceu nos grupos tratados em relação a N ($p < 0,001$) e também entre grupos (C7: $15 \pm 5,68$ $p < 0,05$ vs SDP7: $1,5 \pm 0,61$; Figura 8A). Os MCTs, permaneceram com diferença significativa em relação a pele normal também nas fases finais do processo de cicatrização, tanto no grupo controle ($p < 0,01$), como no grupo tratado ($p < 0,001$) com a pomada SDP 1% (C14: $18,5 \pm 7,81$; SDP14: $10,5 \pm 4,56$; C21: $18,75 \pm 9,6$; SDP21: $13,12 \pm 2,77$; Figura 8A).

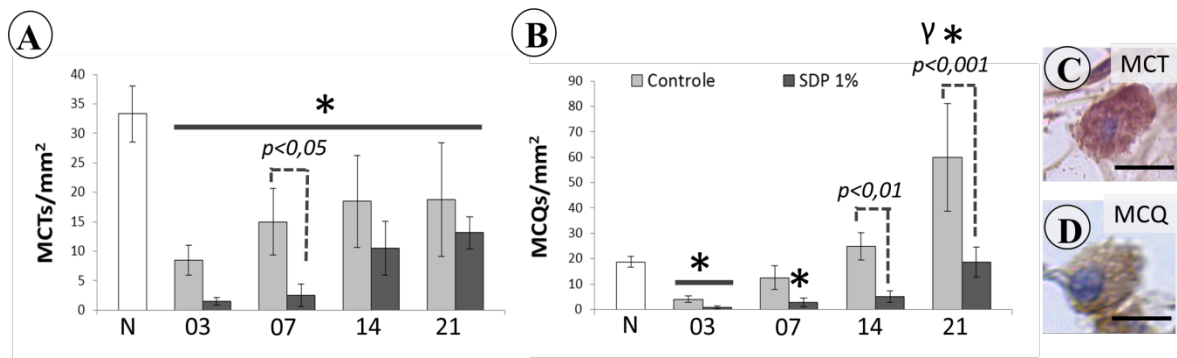


Figura 8: Heterogeneidade dos MCs para triptase e quimase no processo de cicatrização da queimadura: (A) Quantificação mostrando muitos MCTs na pele normal. (B) poucos MCs em N, redução de MCs imunorreativos para quimase nas primeiras fases do processo de cicatrização e muitos MCQs em C21. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. ($n=5$ /grupo). * $p < 0,05$ vs N e γ $p < 0,001$ vs C14. (C): MC imunorreativo para triptase. (D): MC imunorreativo para quimase. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 2 μ m.

Já na quantificação dos MCQs, aos 7 dias, somente o grupo tratado apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação a N (C7: $12,5 \pm 4,67$; SDP7: $2,8 \pm 1,64$; Figura 8B). Em 14 dias pós-lesão, foi observada redução ($p < 0,01$) apenas na comparação da quantidade de MCQs entre grupo controle e tratado (C14: $24,75 \pm 12,73$; SDP14: $5 \pm 2,23$; Figura 8B).

Finalmente, no dia 21 da cicatrização, foram verificados muitos MCQs no grupo C21 em relação aos demais grupos (C21: $60 \pm 21,21$; $p < 0,001$ vs N e $p < 0,01$ vs C14; SDP21: $18,75 \pm 5,9$; $p < 0,001$ vs C21; Figura 8B). Sendo assim, de uma maneira geral, a quantificação de MCTs mostrou que nenhuma fase do processo de reparo tecidual recuperou o número de células encontradas na pele normal. Diferentemente, a análise dos MCCs mostrou que, aos 21 dias do processo de cicatrização, o grupo controle apresentou muitas dessas células.

4.6 Expressão da ANXA1 no citoplasma dos MCs, na epiderme e derme

Após a confirmação da classificação da queimadura em segundo grau pelas análises macroscópicas e histopatológicas, pelas dosagens de citocinas, e da efetividade do tratamento com a pomada SDP 1% no processo cicatricial, analisamos a expressão da proteína AnxA1 no citoplasma dos MCs, na epiderme e derme das lesões dos grupos C e SDP durante o processo de cicatrização, e

também nas secções de pele normal. A especificidade da imunomarcção foi verificada pelos controles de reação (Figura 9E e 10H).

Nas análises do material coletado das queimaduras, foi verificado que os grânulos dos MCs também apresentavam reatividade para a proteína AnxA1 (Figura 9B e C). Para investigar alterações na expressão da proteína durante as diferentes fases de cicatrização, foi realizada análise densitométrica no citoplasma dos MCs em todas as fases do processo cicatricial e na pele normal. Nossas análises mostraram aumento da expressão da AnxA1 apenas na fase aguda da inflamação, no dia 3 após a indução da lesão, nos grupos C e SDP comparados aos demais grupos estudados ($p < 0,001$; Figura 9A).

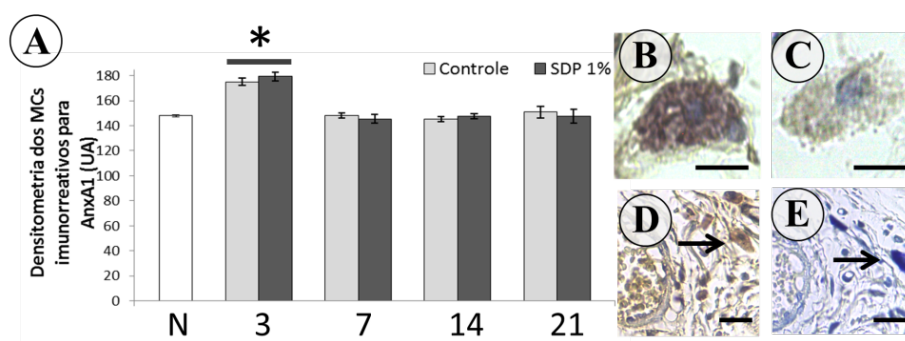


Figura 9: Análise densitométrica da AnxA1 no citoplasma dos MCs. (A) Forte imunomarcção nos MCs na fase inflamatória, C3 e SDP3. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. ($n=5$ /grupo). * $p < 0,001$ vs Pele Normal (N). (B) MC fortemente imunorreativo para AnxA1 na fase inflamatória. (C) MC fracamente imunorreativo para AnxA1, fase de remodelação. Barras de 20 μ m. (D) MC imunorreativo para AnxA1 e (E) ausência de imunorreatividade no corte em série com contra-coloração de hematoxilina e azul de toluidina. Setas indicam MCs. Barras de 50 μ m.

Nas imunomarcções no tecido, em N, foi observada expressão reduzida da proteína (Figura 10G). Aos 3 dias da lesão (Figura 10A e B), fase aguda da inflamação, a expressão da AnxA1 foi aumentada, em ambos os grupos ($p < 0,001$), na epiderme e na derme comparada à pele normal (Figura 10I e J). Também houve diferença entre grupos, sendo a maior imunomarcção da proteína observada no grupo C3 ($p < 0,05$; Figura 10I e J).

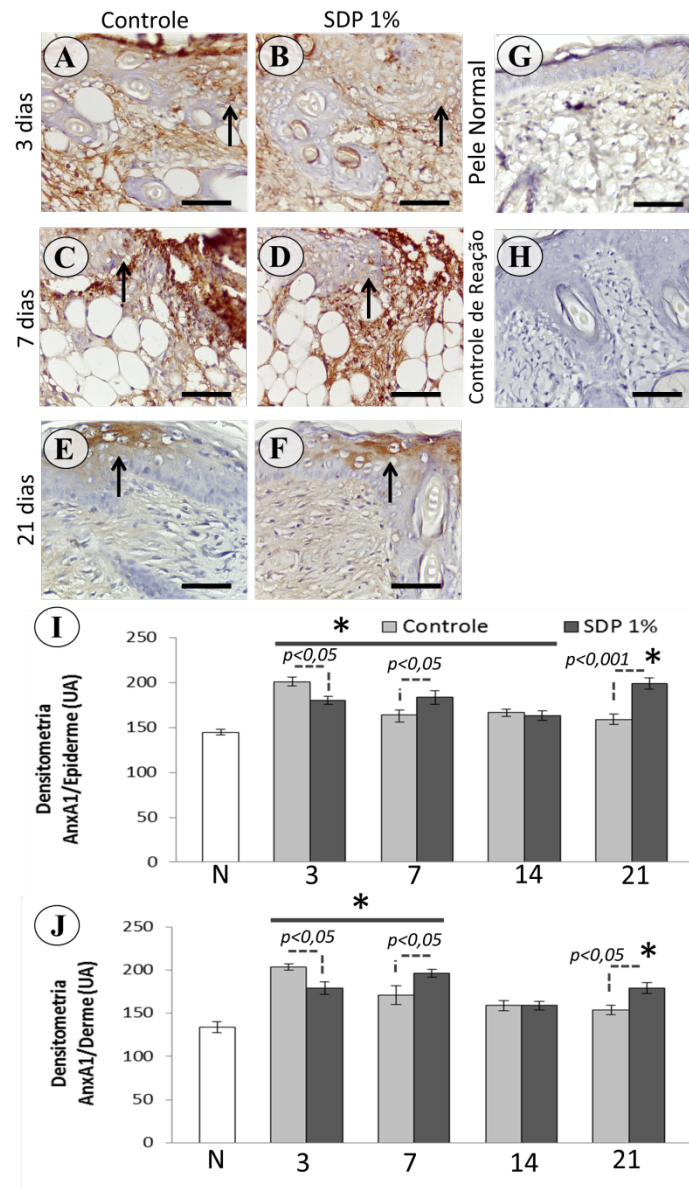


Figura 10: Expressão de AnxA1 em processo de cicatrização de queimadura de segundo grau.

Em (A) C3 e (B) SDP3, aumento da expressão da proteína na fase de inflamação, no epitélio de revestimento (setas) e na derme. (C) C7 e (D) SDP7, expressão aumentada na derme e epiderme (setas), 7 dias após a lesão. (E) C21 e (F) SDP21 maior expressão de AnxA1 no grupo tratado com o SDP 1%, na superfície da epiderme (setas) e derme. (G) fraca expressão de AnxA1 na pele normal. (H) Ausência de imunorreatividade no controle da reação. Contra-coloração: hematoxilina. Barras de 50 μm . Densitometria óptica da imunomarcação da AnxA1 na (I) epiderme e na (J) derme. Os valores são apresentados como média \pm S.E.M. (n=5/grupo). * Valores $p < 0,05$ vs Pele Normal (N).

No dia 7 da cicatrização (Figura 10C e D), a expressão da AnxA1 permaneceu aumentada com relação ao N em ambos os grupos tanto na epiderme (C7 $p < 0,05$; SDP7 $p < 0,001$; Figura 10I e J) como na derme (ambos os grupos $p < 0,001$; Figura 10I e J). Contudo, o grupo SDP7 apresentou maior expressão da AnxA1 ($p < 0,05$)

que C7 na epiderme e na derme (Figura 10I e J). Após 14 dias de indução da lesão, a imunorreação da AnxA1 ainda foi maior nos grupos C ($p<0,01$) e SDP ($p<0,05$), comparada às fases iniciais em relação a N, porém somente na epiderme (Figura 10I e J).

Entretanto, aos 21 dias do processo cicatricial (Figura 10E e F), ocorreu novo aumento na expressão da proteína no grupo SDP comparado a pele normal e ao grupo controle, na derme (SDP21 $p<0,001$ vs N; $p<0,05$ vs C21; Figura 10I e J) e na epiderme ($p<0,001$ vs N e C21; Figura 10I e J). Nesta fase, a forte imunomarcacão da AnxA1 foi especialmente observada em trechos do epitélio de revestimento, próximos a anexos cutâneos em formação (Figura 10E e F).

Portanto, durante o processo cicatricial, entre os grupos, as maiores expressões da proteína foram observadas na epiderme em C3 e SDP21 e na derme em C3, SDP7 e SDP21.

V. DISCUSSÃO

As queimaduras são traumas complexos, com alta taxa de morbi-mortalidade no Brasil e no mundo (SUMMER et al., 2007; PARIHAR et al., 2008) e geram forte impacto econômico e psicossocial, devido o tempo de tratamento (RICHARDSON, MUSTARD, 2009).

Nas lesões de queimadura, as interações entre as células inflamatórias, mediadores químicos, fatores de crescimento e MEC, coordenam o processo de cicatrização, sendo a angiogênese essencial para a remodelação tecidual (EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010; TAKEO, LEE, ITO, 2015). Os MCs e a proteína anti-inflamatória AnxA1 são importantes nos processos de reparo de feridas e angiogênese (LIM, PERVAIZ, 2007; CÔTÉ et al., 2010; DONG et al.; GUO, LIU, SUN; 2013). Contudo, os papéis biológicos dos MCs e da AnxA1 ainda são pouco explorados em queimaduras. Por essas razões, no presente estudo investigamos, em modelo animal de queimadura, a heterogeneidade dos MCs, e a expressão da AnxA1 durante o processo de cicatrização de lesões de segundo grau em animais controles e tratados com SDP 1%.

Primeiramente, foram realizadas análises macroscópicas, em ambos os grupos, para classificação e acompanhamento das lesões durante a evolução do processo de cicatrização, os quais indicaram características de queimadura de segundo grau e melhor evolução das lesões tratadas com a SDP 1%. As nossas observações histopatológicas estão de acordo com dados de literatura e confirmaram a profundidade da lesão, de segundo grau superficial (CHEN, PRZYBOROWSKI, BERTHIAUME; MEYERHOLZ et al., 2009) e, a melhor regeneração no grupo tratado (BAYAT et al., 2005; ATIYEH et al., 2007). A análise histopatológica permitiu evidenciar a evolução da cicatrização, nas distintas fases do processo de reparo. Após 3 dias da indução da lesão, foi observado processo de reparo na fase de inflamação aguda, com infiltração de polimorfonucleados, macrófagos e formação de tecido de granulação, conforme outros estudos (STRONCEK; REICHERT, 2007; TAKEO; LEE; ITO, 2015).

A injúria no tecido promove alterações nas estruturas moleculares e exposição de metabólitos tóxicos fazendo com que agentes imunomoduladores sejam liberados como resultado da lesão (EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010). Minutos após a injúria, polimorfonucleados são atraídos para promover a proteção do tecido lesado

e os mediadores químicos liberados nessa fase influenciam no desenvolvimento de capilares e atraem fibroblastos e queratinócitos, o que marca a próxima fase, de proliferação (WERNER, KRIEG, SMOLA, 2007; TAKEO, LEE, ITO, 2015). Monócitos também são recrutados logo após a lesão até a fase de proliferação, diferenciam-se em macrófagos para remover o tecido lesado e podem permanecer por meses no local (STRONCEK, REICHERT, 2007). Estudos indicam que inflamações exacerbadas têm papel na formação de cicatrizes patológicas e fibroses, pois células imunes secretam fatores que atraem e ativam fibroblastos (EHRlich; GURTNER, LONGAKER, WONG; 2013; TAKEO, LEE, ITO, 2015).

Os nossos estudos também indicaram, na fase aguda do processo de reparo, grande quantidade de adipócitos nas áreas queimadas, além das células inflamatórias, como observado em outras investigações em modelo de queimadura (BABCOCK et al., 2012; LEE et al., 2015). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os adipócitos podem auxiliar no reparo das lesões térmicas, pois fornecem energia para o intenso processo de cicatrização, momento em que a nutrição pode não ser suficiente (VAN DEN BOGAERDT et al., 2009). Ainda, o tecido adiposo contém células tronco mesenquimais (CHEN, PRZYBOROWSKI, BERTHIAUME, 2009), sendo a injeção de gordura utilizada como tratamento em queimaduras severas (PATEL, 2008). Os adipócitos também auxiliam na ativação e migração de fibroblastos (TAKEO, LEE, ITO, 2015) e podem sofrer transdiferenciação para este tipo celular (WERNER, KRIEG, SMOLA, 2007).

Aos 7 dias da indução da lesão, foram encontradas características da fase de proliferação celular, ou proliferação primária, com reepitelização e proliferação de fibroblastos e, aos 14 dias da inferência da injúria, foi observado o aumento da MEC, ou a chamada proliferação secundária, com a clara organização em epiderme, derme e hipoderme.

Nas primeiras fases do processo de reparo de lesão em pele, os queratinócitos além de se dividirem, desfazem os desmossomos, destacam-se das bordas da ferida e, pela ação de MMPs, deslizam para o local da lesão, realizando o processo de migração por meio contração do citoesqueleto, para completar a reepitelização (STRONCEK, REICHERT, 2007; EVERS, BHAVSAR, MAILÄNDER, 2010). Ainda, folículos pilosos e glândulas sebáceas também contêm células progenitoras multipotentes que se deslocam até a lesão para se diferenciarem em diversos tipos

celulares (GURTNER et al., 2008; MEYERHOLZ et al.; CHEN, PRZYBOROWSKI, BERTHIAUME, 2009).

Os queratinócitos regulam a ação de fibroblastos, liberando citocinas que induzem a ativação destes (WONG, GURTNER, LONGAKER, 2013; TAKEO, LEE, ITO, 2015), por sua vez, fibroblastos podem estimular queratinócitos liberando fatores de crescimento, dentre eles, o KGF. Ainda, a reconstrução da membrana basal irá depender da íntima relação entre esses dois tipos celulares (WERNER, KRIEG, SMOLA, 2007).

Aos 21 dias do processo de reparo, a histopatologia das lesões mostrou características da fase de remodelação do tecido, e também foi observada a formação de anexos cutâneos. Entretanto, nos animais tratados com a SDP 1%, os anexos já puderam ser observados desde o período anterior, no dia 14. Os anexos cutâneos são partes funcionais da pele e participam de processos como termorregulação e sistema sensorial, sendo que sua rápida restauração é importante para anatomia e estrutura da pele e, conseqüentemente, das funções normais do órgão (TAKEO, LEE, ITO, 2015).

A maturação, ou remodelação, é a fase mais longa da cicatrização, podendo chegar a dois anos (WONG, GURTNER, LONGAKER, 2013). Durante a remodelação, a derme, maior responsável pelas propriedades de resistência mecânica da pele, é restaurada pela maturação e reorganização das fibras de colágeno e elastina (CHEN, PRZYBOROWSKI, BERTHIAUME, 2009). A formação de cicatrizes e fibroses é o resultado da desorganização do microarranjo e excesso de deposição das fibras colágenas, alterando a estrutura e função da pele (GURTNER et al., 2008; XUE, JACKSON, 2015).

Por isso, na sequência dos estudos histopatológicos, analisamos as fibras de colágeno pelo método de Picrossírius-polarização. No início do processo cicatricial, em 3 e 7 dias após a lesão, foi observada coloração mais fraca do picrossírius e pouca birrefringência na luz polarizada em ambos os grupos, comparados à pele normal, demonstrando a degradação das fibras colágenas. A partir do dia 14 do processo de cicatrização, foi observada coloração mais acentuada na derme e maior birrefringência do que nas primeiras fases cicatriciais, principalmente nos grupos tratados com a pomada SDP 1%. Aos 21 dias da indução da lesão, o grupo SDP apresentou coloração e birrefringência próximas da pele normal, sugerindo que a

reorganização das fibras colágenas ocorreu mais rapidamente nos grupos tratados, corroborando com os resultados anteriores.

Na continuidade do trabalho, as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 e a quimiocina MCP-1 foram quantificadas no sobrenadante do macerado de fragmentos de pele e lesões. O resultado das dosagens realizadas está de acordo com outros trabalhos em queimaduras cutâneas (BARRIENTOS et al.; GAUGLITZ et al., 2008; BABCOCK et al.; OPPELTZ et al., 2012; KUBO et al., 2014).

As dosagens das citocinas TNF- α e IL-6 revelaram aumento aos 7 dias do processo de reparo em relação aos outros períodos e somente o TNF- α , mostrou aumento significativo no grupo controle em relação à pele normal, no dia 3. Kubo e colaboradores (2013) analisaram, em fragmentos de pele de murino queimada, diversas citocinas por meio de RT-qPCR e encontraram aumento na expressão de TNF- α e IL-6 entre 5 e 7 dias, sendo o aumento de TNF- α progressivo do dia 5 até o dia 7 da indução da lesão, e diminuição da expressão dessas citocinas no dia 14. Babcock e colegas (2012) dosaram, por ELISA, aumento de TNF- α sérico em 3 e 7 dias após a indução de lesão térmica em 15% da superfície corpórea de camundongos e no dia 7 nos fragmentos de pele queimada dos mesmos animais. Oppeltz e outros pesquisadores (2012) também encontraram aumento na dosagem de TNF- α , em fragmentos de pele após 3 dias da indução de queimadura de terceiro grau em 12,5% da superfície corpórea de camundongos. Em 2008, Gauglitz e colaboradores quantificaram IL-6 sérica aos 7 dias da indução de queimadura em 60% da superfície corpórea de ratos e observaram aumento dessa citocina. Além disso, estudos *in vitro*, demonstraram aumento de IL-6 e TNF- α em cultura de células oriundas de pacientes queimados quando comparado à expressão dessas citocinas em cultura de células de pele normal (NORONHA et al., 2014a, 2014b).

As nossas dosagens da IL-1 β mostraram aumento da citocina aos 3 e 7 dias em ambos os grupos e, somente no grupo controle, no dia 14 da cicatrização, quando comparadas às dosagens da pele normal e dos outros períodos de tratamento. A alta expressão de TNF- α aos 3 dias e de IL-1 β aos 14 dias do processo de reparo, somente no grupo controle evidenciou, novamente, a efetividade do tratamento com a pomada SDP 1% em reduzir a inflamação inicial e prolongada (ATIYEH et al., 2007). Resultados semelhantes às nossas dosagens foram encontrados em outros trabalhos. Em análises séricas, a dosagem de IL-1 β foi aumentada no período de 2 a 7 dias pós-lesão (BABCOCK et al., 2012) e em

dosagens de fragmentos de lesões de 3 (OPPELTZ et al., 2012) e de 5 a 7 (KUBO et al., 2012) dias após indução de queimaduras.

O recrutamento de leucócitos para o local da pele lesionada depende da liberação de citocinas por parte das células residentes no tecido (GILLITZER, GOEBELER, 2001). As citocinas TNF- α , família IL-1 e IL-6 são expressas por diversos tipos celulares encontrados na pele e em leucócitos, e tem seus níveis aumentados nos processos de inflamação e reepitelização (BARRIENTOS et al., 2008).

Os queratinócitos e as células endoteliais possuem receptores para diversas citocinas, indicando a participação de citocinas pró-inflamatórias na reepitelização (GILLITZER, GOEBELER, 2001). Além disso, queratinócitos armazenam tanto IL-1 α como a IL-1 β e essas são as primeiras citocinas liberadas após injúria cutânea por esse tipo celular (BARRIENTOS et al.; 2008). Ainda, a IL-6 está diretamente envolvida no crescimento epitelial e ratos deficientes desta citocina tem reparo de lesões mais lenta em comparação a animais selvagens (WERNER, KRIEG, SMOLA, 2007).

As dosagens da IL-10 revelaram aumento nos períodos de 3 e 7 dias do processo de reparo tecidual, quando comparadas aos outros períodos e à pele normal. No dia 7, a citocina teve maior expressão no grupo controle. Esses resultados corroboram com os de Gauglitz e colaboradores (2008), que encontraram aumento da IL-10 em análises séricas após 4 dias da indução de queimadura em 60% da superfície corpórea de ratos, e também com os resultados de Kubo e colegas (2013), que observaram aumento da expressão de IL-10 nas amostras de lesões no período de 12 horas até 7 dias posteriores a indução da lesão.

Nossas observações indicaram aumento dos níveis da IL-10 nas fases aguda e de proliferação celular. Enquanto citocinas pró-inflamatórias perpetuam a inflamação, vários mecanismos operam para regular essa atividade, como a IL-10 (GILLITZER, GOEBELER, 2001) e a proteína AnxA1 (LIM, PERVAIZ, 2007; GAVINS, HICKEY, 2012).

As dosagens de MCP-1 mostraram aumento nos 3 e 7 dias da cicatrização das lesões em comparação com outros períodos e pele normal. A quantificação de macrófagos realizada nas secções de pele normal e lesões mostrou, nas fases de inflamação e reepitelização inicial, aumento dessas células correlacionando com a quimiocina MCP-1.

Resultados semelhantes à nossa análise de MCP-1 também foram encontrados por outros pesquisadores em modelo animal de queimadura, em dosagens séricas (GAUGLITZ et al., 2008) e em tecidos (OPPELTZ et al., 2012; KUBO et al., 2014). Em uma investigação *in vitro*, a dosagem de MCP-1, mostrou diminuição da quimiocina em fibroblastos oriundos de queloides, salientando o papel protetor de MCP-1 no processo cicatricial (YEH, SHEN, TAI, 2009).

A quimiocina MCP-1 é liberada, principalmente, por queratinócitos próximos à lesão e recruta monócitos, macrófagos, linfócitos e também MCs (GILLITZER, GOEBELER, 2001; BARRIENTOS et al., 2008) além de induzir fibroblastos a sintetizarem TGF- β e colágeno (GILLITZER, GOEBELER, 2001). O recrutamento e infiltração de monócitos, bem como sua diferenciação para macrófagos em tecidos que sofreram lesões, são bem descritos na literatura. A função dessas células é fagocitar o tecido lesado e contribuir para a proliferação celular, produção e remodelamento de um tecido novo por meio da liberação de citocinas e fatores de crescimento (STRONCEK, REICHERT, 2007; EHRLICH, 2013). Ainda, Gillitzer e Goebeler (2001) descreveram que na fase de proliferação do reparo tecidual, IL-1 e TNF- α são liberados por macrófagos. No entanto, nas fases tardias da cicatrização, observa-se a diminuição do número de macrófagos e aumento do número de MCs (EHRLICH, 2013), característica também observada em nossas análises.

Após a comprovação de que o modelo usado no estudo foi adequado para a indução de queimaduras de segundo grau e que o protocolo de tratamento escolhido promoveu melhor cicatrização no grupo tratado com SDP 1% comparado ao grupo controle, procedemos às análises dos MCs, por meio da quantificação e observação do estado de ativação dessas células nos fragmentos de pele normal das lesões durante a regeneração tecidual.

Os MCs foram observados em grande quantidade e principalmente intactos, na derme da pele normal. Nas fases iniciais do processo de regeneração, nas lesões de 3 e 7 dias após injúria, ocorreu redução acentuada no número dos MCs e, algumas dessas células foram observadas em estado de desgranulação, o que indica a importância de mediadores químicos liberados pelos MCs para o ambiente extracelular. Os MCs entram em ativação logo após a lesão térmica, iniciando o processo de liberação do conteúdo dos seus grânulos cerca de 2 minutos após a queimadura. (BANKOVA et al., 2014). Os MCs modelam a inflamação e a liberação de seus mediadores é importante para a formação do tecido de granulação,

angiogênese, proliferação celular e remodelação (BANKOVA et al.; HARVIMA et al.; SIBILANO, FROSSI, PUCILLO; 2014).

Outras investigações relataram a diminuição do número de MCs nas fases iniciais de cicatrização de feridas (NISHIKORI et al., 1998). Além disso, camundongos deficientes em MCs tiveram o fechamento de ferida comprometida na pele, indicando a importância dos produtos dessas células para o fechamento de lesões (WELLER et al., 2006).

A partir de 14 dias do processo de reparo tecidual, observamos aumento do número de MCs principalmente em estado de ativação no grupo controle. Resultados semelhantes aos nossos, em relação ao aumento do número dessas células no mesmo período, também foram encontrados por Nishikori e colaboradores (1998). Enquanto Bayat e colaboradores (2008) encontraram MCs em atividade aos 16 dias da indução de queimadura de 3º grau em ratos tratados com a pomada antimicrobiana a base de Nitrofuril.

No dia 21 após a lesão, ainda são observados mais MCs no grupo controle, contudo, essas células estão em sua maioria, intactas nesta fase. No mesmo período, como na fase anterior, são observados poucos MCs no grupo SDP. A redução dessas células no grupo tratado pode estar relacionada com a propriedade leucopênica da SDP, causada pela citotoxicidade promovida pelos componentes da pomada às células tronco da medula óssea (GAMELLI, PAXTON, O'REILLY, 1993; ATIYEH et al., 2007).

O efeito da SDP na produção de granulócitos foi investigado em modelo de queimadura em camundongos (GAMELLI; PAXTON; O'REILLY, 1993). Os autores encontraram redução de 50% do total de leucócitos no sangue periférico no período de 1 a 7 dias após a injúria, e também diminuição das células progenitoras de granulócitos e macrófagos na análise da medula óssea do 1º até 4º dia. No mesmo estudo, a administração de SDP em cultura de células progenitoras da medula de murinos e de humanos, promoveu redução na quantidade dessas células de maneira dose-dependente.

Diversas pesquisas têm relacionado a presença exacerbada de MCs com a formação de queloides. Investigações *in vitro* demonstraram a importância dos MCs na proliferação de fibroblastos (LEVI-SCHAFFER, KUPIETZKY, 1990; LEVI-SCHAFFER, RUBINCHIK, 1995; ARTUC et al., 2002; DONG et al., 2015;). Igualmente, estudos *in vivo* relataram aumento do número de MCs em queloides e

cicatrices patológicas (DONG et al., 2014) e em feridas crônicas (HUTTUNEN et al., 2000). Harunari e colaboradores (2006) observaram maior número de MCs em cicatrizes do que na pele humana e suína normais. No entanto, Iba e colaboradores (2004) verificaram, ao induzir queimaduras em camundongos deficientes em MCs, redução na dosagem de hidroxiprolina, principal aminoácido constitutivo de colágeno, quando comparada aos animais selvagens. No mesmo estudo, encontraram melhor arranjo das fibras de colágeno nos animais selvagens.

Investigações indicam o envolvimento dos MCs na cicatrização cutânea, mostrando a relação dessas células com a produção e organização de uma nova MEC, com importante função no microambiente do reparo da lesão, porém, relacionadas a condições patológicas no reparo tecidual, no caso de sua superproliferação.

Assim, o controle da proliferação de MCs no reparo da lesão cutânea é uma importante estratégia terapêutica no tratamento de pacientes queimados e, indica que a redução no número dessas células, observada nos fragmentos de pele dos animais tratados com a pomada SDP 1%, pode estar relacionada com os melhores resultados obtidos no processo de cicatrização dos grupos tratados.

Após quantificação e análise do estado de ativação dos MCs, verificamos o processo de acumulação de histamina dessas células por meio da comparação de MCs positivos para S-O, com MCs positivos para AzT, nos diferentes estágios do processo de cicatrização.

Aos 7 dias do reparo da lesão, foi observado que, somente no grupo tratado, haviam poucos MCs S-O positivos em relação ao número total de células e, no dia 14, em ambos os grupos, havia menor quantidade dessas células positivas para S-O do que para AzT. Conforme observado anteriormente, nesses períodos os MCs estavam, em sua maioria, em estado de desgranulação. Esses resultados sugerem que os MCs não armazenavam grandes quantidades de histamina nesses períodos porque estavam liberando esse mediador para a MEC, participando ativamente do processo de reparo, modelando o início da fase de maturação do tecido.

Os MCs, apesar de relacionados às cicatrizes hipertróficas e queloides, são imprescindíveis a normal cicatrização de lesões, sejam elas de natureza térmica ou não (IBA et al., 2004; WELLER et al., 2006). Dada à importância e envolvimento dos MCs e suas proteases no processo cicatricial, procedemos a análise da

heterogeneidade desse tipo celular, em relação às suas proteases triptase e quimase, pela técnica imuno-histoquímica.

Na pele normal, foi observada maior quantidade de MCTs do que MCQs. Após 3 e 7 dias da indução da lesão, ocorreu diminuição do número de células imunorreativas para ambas as proteases. Nossos resultados estão de acordo com os de Hermes e colaboradores (2000), que também observaram redução de MCs reativos para triptase e quimase em feridas recentes em pele humana. Tanto a triptase como a quimase são relacionadas à degradação do colágeno desnaturado decorrente de lesões (SAARINEN et al., 1994; WERNERSSON, PEJLER, 2014).

Em todas as fases de reparo, os MCTs apresentaram menor número do que na pele normal. Nos animais tratados com SDP 1%, foi observada menor quantidade de MCQs comparados a pele normal em 14 dias e ao grupo controle em 21 dias.

No dia 21, a quantificação de MCQs, mostrou aumento significativo no grupo controle em relação à pele normal, na qual a maioria dos MCs é triptase positiva. Assim, embora o grupo controle apresente MCs totais e S-O positivos aos 21 dias da indução da lesão, em quantidades próximas às da pele normal, essas células expressam proteases diferentes. O conjunto das quantificações dos MCs S-O positivos e da heterogeneidade dessas células, indicaram relação entre o acúmulo de histamina dos MCs e o acúmulo de MCQs no grupo controle aos 21 dias após a injúria, e sugerem que essas células estavam em processo de maturação. O estudo de Nakazawa e colaboradores (2014) demonstrou a importância da histamina para a maturação dos MCs, em que camundongos deficientes em histidina descarboxilase, apresentaram diminuição na expressão da quimase. Além disso, outro estudo indicou que a quimase é a primeira protease a ser expressa em grandes quantidades por MCs (MA et al., 2008), corroborando mais uma vez com o indício de maturação dessas células no período de 7 a 14 dias.

Diversos estudos associam a quimase à formação de fibroses e queloides. Em co-cultura de MCs e fibroblastos, foi verificada a liberação de FGF e triptase pelos MCs e o aumento em espessura da matriz de colágeno onde as células foram cultivadas (ARTUC et al., 2002). Outra investigação *in vitro*, demonstrou que a quimase também promove a proliferação de fibroblastos oriundos de pele humana de maneira dose-dependente (DONG et al., 2012). Em outros trabalhos, foi observado que a quimase facilita a transdução de fatores de crescimento por fibroblastos, bem como a maior expressão dessa protease e aumento do número de

MCQs em queloides (DONG et al., 2013, 2014, 2015). Diferentemente, Hermes e colaboradores (2000) encontraram diminuição do número de MCQs e aumento da atividade de triptase em cicatrizes quando comparadas à pele normal humana. Ainda, a superexpressão de triptase é considerada um biomarcador para a mastocitose (PEJLER et al., 2011).

Outra função relacionada às proteases triptase e quimase, é a alteração de proteínas para suas formas ativas. Estudos indicam que a quimase pode estar envolvida na clivagem de pró-IL-1 β para IL-1 β , transformando-a na sua forma ativa (GABAY, LAMACCHIA, PALMER, 2010), o que está de acordo com a maior quantidade de MCQs positivos observados nos animais controle, na fase final do processo de reparo. Outras investigações *in vitro* demonstram que a quimase cliva a sequencia N-terminal que inativa a colagenase (SAARINEN et al., 1994). A quimase também é importante no processo de ativação da pro-MMP2 e da pro-MMP9 (WELLER et al., 2006), enquanto a triptase possui funções similares em relação à pro-MMP3 e pro-MMP13 (WERNERSSON, PEJLER, 2014).

Deste modo, nossos resultados reforçam que a heterogeneidade dos MCs nos diferentes períodos e em resposta ao tratamento com a SDP 1% está relacionada ao microambiente celular, indicando que os MCs participaram ativamente do processo de remodelação da MEC recém sintetizada no reparo da lesão térmica.

Ao realizar a análise da expressão da AnxA1, observamos que os MCs também apresentaram imunorreatividade para a proteína, principalmente na fase inflamatória, tanto no grupo controle como no grupo tratado. Pesquisas mostraram que os MCs armazenam a AnxA1 (OLIANI et al., 2000; KAMAL, FLOWER, PERRETTI, 2005; D'ACQUISTO, PERRETTI, FLOWER, 2008; PAULA et al., 2015) podendo aumentar sua síntese em processos inflamatórios (KAMAL, FLOWER, PERRETTI, 2005). Ainda, em animais deficientes em AnxA1 (AnxA1^{-/-}), foi observada redução na desgranulação dos MCs (D'ACQUISTO, PERRETTI, FLOWER, 2008). Assim nossos resultados sugerem que a AnxA1 pode estar envolvida na ativação dessas células bem como na liberação da proteínas para o meio extracelular.

Na sequência dos nossos estudos, e diante da importância da proteína AnxA1 nos processos inflamatório, de angiogênese, diferenciação e proliferação de diversos tipos celulares (LIM, PERVAIZ, 2007; CÔTÉ et al., 2010; GIROL et al.,

2013), avaliamos a expressão da AnxA1 na pele, durante a evolução do processo de reparo, nos grupos tratados ou não com a pomada SDP 1%.

Na pele, analisamos separadamente a expressão da Anxa1 na epiderme e na derme. Nossas análises indicaram a expressão da AnxA1 na pele normal e em todas as fases de reparo da lesão. Na pele normal, a imunomarcagem foi fraca, e em conformidade com trabalhos anteriores (BASTIAN et al., 1993; SATO-MATSUMURA et al., 1996). Entretanto, durante o processo de cicatrização, verificamos expressão variável da proteína, que foi observada fortemente expressa na derme e em trechos de reepitelização nas fases iniciais do reparo, com aumento da imunomarcagem da AnxA1 no grupo controle aos 3 dias após injúria e no grupo SDP no dia 7. Esses resultados relacionam a expressão da AnxA1 com o processo inflamatório inicial corroborando com pesquisas realizadas em outros modelos animais (PATEL, 2008; GIROL et al., 2013).

A expressão aumentada da proteína, aos 7 dias após injúria, está de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram participação da AnxA1 no processo de proliferação celular (LIM, PERVAIZ, 2007; GAVINS; HICKEY, 2012). Testes *in vivo* e *in vitro*, indicaram que a AnxA1 promove fechamento de lesões provocadas em epitélio intestinal (LEONI et al., 2013, 2015). A importância da proteína nos processos de migração e proliferação do endotélio de vasos foi explorada em outra investigação (CÔTÉ et al., 2010). Ainda, na pele, em diferentes processos patológicos como em inflamações e neoplasias, ocorre modulação na expressão da AnxA1 (BOUDHRAA et al., 2014a; SATO-MATSUMURA et al., 1996), que está envolvida também na diferenciação de queratinócitos (BASTIAN et al., 1993) e no processo de queratinização e estratificação (SATO-MATSUMURA et al., 2000). Um estudo *in vitro*, demonstrou que a AnxA1 atua na migração de fibroblastos de pele normal humana (linhagem WS1), pois o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26 aumentou a motilidade dessas células em cultura e, o uso de anticorpo bloqueador da AnxA1, promoveu a redução da motilidade dos fibroblastos (BIZZARRO et al., 2012).

Embora a IL-6 possa induzir a expressão de AnxA1 (D'AQUISTO, PERRETTI, FLOWER, 2008), por sua vez, a AnxA1 também pode reduzir a expressão de TNF- α e IL-6 (JIA et al., 2013), o que explica a modulação dessa citocina durante o processo de reparo, principalmente aos 7 dias da injúria e no grupo tratado com SDP 1%. Ainda, nas nossas observações, constatamos aumento dos níveis da IL-

10 nas fases aguda e de proliferação celular, coincidindo com as fases nas quais a proteína AnxA1 também foi bastante expressa nas lesões. Ferlazzo e colaboradores (2003) observaram que, em cultivo de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS), o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1, induziu liberação de IL-10 de modo dose dependente, evidenciando que, parte da mediação anti-inflamatória da AnxA1 é devida ao estímulo da expressão de IL-10. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a proteína AnxA1 e a IL-10 atuam em conjunto no processo de cicatrização das queimaduras.

Aos 14 dias do processo, após reepitelização completa da lesão e no início da fase de proliferação da MEC, ocorreu diminuição da imunorreatividade da AnxA1 em ambos os grupos. Na fase seguinte, no dia 21, observamos a imunomarcção mais forte da AnxA1 nos grupos tratados com SDP 1%, tanto na epiderme como na derme, especialmente em regiões epiteliais, próximas à neogênese dos folículos pilosos e glândulas anexas. A presença da AnxA1 no ducto de glândulas sudoríparas detectada por hibridização *in situ* foi demonstrada em outra investigação (SATO-MATSUMURA et al., 1996).

Além disso, diversos estudos contribuíram para o entendimento das propriedades antifibróticas da AnxA1 (TSAO et al., 1998; KUROSU et al., 2008; GUO et al., 2010; BIZZARRO et al., 2012) na matriz de diferentes órgãos, tanto por diminuir a inflamação e consequente desenvolvimento de fibrose (DAMAZO et al., 2011) como por atuar diretamente no fenótipo dos fibroblastos (NEYMEYER et al.; TRENTIN et al., 2015).

Em modelo de fibrose pulmonar, animais AnxA1^{-/-} desenvolvem processo inflamatório mais intenso e formação de tecido fibrótico no pulmão quando comparados aos animais selvagens. Nesse trabalho, os animais AnxA1^{-/-} apresentaram maiores dosagens de TNF- α e TGF- β 1 no sangue e no lavado broncoalveolar e mais hidroxiprolina na análise bioquímica do tecido, evidenciando a importância da AnxA1 endógena para o controle do processo fibrótico (DAMAZO et al., 2011). O papel protetor do peptídeo Ac2-26 contra a fibrose pulmonar também foi observado na silicose experimental (TRENTIN et al., 2015). O tratamento com o peptídeo reduziu a infiltração de leucócitos, a formação de granuloma, a deposição de colágeno e a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), marcador de miofibroblastos. Ainda no mesmo trabalho, os pesquisadores desenvolveram

cocultura de fibroblastos com o Ac2-26 e observaram redução da expressão de colágeno e MCP-1 de modo dose dependente.

Recentemente, Neymeyer e colaboradores (2015), utilizando RT-qPCR, observaram que ratos com doença renal crônica transcrevem o triplo dos genes de AnxA1 e TGF- β 1 do que ratos saudáveis. No mesmo trabalho, ao tratar fibroblastos isolados de rim com TGF- β 1, houve grande aumento da expressão de α -SMA e Colágeno1A1, porém ao induzir a superexpressão de AnxA1 com transfecção plasmidial nessas células, a expressão de α -SMA e Colágeno1A1 foi reduzida, evidenciando, mais uma vez, a importância da proteína AnxA1 na modulação na atividade de fibroblastos. Desse modo, nossos resultados indicam o papel da AnxA1 no reparo tecidual em queimaduras tanto na regeneração epitelial como na proteção contra formação de queloides

De modo geral, nossos estudos revelaram que a desgranulação dos MCs nas fases iniciais é importante para a modulação do microambiente com a liberação das proteases triptase e quimase, da proteína AnxA1 e estímulo para liberação dos mediadores químicos, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1. Ainda, nossas análises indicam que o tratamento com a SDP 1% promove o repovoamento mais lento do tecido pelos MCs, controlando principalmente os MCs quimase positivos, o que pode exercer efeito protetor contra a formação de queloides. Além disso, nossas análises revelaram a maior expressão da proteína AnxA1 especialmente nos grupos tratados, concomitante aos processos de proliferação e diferenciação de queratinócitos e remodelação da derme, com possibilidade de ação antifibrótica.

Em conjunto, nossos dados mostram a modulação do número, estado de ativação, maturidade e heterogeneidade dos MCs, bem como a relação dessas células com a expressão da AnxA1 e de mediadores pró e anti-inflamatórios durante o processo de reparo tecidual em modelo de queimadura de segundo grau e poderão auxiliar no desenvolvimento futuro de alternativas terapêuticas para o tratamento de lesões cutâneas.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições propostas, permitem concluir que:

1. Os MCs diminuem em quantidade na fase de inflamação aguda, aumentam na fase de proliferação celular em estado de ativação e aparecem inativos na fase de remodelação do tecido. Ainda, o tratamento com a pomada SDP 1% é capaz de impedir a proliferação de MCs nas fases finais do reparo da lesão.
2. Os MCs repovoam a derme e terminam seu processo de maturação entre as fases de proliferação e remodelamento da lesão.
3. Os MCTs e MCQs diminuem nas primeiras fases do processo cicatricial em relação à pele normal. Na fase final do processo cicatricial, o grupo controle apresentou grande número de MCQs, e ambos os grupos apresentaram poucos MCTs.
4. Os MCs aumentam a expressão de AnxA1 na fase aguda da inflamação, durante o reparo da lesão.
5. A proteína AnxA1 apresentou aumento na sua expressão nas primeiras fases do processo de reparo em ambos os grupos, e, no grupo tratado com SPD 1%, na fase de remodelação.
6. No processo de reparo da lesão, os níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 aumentam nas fases aguda e de proliferação celular. Enquanto, TNF- α e IL-6 superexpressam na fase de proliferação celular.
7. O tratamento com SDP 1% reduziu a expressão de TNF- α em 7 dias e de IL-1 β em 14 dias de cicatrização e, aumentou a expressão de IL-10 em 7 dias.
8. Os maiores níveis da quimiocina MCP-1 foram concomitantes ao aumento do número de macrófagos nas fases aguda e de proliferação celular no processo de cicatrização.

Associadas, essas conclusões mostram a importância dos MCs e da AnxA1 na fisiologia da pele normal e durante o processo de cicatrização em queimaduras de segundo grau. Desse modo, os nossos resultados apontam essas células e a proteína como alvos promissores no manejo de lesões cutâneas por queimadura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTUC, M. et al. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? **Experimental dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1999.

ARTUC, M. et al. A long-term coculture model for the study of mast cell-keratinocyte interactions. **The Journal of investigative dermatology**, v. 119, n. 2, p. 411–5, 2002.

ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, v. 33, n. 2, p. 139–48, 2007.

BABCOCK, G. F. et al. The burn wound inflammatory response is influenced by midazolam. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 259–70, 2012.

BANKOVA, L. G. et al. Mouse Mast Cell Proteases 4 and 5 Mediate Epidermal Injury through Disruption of Tight Junctions. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 2812–20, 2014.

BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585–601, 2008.

BASTIAN, B. C. et al. Localization of annexins in normal and diseased human skin. **Journal of dermatological science**, v. 6, n. 3, p. 225–34, 1993.

BAYAT, M. et al. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: A histological and microbiological study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 2, p. 171–7, 2005.

BAYAT, M. et al. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. **Journal of rehabilitation research and development**, v. 45, n. 6, p. 931–38, 2008.

BISCHOFF, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 2, p. 93–104, 2007.

BIZZARRO, V. et al. Annexin A1 N-Terminal Derived Peptide Ac2-26 Stimulates Fibroblast Migration in High Glucose Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

BOUDHRAA, Z. et al. Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, n. 7, p. 749–60, 2014a.

BOUDHRAA, Z. et al. Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 10, p. 903–14, 2014b.

CHEN, M.; PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing, **Critical Reviews in Biomedical Engineering**. v. 37, n. 4, p. 399-421, 2009.

CÔTÉ, M. C. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8013–21, 2010.

CRUZ, B. DE F.; CORDOVIL, P. B. L.; BATISTA, K. DE N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 246–50, 2012.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152–69, 2008.

D'ACUNTO, C. W. et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 1, p. 173–8, 2014.

DAMAZO, A. S. et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunology**, v. 12, n. 59, p. 1-13, 2011.

DONG, X. et al. Mast cell chymase promotes cell proliferation and expression of certain cytokines in a dose-dependent manner. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 6, p. 1487–90, 2012.

DONG, X. et al. Involvement of mast cell chymase in burn wound healing in hamsters. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 5, n. 2, p. 643–47, 2013.

DONG, X. et al. Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via transforming growth factor- β 1/Smad activation in keloid fibroblasts. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 7, p. 3596–607, 2014.

DONG, X. et al. High concentrations of mast cell chymase facilitate the transduction of the transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway in skin fibroblasts. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 3, p. 955–60, 2015.

DOUAIHER, J. et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. **Advances in immunology**, v. 122, p. 211–52, Jan. 2014.

EHRlich, H. P. A. Snapshot of Direct Cell-Cell Communications in Wound Healing and Scarring. **Advances in wound care**, v. 2, n. 4, p. 113–21, 2013.

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777–83, 2010.

FERLAZZO, V. et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 10-11, p. 1363–9, 2003.

FEYERABEND, T. B. et al. Loss of Histochemical Identity in Mast Cells Lacking Carboxypeptidase A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 14, p. 6199–210,

2005.

GAMELLI, R. L.; PAXTON, T. P.; O'REILLY, M. Bone marrow toxicity by silver sulfadiazine. **Surgery, gynecology & obstetrics**, v. 177, n. 2, p. 115–20, 1993.

GASTARDELO, T. S. et al. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 1, p. 177–83, 2009.

GAUGLITZ, G. G. et al. Characterization of the Inflammatory Response During Acute and Post-Acute Phases After Severe Burn. **Shock**, v. 30, n. 5, p. 503–7, 2008.

GAVINS, F. N. E.; HICKEY, M. J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 354, p. 1–11, 2012.

GIL, C. D. et al. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biology International**, v. 30, n. 4, p. 338-44, 2006.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 4, p. 513–21, 2001.

GIROL, A. P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **Journal of immunology**, v. 190, n. 11, p. 5689–701, 2013.

GUO, S. et al. Dynamic expression of proteins associated with adventitial remodeling in adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1312–8, 2010.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M.-Z. Potential role of Anxa1 in cancer. **Future oncology**, v. 9, n. 11, p. 1773–93, 2013.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p.

314–21, 2008.

HARUNARI, N. et al. Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: final similarities to human hypertrophic scar. **Burns**, v. 32, n. 6, p. 669–77, 2006.

HARVIMA, I. T.; NILSSON, G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. **Acta dermato-venereologica**, v. 91, n. 6, p. 644–50, 2011.

HARVIMA, I. T. et al. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 530–44, 2014.

HERMES, B. et al. Altered expression of mast cell chymase and tryptase and of c-Kit in human cutaneous scar tissue. **The Journal of investigative dermatology**, v. 114, n. 1, p. 51–5, 2000.

HUTTUNEN, M. et al. Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializing and chronic wounds. **Experimental dermatology**, v. 9, n. 4, p. 258–265, 2000.

IBA, Y. et al. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. **International immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1873–80, 2004.

JIA, Y. et al. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 476–84, 2013.

KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 39–48, 2005.

KUBO, H. et al. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. **Legal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 8–13, 2014.

KUROSU, K. et al. Identification of Annexin 1 as a Novel Autoantigen in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **The Journal of Immunology**, n. 181, n. 1, p. 756-67, 2008.

LATTOUF, R. et al. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751–8, 2014.

LEE, K. et al. Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 213, p. 1-9, 2015.

LEONI, G. et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 443–54, 2013.

LEONI, G. et al. Annexin A1 – containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 3, p. 1215–27, 2015.

LEVI-SCHAFFER, F.; KUPIETZKY, A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. **Experimental cell research**, v. 188, n. 1, p. 42–9, 1990.

LEVI-SCHAFFER, F.; RUBINCHIK, E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. **The Journal of investigative dermatology**, v. 104, n. 6, p. 999–1003, 1995.

LIM, L. H. K.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968–75, 2007.

MA, F. et al. Direct development of functionally mature tryptase/chymase double-positive connective tissue-type mast cells from primate embryonic stem cells. **Stem cells**, v. 26, n. 3, p. 706–14, 2008.

MARX, D. E.; BARILLO, D. J. Silver in medicine: The basic science. **Burns**, v. 40, SUPPL 1, p. 9–18, 2014.

MENG, Z. et al. The association of anti-annexin1 antibodies with the occurrence of skin lesions in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 2, p. 183–7, 2014.

MEYERHOLZ, D. K. et al. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute burn injury rat model. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 1, p. 26–33, 2009.

NAKAZAWA, S. et al. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. **European journal of immunology**, v. 44, n. 1, p. 204–14, 2014.

NEYMEYER, H. et al. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. **Acta Physiologica**, v. 215, n. 3, p. 144–58, 2015.

NISHIKORI, Y. et al. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. **Archives for dermatological research**, v. 290, n. 10, p. 553–60, 1998.

NORONHA, S. M. R. DE et al. Keratinocyte growth factor, interleukins (1 beta, 6, 8, 10, 12), and tumor necrosis factor alpha in culture medium of dermal fibroblast of burned patients. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 29, Suppl 1, p. 62–8, 2014a.

NORONHA, S. A. et al. Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, Suppl 3, n. 41, p. 60–7, 2014b.

OLIANI, S. M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, n. 9, p. 1429–38, 2000.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 2, p. 603–15, 2001.

OLIANI, S. M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, v. 57, n. 10, p. 450–6, 2008.

OPPELTZ, R. F. et al. Gamma delta ($\gamma\delta$) T-cells are critical in the up-regulation of inducible nitric oxide synthase at the burn wound site. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 528–34, 2012.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 34, n. 1, p. 6–17, Feb. 2008.

PATEL, N. Fat Injection in Severe Burn Outcomes: A New Perspective of Scar Remodeling and Reduction. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 32, n. 3, p. 470–2, 2008.

PAULA, R. et al. The intricate role of mast cell proteases and the annexin A1-FPR1 system in abdominal wall endometriosis. **Journal of molecular histology**, v. 46, n. 1, p. 33–43, 2015.

PEJLER, G. et al. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood Journal**, v. 115, n. 24, p. 4981–90, 2011.

PERRETTI, M.; DALLI, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 936–46, 2009.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2631–9, 2004.

RICHARDSON, P.; MUSTARD, L. The management of pain in the burns unit. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 35, n. 7, p. 921–36, Nov. 2009.

SAARINEN, J. et al. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 27, p. 18134–40, 1994.

SAITO, N. et al. An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. **Science translational medicine**, v. 6, n. 245, p. 1-11, 2014.

SATO-MATSUMURA, K. C. et al. Localization of annexin I (lipocortin I, p35) mRNA in normal and diseased human skin by in situ hybridization. **Archives of Dermatological Research**, v. 288, n. 10, p. 565–9, 1996.

SATO-MATSUMURA, K. C. et al. Membrane expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 292, n. 10, p. 496–9, 2000.

SIBILANO, R.; FROSSI, B.; PUCILLO, C. E. Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 9, p. 2558–66, 2014.

SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698-738, 2014.

SILVA, H. A. L. et al. Expression of annexin A1 in leishmania-infected skin and its correlation with histopathological features. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 560–7, 2015.

STRONCEK, J. D.; REICHERT, W. M. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. **Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the *In Vivo* Environment**, ed. CRC Press/Taylor & Francis. 2007, cap. 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3938/>>. Acesso em 08/03/2015.

SUMMER, G. J. et al. Burn Injury Pain: The Continuing Challenge. **Journal of Pain**, v. 8, n. 7, p. 533–48, 2007.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, W. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harb Perspect Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.

TEIXEIRA, R. A. et al. The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 2, p. 44-53, 2016.

TRENTIN, P. G. et al. Annexin A1-mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 12, p. 3058-71, 2015.

TSAO, F. H. et al. Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 18, n. 1, p. 120–8, 1998.

VAN DEN BOGAERDT, A. J. et al. Collagen cross-linking by adipose-derived mesenchymal stromal cells and scar-derived mesenchymal cells: Are mesenchymal stromal cells involved in scar formation? **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 4, p. 548–58, 2009.

WELLE, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **Journal of leukocyte biology**, v. 61, n. 3, p. 233–45, 1997.

WELLER, K. et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **FASEB journal**, v. 20, n. 13, p. 2366–8, 2006.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle.

Nature Reviews Immunology, v. 14, n. 7, p. 478–94, 2014.

WILGUS, T. A; WULFF, B. C. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. **Advances in wound care**, v. 3, n. 4, p. 356–65, 2014.

WONG, V. W.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Wound Healing: A Paradigm for Regeneration. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n. 9, p. 1022–31, 2013.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119–36, 2015.

YEH, F.-L.; SHEN, H.-D.; TAI, H.-Y. Decreased production of MCP-1 and MMP-2 by keloid-derived fibroblasts. **Burns**, v. 35, n. 3, p. 348–51, 2009.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; SEIFALIAN, A. M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 638–48, 2012.

ANEXO A – Cópia do Certificado de aprovação no CEUA (nº12/14)



Faculdades Integradas “Padre Albino”
 Comissão de Ética para o Uso de Animais
 Rua dos Estudantes, 225 – Catanduva – SP – CEP: 15.809-144
 Fone: (17) 3311-3229 – 3311-3340 – e-mail: ceua@fipa.com.br



C E R T I F I C A D O

Nº 12/14

Certificamos que o Trabalho (Protocolo nº 14.11.03-14), intitulado: “**Heterogeneidade dos mastócitos e ação da proteína ANEXINA A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau**”, de autoria da **Profa. Dra. Ana Paula Girol**, foi **APROVADO** sob o **Registro nº 12/14**, em 20/11/2014, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino - FIPA – Catanduva – SP.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA, os relatórios parciais e/ou final do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

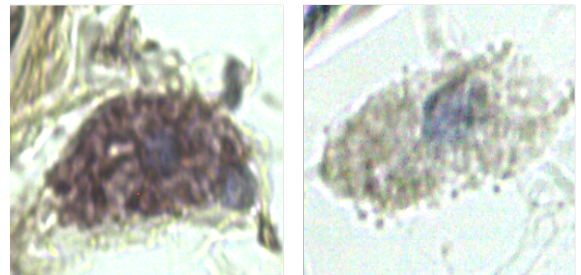
Catanduva (SP), 20 de novembro de 2014.

Profa. Dra. Ana Paula Girol
 Coordenadora da CEUA-FIPA
Profa. Ana Paula Girol
 CRÉ-1 18.134/01-D
 Biologia Celular, Histologia e Embriologia

Prof. Dr. Manziello Cavazzana Jr.
 Coord. Biomedicina-FIPA

CEUA - FIPA

APÊNDICE A – *“Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with Silver Sulfadiazine treatment”*



Article Type: Regular Article

Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with Silver Sulfadiazine treatment

Helena Ribeiro Souza¹⁻², Lucas Ribeiro de Azevedo², Lucas Possebom², Sara de Souza Costa², Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon¹, Sonia Maria Oliani², Ana Paula Girol¹⁻²

1 – Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Catanduva, SP, Brazil

2 – São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil (Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology)

Correspondence:

Ana Paula Girol

Department of Physical and Biological Sciences, Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

Tel.: +55-17-3311-3340/3361

e-mail: anapaulagirol@hotmail.com

Abstract

Mast cells (MCs) participate in all stages of skin healing and one of their mediators is the Annexin A1 protein (AnxA1), linked to inflammation, proliferation, migration and apoptosis processes, but yet not studied in thermal burns. Therefore, our objectives were to evaluate the behavior of MCs and AnxA1 in a second degree burn model, treated or not with silver sulfadiazine 1% (SDP 1%) and associated to macrophages quantification and cytokines dosage. MCs counts showed few cells in the early stages of repair but increased MCs in the final phases in the untreated group. The normal skin presented numerous MCs tryptase positive (MCT) that were reduced after burning in all analyzed periods. Differently, few MCs chymase positive (MCC) were observed in the early stages of healing, however, increased MCQs were found at the final phase in the untreated group. MCs also showed high immunoreactivity for AnxA1 on day 3 in both groups. In the tissue, there was a strong protein expression in the early stages of healing, but in the final phases only in the SDP treated animals. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and MCP-1 levels and macrophages quantification were increased in inflammation and reepithelialization phases. Reduced IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels and numerous macrophages occurred in the treated animals during tissue repair. Our results indicate modulation in the profile of MCs and AnxA1 expression during healing by the treatment with SDP 1%, pointing them as targets for therapeutic interventions on skin burns.

Keywords: skin, healing, tryptase, chymase, interleukins

Introduction

The tissue repair process in the healing of burns can be divided into phases of inflammation, proliferation and maturation, where each stage orchestrates the beginning of the next phase (1–4). The maturation phase is characterized by neogenesis of the epithelial appendages and the extracellular matrix (ECM) remodeling, but pathological scars may be formed due to excessive collagen synthesis (1).

Among the mediators involved in inflammation there are the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and the anti-inflammatory cytokine IL-10, which differ in their expression during wound healing (5–7). The initial phase also involves the release of monocytes chemoattractant protein-1 (MCP-1), that attracts macrophages and mast cells (MCs) (8,9).

The MCs have important functions in the different wound repair phases (10). In the process of degranulation, MCs release chemotactic factors and specific proteases, such as tryptase and chymase, to the ECM (11–13). The variable expression of proteases has led to the recognition of MCs subpopulations in humans and murines (14,15). Moreover, studies have indicated that the granules of MC store the protein annexin A1 (AnxA1) (16,17), the first cloned member of the superfamily of annexins. The annexins are grouped according to their structural characteristics, and display a central domain consisting of four replicates of 60 to 70 amino acids each, with affinity for Ca⁺⁺ and connected to a N-terminal sequence, which confers specificity of action for each member of the superfamily (18). The AnxA1 protein presents various functions related to inflammation (19,20) growth (21), migration, cell proliferation and differentiation, besides membrane transport and apoptosis (20,22). However, there are no known reports on the expression and function of AnxA1 in the repair of burns.

As MCs and AnxA1 have been little explored in burns, the aim of this study was to analyze the profile of these cells by the assessment of their number and heterogeneity for tryptase and chymase, and also to evaluate the expression of AnxA1 in MCs and in skin flaps in a second degree burn model using the silver sulfadiazine at 1% (SDP 1%), considered the standard treatment for partial thickness burns (23,24). The results of these analyses may be useful for better understanding the wound healing and afford the development of new therapeutic strategies for burned patients.

Materials and methods

Animals

Wistar rats (n=40) weighing approximately 250g were obtained from the Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA). The animals were kept in cages in a controlled environment (24 to 25°C, 12h light/dark cycle) with water and food ad libitum. The experiments were conducted after approval and in accordance with the rules of the Ethics Committee for Animal Use of FIPA (Protocol 12/14).

Experimental model of burn and treatment protocols

The animals were anesthetized intraperitoneally with 0,2mL/100g of ketamine and 0,05mL/100g of xylazine and submitted to trichotomy of the dorsal region for applying a metal block with dimensions of 2x2cm², water heated to 100°C, for 10 seconds (25). Immediately after the trauma, the lesions were covered with gauze moistened in cold saline solution. The animals were given analgesic codeine (1mL/kg) immediately after the injury induction, by gavage, and in the next days the analgesic was offered diluted in the drinking water. The control of water intake and weight of the animals was daily performed.

The topical treatments were begun 24h after the induction of burns. Control groups of animals (C Groups) were treated with a daily application of saline and the treated groups received daily administrations of SDP 1% (SDP Groups). Control and treated animals were euthanized by overdose of isoflurane, for removal of lesions after 3, 7, 14 and 21 days of injury (n=5/group). Normal skin flaps (n=5) were also taken from control animals (N Group).

Quantitative analysis of cytokine levels

Fragments from all groups were macerated in liquid nitrogen and added 650µL of a solution containing protease and phosphatase inhibitors (Merck, Millipore Corporation, USA) following the manufacturer's instructions. The material was incubated for 20 minutes at 4°C under constant agitation and then centrifuged at 14.000 RPM for 10 minutes at 4°C. The supernatants were collected and frozen at -80°C.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and MCP-1 were quantified in the supernatant using the MILLIPLEX MAP Kit (RECYTMAG-65K; Merck Millipore Corporation, USA) and analyzed on the Luminex xMAP MAGPIX device (Merck Millipore Corporation, USA). The

concentration of the analytes was determined by the MAGPIX xPONENT Software and expressed in pg/mL.

Histopathological analysis and quantification of cells

Fragments of normal skin and lesions were fixed in 4% formalin, processed for inclusion in paraffin and sectioned at 5 μ m for histopathologic, quantitative and immunohistochemical analysis. The repair process was evaluated histologically by Hematoxylin-Eosin (HE) and the organization of the collagen fibers was evidenced by Picrosirius Polarization method.

MCs were stained with 0.1% toluidine blue (TB+ MCs) and evaluated according to their morphological characteristics in intact or degranulated. The histamine accumulation by MCs was evidenced after staining with 2.5% Safranin-O (S-O+ MCs) (26). The quantification of MCs in the skin fragments was performed in 10 images per slide obtained by 40X objective in a Leica microscope (DM500). The areas of each tissue were obtained using the Leica Image Analysis Software.

Dilutions of the primary antibodies for immunohistochemical analysis

1. Mouse polyclonal anti-AnxA1 (1:700 for the stroma/epithelium within 20 hours of incubation and 1:400 for MCs within 4 hours of incubation; Merck Millipore Corporation, USA).
2. Mouse monoclonal anti-Chymase (1:100; Abcam, USA) and mouse monoclonal anti-Tryptase (1:3000; Merck Millipore Corporation, USA) within 4 hours of incubation.
3. Mouse monoclonal anti-rat monocyte/macrophages (1:150, Merck Millipore Corporation, USA) within 4 hours of incubation.

Immunohistochemical analysis

Sections of the different samples were prepared on gelatinized slides and then deparaffinized, rehydrated, and after antigen retrieval (citrate buffer pH 6.0 at 96°C for 20 minutes) and blocking of endogenous peroxidase, they were incubated in a humid chamber at 4°C with the primary antibody diluted in 1% BSA. After, the sections were incubated with secondary biotinylated antibody, revealed with DAB substrate and counterstained with

Hematoxylin. The negative control reaction was obtained by omitting the primary antibody. The analysis of AnxA1 protein expression in epithelium and stroma from skin fragments was performed by optical densitometry (arbitrary units from 0 to 255) by the program Leica Image Analysis. Densitometric analysis of AnxA1 expression in the cytoplasm of MCs was performed on 10 cells from each sample. The immunoreactive MCs for tryptase (MCT) or chymase (MCC) and macrophages were quantified as previously described.

Statistical analysis

The results were submitted previously to descriptive analysis and determination of normality, then compared by analysis of variance (ANOVA-two way) and Bonferroni post-test. All values were expressed as mean \pm S.E.M. and P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Better healing of the second degree burn lesion after SDP 1% treatment

The histopathological analysis confirmed the characteristics of second degree burns (Fig. 1a2, b2) and, together with the macroscopic analysis, showed the best evolution of the wounds in the SDP groups (Fig. 1f, h). During the wound healing process, after 3 days of the burn induction, common characteristics of the inflammation phase, as the influx of leukocytes and adipocytes proliferation were observed (Fig. 1a2, b2). After 7 days, a re-epithelialization process was verified, featuring the cellular proliferation phase (Fig. 1c2, d2), whereas 14 days post injury (Fig. 1e, f), the proliferation of the ECM was evident, and on day 21 (Fig. 1g, h), the remodeling phase was characterized with formation of epithelial appendages, epidermis and dermis restructuring and changes in the patterns of birefringence of collagen fibers, observed after polarization, indicating reorganization, especially in the skin of the animals treated with SDP 1% (Fig. 1h).

Cytokines and macrophages are modulated during the tissue repair process

The TNF- α quantification showed after 3 days of injury a significant increase ($p < 0,05$) only in C3 group compared to N (N: 7.78 ± 2.29 ; C3: 52.13 ± 18.92 ; Fig. 2a) while on day 7, higher TNF- α levels were found in both groups compared to N ($p < 0,001$) and also to previous phase (C7: 154.18 ± 27.14 , $p < 0.001$ vs C3; SDP7: 143.98 ± 31.91 , $p < 0.001$ vs SDP3; Fig. 2a).

The IL-1 β dosages indicated a significant increase in both groups, on days 3 and 7 compared to N group (N: 224.22 ± 21.21 ; C3: 530.64 ± 94.37 ; $p < 0.05$; SDP3: 582.94 ± 99.01 ; $p < 0.01$; C7: 641.79 ± 122.76 ; $p < 0.01$; SDP7: 684.68 ± 140.04 ; $p < 0.001$; Fig. 2b). Interestingly, in the next period, there was higher amount of this cytokine in the C14 group in relation to N ($p < 0.001$) and reduction of these levels in SDP14 group compared to the previous phase ($p < 0.05$) and the control group (C14: 901.29 ± 70.61 ; SDP14: 314.39 ± 79.83 , $p < 0.001$ vs C14; Fig 2b).

Regarding the IL-6, overexpression ($p < 0.001$) of this cytokine was observed in the lesions collected on day 7 compared to N (N: 0.49 ± 0.02 ; C7: 9192.64 ± 2743.42 ; SDP7: 5100.97 ± 1600.30 ; Fig. 2c), with lower dosage in SDP7 ($p < 0.001$) compared to C7 group.

The quantification of IL-10 showed higher levels in the inflammation (N: 15.67 ± 12.76 , C3: 157.19 ± 21.29 , $p < 0.05$; SDP3: 262.90 ± 68.59 ; $p < 0.001$; Fig. 2d) and cell proliferation phases (C7: 347.06 ± 63.59 ; $p < 0.001$; SDP7: 202.02 ± 66.58 ; $p < 0.01$; Fig. 2d),

in relation to N. Again, the treatment with SDP 1% reduced the cytokine levels on day 7 compared to control ($p < 0.01$).

Finally, the dosages of the MCP-1 chemokine showed elevated levels ($p < 0.001$) on days 3 and 7 of the healing process in relation to N (N: 100.27 ± 50.95 ; C3: 6525.44 ± 1569.07 ; SDP3: 8051.84 ± 1520.58 ; C7: 6774.98 ± 467.06 ; SDP7: 6796.24 ± 845.05 ; Fig. 2e). Similarly, in the quantification of macrophages (Fig. 2g), there was an increase ($p < 0.001$) in the number of these cells in both groups 3 days after the injury compared to N (N: 16.15 ± 4.43 ; C3: 60 ± 19.41 ; SDP3: 75 ± 22.68 ; Fig. 2f). However, in the next phase, only the SDP7 group numerous macrophages compared to N (SDP7 70 ± 5.77 ; $p < 0.001$; Fig. 2f).

Treatment with SDP 1% modulates the number and morphology of the MCs

Quantification of MCs showed a large number of intact cells in N (N: 74.91 ± 5.84 ; Fig. 3a, g). On days 3 and 7, in both groups, there was a significant decrease in the total number of MCs compared to N (C3: 30.94 ± 4.89 ; SDP3: 18.28 ± 3.08 ; $p < 0.001$: 80.01 ± 6.01 ; C7: 18.51 ± 8.12 ; SDP7: 39.55 ± 13.29 $p < 0.01$; Fig. 3b, c, g). In the SDP group, the MCs were observed mostly degranulated 7 days post injury (SDP7: 32.73 ± 22.55 , $p < 0.05$ vs N: 5.09 ± 1.97 ; Fig. 3h).

In the final phases of repair, the amount of MCs increased only in C group. These cells were observed, mostly degranulated 14 days post injury (C14: 59.88 ± 12.87 $p < 0.05$ vs SDP14: 38.31 ± 9.55 ; Fig. 3d, h), but intact after 21 days (C21: 53.75 ± 6.81 $p < 0.001$ vs SDP21: 15.66 ± 5.66 ; Fig. 3f, h).

Histamine storage by mast cells during healing

After observing the modulation promoted by SDP 1% in MCs, we analyzed the histamine accumulation in the cytoplasmic granules of MCs, during the tissue repair by reaction to S-O (Fig. 3j) (26). Then, the quantification of the TB+ MCs was compared to the MCs S-O+ (Fig. 3i).

Numerous S-O+ MCs were observed in N (S-O+: 70 ± 7.01 ; Fig. 3i). In the lesions, it occurred a marked difference between TB+ MCs and S-O+ MCs on day 7 only in the SDP group (SDP7 TB+: 39.55 ± 29.73 $p < 0.01$ vs SDP7 S-O+: 3.94 ± 1.28 ; Fig. 3i) and on day 14 in both groups (C14 TB+: 76 ± 13.14 $p < 0.01$ vs C14 S-O+: 42.17 ± 10.51 ; SDP14 TB+: 41.9 ± 11.01 $p < 0.05$ vs SDP14 S-O+: 20.83 ± 5 ; Fig. 3i), matching the periods in which the MCs showed up mostly degranulated, that indicates low accumulation of histamine by MCs, in these periods.

Treatment with the SDP 1% influences the heterogeneity of MCs

To analyze the heterogeneity of MCs during the healing process these cells were quantified after immunohistochemistry for the tryptase (MCT; Fig. 2k) and chymase (MCC; Fig. 2l). In the N group, the MCs were mostly tryptase + (MCT: 33.3 ± 4.79 ; Fig. 3m MCC: 18.7 ± 2.1 ; Fig. 3n).

At all stages of tissue repair it was observed reduction of MCTs in both groups compared to N, with greater differences ($p < 0.001$) in the early stages (C3: 8.5 ± 2.57 ; SDP3: 1.5 ± 0.61 ; C7: 15 ± 5.68 ; SDP7: 2.5 ± 1.93 ; Fig 3m) than the final stages of repair (C14: 18.65 ± 7.81 ; $p < 0.05$ vs N; SDP14: 10.5 ± 4.56 ; $p < 0.01$ vs N; C21: 18.75 ± 9.60 ; $p < 0.05$ vs N; SDP21: 13.12 ± 2.77 ; $p < 0.01$ vs N; Fig 3m).

On day 3 of the healing, there was a reduction in the number of MCCs ($p < 0.001$), compared to N group (C3: 4 ± 1.27 ; SDP3: 0.87 ± 0.52 ; Fig. 3n), but after 7 days of injury the amount of MCCs was reduced ($p < 0.05$) only in SDP7 compared to N group (C7: 12.5 ± 4.67 ; SDP7: 2.8 ± 1.64 ; Fig. 3n). On day 14, the treated group showed fewer MCCs ($p < 0.01$) compared to C14 (C14: 24.75 ± 5.37 ; SDP14: 5 ± 2.23 ; Fig. 3n). Finally, after 21 days of burn lesion, increased MCCs were found in C21 group in relation to the other groups (C21: 60 ± 21.21 , $p < 0.001$ vs N and $p < 0.01$ vs C14; SDP21: 18.75 ± 5.90 , $p < 0.001$ vs C21; Fig. 3n).

The expression of AnxA1 in the cytoplasm of MCs, epidermis and dermis varies during the wound healing

In the cytoplasm of MCs it was observed reactivity for the AnxA1 protein (Fig. 4l and 4m). The densitometric analysis showed increased immunostaining for AnxA1 ($p < 0.001$) in the phase of inflammation, in C3 and SDP3 groups, compared to the others (Fig. 4k). The specificity of the immunolabeling was checked by control of the reaction and the counterstaining with TB in serial sections.

In the tissues, there was reduced AnxA1 protein expression in the normal skin (Fig. 4g, i, j). After burn, on day 3 (Fig. 4a, b), the expression of AnxA1 was increased ($p < 0.001$) in both groups in the epithelium (Fig. 4i) and stroma (Fig. 4j) compared to N, especially in the C3 group ($p < 0.05$; Fig. 4i, j).

On day 7, the AnxA1 expression remained increased with respect to N (Fig. 4c, d), in regions of reepithelization (C7: $p < 0.05$; SDP7: $p < 0.001$; Fig. 4i) and in the dermis ($p < 0.001$; Fig 4j). However, the SDP7 group showed higher immunostaining for AnxA1 compared to C7 group ($p < 0.05$; Fig. 4i, 4j).

After 14 days of injury the immunoreaction for AnxA1 was high only in the epithelium in C ($p<0.01$) and SDP groups ($p<0.05$) compared to N (Fig. 4i). Thereafter, further increase of the protein expression occurred in SDP21 group (Fig. 4f) compared to N and C21 groups (Fig. 4e) in the dermis (SDP21: $p<0.001$ vs N; $p<0.05$ vs C21; Fig. 4j) and epidermis ($p<0.001$ vs N and C21; Fig 4i) especially observed near the epithelial appendages development.

Discussion

Histopathological findings confirmed the depth of the injury as a superficial second degree burn (25) and also the best regeneration in the treated group (23,27). Furthermore, at 21 days of the repair process, the analysis of the lesions showed formation of epithelial appendages, especially in the SDP group. The appendages are functional parts of the skin, therefore a fast regeneration is important to the restoration of normal anatomy, structure and function (4).

Next, knowing the importance of the inflammatory mediators, levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and MCP-1 were quantified in the supernatant of the macerated fragments. On days 3 and 7, the dosages of IL-1 β , IL-10 and MCP-1 were increased compared to normal skin. Differently, the higher levels of IL-6 were observed only 7 days post injury. While the TNF- α dosages were elevated in both burned groups on day 7 but on day 3 only in the control group. Increased levels of IL-1 β were also found in the control group 14 days after injury. The results of our measurements are consistent with other studies in skin burns (5–9,28).

The pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 and the chemokine MCP-1 are important for leukocyte recruitment and re-epithelialization (8), nevertheless the prolonged inflammation can be harmful (23). However, our evaluations showed that the treatment with SDP 1% decreased levels of IL-6 and IL-1 β and increased the dosage of MCP-1 on day 7. Besides, the macrophage quantification followed the cytokines levels. In an *in vitro* study, the dosage of MCP-1 was decreased in fibroblasts derived from keloids, emphasizing the protective role of MCP-1 in the healing process (29). This chemokine is released primarily by keratinocytes near the injury and recruit monocytes, macrophages, lymphocytes and also MCs (8,9).

After verifying that the model used in this study was suitable for the induction of second degree burns, we proceed to the analysis of MCs. The MCs were observed in large quantities and mainly intact in the dermis of the normal skin, with a significant reduction of total number on days 3 and 7 after injury, as in other investigations (3,12,30). In addition, mice deficient in MCs presented an impaired skin wound closure, indicating the importance of the mediators of these cells to this process (31).

Later, in the following phases, there was an increase of MCs number in the untreated group, as also observed in other studies (12,30). The MCs were found especially degranulated on day 14, but intact 21 days after injury in the control group. The reduction of these cells in

the treated group may be related to the leukopenic property of SDP, due to cytotoxicity promoted by the drug components to stem cells from bone marrow (23,32).

Several *in vivo* and *in vitro* studies have linked the heightened presence of MCs with the proliferation of fibroblasts and formation of keloids (33–37). Thus, the control of MCs proliferation in the repair of the skin lesion is an important therapeutic strategy in the treatment of burn patients. Still, in the later stages of healing, it was observed decrease in the number of macrophages and increased in the number of MCs (3), characteristics which were also observed in our cell quantifications.

With that in mind, following the investigation, we studied the histamine accumulation and heterogeneity of MCs. The process of histamine accumulation was verified by S-O+ MCs, comparing these cells to TB+ MCs. Our results showed differences in the number of MCs TB+ and S-O+ in the same periods in which these cells were found to be active, corroborating that the MCs were still releasing the content of their granules in these periods.

Regarding the heterogeneity of MCs for tryptase and chymase, after 3 days of burn, decreased immunoreactive cells were observed for both proteases. The reduction in the number of MCTs remained in all examined periods of wound healing. These results are in agreement to another study (38) that showed the reduction of MCTs and MCCs in human skin recent wounds. The same study found increased tryptase activity in older scars when compared to normal human skin. In addition, tryptase is considered a biomarker for mastocytosis (39). Given the MCCs, our analysis showed reduced cells in the initial phases, but numerous MCCs were observed in the lesions from day 14. In the lesions of the untreated groups the increased MCCs in the late phases of repair matches with the elevated IL-1 β levels found in our quantifications and are in line with studies that indicate the involvement of chymase in the cleavage of pro-IL-1 β to IL-1 β , activating it (40). Furthermore, these results indicate the relation between the MC histamine storage and chymase accumulation and are in agreement with a study that demonstrated the importance of histamine to the maturation of MCs and accumulation of proteases (26). Additionally, other *in vitro* study demonstrated that during MC maturation process, the chymase is expressed by most cells and in larger quantities than tryptase (41), indicating again that, in our model, these cells are in the process of infiltration and maturation in the newly regenerated tissue.

Besides that, several studies associate the chymase to the formation of fibrosis and keloids (10,34,35,42,43). While other investigations indicate that both tryptase and chymase are important for collagen degradation (13,31,38,44). Thus, our results reinforce that the heterogeneity of MCs, in different periods and in response to treatment with SDP 1%, is

related to their function in the cellular microenvironment, indicating that the MCs actively participate in the remodeling phase of the repair process.

Continuing our study, we evaluated the expression of AnxA1 in the MCs cytoplasm, during tissue healing and normal skin. Our evaluations, showed strong MC immunoreactivity for the protein, mainly in the inflammatory phase, on day 3, in both groups. These results are in accordance to different investigations that also showed the presence of AnxA1 in the granules of MCs (16–18,45) with increased synthesis during the inflammatory processes (45).

In the tissue evaluations, a weak immunostaining was found in normal skin, in accordance with previous studies (46,47). However, an increased AnxA1 expression was observed in both groups on 3 and 7 days after injury. These results relate the expression of AnxA1 to the inflammatory process corroborating with other researches in different models of inflammation (19,48) and are also in agreement with studies that have shown the participation of AnxA1 in the process of cellular proliferation (20). Studies have indicated the importance of AnxA1 to the closure of intestinal epithelium lesions (49,50), migration and proliferation of endothelial cells (21), differentiation of keratinocytes (46) and their stratification and keratinization (51) and also in the motility of fibroblasts (52).

In the remodeling phase, on day 21, higher immunostaining for AnxA1 was observed in the SDP group, both in the stroma and epithelial regions, especially close to the neogenesis of hair follicles and glands. The presence of AnxA1 was detected in the duct of sweat glands, demonstrated by *in situ* hybridization, in another research (47). In addition, studies have contributed to the understanding of the AnxA1 antifibrotic properties in the matrix of different organs, by decreasing inflammation and subsequent development of fibrosis (53) or by acting directly on the phenotype of fibroblasts (54,55). Therefore, our results indicate the role of AnxA1 in tissue repair in burns both in epithelial regeneration as in the protection against keloid formation.

Moreover, IL-6 and TNF- α can be linked to AnxA1 expression (22). Although IL-6 can induce the expression of AnxA1 (18), in turn, the AnxA1 can equally reduce TNF- α and IL-6 expressions (56), which explains the modulation of these cytokines during the repair process after 7 days of injury and in the SDP group, when the AnxA1 expression was increased. Our observations also indicated increase in IL-10 levels in the phases of inflammation and cell proliferation, that is again coincident with the phases in which the AnxA1 protein expression is higher in the lesions. While pro-inflammatory cytokines perpetuate inflammation, other mechanisms operate to regulate this activity, such as IL-10 (8), and AnxA1 protein (20,22).

Thus, our results suggest that AnxA1 protein and IL-10 act together in the burn healing process.

In general, our investigation revealed that degranulation of MCs in the early phases of wound healing is important for modulation of the microenvironment with the secretion of proteases and the AnxA1 protein, which may stimulate the release of chemical mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and MCP-1. Furthermore, our analysis showed that treatment with SDP 1% promotes slower repopulation of the tissue by MCs, controlling mainly MCCs, which may exert a protective effect against the formation of keloids. In addition, our studies revealed increased expression of the protein AnxA1 especially in the treated group, concomitant to keratinocytes proliferation and differentiation and also stromal remodeling, with the possibility of anti-fibrotic action.

All together, our data show modulation in the number, degranulation state, maturity and heterogeneity of MCs, and the relation of these cells with the AnxA1 and cytokines expression during the tissue repair process in a model of second degree burn. Thereby, MCs and AnxA1 can be considered as targets for the development of new strategies in the healing of burned patients.

Acknowledgments

To UNESP, FIPA, FAPESP (Process 2015/03359-5) and CNPq for structural and financial supports.

Conflicts of interest

None

References

1. Stroncek JD, Reichert WM. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. *Indwelling Neural Implant Strateg Contend with Vivo Environ.* 2007;3–33.
2. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314–21.
3. Ehrlich HP. A Snapshot of Direct Cell-Cell Communications in Wound Healing and Scarring. *Adv wound care.* 2013;2(4):113–21.
4. Takeo M, Lee W, Ito W. Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1).
5. Kubo H, Hayashi T, Ago K, Ago M, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Leg Med. Elsevier Ireland Ltd;* 2014;16(1):8–13.
6. Oppeltz RF, Rani M, Zhang Q, Schwacha MG. Gamma delta ($\gamma\delta$) T-cells are critical in the up-regulation of inducible nitric oxide synthase at the burn wound site. *Cytokine. Elsevier Ltd;* 2012;60(2):528–34.
7. Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral JM, et al. Characterization of the Inflammatory Response During Acute and Post-Acute Phases After Severe Burn. *Shock.* 2008;30(5):503–7.
8. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69(4):513–21.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585–601.
10. Dong X, Geng Z, Zhao Y, Chen J, Cen Y. Involvement of mast cell chymase in burn wound healing in hamsters. *Exp Ther Med.* 2013;5(2):643–7.
11. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol.* 2014 Jan [cited 2016 Jan 20];122:211–52.
12. Nishikori Y, Kakizoe E, Kobayashi Y, Shimoura K, Okunishi H, Dekio S. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(10):553–60.
13. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group;* 2014;14(7):478–94.
14. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses:

comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):93–104.

15. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*. 1997;61(March):233–45.
16. Oliani SM, Christian HC, Manston J, Flower RJ, Perretti M. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. *Lab Invest*. 2000 Sep [cited 2016 Jan 20];80(9):1429–38.
17. Paula R, Oliani AH, Vaz-Oliani DCM, D'Ávila SCGP, Oliani SM, Gil CD. The intricate role of mast cell proteases and the annexin A1-FPR1 system in abdominal wall endometriosis. *J Mol Histol*. 2015;46(1):33–43.
18. D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*. 2008;155(2):152–69.
19. Girol AP, Mimura KKO, Drewes CC, Bolonheis SM, Solito E, Farsky SHP, et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *J Immunol*. 2013;190(11):5689–701.
20. Lim LHK, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*. 2007;21(4):968–75.
21. Côté MC, Lavoie JR, Houle F, Poirier A, Rousseau S, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12 [cited 2016 Jan 20];285(11):8013–21.
22. Gavins FNE, Hickey MJ. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. *Front Immunol*. 2012;3(NOV):1–11.
23. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo S a. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*. 2007;33(2):139–48.
24. Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: The basic science. *Burns* [Internet]. Elsevier Ltd and International Society of Burns Injuries; 2014;40:S9–18.
25. Meyerholz DK, Piester TL, Sokolich JC, Zamba GKD, Light TD, David K. Meyerholz*, Travis L. Piester, Julio C. Sokolich GKDZ and. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute burn injury rat model. *Int J Exp Pathol* (2009), 90. 2009;90(1):26–33.
26. Nakazawa S, Sakanaka M, Furuta K, Natsuhara M, Takano H, Tsuchiya S, et al. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):204–14.

27. Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, Taheri S, Rakhshan M. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: A histological and microbiological study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2005;78(2):171–7.
28. Babcock GF, Hernandez L, Yadav E, Schwemberger S, Dugan A. The burn wound inflammatory response is influenced by midazolam. *Inflammation.* 2012;35(1):259–70.
29. Yeh F-L, Shen H-D, Tai H-Y. Decreased production of MCP-1 and MMP-2 by keloid-derived fibroblasts. *Burns.* 2009;35(3):348–51.
30. Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, Jalili MR. Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. *J Rehabil Res Dev.* 2008;45(6):931–8.
31. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* 2006;20(13):2366–8.
32. Gamelli RL, Paxton TP, O'Reilly M. Bone marrow toxicity by silver sulfadiazine. *Surg Gynecol Obstet.* 1993 Aug [cited 2016 Jan 20];177(2):115–20.
33. Levi-Schaffer F, Rubinchik E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1995 Jun [cited 2016 Jan 20];104(6):999–1003.
34. Dong X, Zhang C, Ma S, Wen H. High concentrations of mast cell chymase facilitate the transduction of the transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway in skin fibroblasts. *Exp Ther Med.* 2015;9:55–60. A
35. Dong X, Zhang C, Ma S, Wen H. Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via transforming growth factor- β 1/Smad activation in keloid fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):3596–607.
36. Harunari N, Zhu KQ, Armendariz RT, Deubner H, Muangman P, Carrouger GJ, et al. Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: final similarities to human hypertrophic scar. *Burns.* 2006;32(6):669–77.
37. Huttunen M, Aalto ML, Harvima RJ, Horsmanheimo M, Harvima IT. Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializing and chronic wounds. *Exp Dermatol.* 2000;9(4):258–65.
38. Hermes B, Feldmann-Böddeker I, Welker P, Algermissen B, Steckelings MU, Grabbe J, et al. Altered expression of mast cell chymase and tryptase and of c-Kit in human cutaneous scar tissue. *J Invest Dermatol.* 2000;114(1):51–5.
39. Pejler G, Rönnberg E, Waern I, Wernersson S, De W, Ro E. Mast cell proteases : multifaceted regulators of inflammatory disease Review article Mast cell proteases : multifaceted regulators of inflammatory disease. 2011;115(June):4981–90.

40. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2010;6(4):232–41.
41. Ma F, Kambe N, Wang D, Shinoda G, Fujino H, Umeda K, et al. Direct development of functionally mature tryptase/chymase double-positive connective tissue-type mast cells from primate embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(3):706–14.
42. Artuc M, Steckelings UM, Grützkau A, Smorodchenko a, Henz BM. A long-term coculture model for the study of mast cell-keratinocyte interactions. *J Invest Dermatol*. 2002;119(2):411–5.
43. Dong X, Chen J, Zhang Y, Cen Y. Mast cell chymase promotes cell proliferation and expression of certain cytokines in a dose-dependent manner. *Mol Med Rep*. 2012;5(6):1487–90.
44. Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem*. 1994;269(27):18134–40.
45. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(SUPPL. 1):39–48.
46. Bastian BC, van der Piepen U, Römisch J, Pâques EP, Bröcker EB. Localization of annexins in normal and diseased human skin. *J Dermatol Sci*. 1993;6(3):225–34.
47. Sato-Matsumura KC, Koizumi H, Matsumura T, Ohkawara A, Takasu T, Furuta Y, et al. Localization of annexin I (lipocortin I, p35) mRNA in normal and diseased human skin by in situ hybridization. *ArchDermatolRes*. 1996;288(0340-3696 (Print)):565–9.
48. Patel N. Fat Injection in Severe Burn Outcomes: A New Perspective of Scar Remodeling and Reduction. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(3):470–2.
49. Leoni G, Alam A, Neumann P, Lambeth JD, Cheng G, Mccoy J, et al. Orchestrate Epithelial Repair. 2013;123(1).
50. Leoni G, Neumann P, Kamaly N, Quiros M, Nishio H, Jones HR, et al. Annexin A1 – containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. 2015;125(10):1–13.
51. Matsumura KCST, Nakamura H, Sawa H. Membrane expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes. 2000;496–9.
52. Bizzarro V, Fontanella B, Carratù A, Belvedere R, Marfella R, Parente L, et al. Annexin A1 N-Terminal Derived Peptide Ac2-26 Stimulates Fibroblast Migration in High Glucose Conditions. *PLoS One*. 2012;7(9):1–9.
53. Damazo AS, Sampaio AL, Nakata CM, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM.

Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunol.* BioMed Central Ltd; 2011;12(1):59.

54. Trentin PG, T Ferreira TP, Arantes a CS, Ciambarella BT, Cordeiro RSB, Flower RJ, et al. Annexin A1-mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *Br J Pharmacol.* 2015;n/a – n/a.

55. Neymeyer H, Labes R, Reverte V, Saez F, Stroh T, Dathe C, et al. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. *Acta Physiol.* 2015;215(3):144–58.

56. Jia Y, Morand EF, Song W, Cheng Q, Stewart A, Yang YH. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol.* 2013;228(July):476–84.

Figure Legends

Figure 1.

Macroscopic and histopathologic analysis of the healing process in a second degree burn. (a) C3 and (b) SDP3, inflammation phases, with leukocytes influx and presence of adipocytes in both groups. (c) C7 and (d) SDP7, proliferation phase with re-epithelialization (arrows). Up to 7 days weakly stained collagen fibers (a3, b3, c3 and d3) and low birefringent after polarization (a4, b4, c4 and d4) in the dermis of both groups. (e) C14 and (f) SDP14, complete re-epithelialization and fast healing in SDP 1% group (e1 and f1). Dermis and hypodermis (e2, f2 - arrows) are better organized and collagen fibers more strongly stained in the group treated with SDP 1% (e3, f3). (g) C21 and (h) SDP21, remodeling phase, the epithelial attachments (g1, h1, g2, h2 - arrows) may be observed in larger amount and with increased birefringence under polarized light in the groups treated with SDP 1% (g4 and h4). Normal Skin (i). (a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1 and i1) Macroscopic analysis. (a2, b2, c2, d2, e2, f2, g2, h2 and i2) Staining: HE. Bars 500 μ m. Picrosirius staining without (a3, b3, c3, d3, e3, f3, g3, h3 and i3) and after (a4, b4, c4, d4, e4, f4, g4, h4 and i4) polarization. Bars 200 μ m.

Figure 2.

Cytokines and macrophages in wound healing in a second degree burn. (a) **TNF- α** : high dosages in C3 and in both groups after 7 days. (b) **IL-1 β** : high levels in both groups on days 3 and 7 and also in C14. (c) **IL-6**: overexpression on day 7, especially in the control group. (d) **IL-10**: Increased levels on days 3 and 7. (e) **MCP-1**: overexpression on days 3 and 7. (f) **Macrophages**: numerous macrophages on day 3 and SDP7. (g): Macrophage. Counterstaining: Hematoxylin. Bar 2 μ m. Values are presented as mean \pm S.E.M. (n=5/group). * $p < 0.05$ vs Normal Skin (N).

Figure 3.

Morphology of MCs in burn healing process: (a) MCs (arrows), most intact in Normal Skin (N). (b) C3 and (c) SDP3 with few MCs and mostly degranulated. (d) C14 (e) SDP14, MCs degranulated, mainly in control group. (f) C21, numerous intact MCs. Details of intact (a and f) and degranulated MCs (b and c). Staining: Toluidine Blue. Bars 50 μm . **Quantification of MCs:** (g) numerous intact MCs in N and C21 and (h) degranulated MCs in SDP7 and in both groups on day 14. (i) **Differences between quantification of MCs evidenced by Toluidine blue or Safranin-O**, with few MCs S-O+ (MCs histamine storage) in SDP7, C14 and SDP14 compared to the MC TB+ (total MCs in the tissue). (j) MC stained with Safranin-O (MC S-O+); (k) reactive MC for tryptase (MCT) and (l) chymase (MCC); Bars 50 μm . **Heterogeneity of MCs**, showing many MCTs (m) in N and numerous MCCs (n) in C21. Values are presented as mean \pm S.E.M. (n=5/group). * $p < 0.05$ vs N and $\gamma p < 0.001$ vs C14.

Figure 4.

AnxA1 expression in the second degree burn healing process. (a) C3 and (b) SDP3, increased expression of the protein in the inflammation phase, 3 days post injury, in the surface epithelium (arrows) and dermis. (c) C7 and (d) SDP7, increased expression in the stroma and epithelium (arrows), 7 days post injury. (e) C21 and (f) SDP21 higher expression of AnxA1 in the group treated with SDP 1%, surface epithelium (arrows). (g) Low expression of AnxA1 in normal skin. (i) No immunoreactivity in the reaction control. Counter-staining: hematoxylin. Bars 50 μm . **Optical densitometry of immunostained AnxA1 in** (i) Epithelium and (j) Stroma. (k) **Densitometric analysis of AnxA1 in the cytoplasm of MCs.** Values are presented as mean \pm S.E.M. (n=5/group). Values $p < 0.05$ vs Normal Skin (N). (l) strongly AnxA1 immunoreactive MC in the inflammatory phase. (m) weakly AnxA1 immunoreactive MC, remodeling phase. Bars 20 μm . (n) MC immunoreactive for AnxA1 and (o) the same cell in serial section with counterstaining of hematoxylin and toluidine blue, arrows indicate MCs. Bars 50 μm .

Figures
Figure 1

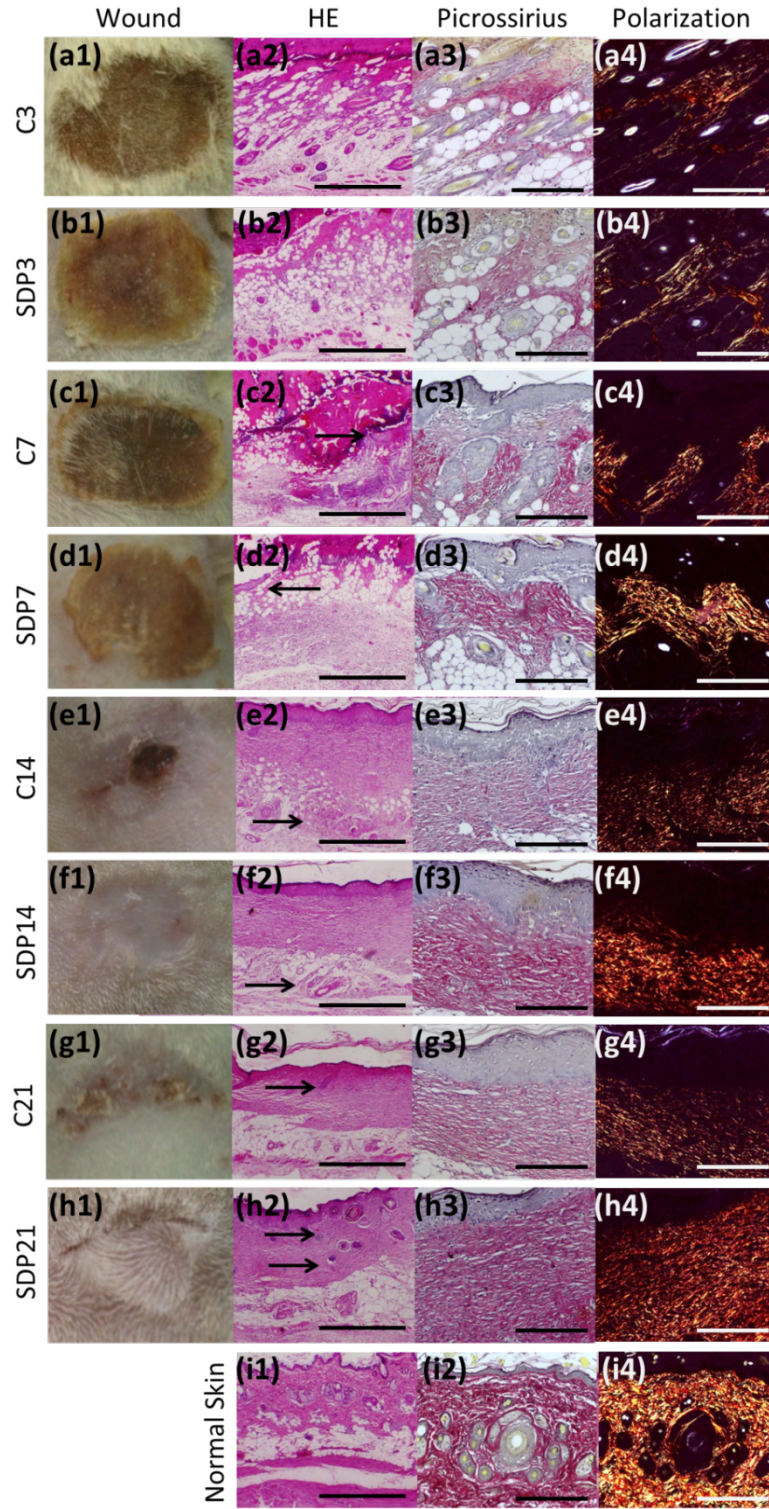


Figure 2

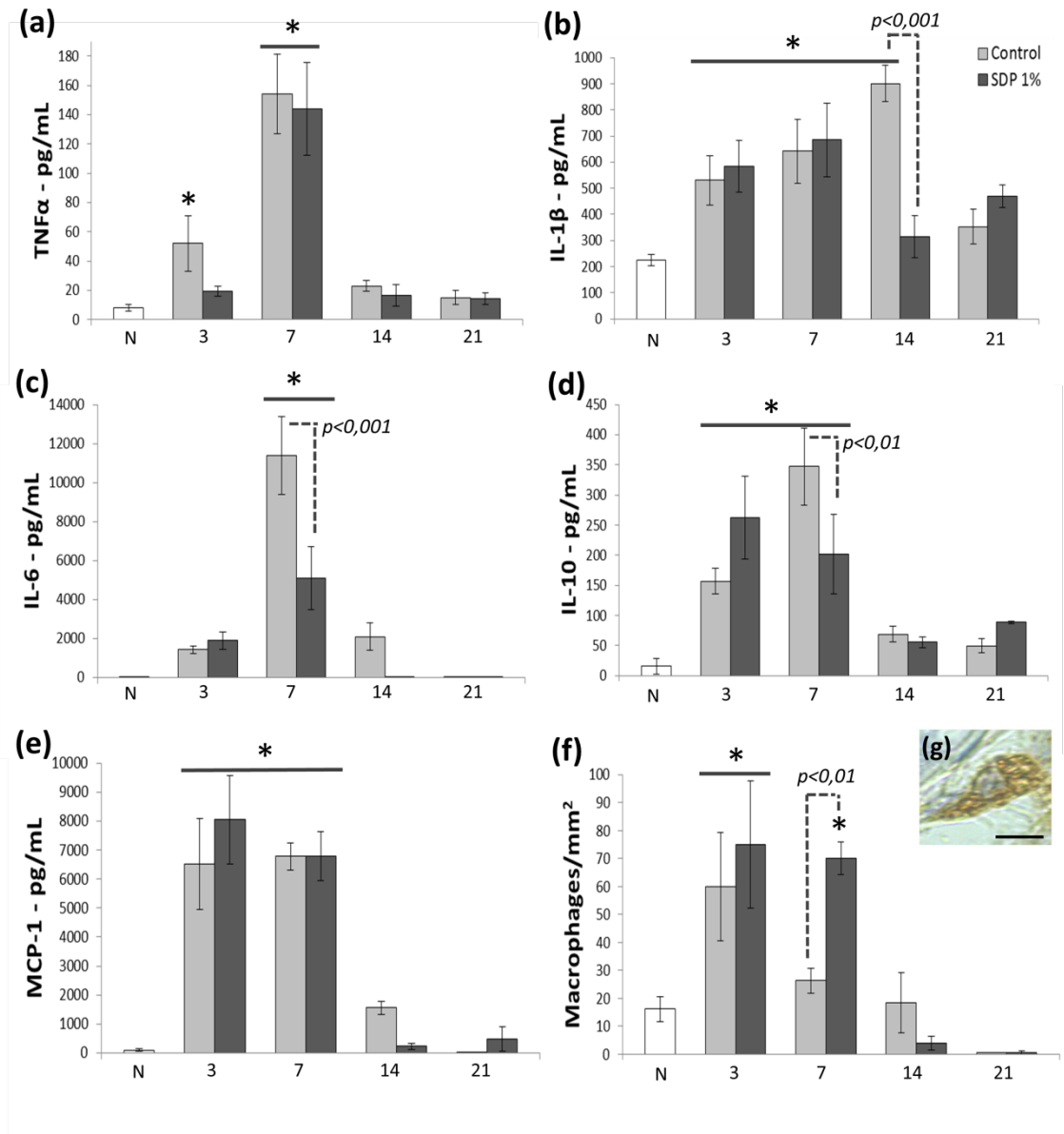


Figure 3

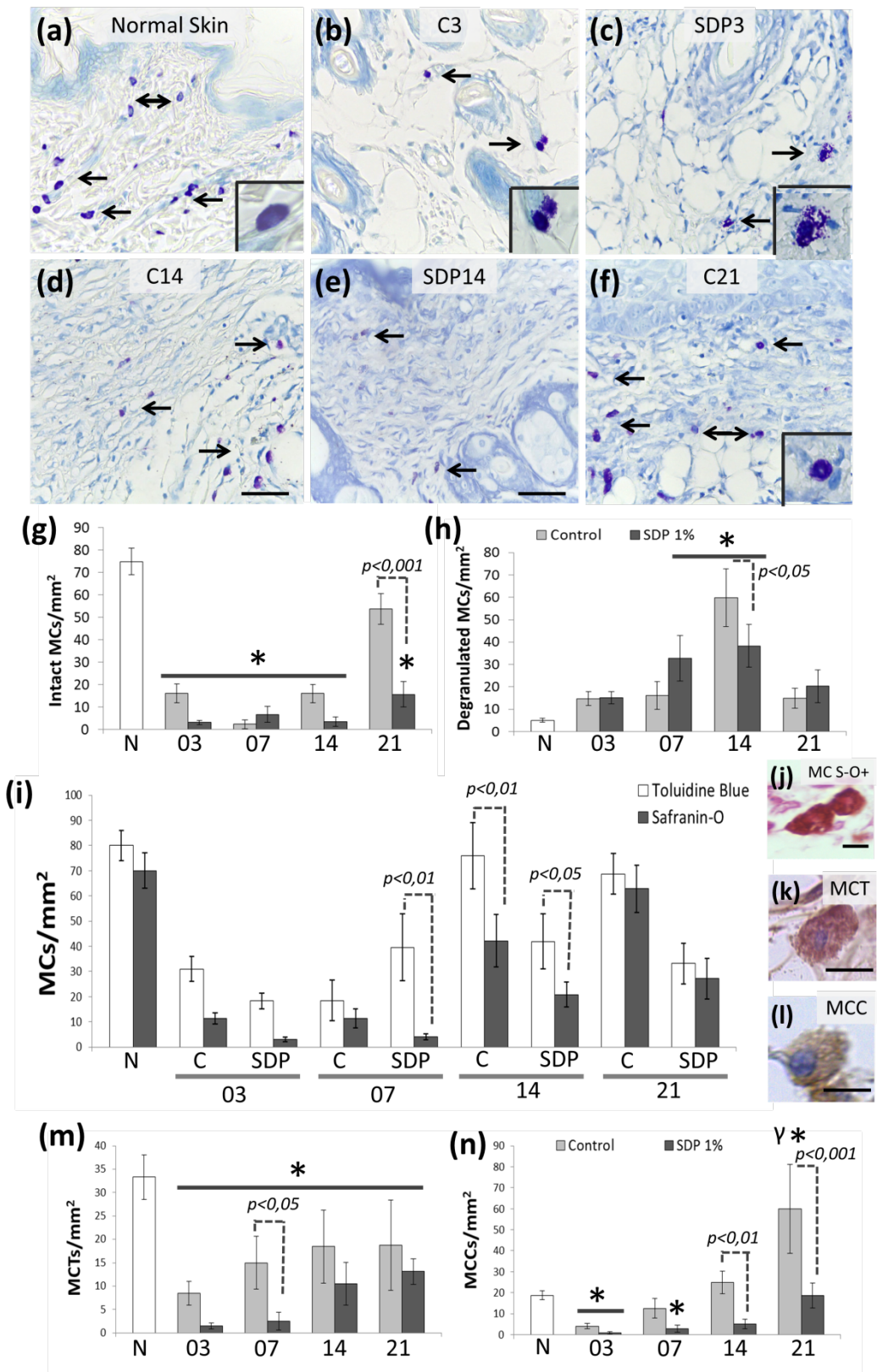
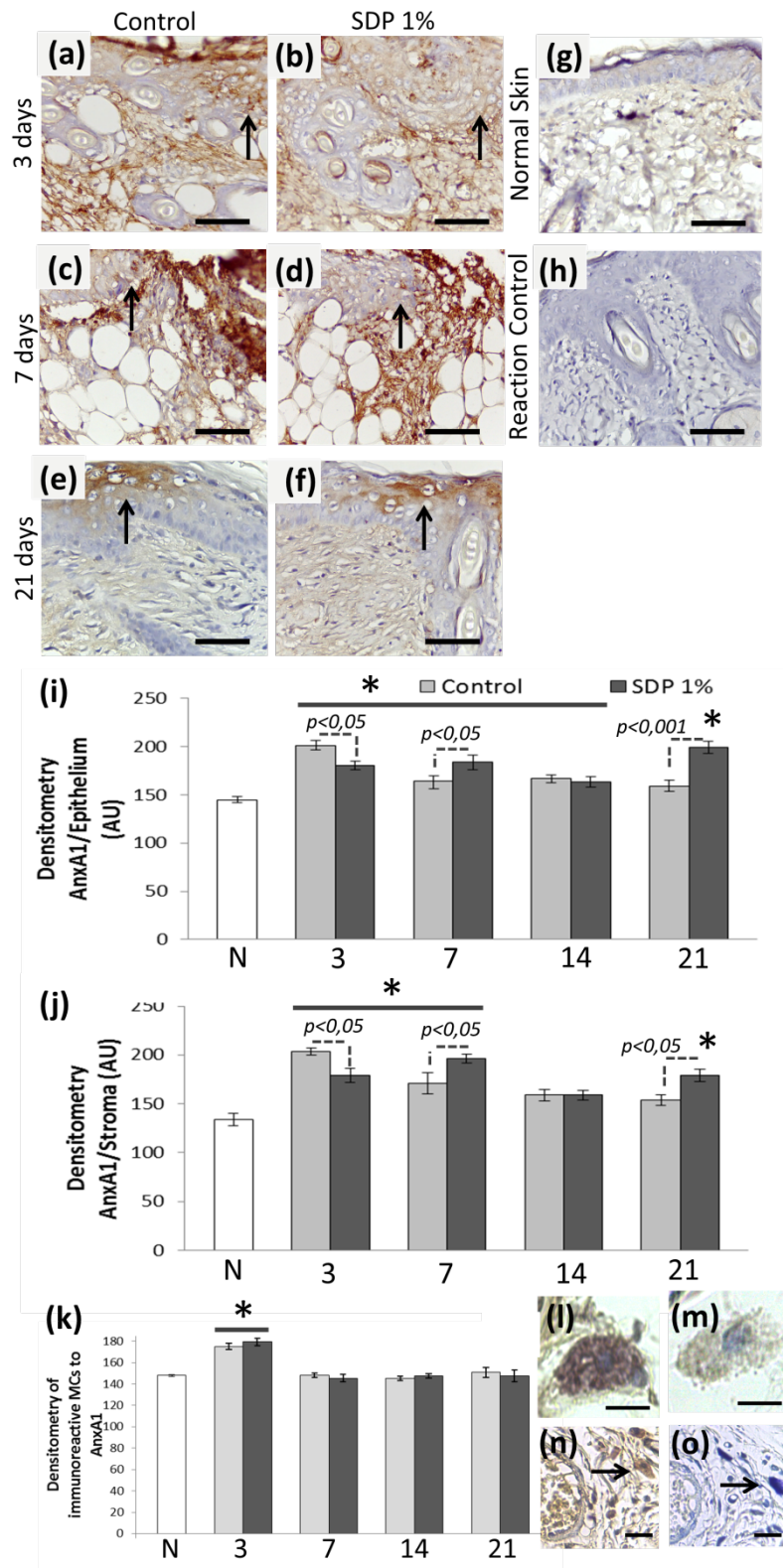


Figure 4



APÊNDICE B – “*Lavandula officinalis* and *Arctium lappa* in a model of second degree burn”



Title: Healing effects of *Lavandula officinalis* and *Arctium lappa* in a model of second degree burn

Short Title: L. officinalis and A. lappa in burn model

Jean C. B. Cesário¹, Iasmin B. Prette¹, Isis Forgerini¹, Rafael M. De Santis¹, Bruna G. Glad³, Melina M. Iyomasa-Pilon¹, Helena R. Souza^{1,2}, Andréia H. Moreno¹, Giselda P. R. da Silva³, Ana P. Girol^{1,2}

1. Padre Albino Integrated College (FIPA), Department of Physical and Biological Sciences, Catanduva, São Paulo, Brazil.

2. São Paulo State University, (UNESP), Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

3. Municipal Institute of Education (IMES), Catanduva, São Paulo, Brazil.

Correspondence: Ana Paula Girol.

Department of Physical and Biological Sciences, Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

Tel.: +55-17-3311-3340/3361

e-mail: anapaulagirol@hotmail.com

Abstract

Our objective was to evaluate the phytotherapeutic treatment with *Lavandula officinalis* and *Arctium lappa* in a second degree burn model. Wistar rats were anesthetized and submitted to thermal burns. The lesions were treated with essential oil (EO) of *L. officinalis* pure or in a cream containing 0.5% of OE associated with 10% of *A. lappa* extract. Macroscopically it was observed more discreet edema in the groups treated with herbal medicines, but itching in the animals treated with pure EO. Immunohistopathological analysis of days 3, 7, 14 and 21 showed better reepithelialization and reappearance of attachments in treated animals. Increased mast cells were observed in the final stages of healing in the group treated with EO pure. Immunohistochemical studies showed higher expression of EGFR in all phases of wound healing and lower expression of MMP2 and MMP9 in the initial stages in the herbal medicines treated animals compared to controls. AST serum levels were reduced in animals treated with the cream containing EO and *A. lappa* extract. Our data showed better healing in animals treated with OE of *L. officinalis* pure and especially in association with *A. lappa* extract, pointing these phytotherapies as strategies for the skin burns treatment.

Keywords: Burn, healing, phytotherapy, *L. officinalis*, *A. lappa*, EGFR, MMP, AST.

Introduction

Burns are complex traumas that present high mortality rate and generate strong economic and psychosocial impact due to prolonged treatment, which is a major problem of national public health (Richardson & Mustard 2009).

In order to restore the skin and prevent sequelae, factors such as the degree and extent of injury, infection, techniques and drugs available are considered in selecting the treatment of burns (Summer et al. 2007; Parihar et al. 2008). In this sense studies on new therapeutic possibilities are important, and for this purpose, easily reproducible animal models that show clinical and histopathological similarities with second degree burns in human were established to evaluate the use of therapeutic agents in the healing evolution (Meyerholz et al. 2009; Tavares Pereira et al. 2012) .

The wound healing is a highly complex process involving inflammation and remodeling. These events are orchestrated by different cell types and influenced by cell-cell and cell-matrix interactions (Evers et al. 2010). The mast cells (MCs) have important functions both in the acute and remodeling phase of the wound healing after burn (Iba et al. 2004; Dong et al. 2013; Douaiher et al. 2014; Wernersson & Pejler 2014). In the degranulation process, MCs release chemotactic factors, growth factors and proteases such as tryptases and chymases into the extracellular environment, contributing to the degradation of extracellular matrix (ECM), angiogenesis and tissue remodeling by selective proteolysis and activation of the matrix metalloproteinases (MMPs) (Barrientos et al. 2008; Pansrikaew et al. 2010; Simionescu et al. 2013; Wernersson & Pejler 2014).

The proteolytic degradation of ECM, through MMPs, is one of the key factors in repair and remodeling in wound healing and the imbalance between the formation and degradation of collagen results in abnormal scars. The expression of MMP2 and MMP9 in

different types of cells in the wound environment is consistent with their role in the healing process. The MMP2, anti-inflammatory, is observed primarily in fibroblasts, related to the remodeling of the ECM. While the MMP9, pro-inflammatory, is secreted by keratinocytes and inflammatory cells and is associated with the epithelialization (Gillard et al. 2004). Furthermore, the expression of the epidermal growth factor (EGF) is extremely important for rapid wound closure and the action of this factor depends on the interaction with its receptor, EGFR (Barrientos et al. 2008).

Researches on the use of medicinal plants in the treatment of different clinical conditions are still scarce (Knott et al. 2008; Alnamer et al. 2012), which stimulates the development of new research into the effectiveness of herbal medicines in the search for therapeutic alternatives in the burns care.

Various plants, as extracts, decoction or essential oils (EOs) are indicated in folk medicine as anti-inflammatory and cicatrising, among them the *Lavandula officinalis* (Alnamer et al. 2012) and the *Arctium lappa* (Sohn et al. 2011; Knott et al. 2008), including in the treatment of skin affections (Knott et al. 2008; Mayrand et al. 2012). In view of the great impact of burns on public health and the growing interest related to herbal medicines, this research was performed to evaluate the efficacy and safety of topical use of *L. officinalis* EO pure or associated with the *A. lappa* extract in a model of second degree thermal injury in rats.

Materials and methods

Animals

Wistar rats weighing approximately 350g were obtained from the Padre Albino Integrated College (FIPA) and divided into four groups (n=5/group). The animals were kept in cages in a controlled environment (24 to 25°C, 12h light/dark cycle) with water and food ad libitum. The experiments were conducted after approval and in accordance with the rules of the Ethics Committee for Animal Use of FIPA (Protocol 12/14).

Herbal Medicines

The *L. officinalis* EO (By Samia®, São Paulo, Brazil) was used pure or associated in the formulation of 0,5% of *L. officinalis* EO plus 10% of *A. lappa* extract, incorporated into a cream base (Biocap®, Trindade, Brazil). The EO *L. officinalis* was evaluated for their color, density and evaporation residue, being within the expected.

The *A. lappa* extract was obtained from 40g of dried and grinded leaves and 160 mL of ethanol in a Soxhlet extractor. For phytochemical analysis of the extract, tests of standard reaction were performed for the identification of tannins (reaction of ferric chloride, neutral lead acetate and copper acetate), flavonoids (Shinoda reaction, reaction of aluminum chloride, sodium hydroxide reaction and ferric chloride reaction) and saponins (foaming by shaking) (Abo-dola & Lutfi 2016), wherein the tests confirmed the presence of these actives.

Burn injury model and treatment protocols

The animals were anaesthetized intraperitoneally with 0,2mL/100g of ketamine (BioChimico, Itatiaia, Brazil) and 0,05 mL/100g of xylazine (Ceva Santé Animale, Paulínea, Brazil) and subjected to shaving the dorsal area for application of a metal block 2 cm² for 10 seconds,

preheated to 100°C with boiling water, setting the second degree burn (Meyerholz et al. 2009; Tavares Pereira et al. 2012). Immediately after the trauma, the lesions were covered with gauze moistened in cold saline solution. The animals were given analgesics codeine (1mL/kg) (Cristália, Itapira, Brazil) by gavage, after the induction of injury, and in the following days, the codeine was provided in the water (30mg/L). The control of water intake and weight of the animals was daily performed.

Topical treatment were initiated 24 hours after burns induction and were maintained for 30 days. Control group animals were treated with two daily applications of 0,9% saline and the animals of the herbal medicine treated groups received topical administrations, twice a day, of the EO of *L. officinalis* pure or a cream containing *L. officinalis* EO plus *A. lappa* extract. To follow the evolution of the healing process there were performed excisions of the lesions in the upper and lower quadrants, right and left, respectively, after 3, 7, 14 and 21 days of injury.

Histopathological, immunohistochemical and biochemical analyzes

Fragments of normal skin and lesions were fixed in 4% formalin, processed for inclusion in paraffin and sectioned at 5µm for histopathologic, quantitative and immunohistochemical analysis. The repair process was evaluated histologically by Hematoxylin-Eosin (HE) and MCs were stained with 0,1% toluidine blue and evaluated according to their morphological characteristics in intact or degranulated. The quantification of MCs in the skin fragments was performed using 10 images per slide obtained by 40X objective in a Leica microscope (DM500). The areas of each tissue were obtained using the Leica Image Analysis Software. Data were expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.) of the number of MCs per mm². The expression of EGFR, MMP2 and MMP9 were evaluated by immunohistochemistry and subsequent optical densitometry of the immunostaining. For this, sections of the different

samples were prepared on gelatinized slides, deparaffinized, rehydrated, and after antigen retrieval (citrate buffer pH 6.0, to 96°C, for 10 minutes), endogenous peroxidase blockade and washing in PBS, the slides were incubated overnight in a humid chamber at 4°C with the polyclonal primaries antibodies: rabbit anti-EGFR (1:100; Abcam, Cambridge, MA, US), rabbit anti-MMP2 (1:100; Abcam) and rabbit anti-MMP9 (1:100; Abcam) diluted in 1% BSA. In the next day, the slides were incubated with biotinylated secondary antibody (kit Zymed Invitrogen, Carlsbad, CA, US), and then in DAB substrate (Zymed Invitrogen kit) for revelation. Subsequently, the sections were counterstained with hematoxylin.

For densitometric analysis, slides of all the groups and periods were used and 10 distinct points of epidermis for EGFR and MMPs and also 10 points of the stroma for MMPs were evaluated to obtain the average related to the immunostaining intensity. The values were obtained as arbitrary units (0 to 255) using the Leica Image Analysis software.

For biochemical analysis, after 30 days, the animals of the control and treated groups were euthanized by overdose of anesthetic. The blood was collected by cardiac puncture using heparinized syringes, centrifuged for 15 minutes at 3.000 RPM and the plasma was used for measurements of serum aspartate aminotransferase (AST) (Kit Labtest, Lagoa Santa, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The dosages were compared with animals not subjected to burns.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed by ANOVA (one-way) followed by Bonferroni post-test and P values less than 0,05 were considered statistically significant.

Results

The repair process evolution of thermal injuries was better in animals treated with herbal medicines

Histopathological analysis confirmed the characteristics of second-degree burns (Figure 1). In all groups, in the acute phase of inflammation, after 3 days of burn induction (Figure 1A, F, K), it was observed an inflammatory influx, especially of polymorphonucleates. On day 7 (Figure 1B, G, L), the reepithelialization and fibroblasts proliferation processes were observed. Whereas on days 14 (Figure 1C, H, M) and 21 (Figure 1D, I, N) post injury, the remodeling phase was characterized by the restructuring of the epidermis and dermis.

Through the macroscopic analysis, it was also possible to observe better healing in groups treated with herbal medicines, which showed mild edema and faster falling of burned skin crusts, wounds closing and reappearance of attachments. However, the animals treated with pure *L. officinalis* EO exhibited itching compared to other groups (Figure 1E, J, O).

Treatment with *L. officinalis* and *A. lappa* modulate the number and morphology of MCs

The MCs were quantified in all groups and phases of the studied wound healing (Figure 2). Quantification of total MCs showed few cells in all groups on days 3 (Control, Figure 2A: 12.2 ± 1.08 ; *L. officinalis* EO: 11.57 ± 2.27 ; *L. officinalis* and *A. lappa*: 5.37 ± 0.73 ; Figure 2E) and 7 after injury induction (Control, Figure 2B: 17 ± 3.59 ; *L. officinalis* EO: 11.2 ± 2.98 ; *L. officinalis* and *A. lappa*, Figure 2C: 1.56 ± 1.18 ; Figure 2E

Differently after 14 days of wound healing, higher number of MCs was observed ($p < 0.05$) in the group treated with pure *L. officinalis* EO (Control: 2.5 ± 1.77 ; *L. officinalis* OE, Figure 2D: 23.8 ± 10 ; *L. officinalis* and *A. lappa*: 0.75 ± 0.25 ; Figure 2E), and in this same period,

these cells were observed, mostly ($p < 0.01$), degranulated (Control: 2.25 ± 1.77 ; L. officinalis EO: 20 ± 7.42 ; L. officinalis and A. lappa: 0.7 ± 0.2 , Figure 2F).

Finally, after 21 days of the tissue repair process, numerous MCs were found in the group treated with pure oil (Control: 10 ± 1 $p < 0.01$ vs L. officinalis EO: 35 ± 7.2 $p < 0.001$ vs L. officinalis and A. lappa: 4.83 ± 1.38 , Figure 2E), showing that the treatment with pure L. officinalis EO, although promoting rapid reepithelialization and healing, it has also induced MCs proliferation. But this adverse effect was reversed when the EO was associated with A. lappa extract in the cream formulation.

Treatment with L. officinalis EO and A. lappa extract modulates the expression of MMPs

The MMP2 (Figure 3) and MMP9 (Figure 4) immunostaining was analyzed in the epidermis and dermis of lesions in all groups during the tissue repair process. The specificity of the immunostaining was confirmed by the reaction control.

After 3 days of injury, the MMPs expressions were reduced and observed only in some animals that had already initiated the reepithelialization process. From day 7 of injury, the immunostaining was verified in all groups and the expression of MMP 9 was more intense than that of MMP2.

The MMP2 expression in the epithelium was increased in the control group (Figure 3A, B, J) compared to groups treated with medicinal herbs on days 7 ($p < 0.05$; Figure 3D, G, J) and 14 ($p < 0.01$; Figure 3E, H, J) post injury. In the stroma, the animals treated with pure L. officinalis EO showed greater variation in the expression of MMP2 (Figure 3K) which was reduced on day 7 ($p < 0.01$) compared to control group and increased on day 14 ($p < 0.05$) in relation to the group treated with the cream of L. officinalis EO associated to A. lappa extract.

But, in contrast, after 21 days of healing, the MMP2 expression was reduced ($p < 0.001$) compared to the to control animals and cream treated group.

The expression of MMP9 (Figure 4) was higher in the control animals in the epithelium ($p < 0.001$) and stroma ($p < 0.05$) after 14 days of lesion repair process, compared to the groups treated with herbal medicine. On day 21 the increase was only observed in the epithelium of control group ($p < 0.05$) compared to the group treated with the cream of *L. officinalis* EO associated to *A. lappa* extract.

Higher expression of EGFR in animals treated with herbal medicines during the wound healing process

The immunostaining of EGFR was analyzed in skin lesions in all groups in the tissue repair process (Figure 5). The specificity of the immunostaining was confirmed by the reaction control (Figure 5J).

Similar to MMPs the expression of EGFR on day 3 was reduced and only observed in some animals of the treated groups, but from day 7 of injury, with the evolution of the wounds closure, it was observed significant increase of EGFR expression in animals treated with *L. officinalis* EO pure ($p < 0.001$) or in cream associated with *A. lappa* extract ($p < 0.05$) compared to control animals (Figure 5A, D, G, K). The receptor immunostaining continued increased in herbal treated groups compared to the control in the remodeling phase, on days 14 ($p < 0.05$; Figure 5E, H, K) and 21 after injury induction (*L. officinalis* EO: $p < 0.05$; *L. officinalis* EO + *A. lappa*: both $p < 0.01$ vs Control; Figure 5F, I, K).

Treatment with *L. officinalis* EO and *A. lappa* reduces AST post burn

The blood plasma analysis showed that in animals subjected to burn there was a significant increase of AST in relation to normal group. Animals treated with the cream containing *L.*

officinalis EO and *A. lappa* extract showed significant reductions in the levels of AST ($p < 0.05$) compared to other groups subjected to burns (Figure 6).

Discussion

Burns constitute serious public health problems and although there are different types of treatments for these lesions the occurrence of pathological scarring as a result of this type of injury is not rare (Richardson & Mustard 2009; Summer et al. 2007), which encourages the search for alternative therapies such as herbal medicine in the treatment of burned patients. In this study we evaluated the effects of *L. officinalis* EO pure or associated with *A. lappa* extract in cream in the repair of second burn model injury in rats.

First, we perform the macroscopic analysis for monitoring the injuries during the wound healing process. Our observations showed faster healing in animals treated with herbal medicines when compared to controls that received topical application of saline. The results of macroscopic studies were corroborated by histopathological analysis and are consistent with data obtained in other investigations, that used different medicinal plants as treatment in burn models (Sakarcan et al. 2005; Chandran & Kuttan 2008). The analysis of *L. angustifolia* EO properties revealed that it has anti-inflammatory properties, reducing neutrophil adherence (Abe et al. 2003). However, our study also showed that treatment with *L. officinalis* EO pure, although promoted more rapid healing than the group without treatment, it also led to allergic reaction in the skin of animals. This adverse effect was reversed in the treatment with EO associated to *A. lappa* extract in cream. Several reactions like allergies, burning sensation and dermatitis have also been documented with the use of other medicinal herbs (Posadzki et al. 2013). On our phytochemical analyzes of the *A. lappa* extract, it was observed the presence of flavonoids, tannins and saponins, substances already known for their anti-inflammatory properties (Abo-dola & Lutfi 2016), which may also have prevented the allergic reaction on our model.

Knowing that in the burn injury the interactions between inflammatory cells and the ECM coordinate healing and tissue remodeling (Evers et al. 2010), in the continuity of the study we proceeded to the analysis of MCs, by quantifying these cells and evaluating their activation state in animals of all groups, on different times of the tissue repair process.

On days 3 and 7 after injury, we found fewer MCs in all treatment groups. The inflammation in the early stages of the wound repair process is important to the overall healing, and this process depends on activation of MCs (Dong et al. 2013; Wernersson & Pejler 2014). An impaired skin wound closure was observed in a study that used MCs deficient mice, indicating the importance of the mediators releases from these cells to wound healing (Weller et al. 2006).

On days 14 and 21, the total amount of MCs was higher in the group treated only with *L. officinalis* OE compared to the other groups, and, on day 14, these cells were degranulated. This result is consistent with the formation of the allergic reaction in animals treated with pure OE, corroborating our findings. However, other researchers (Cho et al. 2011) found a reduction of the inflammatory response in the treatment of passive cutaneous anaphylaxis reaction with herbal treatment with *Fritillaria ussuriensis*, by reducing the release of histamine and cytokines. Furthermore, a recent study demonstrated as the oleamide, another bioactive present in the alcoholic extract of *A. lappa*, decreased the allergic response by reducing the release of histamine, TNF- α and IL-4 (Yang et al. 2016), which corroborates with our observation on the MCs reduction in the group treated with oil and *A. lappa* extract.

MCs and their proteases are related to matrix remodeling and are present in the final stages of repair injuries and burns (Nishikori et al. 1998; Ehrlich 2013). A study that verified the dosage of tryptase and chymase in the late stages of repair of deep cuts in the skin of mice, observed that the activity of these two proteases decreased on day 10 and increased on days 15 and 20 after injury (Iba et al. 2004). Although MCs are important for the remodeling of the

matrix and cell proliferation (Weller et al. 2006; Wernersson & Pejler 2014), researches also indicated the MC relation to the formation of hypertrophic scars and fibrosis by activating fibroblasts (Levi-Schaffer & Rubinchik 1995; Douaiher et al. 2014; Dong et al. 2015).

MCs synthesize and release MMP2 and MMP9 (Iba et al. 2004; Wernersson & Pejler 2014). Furthermore, it is also known that chymase is important to enable the synthesis of MMP2 and MMP9 (Weller et al. 2006; Wernersson & Pejler 2014). For these reasons, we analyzed the expression of these MMPs in the thermal injuries. Our results showed decreased expression of MMP2 in the epithelium, the groups treated with herbal medicines, compared to the control. However, in the stroma on day 14 after the injury an increased protein expression occurred in the group treated with pure *L. officinalis* OE. The expression of MMP9 was stronger in all groups compared to MMP2, however, in the herbal treated groups the intensity of labeling was lower in the epithelium and stroma compared to the control group.

The herbal treated groups showed better healing than the control animals, which may be related to the control of the expression of MMP2 and MMP9 by the treatment. Investigations indicate that the delay in the thermal injury repair processes in the skin of older mice is associated with increased expression of MMP9 (Oriana et al. 2013). Other studies show that the degradation of the dermal matrix regeneration (Integra) is related to high levels of MMP2 in blood plasma. Moreover, MMP9 may be associated with fibrosis and scarring (Nessler et al. 2014).

We continue our studies with the evaluation of EGFR expression in the epithelium. Our analyzes showed reduced expression of EGFR in the inflammatory phase and only observed in the animals treated with herbal medicines, in which wounds closure occurred earlier. From 7 days after injury the EGFR immunostaining was observed in all groups. However, a significant receptor increase was verified in the treated animals, especially in the pure *L. officinalis* EO group. These results indicate again, the efficacy of herbal medicines used in

modulating the tissue repair. The EGF is released mainly by fibroblasts and macrophages and is one of the main growth factors in the tissue regeneration process by promoting the reepithelialization mediated by EGFR (Barrientos et al. 2008).

Another important factor to be considered in the thermal injury is the possibility of deep systemic and metabolic changes (Richardson & Mustard 2009) and the action of herbal medicines in reducing damage was already reported (Chandran & Kuttan 2008). Thus, at the end of the study, we evaluated the effects of treatment with *L. officinalis* OE pure or associated with *A. lappa* on the levels of AST in the plasma of unburned and burned animals, treated or not with the herbal medicines. Our results indicated an increase in AST levels post burn, with significant reduction of these levels after treatment with OE associated with *A. lappa*, which indicates, besides the toxicity absence of the treatment, the protective effect of herbal medicine in reducing injury to internal organs.

All together, the macroscopical, histopathological, immunohistochemical and biochemical analyzes showed that topical treatment with *L. officinalis* OE pure or associated with *A. lappa* extract promoted better tissue repair compared to untreated animals in the used model of second-degree burns in rats. These results open the possibility of further exploration of these herbal medicines in the treatment of burns.

Acknowledgments

To UNESP, FIPA and FAPESP (Process 2015/03359-5) for structural and financial supports.

Conflicts of interest

None

Literature Cited

- Abe, S. et al., 2003. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediators of inflammation*, 12(6), pp.323–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1781633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Abo-dola, M.A. & Lutfi, M.F., 2016. Anti-inflammatory activity of Euphorbia aegyptiaca extract in rats. *International Journal of Health Sciences*, 10(March), pp.69–75.
- Alnamer, R. et al., 2012. Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of Lavandula officinalis from Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012, pp.1–5.
- Barrientos, S. et al., 2008. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), pp.585–601. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.
- Chandran, P.K. & Kuttan, R., 2008. Effect of Calendula officinalis Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 43(2), pp.58–64.
- CHO, I.-H. et al., 2011. Fritillaria ussuriensis Extract Inhibits the Production of Inflammatory Cytokine and MAPKs in Mast Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), pp.1440–1445. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10029591095/>.
- Dong, X. et al., 2015. High concentrations of mast cell chymase facilitate the transduction of the transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway in skin fibroblasts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, pp.955–960. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2216>.
- Dong, X. et al., 2013. Involvement of mast cell chymase in burn wound healing in hamsters. *Experimental and therapeutic medicine*, 5(2), pp.643–647. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3570197&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Douaiher, J. et al., 2014. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase

serine proteases in inflammation and wound healing. *Advances in immunology*, 122, pp.211–52.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4115062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 20, 2016].

Ehrlich, H.P., 2013. A Snapshot of Direct Cell-Cell Communications in Wound Healing and Scarring. *Advances in wound care*, 2(4), pp.113–121. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3840552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Evers, L.H., Bhavsar, D. & Mailänder, P., 2010. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology*, 19(9), pp.777–783. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x>.

Gillard, J.A. et al., 2004. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12, pp.295–304.

Iba, Y. et al., 2004. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *International immunopharmacology*, 4(14), pp.1873–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531302>.

Knott, A. et al., 2008. Natural *Arctium lappa* fruit extract improves the clinical signs of aging skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(4), pp.281–289.

Levi-Schaffer, F. & Kupietzky, A., 1990. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Experimental cell research*, 188(1), pp.42–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328776> [Accessed January 20, 2016].

Levi-Schaffer, F. & Rubinchik, E., 1995. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 104(6), pp.999–1003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7769271> [Accessed January 20, 2016].

Mayrand, D. et al., 2012. Angiogenic properties of myofibroblasts isolated from normal human skin wounds. *Angiogenesis*, 15(2), pp.199–212.

Meyerholz, D.K. et al., 2009. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute

burn injury rat model. *Int. J. Exp. Path.* (2009), 90,, 90(1), pp.26–33. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2669613/pdf/iep0090-0026.pdf>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2669613/?report=abstract>.

Nessler, M.B. et al., 2014. Levels of plasma matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in response to INTEGRA® dermal regeneration template implantation. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 20, pp.91–6. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3907513&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Nishikori, Y. et al., 1998. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Archives for dermatological research. Archiv fur dermatologische Forschung*, 290(10), pp.553–560.

Oriana, S. et al., 2013. Delayed wound healing in aged skin rat models after thermal injury is associated with an increased MMP-9, K6 and CD44 expression. *Burns*, 39(4), pp.776–787. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2012.09.013>.

Pansrikaew, P. et al., 2010. Correlation of mast cell density, tumor angiogenesis, and clinical outcomes in patients with endometrioid endometrial cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 11(3), pp.623–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039027>.

Parihar, A. et al., 2008. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 34(1), pp.6–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905515> [Accessed January 20, 2016].

Posadzki, P., Watson, L.K. & Ernst, E., 2013. Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clinical Medicine*, 13(1), pp.7–12. Available at: <http://www.clinmed.rcpjournals.org/content/13/1/7.full>.

Richardson, P. & Mustard, L., 2009. The management of pain in the burns unit. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 35(7), pp.921–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505764> [Accessed January 20, 2016].

Simionescu, C. et al., 2013. Tumor angiogenesis, macrophages and mast cell microdensities in endometrioid endometrial carcinoma. *Oncology Letters*, 6(2), pp.415–420.

- Sohn, E.-H. et al., 2011. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. *Clinical and Molecular Allergy*, 9(1), pp.1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-7961-9-4>.
- Summer, G.J. et al., 2007. Burn Injury Pain: The Continuing Challenge. *Journal of Pain*, 8(7), pp.533–548.
- Tavares Pereira, D.D.S. et al., 2012. Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Weller, K. et al., 2006. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), pp.2366–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966487>.
- Wernersson, S. & Pejler, G., 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), pp.478–494. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3690>.
- Yang, W.-S. et al., 2016. Antiallergic Activity of Ethanol Extracts of *Arctium lappa* L. Undried Roots and Its Active Compound, Oleamide, in Regulating FcεRI-Mediated and MAPK Signaling in RBL-2H3 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(18), pp.3564–3573. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b00425>.

Figure legends

Figure 1.

Histopathological analysis of wound healing in second degree burn. On day 3 after injury, inflammatory cell infiltration and skin crust formation in the control group (A), and animals treated with pure *L. officinalis* EO (F) or *L. officinalis* EO + *A. lappa* (K). Initial epithelialization in groups treated with herbal medicines. In the proliferation phase, on day 7, it can be observed more pronounced reepithelialization after treatment (G e H), compared to the control group (B). Complete reepithelialization 14 days after lesion induction and stroma reorganization phase in all groups (C, H e M). In the remodeling phase, 21 days after injury (D, I e N), epithelial attachments may be seen in greater quantities after treatment with herbal medicines. Macroscopic analysis of the lesion, showing better healing in the treated groups (E, J e O), with allergic process in animals treated with pure *L. officinalis* EO (J). Staining: HE. Bars 500 μ m.

Figure 2.

MCs Quantification in thermal second degree burn model. Few MCs on days 3 and 7 of the injury repair, in the control (A) and herbal treated groups (B and C). On days 14 and 21, a larger amount of MCs in the animals treated with pure *L. officinalis* EO, mainly degranulated (D). Quantification of total (F) and degranulated MCs (F), values presented as mean \pm S.E.M.

Figure 3.

MMP2 expression in the evolution of healing in second degree burn. In the epithelium, strong expression of the protein in the control group on day 7 (A) and 14 (B) and reduction on day 21 (C). In the stoma, the expression of MMP2 is increased in control on days 7 (A) and 21 (C), in the pure *L. officinalis* treated group on day 14 (E) and in the group treated with *L.*

officinalis EO associated with *A. lappa* (I). Counter-staining: Hematoxylin. Bars 50 μ m.

Densitometric analysis of the MMP2 expression in epithelium (J): α $p < 0,05$ vs *L. officinalis* OE 14 days; μ $p < 0,001$ vs Control 14 days; stroma (K) & $p < 0,001$ vs *L. officinalis* OE 7 days; σ $p < 0,001$ vs *L. officinalis* OE 14 days; ρ $p < 0,05$ vs *L. officinalis* OE + *A. lappa* 14 days. Data are presented as \pm mean S.E.M.

Figure 4.

MMP9 expression in the evolution of healing in second degree burn. Strong immunostaining in all periods, especially in control animals. Decreased expression of the protein after treatment with pure *L. officinalis* on day 14 (E) and EO associated with *A. lappa* on day 21 (I). Counterstaining: Hematoxylin. Bars 50 μ m. **Densitometric analysis** of MMP9 expression in the epithelium (J): α $p < 0,05$ vs *L. officinalis* EO 14 days; & $p < 0,001$ vs *L. officinalis* E) 14 days; μ $p < 0,001$ vs Control 14 days; σ $p < 0,001$ vs *L. officinalis* OE 14 days; and stroma (K). Data are presented as \pm mean S.E.M.

Figure 5.

EGFR expression in the evolution of healing in second degree burn. EGFR expression after 7 (A, D, G), 14 (B, E, H) and 21 (C, F, I) days post injury. The expression of the receptor is increase with treatment with herbal medicines. Absence of immunostaining in reaction control (J). Counter-staining: hematoxylin. Bars 50 μ m. Densitometric analysis (K): The data are represented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and confirm the increased in immunostaining in groups treated with EO *L. officinalis* and associated to *A. lappa*.

Figure 6.

AST serum levels after second degree burn and treatments. Data are presented as mean \pm mean S.E.M, (n =10/group) and show increased levels of AST after burning and reduction of the analyte with *L. officinalis* OE + *A. lappa* treatment . ***p<0,001 and **p<0,01 vs Normal, not burned animals; [#] p<0,05 vs control group 30 days after injury.

Figure 1

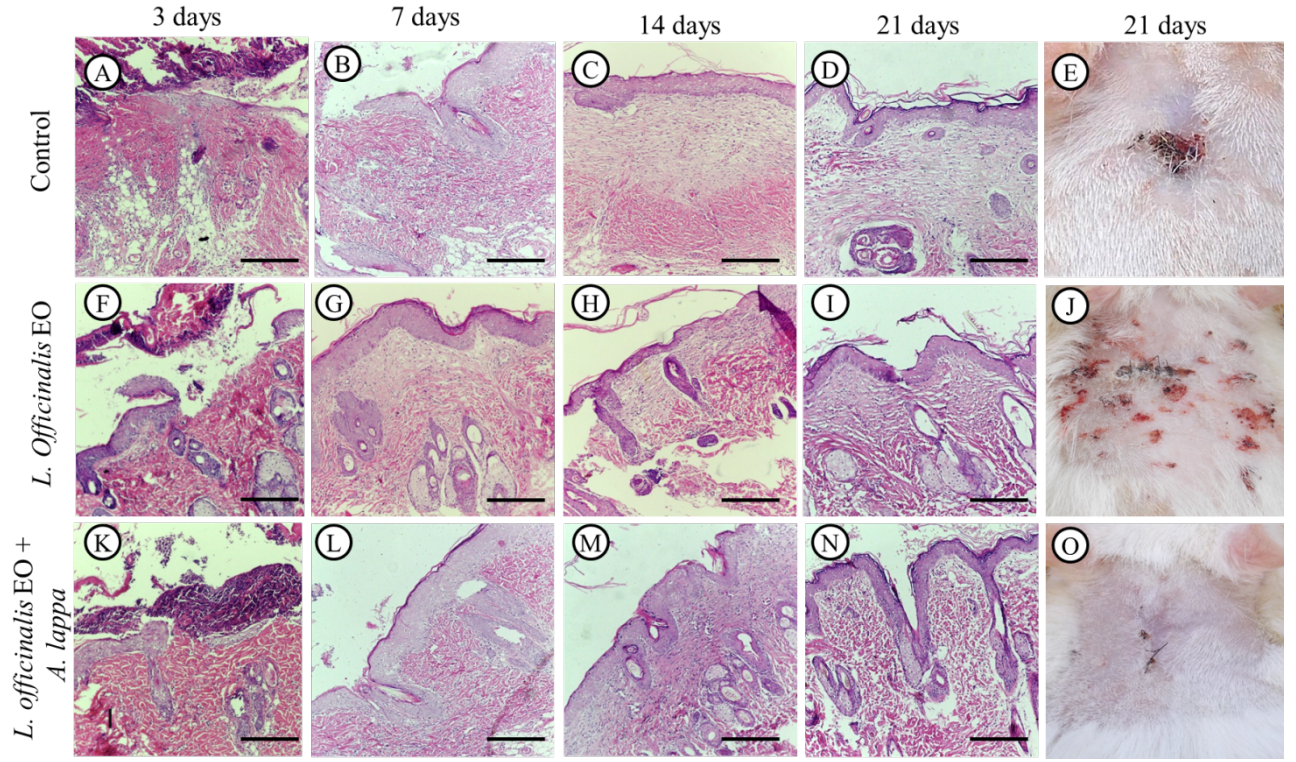


Figure 2

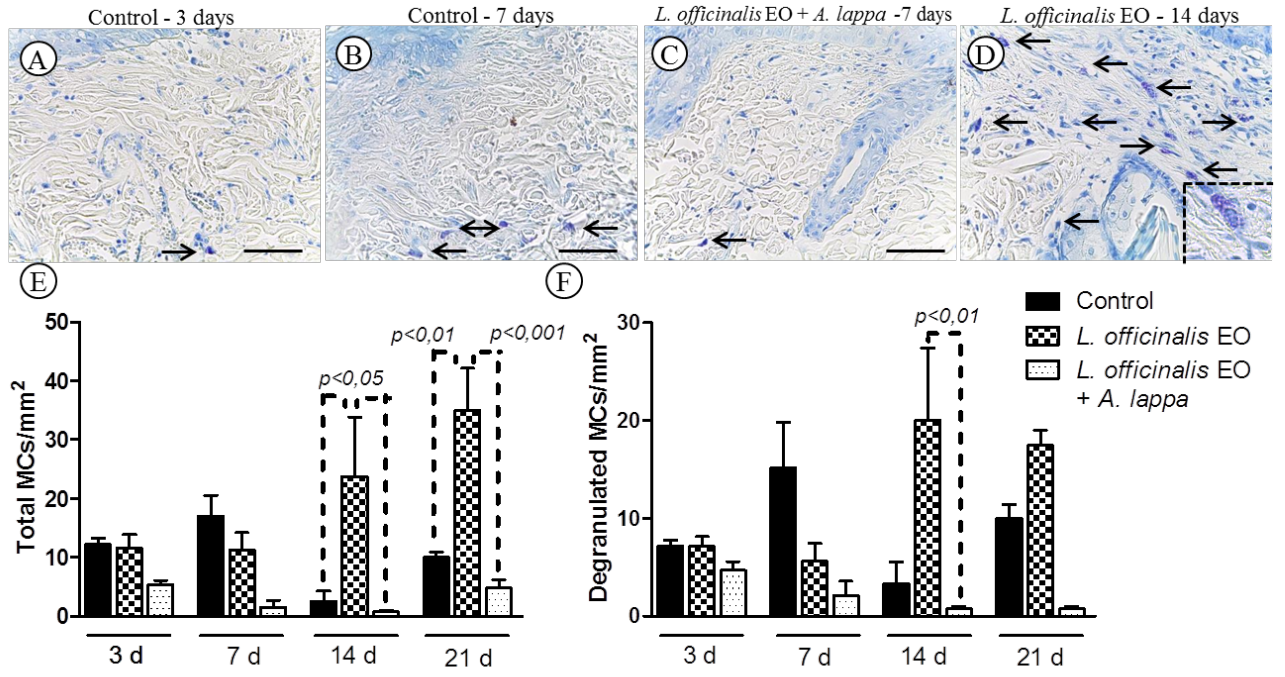


Figure 3

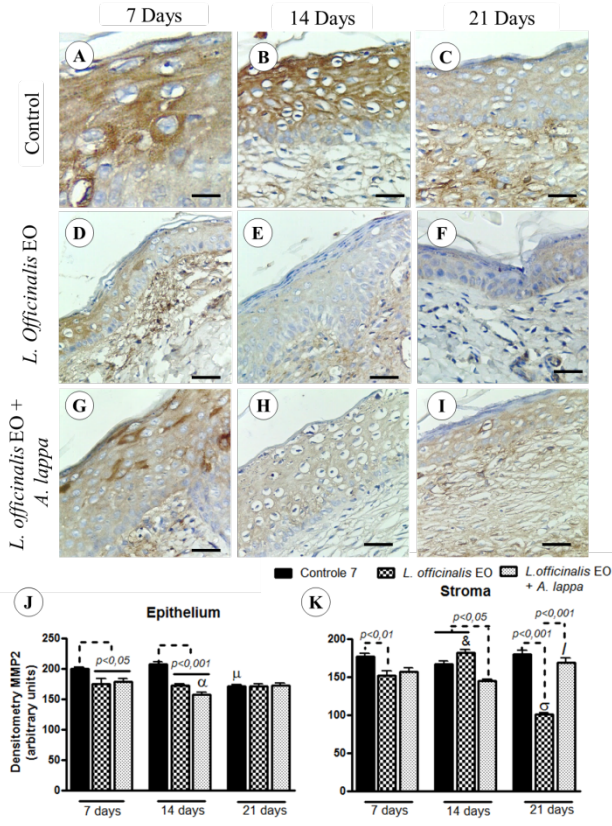


Figure 4

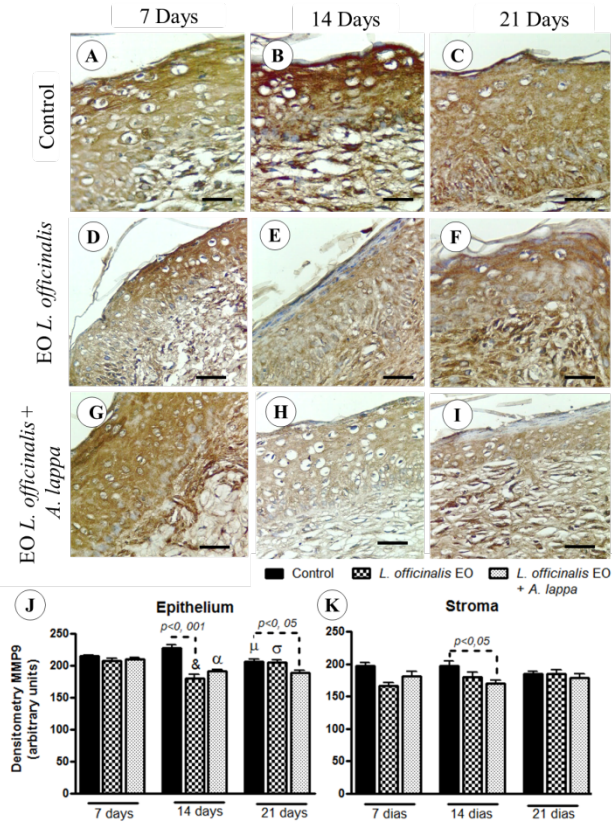


Figure 5

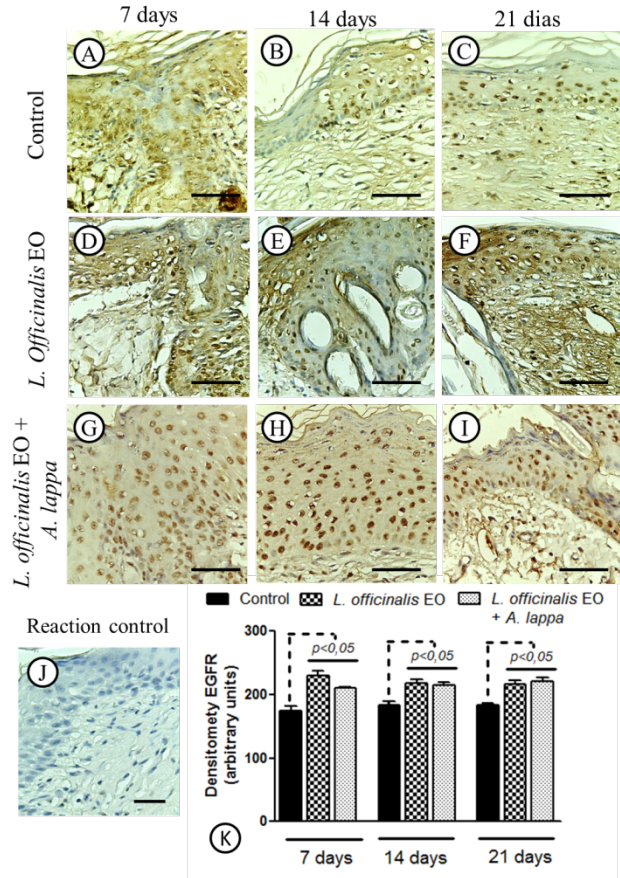
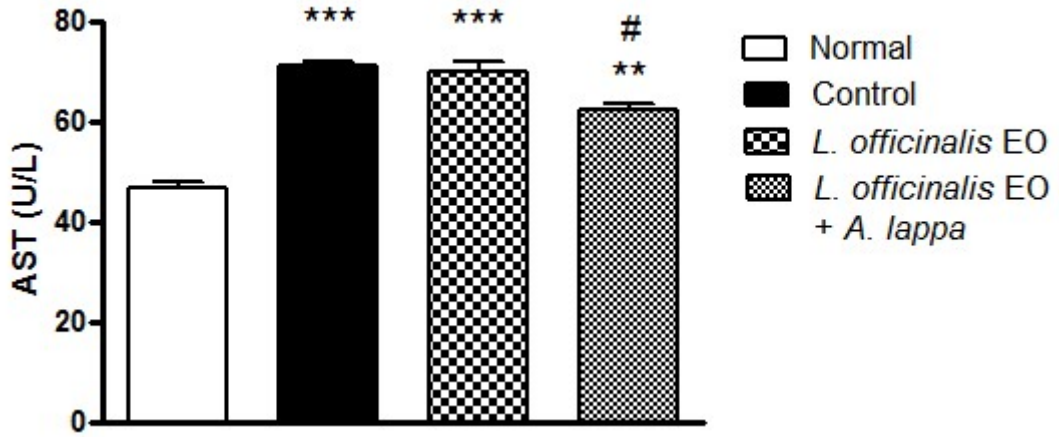


Figure 6



Author Contributions

JCBC: performed experimental protocols, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes and results interpretation.

IBP: performed experimental protocols, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes and results interpretation.

IF: performed experimental protocols, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes and results interpretation.

RMS: performed experimental protocols, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes and results interpretation.

BGG: performed experimental protocols, carried out the medicinal drugs preparation and results interpretation.

MMIP: performed experimental protocols, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes and results interpretation.

HRS: performed experimental protocols, biochemical, histopathological, immunohistochemical, statistical analyzes, results interpretation and drafted the manuscript.

AHM: performed phytochemical analysis, results interpretation and critical review of the manuscript.

GPRS: designed the study, carried out the medicinal drugs preparation and results interpretation.

APG: designed the study, performed statistical analyzes, results interpretation and drafted the manuscript.

All authors have read and approved the final manuscript.

APÊNDICE C – *“Biochemical analysis and bone remodeling in response to oophorectomy and aquatic training”*



(quando ativada pelo seu ligante, RANKL) promove a maturação de osteoclastos e mantém ativa sua ação fagocítica. O segundo atua como uma armadilha: captura RANKL e impede-o de se ligar ao receptor. O estrogênio induz a produção de OPG por osteoblastos impedindo a ativação de osteoclastos e promovendo apoptose.^{1,2,5}

Com o declínio dos esteroides sexuais no período do climatério, especialmente no período pós-menopausa, o equilíbrio de mecanismo de remodelação óssea é perturbado, causando mais reabsorção do que produção óssea. Esta situação coloca as mulheres no grupo de alto risco de desenvolvimento de osteoporose - que é uma condição patológica de ossos enfraquecidos.⁶ Estima-se que depois de 50 anos de idade, 30% das mulheres podem sofrer fraturas provocadas por osteoporose.³

A fosfatase alcalina é uma enzima que se acredita facilita a calcificação dos osteoblastos e os protege contra a degradação enzimática. Encontrado em células osteogênicas e membrana de osteoblastos ativos, a sua concentração plasmática é usada como um marcador de formação óssea.^{3,4} Das isoformas de fosfatase alcalina encontradas no soro, aquelas pertencentes ao osso e do fígado são as mais importantes.^{4,5}

Além da influência hormonal, a remodelação óssea também influencia as tensões impostas pela gravidade (estímulo piezométrico) e tensão muscular. Portanto, o exercício tem sido indicado como uma prática importante, tanto na prevenção como no tratamento da osteoporose.⁷⁻¹² Estudos mostram que os melhores resultados de formação óssea são obtidos com exercícios de resistência anaeróbia (forte impacto sobre o osso).^{8,13, 14} Estes exercícios requerem um acompanhamento profissional para garantir uma realização segura, principalmente se for praticada por indivíduos com osteoporose, pois eles podem causar lesões se realizados de forma inadequada. Embora os exercícios aquáticos exerçam tensão muscular,^{7,10,11,15} eles não promovem o mesmo impacto que exercícios de resistência, o que conduz a baixa taxa de lesões¹¹ e, por conseguinte, são considerados seguros. No entanto, poucos estudos têm sido realizados sobre a contribuição da natação para o tratamento da osteoporose. Um estudo⁷ mostrou resultados positivos sobre o efeito da natação na remodelação óssea, no entanto, foram utilizadas sobrecargas acopladas ao tronco dos animais, o que aumentou seu esforço no exercício. Assim, o objetivo deste estudo é investigar, através de parâmetros histomorfométricos de osso e análise de biomarcadores, se a natação pode prevenir a perda óssea causada pela redução de esteroides sexuais em mulheres pós-menopausa, e, portanto, ser indicado para auxiliar no tratamento da osteoporose.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (n° 13.03.25-01) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA, Catanduva, SP, Brasil). Este estudo foi realizado em associação com a FIPA e Instituto Municipal de Ensino Superior de Catanduva (IMES Catanduva, SP, Brasil).

Foram utilizados vinte e quatro ratos fêmeas Wistar pesando aproximadamente 100g. Elas foram mantidas a $24 \pm 1^\circ \text{C}$ e submetidas a ciclo luz/escuro de 12/12h, com acesso a água e comida *ad libitum* (Nuvilab® CR-1). Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 6): 1. Grupo intacto (sem cirurgia) e sedentário - IntSed (grupo controle); 2. Grupo intacto e treinado - IntTr; 3. Um terceiro grupo ooforectomizado e sedentário - OVXSed; e 4. Um quarto grupo ooforectomizado e treinado - OVXTr. Os dois grupos sedentários foram expostos a algum estímulo aquático. Eles entraram em contato com a água por no máximo 1 min, cinco dias por semana, durante oito semanas. Este estímulo se destina

a assegurar que os resultados não foram decorrentes do contato com a água, porém do exercício proposto.

Para executar a ooforectomia, os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de 115,34mg/kg de cloridrato de cetamina (Hameln Pharmaceuticals GmbH®, Hameln, Alemanha) e 11,5mg/kg de cloridrato de xilazina (Vetbrands® Paulínia, SP, Brasil). O oviduto foi ligado por meio de um fio de sutura, e aquele pertence ao ovário foi removido; o músculo e a pele foram suturados e o mesmo procedimento foi realizado através do corpo do animal. Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 11,5 mg/kg do antibiótico enrofloxacin (Mantecorp® Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e analgésico/anti-inflamatório/antipirético por via subcutânea com 16,6 mg/kg de Fluxina meglumina (Mantecorp®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os ratos permaneceram em recuperação durante uma semana antes de iniciar os exercícios. O treinamento começou com apenas 20 minutos na primeira semana e houve um acréscimo de 10 minutos a cada semana, de modo que na quinta semana de treinamento, os animais exercitados nadaram durante 60 minutos. O protocolo de treinamento foi realizado durante cinco dias por semana, com a temperatura da água entre 28° e 30°C. Os animais sedentários foram submetidos a algum estímulo que durou o máximo 1 minuto diariamente, durante o mesmo período de formação dos grupos ativos. Todos os animais tiveram contato com a água para assegurar que os resultados não fossem causados por stress aquático.¹⁵ Os ratos foram pesados uma vez por semana. Quando o período de treinamento foi completado, todos os grupos foram submetidos a um período de jejum de 6 horas e foram anestesiados. Após a confirmação de uma anestesia profunda, seu sangue foi colhido através de punção cardíaca e, em seguida, centrifugado a 2.500 rpm durante 15 min para dosagem de cálcio e fosfatase alcalina. Para as dosagens séricas, foram usados kits Labtest Diagnóstica® Brasil: Cálcio (Ref 90) e fosfatase alcalina (Ref 79). Todas as instruções do fabricante foram seguidas, realizadas por espectrofotômetro (modelo SP - 2000UV). Em seguida, os ratos foram sacrificados por decapitação. O fêmur direito foi removido, dissecado e armazenado numa solução de formalina a 10%.

Os fêmures foram radiografados por um equipamento de raios-x odontológico, em plano anteroposterior com de 0,15 de exposição a cada segundo. A tensão nominal máxima do equipamento foi 70kVp e a máxima corrente nominal foi de 10mA. Foi utilizado filme raios-X M2 periapical - oclusal (5x7 cm). A distância entre o foco do raio-X e o filme era de 5cm. A revelação do filme radiográfico foi feita por procedimentos de rotina, no qual todos os filmes permaneceram o mesmo tempo no revelador e no fixador. As imagens de raios-X foram digitalizadas com resolução de 1200 dpi.¹⁶ As imagens foram analisadas usando o software *ImageJ*, que compara a densitometria de radiografias com os valores médios da densidade da massa óssea para cada grupo.

Os ossos passaram por um processo de descalcificação em ácido nítrico 9% por cinco dias conduzido na Quimesp Química LTDA, Guarulhos, SP, Brasil. Depois, foram processadas em parafina e cortadas em micrótomo (Spencer 820) com uma lâmina de 5µm de espessura. O material foi corado com hematoxilina e eosina. As imagens das lâminas foram capturadas por um microscópio óptico (Leica, DM500 - câmera ICC50). A análise qualitativa das imagens foi realizada comparando-as com o grupo IntSed (controle). Para análises quantitativas, utilizou-se em todos os grupos a medição da área de tecido ósseo de cabeça femoral e do pescoço, com exceção das áreas do tecido da medula óssea (com a ajuda do software *ImageJ*) e uma contagem de osteoclastos visíveis em imagem aumentada 400x através do microscópio óptico, tomando dez imagens diferentes por animal. Em todas as análises quantitativas, o teste estatístico ANOVA bicaudal foi empregado, tendo em conta as variáveis exercício vs. ovariec-

tomia. O pós-teste de Bonferroni foi utilizado com o nível de 5% de probabilidade de que a relação entre as variáveis têm $p \leq 0,05$. O software *GraphPad Prism 4.00* foi utilizado na análise estatística.

RESULTADOS

Maior ganho de peso foi observado no grupo de ratas ooforectomizadas, o que corrobora estudos semelhantes; o rato castrado é também um modelo para a indução de obesidade.^{5,7,10,15}

O cálcio sérico total não teve nenhuma relação com os valores médios de cada grupo. (Tabela 1) Nenhum grupo demonstrou valores anormais da concentração de Ca^{2+} no sangue (9-1,5mg/dL).¹⁷ Embora os grupos não tenham apresentado uma diferença estatisticamente significativa, constatou-se valores mais elevados de atividade enzimática nos grupos ovariectomizados, principalmente no grupo OVXSed. (Tabela 1) Nenhum grupo apresentou valores anormais em comparação com os valores de referência da atividade enzimática (a quantidade em humanos a 37°C varia de 27-390 U/L, dados relatados pelo kit Labtest® Diagnóstico, Brasil).

Referente a raios-X (Figura 1) o grupo IntTr apresentou maior densidade óssea na diáfise e epífise em comparação com os demais grupos, indicando que a preservação do ovário associada ao exercício foi capaz de preservar e promover maior formação óssea. Nos grupos ooforectomizadas, o grupo treinado (OVXTr) apresentou mais massa óssea do que o grupo sedentário (OVXSed).

A densitometria ótica de raios-X (Tabela 1) confirma o que foi observado na Figura 1 e mostra uma diferença estatisticamente significativa na densidade óssea do grupo OVXSed, que era menor do que os demais outros grupos, os quais apresentaram valores próximos dos médios. Este fato nos permite concluir que nestes grupos o tecido ósseo era mais denso.

A Figura 2 e a Figura 3 mostram que, em comparação com o grupo controle IntSed, houve alterações no arranjo estrutural do tecido ósseo nos demais grupos. A Figura 2 mostra a histologia da cabeça femoral no grupo IntTr, que possui mais condrócitos visíveis e melhor organização estrutural do tecido (em comparação com os demais grupos), sugerindo que a formação óssea aumentou neste grupo. No grupo OVXSed, os condrócitos são pouco visíveis e há grandes lacunas, que mostram uma melhoria no pareamento osteocondral. Em OVXTr, também foram observados menos condrócitos, mas a organização do tecido parece ser melhor e as lacunas que aparecem sugerem menor pareamento osteocondral comparado ao grupo OVXSed.

Na Figura 3 se observa que a diáfise do microarranjo do osso esponjoso proximal em IntTr tem menos falhas do que nos de-

mais grupos, especialmente em comparação com os animais ooforectomizados. Este fato sugere que o osso foi reforçado pelas tensões causadas pelo exercício.

Em relação ao tamanho das lacunas nos ossos em grupos ooforectomizados, existem diferenças entre os dois grupos. (Figura 2 e Figura 3) Houve uma maior desorganização estrutural do microarranjo do osso no grupo OVXSed, a linha epifisária deve ser realçada, por ter se tornado totalmente disfuncional - o que não ocorreu nos demais grupos. Isso significa que o exercício foi capaz de prevenir a desintegração do arranjo geral do osso no grupo OVXTr. No grupo OVXSed, foram observados muitos adipócitos abaixo da linha epifisária, mas o mesmo não foi observado no grupo OVXTr, mostrando que o exercício impediu a infiltração maciça de gordura no osso.

A avaliação da massa óssea (Tabela 1) mostra que os grupos intactos tinham mais massa óssea do que os grupos ooforectomizados. O grupo OVXSed teve o menor percentual de massa óssea, com uma diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos. No grupo OVXTr, a massa óssea foi maior comparada com OVXSed, mostrando que o exercício físico foi crucial na preservação do osso.

No grupo OVXSed observou-se, por meio de microscópio óptico de ampliação de 400x, maior quantidade de osteoclastos do que nos demais grupos, como mostrado na Tabela 1.



Figura 1. Radiografia dos fêmures. A: IntSed (controle); B: IntTr; C: OVXSed; D: OVXTr.

Tabela 1. Variação do peso corporal inicial e final. Dosagem de cálcio e fosfatase alcalina séricos; densitometria ótica de raios-x; medida de massa óssea e a soma total de osteoclastos nos grupos individuais de animais.

Grupos (n=6)	IntSed	IntTr	OVXSed	OVXTr
Peso corporal inicial (g)	110,8 ± 1,4	107 ± 1,1	100,8 ± 0,9	102 ± 1,9
Peso corporal final (g)	383 ± 5	332,8 ± 17,8	446,6 ± 17,2	462,4 ± 11,6
Cálcio (mg/dL)	9,4 ± 0,7	11,1 ± 0,5	10,5 ± 0,4	9,8 ± 0,6
Fosfatase Alcalina (U/L a 37 C)	169,5 ± 32,5	162,1 ± 43,6	224,7 ± 19,7	204,6 ± 27,4
Densitometria ótica raio-x (U.A.)	56,1 ± 3,5	65 ± 5	30,1 ± 3,1 **	59,4 ± 3,2
Massa óssea (%)	60,9 ± 3,7	66,6 ± 3,1	42,4 ± 3,3 *	56,8 ± 2,2
Contagem de osteoclastos (Células visíveis em 400x)	1 ± 0,4	1,7 ± 0,2	6,5 ± 0,6 **	2,2 ± 0,2

Dados são expressos em média ± desvio padrão; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ – Teste ANOVA bicaudal com pós-teste de Bonferroni.

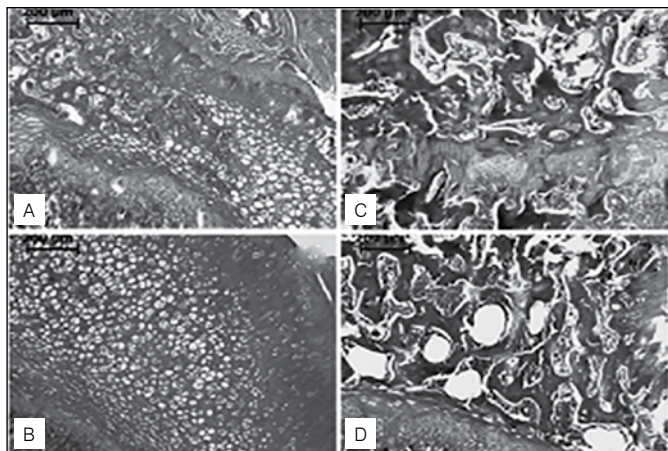


Figura 2. Histologia da cabeça femoral corada com hematoxilina e eosina. A: IntSed (controle); B: IntTr; C: OVXSed; D: OVXTr.

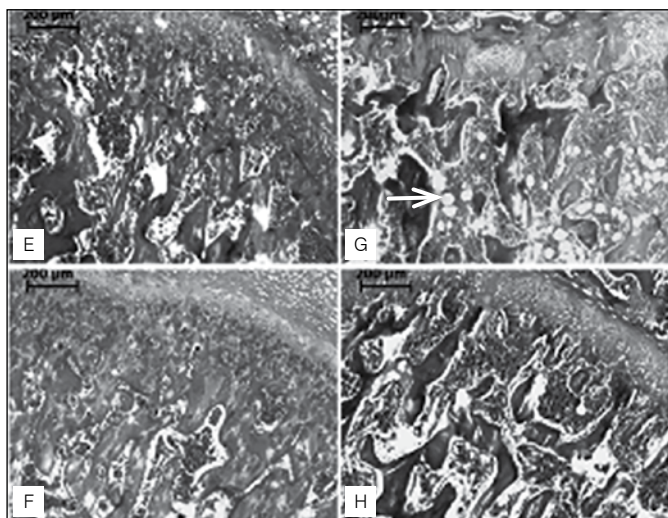


Figura 3. Histologia do colo femoral e linha epifisária corados com hematoxilina e eosina. E: IntSed (controle); F: IntTr; G: OVXSed; H: OVXTr. A seta azul indica os adipócitos.

DISCUSSÃO

Na Figura 1, o raio-x mostrou que o grupo OVXSed teve a menor quantidade de massa óssea, com uma diferença significativa em comparação com os outros grupos ($p < 0,001$). Este resultado indica que o exercício aquático foi capaz de reduzir a perda de massa óssea causada pela ooforectomia, o que não foi observado no grupo OVXTr. Estes resultados podem ser comparados com estudos com ratos castrados e exercícios de resistência^{8,10} ou exercícios aeróbicos.^{7,9}

A medição da massa óssea nos permitiu avaliar estatisticamente a ossificação dos grupos. A porcentagem de massa óssea no OVXSed foi menor do que em todos os outros grupos (como observado no raio-X), e mostrou uma diferença significativa ($p < 0,01$). (Tabela 1) A porcentagem de massa óssea no grupo OVXTr apresentava valores mais próximos dos do grupo controle, o que indica que a natação foi eficaz em combater o avanço do enfraquecimento ósseo.

A soma total de osteoclastos mostrou que houve um maior número de células fagocíticas no fêmur do grupo OVXSed, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Um estudo⁷ encontrou maior atividade dos osteoclastos nos ossos de animais sedentários. O exercício de natação foi aparentemente

responsável pela diminuição da proliferação dos osteoclastos. Outro estudo¹⁸ encontrou um maior número de osteócitos e menos falhas em grupos de ratos exercitados em rodas de correr. O número de adipócitos no fêmur do grupo OVXSed foi maior do que em qualquer outro grupo. (Figura 3) O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo que é parte do osso - células osteoprogenitoras e adipócitos têm a mesma origem embrionária, e a expressão dos seus fatores de transcrição específicos é o que determina a sua diferenciação. Portanto, sua presença na histologia óssea não é infrequente. Entretanto, a análise mostrou que o exercício aparentemente evitou a diminuição excessiva da massa óssea nas ratas ooforectomizadas. Os resultados indicam que os adipócitos ósseos se infiltram para preencher as grandes lacunas de ossos osteoporóticos, corroborando o estudo que avaliou o efeito da caminhada no osso de ratas ooforectomizadas.¹² Os mais altos níveis da atividade da enzima fosfatase alcalina foram encontrados em animais ooforectomizados, especialmente no grupo OVXSed, que apresentou aumento do enfraquecimento ósseo, no entanto, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles. Embora a fosfatase alcalina seja um biomarcador da formação óssea, ela se encontra aumentada em doenças onde predomina a reabsorção.^{4,5} Por isso, se assume que as proteínas produzidas por osteoclastos na reabsorção são capazes de ativar a diferenciação osteogênica e manter ativos os osteoblastos.^{4,19}

Estudos têm mostrado que mulheres na pós-menopausa podem apresentar taxas mais elevadas de fosfatase alcalina do que mulheres na pré-menopausa, que apresentam valores de densidade mineral óssea (DMO) inversamente proporcionais.^{20,21}

A análise bioquímica de biomarcadores da remodelação óssea pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de osteoporose, uma vez que DMO, que é o teste padrão para o diagnóstico da osteoporose,³ é uma medida pontual e não reflete as alterações dinâmicas as quais o tecido é submetido no momento do exame.^{4,20,21}

A perda de cálcio em ratas jovens e ooforectomizadas pode ser causada por uma redução no teor de cálcio no osso¹⁰ e um aumento na excreção de cálcio a partir do trato gastrointestinal, urina e suor.⁷ Mesmo nos grupos que apresentam maior enfraquecimento do osso, não foi detectado nenhum aumento de cálcio no soro. Este resultado pode ser explicado pela regulação da fisiologia de Ca^{2+} , que depende de um complexo de controle de uma série de reações controladas por calcitonina, produzida pela paratireoide, e outros hormônios. Como o cálcio participa de uma variedade de processos fisiológicos e desvios no soro, este pode interferir na operação normal do corpo.¹⁷ Entretanto, outros estudos observaram uma diminuição da concentração de cálcio no soro e na urina em mulheres climatéricas e pós-menopáusicas que se exercitavam com a corrida e ginástica por um período de um ano. Quando estas mulheres interrompiam o treinamento, seus valores de DMO diminuam concomitantemente,²² o que também acontece em ratas ooforectomizadas e treinadas.⁹

CONCLUSÃO

O exercício e ooforectomia não promoveram alterações nos níveis séricos de cálcio. Através da análise a dosagem da enzima fosfatase alcalina, constatou-se que houve uma maior formação óssea em grupos ooforectomizadas, mas a formação óssea não foi suficiente para combater a degradação promovida por deficiência de estrogênio em consequência da remoção dos ovários e o estilo de vida sedentário. A diminuição de esteroides sexuais causada pela ooforectomia foi responsável por grave perda óssea. Através dos parâmetros utilizados, a natação se revelou eficaz para prevenir a perda de massa óssea, a desorganização da estrutura óssea e a proliferação de osteoclastos e adipócitos.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento deste trabalho. HRS (0000-0002-5645-9123)* foi o responsável pela concepção, design do estudo, coleta e interpretação de dados, procedimentos técnicos, exames macroscópicos e histopatológicos, análise estatística, redação do manuscrito e revisão crítica. APG (0000-0002-8760-8945)* foi o responsável pela interpretação de dados, exames macroscópicos e histopatológicos e revisão crítica. APSS (0000-0002-7479-8428)* participou da concepção, design do estudo e revisão crítica. MRG (0000-0001-6979-0563)* executou os procedimentos técnicos e exames macroscópicos e histopatológicos. MMI (0000-0001-8312-7143)* efetuou os procedimentos técnicos. MFA (0000-0001-9166-1899)* supervisionou todas as fases do estudo, escreveu o manuscrito, realizou a revisão crítica e aprovação final da versão a ser submetida para publicação. Todos os autores contribuíram para o conceito intelectual do estudo. *Número ORCID (*Open Research and Contributor ID*).

REFERÊNCIAS

1. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(6):618-25.
2. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(Suppl 1):S1.
3. Neto AMP, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral N, et al. Consenso Brasileiro de Osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol*. 2002;42(6):343-54.
4. Dreyer P, Vieira JG. Bone turnover assessment: a good surrogate marker? *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(2):99-105.
5. de Almeida Jackix E, Cúneo F, Amaya-Farfan J, de Assunção JV, Quintaes KD. A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. *J Med Food*. 2010;13(6):1385-90.
6. Martini LA, Moura EC, Santos LC, Malta DC, Pinheiro MM. Prevalência de diagnóstico auto-referido de osteoporose, Brasil, 2006. *Rev Saude Publica*. 2009;43(Supl.2):107-16.
7. Boaro SN, Anaruma CA. Efeito de exercício de natação sobre o osso esponjoso de ratas ovariectomizadas. *Fiep Bulletin*. 2010;80:1-6.
8. Shigemoto GE, Prestes J, Leite RD, Pereira GB, Pontes CL, D'Ávila FV, et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22(5):607-17.
9. Tenório AS, Alves SB, Bezerra AL, Souza GML, Catanho MTJA, Tashiro T, et al. Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas. *Acta Cir Bras*. 2005;20(4):280-3.
10. Renno ACM, Faganello FR, Moura FM, Santos NSA, Tirico RP, Bossini PS, et al. Os efeitos de um programa de atividade física de carga progressiva nas propriedades físicas e na força óssea de ratas osteopênicas. *Acta Ortop Bras*. 2007;15(5):276-9.
11. Martins CC, Monte AAM. Natação e Flexibilidade: Revisão de literatura. *Rev Bras de Prescrição e Fisiologia do Exercício*. 2005;5(26):111-7.
12. Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S. Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(8):1759-67.
13. Nagasawa S, Honda A, Sogo N, Umemura Y. Effects of low-repetition jump exercise on osteogenic response in rats. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26(3):226-30.
14. Wilhelm M, Roskovensky G, Emery K, Manno C, Valek K, Cook C. Effect of resistance exercises on function in older adults with osteoporosis or osteopenia: a systematic review. *Physiother Can*. 2012;64(4):386-94.
15. Esteves ACF, Bizzaria SC, Coutinho MPG, Barreto TKDP, Santos MSB, Moraes SRA. A natação minimiza o retardo no crescimento somático e ósseo de ratos? *Rev Bras Med Esporte*. 2010;16(5):368-72.
16. Shimano MM, Volpon JB. Comportamento mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação. *Acta Ortop Bras*. 2007;15(5):254-7.
17. Toledo TO, Nagem TJ, Matos RL, Araújo AL, Queiroga LE, Silva RR, Silva E, Ferreira Jr DB. Efeitos de Rutina sobre os níveis de Cloreto, Cálcio e Fósforo em soros de coelho. *Rev Chil Nutr*. 2003;30(3):263-70.
18. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, Duarte JA. Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. *Calcif Tissue Int*. 2011;88(6):443-54.
19. Vieira JGH. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. *Bras Patol Med Lab*. 2007;43(2):75-82.
20. Atalay S, Elci A, Kayadibi H, Onder CB, Aka N. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Ann Lab Med*. 2012;32(1):23-30.
21. Kumar A, Devi SG, Mittal S, Shukla DK, Sharma S. A hospital based study of biochemical markers of bone turnovers & bone mineral density in north Indian women. *Indian J Med Res*. 2013;137(1):48-56.
22. Danz AM, Zittermann A, Schiedermaier U, Klein K, Hötzel D, Schönau E. The effect of a specific strength-development exercise on bone mineral density in perimenopausal and postmenopausal women. *J Womens Health*. 1998;7(6):701-9.

APÊNDICE D – *“Expressão de metaloproteinases de matriz e anexina a1 em tumores de pele de diferentes graus de malignidade”*

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ E ANEXINA A1 EM TUMORES DE PELE DE DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE

EXPRESSION OF THE MATRIX METALLOPROTEINASES AND ANNEXIN A1 IN SKIN TUMORS OF DIFFERENT MALIGNANCY GRADES

EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS DE MATRIZ Y ANEXINA A1 EN TUMORES DE LA PIEL DE DIFERENTES GRADOS DE MALIGNIDADE

Tatiana Medeiros Alves*, Patrícia Martins Baviera*, Thalita Alves de Oliveira*, Maryam Buainain Tadei*, Matheus Vicente Mayorquim*, Helena Ribeiro de Souza**, Mairto Roberis Geromel***, Ana Paula Girol****

Resumo

Introdução: Câncer de pele é doença multifatorial consequente de alterações genéticas e exposição prolongada aos raios solares, entre outras causas. Os basocarcinomas (CBC) são benignos, com invasividade local e reduzido potencial de metastatização; os carcinomas espinocelulares (CEC) são neoplasias malignas, divididos nos graus 1, 2 e 3 e no grupo acantolítico, de pior prognóstico. Estudos associam a resposta inflamatória exacerbada e modificação na matriz extracelular com o desenvolvimento tumoral. **Objetivos:** Analisar, por imuno-histoquímica, nas lesões de CBC e CEC (1, 2, 3 e no subtipo acantolítico) a expressão da proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1) e das metaloproteínas de matriz dos tipos 2 e 9 (MMP2 e MMP9). **Material e Método:** Para as análises imuno-histoquímicas, secções das biópsias de todos os grupos, após recuperação antigênica e bloqueio da atividade da peroxidase endógena foram incubadas com anticorpos primários policlonais rabbit: anti-ANXA1 (1:2000), anti-MMP2 e anti-MMP9 (1:100). Posteriormente, incubadas com o anticorpo secundário biotinilado, reveladas com os substratos diaminobenzidina ou o aminoetil carbazol e contracolorados com hematoxilina. A expressão das proteínas foi verificada pela densitometria e as análises estatísticas pela ANOVA e Bonferroni. **Resultados:** As análises imuno-histoquímicas e densitométricas revelaram padrão diferencial na expressão da ANXA1 nas variantes dos tumores de pele estudados, sendo a proteína pouco expressada no CBC e tecido normal e fortemente expressada no CEC grau 1 e no subtipo acantolítico. Enquanto, nos graus 2 e 3, mais invasivos, ocorreu diminuição na expressão da ANXA1 comparada ao grau 1. Resultados similares foram observados para MMP2, enquanto a expressão de MMP9 foi maior no CEC de grau 3. **Conclusão:** Os dados sugerem que a expressão desregulada da ANXA1 no CEC pode estar correlacionada às MMP2 e MMP9, contribuindo com processos de proliferação celular, remodelação do estroma e invasividade tumoral.

Palavras-chave: Neoplasias cutâneas. Carcinoma basocelular. Carcinoma de células escamosas. Microambiente tumoral.

Abstract

Introduction: Skin cancer is a multifactorial disease resulting from genetic mutations as well as from prolonged exposure to sunlight, among other causes. Basal cell carcinomas (BCC) are benign, with local invasiveness and reduced potential to metastasize, while, squamous cell carcinoma (SCC) are malignant neoplasms, and can be divided into grades 1, 2 and 3, besides of the acantholytic group, which presents poor prognosis. Studies associate exacerbated inflammatory response and modification in the extracellular matrix to tumor development. **Objectives:** To analyze, by immunohistochemistry, the expression of the anti-inflammatory protein annexin A1 (ANXA1) and the matrix metalloproteinases of the types 2 and 9 (MMP2 and MMP9), in lesions of BCC and SCC (grades 1, 2, 3 and acantholytic subtype). **Materials and Method:** For immune-histochemical analysis, sections of biopsies of all groups, following antigen retrieval and blocking of endogenous peroxidase activity were incubated with primary rabbit polyclonal antibodies: anti-ANXA1 (1:2000), anti-MMP2 and anti-MMP9 (1:100). Subsequently, they were incubated with biotinylated secondary antibodies, developed with diaminobenzidine or amino ethyl carbazole substrate and counterstained with hematoxylin. The expression of the proteins was verified by densitometry and statistical analysis by ANOVA and Bonferroni. **Results:** The immune-histochemical and densitometric studies revealed a differential standard in the expression of ANXA1 in the variants of the skin tumors analyzed. Reduced protein expression was observed in BCC and normal tissue, when strong immunoreactivity for ANXA1 was found in the SCC grade 1 and in the acantholytic subtype. In grades 2 and 3, more invasive, we observed instead a decrease in the expression of ANXA1 compared to grade 1. Similar results were detected for MMP2 expression, but MMP9 showed stronger expression in the SCC grade 3. **Conclusion:** Our data suggest that the deregulated expression of the ANXA1 in SCC may be associated to MMP2 and MMP9 contributing to cell proliferation processes, stromal remodeling and tumor invasiveness.

Keywords: Skin neoplasms. Basal cell carcinoma. Squamous cell carcinoma. Tumor microenvironment.

Resumen

Introducción: El cáncer de piel es una enfermedad multifactorial que resulta de cambios genéticos y la exposición prolongada a la luz solar, entre otras cosas. Los basocarcinomas (CBC) son benignos, con invasión local y reducido potencial para la metástasis; los carcinomas de células escamosas (SCC) son tumores malignos divididos en grados 1, 2 y 3 y el grupo acantolítico, de peor pronóstico. Estudios asocian la respuesta inflamatoria exacerbada y la modificación en la matriz extracelular en el desarrollo tumoral. **Objetivos:** Analizar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, en las lesiones de BCC y SCC (1, 2, 3 y acantolítico subtipo) la expresión de anti-inflamatorio proteína anexina A1 (ANXA1) y metaloproteinasas de la matriz de tipos 2 y 9 (MMP2 y MMP9). **Material y Método:** Para

* Acadêmicos do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), de Catanduva-SP.

** Técnica dos Laboratórios de Histopatologia e Imuno-histoquímica das FIPA e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), de São José do Rio Preto-SP.

*** Técnico do Laboratório de Histopatologia e Imuno-histoquímica das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), de Catanduva-SP.

**** Bióloga, Mestre em Morfologia pela UNIFESP, Doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular, e Pós-Doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Professora (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia das FIPA e Docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP. Contato: anapaulagirol@hotmail.com

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Histopatologia, Imuno-histoquímica e Multidisciplinar das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

el análisis inmunohistoquímico, secciones de biopsias de todos los grupos siguientes de recuperación de antígeno y el bloqueo de la peroxidasa endógena se incubaron con anticuerpos primarios de conejo policlonal anti-ANXA1 (1:2000), anti-MMP2 y MMP9 anti-(1:100). Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado, desarrollado con sustrato de diaminobencidina o carbazol de aminoetilo y contracorados con hematoxilina. La expresión de las proteínas se verificó mediante densitometría y el análisis estadístico por ANOVA y Bonferroni. Resultados: El análisis inmunohistoquímico y el diferencial estándar densitométrico reveló la expresión de ANXA1 en variantes de tumores de piel estudiados, poca proteína expresada en BCC y el tejido normal y que se expresa fuertemente en el grado 1 y CCA acantolítico subtipo. Mientras que en los grados 2 y 3, más invasivos, una disminución en la expresión de ANXA1 comparación con grado 1. Se observaron resultados similares para MMP2, MMP9 expresión fue mayor en el grado de CEC 3. Conclusión: Los datos sugieren que la expresión desregulada ANXA1 de la CCA se puede correlacionar la MMP2 y MMP9, contribuyendo a los procesos de proliferación celular, la remodelación del estroma y la invasividad tumoral.

Palabras clave: Neplasias cutáneas. Carcinoma basocelular. Carcinoma de células escamosas. Microambiente tumoral.

INTRODUÇÃO

O câncer de pele constitui a neoplasia maligna mais comum em humanos e, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil também é o mais frequente, correspondendo a 25% do total de tumores malignos dos quais 95% são tumores não melanoma e que abrangem carcinomas basocelulares (CBC) (70%) e espinocelulares ou epidermoide (CEC) (25%). As estimativas brasileiras apontam para 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres, em 2016¹.

O CBC é um tumor benigno, com invasividade local e reduzido potencial de metastatização² enquanto o CEC constitui um tumor maligno que surge na epiderme e atinge os queratinócitos. Os tumores primários dessa condição são facilmente tratáveis, contudo, podem provocar incapacitação por desfiguramento, além de apresentarem potencial para recorrência local e a ocorrência de metástases linfáticas e em órgãos a distância³. Portanto, é extremamente importante identificar nesses tumores aqueles que são mais agressivos e requerem acompanhamento mais próximo e tratamentos adicionais como linfonedectomia e radioterapia.

Os fatores prognósticos já estabelecidos incluem localização, tamanho e profundidade do tumor primário, bem como, grau de diferenciação e proliferação, invasão perineural, história de tratamento anterior, imunossupressão e fatores etiológicos, tais como cicatrizes de queimaduras, radiação e ulceração crônica^{4,5} e ainda, subtipos histológicos, como o acantolítico de prognóstico mais desfavorável. Nesta condição, as células perdem os desmossomos e assumem contornos arredondados, com superfície lisa, podendo se desprender facilmente⁴.

Ainda, diferentes marcadores moleculares têm sido associados com a progressão ou prognóstico do CEC cutâneo⁴, entre eles o Ets-1, um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes, incluindo

metaloproteinases de matriz (MMPs)⁶. As MMPs são proteinases extracelulares dependentes de zinco que pertencem a uma família de endopeptidases implicada em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo remodelação tecidual e organogênese e, em condições patológicas, as inflamações, doenças autoimunes e carcinogênese. Entre as MMPs, as gelatinases, MMP2 e MMP9, degradam os colágenos da lâmina basal e estruturas colágenas desnaturadas e estão envolvidas com a invasividade tumoral⁷.

Como exposto, o desenvolvimento e a progressão do câncer dependem não somente de suas características genéticas, mas também de interações das células tumorais com o estroma, sendo o microambiente tumoral crucial para seu desenvolvimento, caracterizando-se principalmente pela composição alterada da matriz extracelular, alta densidade de microvasos, abundância de células inflamatórias e fibroblastos⁸.

No desenvolvimento tumoral, a habilidade de migração das células epiteliais é um evento patofisiológico relacionado ao processo da reparação tecidual, o qual necessita da reorganização do citoesqueleto, da adesão entre célula e elementos da matriz e da remodelação da matriz. A migração celular pode ser iniciada por múltiplos sinais químicos e físicos presentes no microambiente, que são sensibilizados por receptores encontrados na membrana celular ou no interior das células⁶. As investigações que relacionaram a proteína anexina 1 (ANXA1) à regulação do crescimento celular, juntamente com a sua participação na cascata de sinalização e adesão celular, têm demonstrado um alvo importante para as pesquisas relacionadas com o desenvolvimento tumoral^{9,10}.

A ANXA1 é uma proteína anti-inflamatória, induzida por glicocorticoide com ações inibitórias da fosfolipase A2. As proteínas da superfamília das anexinas compartilham uma estrutura que compreende uma

extremidade N-terminal e um domínio central, C-terminal. O domínio central é responsável pela afinidade ao cálcio e a ligação aos fosfolípidios. Já o domínio N-terminal é único para cada membro da superfamília, possui variações no comprimento e na sequência de aminoácidos e confere as atividades e funções específicas das anexinas^{11,12}.

De fato, a porção N-terminal da ANXA1 é a região regulatória da proteína e contém sítios para processos pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação e proteólise. A ANXA1 está envolvida em algumas das ações benéficas dos glicocorticoides, incluindo a inibição da proliferação celular e da diapedese leucocitária, a regulação da diferenciação celular e do tráfico de membranas^{11,13}. Além disso, esta proteína tem sido associada com a progressão em alguns tumores invasivos, sugerindo um papel na regulação da migração/invasão das células epiteliais¹².

Estudos *in vivo* têm demonstrado que o padrão da expressão da ANXA1 no câncer humano não é bem definido. O aumento da expressão desta proteína foi previamente observado no glioblastoma e no adenocarcinoma mamário, enquanto outras investigações relataram redução ou perda da expressão da ANXA1 no câncer de cabeça e pescoço, esôfago, próstata e mama^{11,12,14,15}. A diminuição na expressão da ANXA1 foi observada nas células tumorais de laringe^{9,10}.

Embora os estudos mostrem que a ANXA1 modula a resistência a drogas em tumores e regula a proliferação celular, sua associação no desenvolvimento da metástase em alguns tumores sugere que esta proteína regula o processo de migração/invasão celular^{12,15}. Similarmente, a falta de ANXA1 no tumor torna as células tumorais resistentes a apoptose, induzida por agentes quimioterapêuticos^{11,15}, sugerindo esta proteína como um biomarcador negativo no desenvolvimento e na progressão do câncer.

Como exposto, o papel exato da ANXA1 na fisiologia celular não está totalmente esclarecido. Ainda, diante da necessidade de novos marcadores prognósticos para o CEC, o estudo da ANXA1 nessas lesões, correlacionada a mudanças na matriz extracelular, poderá revelar importantes funções da proteína na biologia tumoral e contribuir para o desenvolvimento de novos biomarcadores.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do material

As análises foram realizadas em biópsias de pele normal, CBC e CEC de diferentes classificações de Broders¹⁶, CEC de graus 1, 2 e 3, sendo considerado também o subtipo acantolítico (n=20 de cada condição), provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), após autorização do responsável pelo setor e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa das FIPA (74/11). Os blocos de parafina, contendo fragmentos das biópsias, foram utilizados para a obtenção de secções de 5µm e, em seguida, processados e submetidos a análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.

Análises imuno-histoquímicas

As expressões das proteínas ANXA1, MMP-2 e MMP-9 foram detectadas, por meio dos anticorpos primários policlonais *rabbit* anti-ANXA1 (1:2000); anti-MMP-2 (1:1000) e anti-MMP-9 (1:1000) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK). Os cortes foram preparados em lâminas silanizadas e, então, desparafinizados, re-hidratados, incubados em calor úmido em solução tampão citrato, pH 6,0, por 20 minutos para a recuperação antigênica e deixados em solução de peróxido de hidrogênio (p.a) a 3% em metanol, por 30 minutos, para o bloqueio de peroxidase endógena. A seguir, foram incubados *overnight* com os anticorpos primários diluídos em BSA a 1%, em câmara úmida a 4°C. Após, foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit Zymed, Invitrogen), revelados com o substrato diaminobenzidina (para ANXA1 e MMP2) ou o aminoetil carbazol (para MMP9) (Kits Zymed, Invitrogen); contrainformados com Hematoxilina de Harris e montados.

Todos os fragmentos processados imuno-histoquimicamente foram analisados no microscópio LEICA DM50, do Laboratório Multidisciplinar das FIPA; e as proteínas foram quantificadas no analisador de imagens (*software LEICA Image Analysis*).

Análises estatísticas

Para as quantificações das proteínas ANXA1, MMP-2 e MMP-9 foram analisados vinte diferentes pontos das células epiteliais em três diferentes regiões por lâmina de todas as biópsias, para se obter uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram

obtidos como unidades arbitrárias e a densidade óptica média mostrou a intensidade de imunomarcagem apenas nas áreas imunoreativas¹⁴.

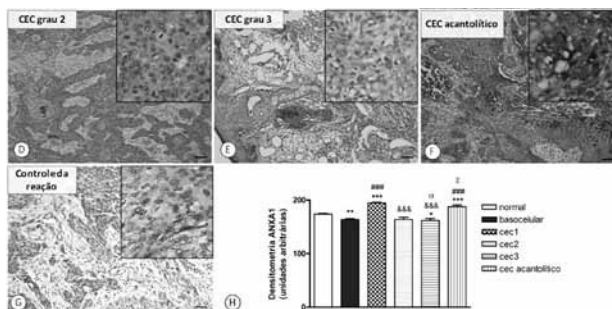
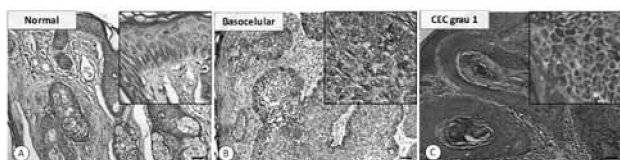
As médias foram comparadas pela ANOVA, seguidas pelo teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média ± S.E.M. Valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

As análises imuno-histoquímicas e densitométricas revelaram padrão diferencial na expressão da ANXA1 nas variantes dos tumores de pele estudados. Nas margens livres do tumor, pele normal, observamos a expressão da ANXA1 na epiderme, especialmente no citoplasma das células basais, nas células da camada espinhosa e nas células corneificadas. A ANXA1 também foi localizada no estroma da derme e nas glândulas sebáceas (Figura 1A). Nos CBC nodulares ocorre o desarranjo da epiderme e a invasão da derme pelo tumor que se apresenta como blocos arredondados formados por células que se assemelham às da camada basal da epiderme. Na parte central, os blocos são sólidos e preenchidos por células que expressam ANXA1 (Figura 1B). Contudo, a imunomarcagem para ANXA1 mostrou redução da expressão da proteína no CBC (p<0,01) com relação à pele normal (Figura 1H).

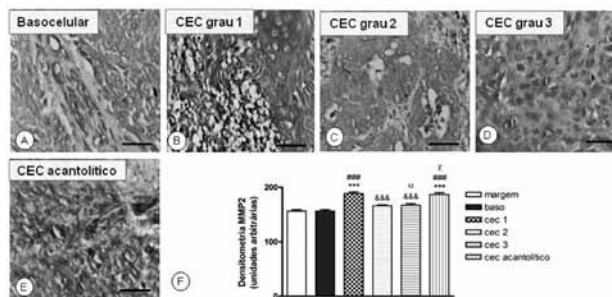
Diferentemente, houve superexpressão da ANXA1 (p<0,001) nos CEC de grau 1 (Figura 1C) e no subtipo acantolítico (Figura 1F) comparado à pele normal e CBC (Figura 1H). De maneira interessante, nos CEC de graus 2 (Figura 1D) e 3 (Figura 1E), mais indiferenciados e invasivos, a imunorreatividade para a proteína é significativamente reduzida (p<0,001) com relação ao CEC de grau 1 e subtipo acantolítico (Figura 1H). A especificidade do anticorpo foi comprovada pelo controle da reação (Figura 1G).

Figura 1 - Expressão da ANXA1 em carcinomas cutâneos. ANXA1 em pele normal (A). No carcinoma basocelular (CBC) (B) e no espinocarcinoma (CEC) de graus 2 (D) e 3 (F) a imunorreatividade é diminuída. Enquanto no CEC de grau 1 (C) e no subtipo acantolítico (E) ocorre superexpressão da proteína. Ausência de imunorreatividade no controle da reação (G). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10µm. Análises densitométricas (H). Valores como média ±S.E.M.***p<0,001 vs pele controle; ###p<0,001 vs CBC, &&&p<0,001 vs CEC grau 1; ° p<0,05 vs CEC grau 2, † p<0,05 vs CEC grau 3



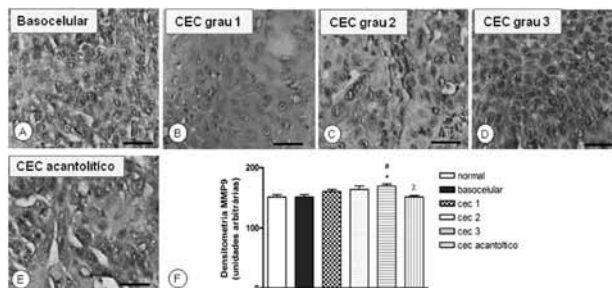
Os estudos da expressão das MMP2 e MMP9 mostraram modulação da imunorreatividade para essas MMPs. As análises de expressão da MMP2 mostraram resultados semelhantes aos encontrados para a ANXA1, com superexpressão da MMP2 no CEC de grau 1 (Figura 2B) e subtipo acantolítico (Figura 2D), comparados aos outros graus de CEC (Figuras 2B e C) e, especialmente, à pele normal e CBC (p<0,001) (Figuras 2A e H).

Figura 2 - Expressão da MMP2 em carcinomas cutâneos. No carcinoma basocelular (CBC) (A) e no espinocarcinoma (CEC) de graus 2 (B) e 3 (C) a imunorreatividade é diminuída. Superexpressão no CEC de grau 1 (B) e no subtipo acantolítico (E). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10µm. Análises densitométricas (F). Valores como Média ±S.E.M. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs pele normal; ###p<0,001 vs CBC; &&&p<0,001 vs CEC grau 1; ° p<0,05 vs CEC grau 2, † p<0,05 vs CEC grau 3



Diferente da imunorreatividade para MMP2, que acompanhou o padrão de expressão da ANXA1 nas biópsias estudadas, a MMP9 aumenta de modo significativo (p<0,05) no CEC de grau 3 (Figura 3D), comparado à pele normal, CBC (Figura 3A) e subtipo acantolítico (Figuras 3E e F).

Figura 3 - Expressão da MMP9 em carcinomas cutâneos. Menor expressão no carcinoma basocelular (CBC) (A) e no espinocarcinoma (CEC) de graus 2 (B) e 3 (C). Aumento na expressão no CEC de grau 1 (B) e no subtipo acantolítico (E). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10µm. Análises densitométricas (F). Valores como Média ±S.E.M. *p<0,05; vs pele normal; #p<0,05 vs CBC; †p<0,05 vs CEC grau 3



DISCUSSÃO

Embora o progresso alcançado para novos diagnósticos e tratamentos tenha levado ao declínio da taxa de mortalidade, o câncer continua sendo uma das maiores causas de morte nos países industrializados. O melhor entendimento das interações entre as células neoplásicas e microambiente tumoral poderá originar novos alvos biológicos na intervenção terapêutica do câncer de pele humano.

No presente estudo, mostramos que a expressão desregulada da proteína ANXA1 pode estar relacionada às expressões das MMP2 e MMP9 e influenciar a proliferação e invasão tumorais nos carcinomas cutâneos.

As análises imuno-histoquímicas dos tumores de pele mostraram expressão da ANXA1 em todas as condições clínicas estudadas. As imunomarcações foram reduzidas no CBC, condição benigna, e aumentadas no CEC, mais agressivo e potencialmente maligno, o que pode estar relacionado a processos de proliferação celular¹⁴. Contudo, o aumento na expressão da proteína foi observado nos tumores de grau 1 e no subtipo acantolítico, com redução na expressão da proteína nos carcinomas de graus 2 e 3, indiferenciados e mais invasivos. A expressão desregulada da proteína indica envolvimento da ANXA1 na carcinogênese. Outros estudos têm associado a ANXA1 com a progressão em alguns tumores invasivos, sugerindo um papel na regulação da migração/invasão das células epiteliais¹¹⁻¹⁵. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ANXA1 modula essas respostas celulares não estão completamente determinados. Em uma investigação¹⁷ realizada com 115 pacientes portadores de carcinoma oral, foi demonstrada elevada expressão da ANXA1 no núcleo das células epiteliais tumorais, correlacionando com pobre prognóstico.

Por outro lado, alguns pesquisadores observaram diminuição na expressão da ANXA1 na membrana plasmática no carcinoma de laringe, faringe e oral, mostrando a desregulação da expressão da proteína ANXA1 na diferenciação das células epiteliais tumorais¹⁸⁻²⁰. Embora ocorra diminuição na expressão da ANXA1 nas células tumorais de laringe⁹, o tratamento com o peptídeo Ac2-26 (porção N-terminal da ANXA1), na linhagem celular de câncer de laringe (Hep-2), resultou no aumento da expressão da ANXA1 e na inibição do crescimento tumoral, sugerindo um papel regulatório desta proteína no desenvolvimento do câncer de laringe. Em uma outra

investigação também em carcinoma epidermoide de laringe¹⁰ foi indicado que a ANXA1 pode contribuir na regulação do crescimento tumoral e metástase por meio de mecanismos parácrinos mediados pelo receptor para peptídeos formilados (FPR2).

Parece que a ANXA1 pode exercer alguma função supressora de tumor, pois níveis ausentes ou reduzidos dessa proteína têm sido observados em vários tipos de cânceres, incluindo linfomas de células B, carcinomas de esôfago, além de câncer de mama⁸. Além disso, a falta de ANXA1 no tumor, induzida por agentes quimioterápicos, torna as células tumorais resistentes a apoptose¹¹, sugerindo essa proteína como um biomarcador negativo no desenvolvimento e na progressão do câncer.

Na sequência do estudo, avaliamos a expressão de MMP2 e MMP9, associando à expressão da ANXA1. Nossas observações revelaram expressão reduzida da MMP2 na pele normal e CBC e aumento na expressão da endopeptidase no CEC de grau 1 e no subtipo acantolítico, mesmas variantes clínico-patológicas onde ocorreu superexpressão da ANXA1 e, portanto, indicam padrão semelhante na expressão da MMP2 com relação à ANXA1. Diferentemente, a MMP9 mostrou tendência a aumento nos CECs de todos os graus, especialmente no CEC de grau 3.

As MMPs são essenciais para a remodelação da matriz extracelular e sua superexpressão facilita o envelhecimento celular e o câncer. A MMP2 degrada fibras de colágeno e elásticas e a MMP9, principalmente as fibras elásticas⁷. A superexpressão da MMP2 em modelo animal de papilomas cutâneos também mostrou aumento dessas gelatinases, especialmente da MMP2²¹. Ainda, o aumento na expressão de MMP2 em CEC comparado a CBC também foi observado em outra investigação usando biópsias humanas²². A associação da ANXA1 com MMPs também foi demonstrada nas células Hep-2 de tumor epidermoide de laringe, tratadas com o peptídeo mimético da ANXA1¹⁰, o qual reduziu a expressão da MMP2 e aumentou da MMP9. Estudos mostram que, dependendo do tipo de célula cancerosa, a ANXA1 e o seu péptido podem estimular diferentes vias de sinalização para induzir a proliferação, resistência a apoptose, angiogênese por meio de fatores de crescimento e mediadores celulares e a invasão pelas MMPs¹². Desse modo, nossos dados enfatizam que a ANXA1 pode afetar a expressão das MMPs durante o processo de carcinogênese.

CONCLUSÕES

A expressão desregulada da ANXA1 no CEC pode estar correlacionada às MMP2 e MMP9, contribuindo com

processos de proliferação celular, remodelação do estroma e invasividade tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer [citado em 23 jan. 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>
2. Souza CFD, Menegotto PF, Shibue JRT, Thomé EP, Schmitt JV, Tarlé RG. Topografia do carcinoma basocelular e suas correlações com o gênero, a idade e o padrão histológico: um estudo retrospectivo de 1.042 lesões. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(2):272-7.
3. Scanavini RC. Estudo dos fatores prognósticos do carcinoma espinocelular de pele de cabeça e pescoço [dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2005.
4. Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res*. 2007; 298:469-77.
5. Galán I, Laso AR, Gañán LD, Cámara E. Prevalence and correlates of skin cancer risk behaviors in Madrid (Spain). *Gac Sanit*. 2011; 25(1):44-9.
6. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2011; 278(1):16-27.
7. Philips N, Auler S, Hugo R, Gonzalez S. Beneficial regulation of matrix metalloproteinases for skin health. *Enzyme Res*. 2011 Mar 8; 2011:427285.
8. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003; 200(4):429-47.
9. Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, Maniglia JV, Raposo LS, Tajara EH, et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120(12):2582-9.
10. Gastardelo TS, Cunha BR, Raposo LS, Maniglia JV, Cury PM, Lisoni FCR, Tajara EH, Oliani SM. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e111317.
11. Lim LHK, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*. 2007; 21(4):968-75.
12. Boudhraa Z, Bouchon B, Viillard C, D'Incan M, Degoul F. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Feb; 130(4):205-20.
13. Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan; 14(2):2652-83.
14. Perez BC, de Almeida MA, Costa SS, Geromel MR, Girol AP. Expressão diferencial da proteína Anexina-A1 em tumores de pele e mama. *Ciênc Pesq Consciênc Rev Med*. 2012; 4(1):22-6.
15. Guo C, Liu S, Sun MZ. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol*. 2013 Nov; 9(11):1773-93.
16. Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. *Ann Surg*. 1921; 73(2):141-60.
17. Lin CY, Jeng YM, Chou HY, Hsu HC, Yuan RH, Chiang CP, et al. Nuclear localization of annexin A1 is a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Surg Oncol*. 2008; 97(6):544-50.
18. Pedrero JMG, Fernandez MP, Morgan RO, Zapatero AH, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol*. 2004; 164(1):73-9.
19. Rodrigo JP, Garcia-Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Suárez C, Herrero A. Annexin A1 expression in nasopharyngeal carcinoma correlates with squamous differentiation. *Am J Rhinol*. 2005; 19(5):483-7.
20. Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Nakashima D, Kouzu Y, et al. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135(7):943-9.
21. Subramanian V, Venkatesan B, Tumala A, Vellaichamy E. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol*. 2014 Apr; 66:44-55.
22. de Oliveira Poswar F, de Carvalho Fraga CA, Gomes ES, Farias LC, Souza LW, Santos SH, et al. Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2015 Feb; 23(1):20-5.

Recebido em: 10/02/2016

Aceito em: 05/04/2016