



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRICIA DURGANTE RITTER

**PROTECTINA DX ACELERA O PROCESSO CICATRICAL
EM MODELO MURINO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

PATRICIA DURGANTE RITTER

**PROTECTINA DX ACELERA O PROCESSO CICATRICAL
EM MODELO MURINO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rúbia Casagrande

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R615p Ritter, Patricia Durgante.
Protectina DX acelera o processo cicatricial em modelo murino de feridas cutâneas / Patricia Durgante Ritter. - Londrina, 2023.
108 f. : il.

Orientador: Rubia Casagrande.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Cicatrização - Tese. 2. Feridas cutâneas - Tese. 3. Mediadores lipídicos pró-resolutivos - Tese. 4. Protectina DX - Tese. I. Casagrande, Rubia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

PATRICIA DURGANTE RITTER

**PROTECTINA DX ACELERA O PROCESSO CICATRICAL
EM MODELO MURINO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Prof^a. Dr^a. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Victor Fattori
Boston Children's Hospital - EUA

Dra. Camila Rodrigues Ferraz
University of Maryland - EUA

Londrina, 20 de abril de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Rubia Casagrande, minha orientadora, por todos os ensinamentos, por estar sempre disposta e disponível para me ajudar no caminho até a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri que contribuiu para esta pesquisa com seu conhecimento, disponibilizou seu tempo, laboratório e equipamentos.

A meu marido e meus filhos, que compreenderam e perdoaram a minha ausência nesse período.

Aos companheiros de pesquisa e laboratório, sem a ajuda dos quais esse trabalho não teria sido possível: Soraia Pierotti, Tiago Zaninelli, Camila Ferraz, Telma Saraiva, Allan Bussmann, Anelise Franciosi, Mariana Bertozzi, Willian Chinen.

Aos professores e colaboradores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo auxílio prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária e Financiadora de Estudos e Projeto (FINEP).

RESUMO

Ritter, Patrícia Durgante. **Protectina DX acelera o processo cicatricial em modelo murino de feridas cutâneas**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Lesões cutâneas ocorrem repetidamente e não há tratamento eficaz que garanta a cicatrização adequada. A protectina DX (PDX), um mediador lipídico pró-resolutivo derivado do ômega 3, mostrou efeito benéfico na resolução da inflamação, controle da dor, proteção contra o estresse oxidativo e fibrose em vários modelos de doença, mas ainda não foi testado na cicatrização de feridas cutâneas. Este estudo investigou o efeito da PDX em um modelo de cicatrização por segunda intenção de ferida excisional sem tratamento tópico. Foram realizadas duas lesões circulares no dorso de camundongos com punch de biópsia de 5 mm de diâmetro e os animais foram tratados com o fármaco em estudo (PDX 10 ng), via intraperitoneal (IP), 1 vez ao dia por 7 dias. Ao término do período de estudo os animais foram terminalmente anestesiados e as amostras de pele contendo a lesão foram coletadas com punch de biópsia de 6 mm de diâmetro. A evolução do grupo tratado foi comparada com grupo controle com lesão (tratamento com veículo - solução fisiológica), e com grupo Sham em alguns experimentos. Os parâmetros avaliados foram tempo de fechamento, o recrutamento de células de defesa, a produção de mediadores inflamatórios e a fluorescência em animais marcados. Observamos o aceleração da cicatrização no grupo tratado, avaliado por medidas macroscópicas e histológicas, evidenciando maior quantidade de queratinócitos cobrindo a ferida e menor área de lesão remanescente. Aumento de TGF- β no D7 em comparação ao D3 e ao grupo controle com lesão, medido por ELISA em camundongos hairless e o aumentando a fluorescência em camundongos marcados CX3CR1-eGFP/+ C57BL/6. Notamos também redução de TNF- α no D7 em comparação ao D3 e ao grupo controle com lesão (ELISA), redução do infiltrado inflamatório no tecido de granulação (histologia) e da atividade de MPO, sugerindo atividade anti-inflamatória pelo menor recrutamento de neutrófilos. Por outro lado, reduziu NAG (marcador para macrófagos), não reduziu a IL1- β (ELISA) e não mostrou diferença estatisticamente significativa no número de feridas ainda com gap epitelial. Sendo assim, PDX é candidata a estudos subsequentes no tratamento da cicatrização.

Palavras-chave: Inflamação; Ferimentos; Macrófagos; pró-resolução; mediadores lipídicos especializados; protectina DX.

ABSTRACT

RITTER, Patricia Durgante. **Efficacy of Protectin DX on excisional wound healing in hairless mice.** 108 pp. Dissertation (master's degree in health sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Skin injuries occur repeatedly, and there is no effective treatment that guarantees proper healing and scarring. PDX is one of the specialized pro-resolving lipid mediators (SPM), omega 3 derived, that has shown beneficial effect in inflammation resolution, pain control, protection against oxidative stress and fibrosis in several disease models. It has not been widely studied in cutaneous lesions, therefore we tested the effect of PDX on excisional wound healing by secondary intention in healthy murine model. Total of 2 lesions, 5 mm of diameter, were created by a biopsy punch tool on the back of each mouse with no topical treatment. Animals were treated with PDX 10ng or saline solution (control group), IP, daily for 7 days, when wound samples were harvested for analysis. PDX treatment provided faster healing and superior reepithelialization, reduced TNF- α , MPO activity and inflammatory infiltrate. It also increased TGF- β , and fluorescence observed in CX3CR1-eGFP/+ labeled C57BL/6 mice. However, it failed to lower IL1- β (ELISA) and showed no significant difference in epithelial gap count. Our results correspond in part to those described in current literature, suggesting that PDX limits inflammation and enhances resolutive and proliferative activities, through still unknown mechanisms. Therefore, it is a candidate for further studies on skin wound healing treatment.

Keywords: inflammation; wounds, macrophage; pro-resolution; specialized lipid mediators; protectin DX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da pele	19
Figura 2.	Fases do processo cicatricial	20
Figura 3.	Alteração de função dos macrófagos	26
Figura 4.	Biossíntese de mediadores lipídicos inflamatórios	35
Figura 5.	Biossíntese de lipídios pró-resolutivos	38
Figura 6.	Estrutura química de lipídios pró-resolução derivados do DHA, Protectina D1, DX e AT	41
Figura 7.	Esquema ilustrativo do delineamento experimental	47
Figura 8.	Método de avaliação macroscópica da lesão	50
Figura 9.	Avaliação dos parâmetros histológicos (HE)	55
Figura 10.	Avaliação do infiltrado inflamatório (HE)	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-CH ₃)	Cadeia metil
(-COOH)	Grupo carboxila
AA	ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido graxo
ALA	Ácido alfa-linolênico
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ARDS	Síndrome do desconforto respiratório agudo
C5a	Componente C5a do sistema complemento
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CLP	Ligadura e perfuração cecal
COX	Cicloxygenase
CYP	Citocromo P450
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DHA	Ácido docosahexaenoico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FGF	Fator de Crescimento de fibroblastos
H&E	Hematoxilina eosina
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil amônio
ICAM1	Molécula de adesão intercelular-1
IFNs	Interferons
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucinas
NO	Óxido nítrico sintase induzível
K-ATPase	Bomba sódio potássio adenosinatrifosfatase
LOX	Lipoxigenase
LPR	Lipídios pró-resolutivos
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MaRs	Maresinas
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MEC	Matriz extracelular

MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
NAG	N-acetil-glucosamina
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NGF	Fator de Crescimento de neuronal
NO	Oxido nítrico
PD1	Protectina D1
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDX	Protectina DX
PG	Prostaglandinas
PGI	Prostaciclina
PMN	Polimorfonuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rvs	Resolvinas
SELE	E-Selectina
SMA	Actina de músculo liso
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxanos
UVB	Luz ultravioleta B
VCAM1	Molécula 1 de adesão celular vascular
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	FERIDAS	14
2.2	PELE	14
2.2.1	Estrutura e Função	15
2.3	CICATRIZAÇÃO	20
2.3.1	Fases da Cicatrização	21
2.3.2	Mediadores	29
2.4	LIPÍDIOS PRÓ-RESOLUTIVOS	36
2.4.1	PD1	39
2.4.2	PDX.	39
2.5	MODELOS DESCRITOS NA LITERATURA	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAIS	45
4.2	MÉTODOS	45
4.2.1	Animais Experimentais	45
4.2.2	Delineamento Experimental	46
4.2.3	Protocolo Experimental	48
4.2.4	Diluição da Protectina DX (PDX).....	49
4.2.5	Avaliação Macroscópica da Lesão	49
4.2.6	Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)	51
4.2.7	Avaliação da Atividade da N-Acetilglicosaminidase (NAG).....	51
4.2.8	Avaliação da Produção de Diferentes Citocinas (IL1- β , TGF- β e TNF- α)	52
4.2.9	Avaliação Histológica da Lesão.....	53
4.2.10	Ensaio de Fluorescência	57
4.2.11	Análise Estatística dos Resultados	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO	58
5.1	EFFICACY OF PROTECTIN DX ON EXCISIONAL WOUND HEALING IN HAIRLESS MICE	58
6	CONCLUSÃO	96
7	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão de cobertura que envolve todo o organismo externamente, dessa forma, recebe constantemente múltiplas agressões do meio externo às quais precisa responder, restaurando a integridade da estrutura danificada (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). A maioria dessas lesões são pouco agressivas e resolvem-se espontaneamente sem qualquer tipo de intervenção, algumas, no entanto, tornam-se crônicas ou patológicas levando a alteração da função do local. Extremos de idade, lesão em grande extensão da superfície corporal, tempo prolongado de evolução, presença de infecção, tensão ou corpos estranhos na ferida, pouca oxigenação e tabagismo (BLAIR et al., 2020) são exemplos de fatores prejudiciais ao processo cicatricial. Entre as comorbidades que afetam a cicatrização podemos citar diabetes mellitus, doenças vasculares, tumores em atividade, desnutrição, obesidade (DAS, 2018) e imunossupressão (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; HO et al., 2017). Contudo, algumas lesões evoluem mal mesmo na ausência de fatores predisponentes e outras evoluem bem apesar deles. Buscamos conhecimento para identificar as causas desse fato, que poderia justificar as falhas das terapias atuais (ZOMER; TRENTIN, 2018). O estudo da cicatrização é importante porque feridas abertas e cicatrizes que limitem a mobilidade dos indivíduos interferem com as atividades diárias e a saúde, constituindo um problema de saúde pública (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; HO et al., 2017; SEN et al., 2009). Atualmente, o foco do tratamento das feridas vai além de facilitar a resolução da lesão, restaurar a integridade da pele e a função, é necessário que isso ocorra rapidamente, e que minimize os impactos sociais e estéticos (MOYSIDIS et al., 2022) de maneira especial quando localizadas em partes expostas do corpo.

No momento em que uma lesão ocorre, mecanismos sinalizadores desencadeiam o início do processo de reparo, visando a restauração mais próxima possível da condição original. A hemostasia é primeira fase do processo cicatricial, visando minimizar a perda sanguínea do organismo, seguida pela fase inflamatória, na qual o sistema imunológico atua para evitar infecção, remover células e tecidos desvitalizados e fornecer o substrato inicial para a reparação. Na sequência a fase

proliferativa estimula a replicação celular e a produção de deposição de material proteico para preencher a área, que será posteriormente remodelada, até a cicatriz final resultante. Estudos nas últimas décadas revelaram diferentes funções das células e dos mediadores envolvidos no processo cicatricial, com foco especial na transição entre as fases inflamatória e proliferativa. Eles levaram à descoberta dos lipídios pró-resolutivos (LPR), mediadores derivados de ácidos graxos essenciais (ômega-3 principalmente), sintetizados endogenamente em locais de inflamação que favorecem a resolução do processo inflamatório (BASIL; LEVY, 2016; HERRERA et al., 2015; NORLING et al., 2011). São exemplos de LPR as lipoxinas, maresinas, protectinas e resolvinas.

A protectina DX (PDX) é derivada do DHA e mostrou-se benéfica em modelos de doenças inflamatórias, porém não há relatos de sua aplicação em cicatrização cutânea. Muitas substâncias vêm sendo estudadas no tratamento da cicatrização de feridas, e alguns estudos mostraram resultados positivos, porém ainda com limitações técnicas, de custos e de estabilidade. Esse estudo avalia a ação da PDX em componentes celulares e mediadores envolvidos no processo de cicatrização de lesão cutânea excisional no dorso de camundongos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FERIDAS

Feridas são causadas pela ruptura da estrutura anatômica com perda de função da área afetada. Podem ser agudas, quando evoluem de maneira adequada e dentro do período temporal esperado, ou crônicas, quando evoluem de forma inadequada ou deixam de cicatrizar sendo que a partir de 6 meses qualquer ferida é considerada crônica (WILKINSON; HARDMAN, 2020).

Quanto ao tipo de cicatrização podem ser classificadas como fechamento por primeira intenção, quando as bordas da ferida são aproximadas de forma imediata por pontos de sutura, grampos, cola ou fita adesiva. Feridas extensas onde houve perda de substância que não permita aproximação de bordas geralmente são deixadas abertas, protegidas por curativos, e cicatrizam por segunda intenção, epitelizando a partir das bordas ou do leito, se houver queratinócitos remanescentes na camada basal do epitélio ou nos anexos cutâneos. O fechamento por terceira intenção ocorre quando se torna possível a aproximação tardia das bordas de uma ferida inicialmente deixada aberta (RITTIÉ, 2016).

2.2 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 16% do peso corporal (LEIDER, 1949) constituindo uma barreira semipermeável que permite a absorção e a eliminação de algumas substâncias de forma controlada. Se lesada, sua função é prejudicada, ocorrendo perda de líquidos e nutrientes para o exterior e tornando-se uma porta de entrada para microrganismos causadores de infecções (MOYSIDIS et al., 2022), por isso é importante a rápida restauração da cobertura cutânea (SORG; KRUEGER; VOLLMAR, 2007).

2.2.1 Estrutura e Função

A pele oferece proteção física, química, biológica, radiológica e térmica. A disposição das células e proteínas forma uma barreira física ao trânsito livre de partículas, e a sobreposição das camadas confere resistência mecânica. Participa da homeostase, prevenindo a perda de líquidos e atuando na regulação da temperatura (aumentando ou diminuindo a troca de calor com o meio através da circulação periférica e da produção de suor) (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021). Permite a absorção controlada de substâncias, podendo ser via de administração de medicamentos. Ela é composta pela epiderme, derme e tecido celular subcutâneo (RODRIGUES et al., 2019). Cada uma das camadas contribui para a espessura total da pele, e varia conforme a região do corpo onde se encontra. Cada camadas possui tipos celulares e características específicas (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021).

A epiderme é a camada mais externa, semipermeável, resistente e fica em contato com meio externo (RODRIGUES et al., 2019). Os queratinócitos tem origem embrionária na ectoderme e constituem 95% das células presentes na epiderme, sendo responsáveis pela produção de queratina, que confere resistência à pele. Os queratinócitos são organizados em cinco camadas ou estratos, se multiplicando a partir da camada basal e alterando suas características ao migrarem em direção à superfície até serem eliminados (GANTWERKER; HOM, 2011). Eles se unem às células vizinhas através dos desmossomos (estruturas proteicas de ligação intercelular) e à camada basal através dos hemidesmosomos (SINGER; CLARK, 1999). Na camada basal também se encontram os melanócitos e as células de Merkel originados na crista neural. Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, que é transferida para as células vizinhas conferindo pigmentação e proteção ao material genético da radiação ultravioleta (HO et al., 2017). As células de Merkel têm função mecanorreceptora e representam a menor população celular, a proporção de melanócitos em relação aos queratinócitos é de aproximadamente 1: 36 (CICHOREK et al., 2013). É a partir da camada basal que se desprenderão os queratinócitos migratórios para o leito das feridas, favorecendo a re-epitelização a partir de suas bordas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021). Superficialmente à camada basal está o estrato espinhosos, onde são

encontradas as células de Langerhans, com origem embrionária no fígado fetal com contribuição de progenitores do saco vitelínico (DAVIES et al., 2013). Elas são células sentinelas apresentadoras de antígeno residentes na epiderme, responsáveis pelo início da resposta imunológica através da apresentação de antígenos (MINUTTI et al., 2017). As células de Langerhans se autorrenovam, sendo independentes de células circulantes para manter a população estável, porém há possibilidade de serem substituídas por monócitos caso sejam eliminadas (MINUTTI et al., 2017). Seguem os estratos granuloso, lúcido e córneo, onde a quantidade de queratina aumenta progressivamente até os queratinócitos perderem o núcleo e a conexão com as células vizinhas sendo eliminados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WEI et al., 2017). Na epiderme murina são encontradas ainda as células T dendríticas epidérmicas (DETCs), um subtipo de célula T $\gamma\delta$, com origem no timo e função na epitelização após lesão através da produção de IGF-1 e KGF-1/2 (HAVRAN; JAMESON, 2010; LI et al., 2018).

A derme é a camada subjacente, unida à epiderme por uma superfície irregular de projeções da derme para a epiderme (papilas dérmicas) e de projeções da epiderme para a derme (cristas epidérmicas), aumentando a aderência entre as duas camadas pelo aumento da área de contato. A derme é formada pela matriz extracelular, onde encontram-se os anexos cutâneos (glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos), vasos sanguíneos e linfáticos, e terminações nervosas e é responsável por nutrir e dar resistência à pele (RODRIGUES et al., 2019). É a partir das células tronco epiteliais residentes nos folículos pilosos e glândulas sebáceas que os queratinócitos se proliferam e migram para cobrir feridas em que a camada basal tenha sido lesada (GANTWERKER; HOM, 2011). Os fibroblastos macrófagos, mastócitos, células T, células dendríticas e células adiposas são residentes na derme, que é subdividida em apenas duas camadas: a papilar mais superficial e delgada onde as papilas dérmicas se conectam à epiderme, constituída por tecido conjuntivo frouxo; e a reticular mais espessa, com menor celularidade e tecido conjuntivo denso não modelado (com fibras colágenas dispostas em diferentes sentidos) o que confere resistência ao estiramento. As fibras elásticas conferem elasticidade à pele e estão presentes em ambas as camadas (RODRIGUES et al., 2019).

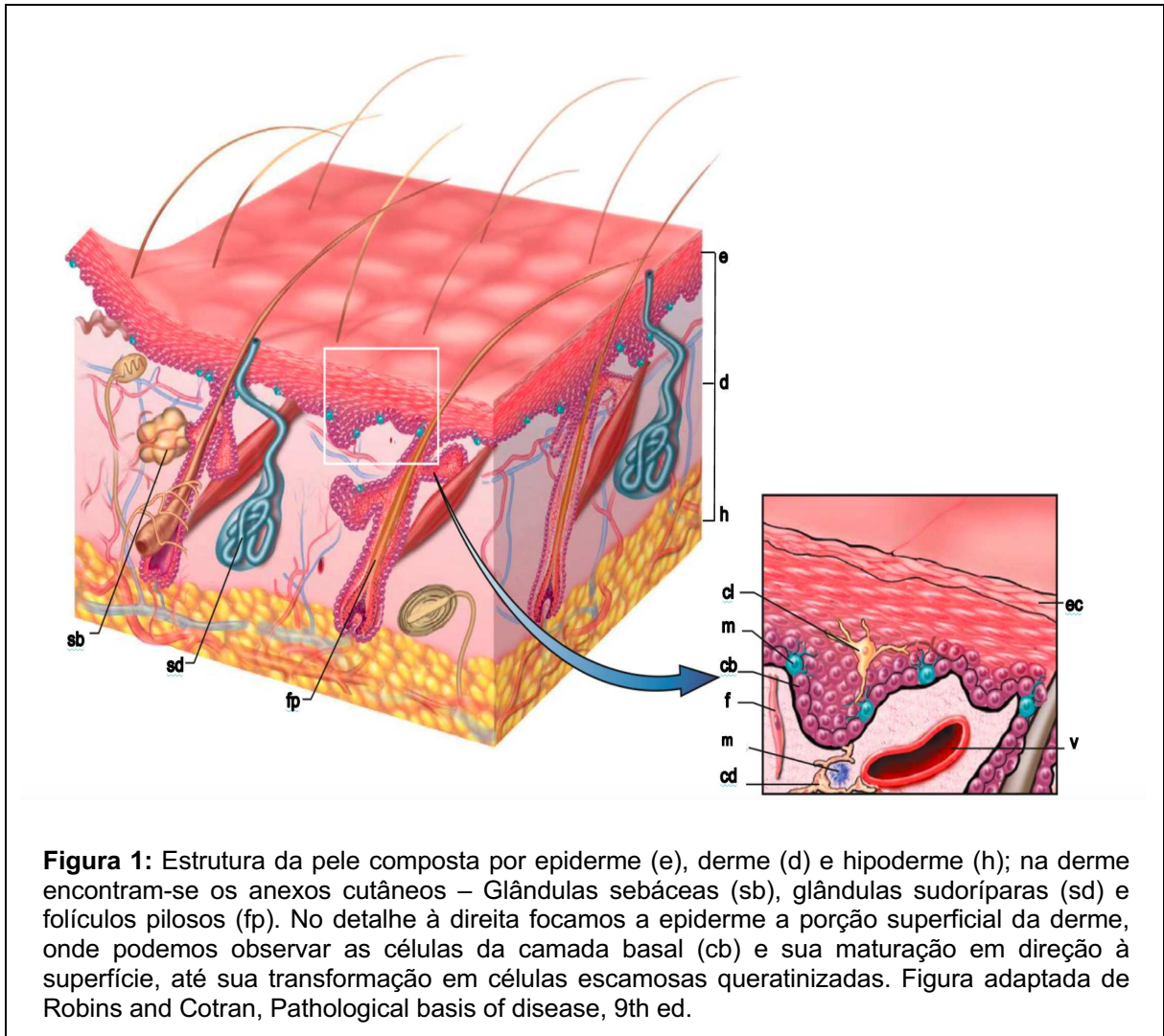
Os macrófagos residentes na derme, assim como as células de Langerhans na epiderme, têm origem embrionária no saco vitelínico e no fígado fetal e multiplicam para manter a população estável, porém sua substituição por células derivadas da medula óssea na vida pós-natal parece ser possível (DAVIES et al., 2013; GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2017; KLOC et al., 2019). Eles têm função sentinela imunológica e na manutenção da homeostase, e iniciam a resposta inflamatória e o recrutamento de células inflamatórias na ocorrência de um estímulo lesivo (MINUTTI et al., 2017). Quando estimulados, os monócitos são recrutados e se transformam em macrófagos teciduais ativados ao deixarem a circulação e migrarem para os tecidos. Existem muitos fenótipos possíveis de monócitos, classificados de acordo com os receptores de membrana expressos, uma combinação principalmente entre CCR2, CX3CR1 e LY6CL. Essa característica determina o tipo de ativação dos macrófagos, explicados de maneira simplista como pró-inflamatórios M1 ou resolutivos M2 (MURRAY, 2017). Em modelo de lesão cutânea utilizando-se camundongos jovens e saudáveis os macrófagos aparecem nas primeiras 24 – 48h, com pico próximo ao terceiro dia, diminuição a partir do dia 5 e retorno ao número basal no dia 10. Nesses animais a ferida costuma estar totalmente fechada no 14º dia, porém alterações no número, na capacidade funcional, ou na capacidade de interação dos macrófagos com as outras células levam a cicatrização deficiente (RODRIGUES et al., 2019). Modelos depletados de macrófagos apresentaram maior tempo de cicatrização, aumento compensatório de neutrófilos e redução na angiogênese, na formação de tecido de granulação, na deposição de colágeno e na liberação de fatores de crescimento (MIRZA; DIPIETRO; KOH, 2009). O oposto (aumento do número de macrófagos) acelerou a cicatrização tanto em modelos hígidos como em diabéticos (RODRIGUES et al., 2019). A contribuição das células dendríticas está relacionada à apresentação de antígenos ao sistema imunológico (WEISHEIT; ENGEL; KURTS, 2015) e das células T à produção de citocinas e fatores de crescimento (HAVRAN; JAMESON, 2010).

Os mastócitos são encontrados próximos à epiderme, aos vasos, folículos pilosos e nervos, onde podem ser facilmente ativados pelos estímulos externos ou endógenos (WELLER et al., 2006). Eles também têm origem embrionária no saco vitelínico (WOLF; GOODRIDGE, 2018) e são primariamente responsáveis por

reações alérgicas, porém sua presença estratégica e numerosa permite que participem em todas as fases da cicatrização e apresentem diferentes funções de acordo com o estímulo recebido (RODRIGUES et al., 2019). Não é claro se eles são subtipos diferentes ou se seu fenótipo é alterado durante a cicatrização e esse estudo é dificultado pelo fato de não serem células circulantes de fácil coleta (WULFF; WILGUS, 2013). A ativação mastocitária foi relacionada ao recrutamento de células inflamatórias após observações em lesões em mucosas e fetais. Observou-se que lesões ocorridas até o D15 da gestação em camundongos evoluem sem cicatrizes, enquanto as ocorridas a partir do D18 apresentaram maior degranulação dos mastócitos e formação de cicatriz. A injeção de lisados mastocitários na lesão do D15 induziu a formação de cicatriz e a sua eliminação no D18 a reduziu (WULFF et al., 2012). Wulff observou redução da fibrose cicatricial, possivelmente pela diminuição do número de neutrófilos recrutados em modelo depletado de mastócitos (WULFF; WILGUS, 2013). Em camundongos adultos saudáveis, parecem ter função de “ajuste fino” na cicatrização, interagindo com as demais células, pois adultos depletados de mastócitos apresentaram cicatrização no mesmo tempo que os controles (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; SHIOTA et al., 2010).

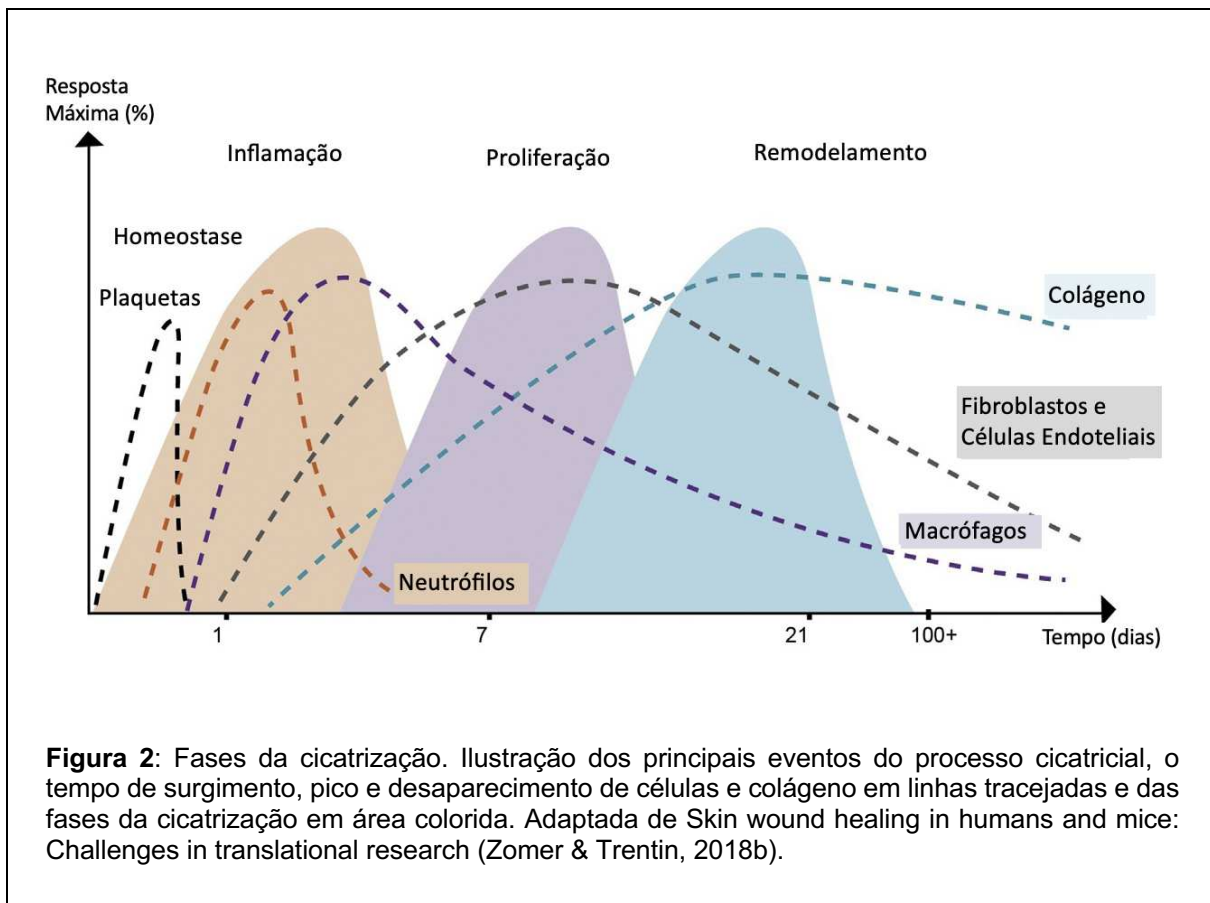
Os fibroblastos são células fusiformes de origem mesenquimal responsáveis por regular a renovação da MEC (LI; WANG, 2011). Quando estimulados pelo processo cicatricial produzem proteinases (ex. metaloproteinases de matriz) para degradar a matriz provisória enquanto secretam colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos, fibronectina, ácido hialurônico, além de fatores de crescimento e citocinas (NGUYEN; SOULIKA, 2019)

O tecido celular subcutâneo ou hipoderme é o tecido adiposo subjacente à derme composto principalmente por adipócitos, onde encontram-se neurônios sensoriais e vasos sanguíneos e escassos anexos cutâneos. Ele protege o corpo de alterações térmicas além de servir como reserva de fornecimento de energia e fatores de crescimento (RODRIGUES et al., 2019). A Figura 1 ilustra a estrutura das camadas da pele e suas principais células.



2.3 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é o reestabelecimento da continuidade da barreira cutânea após traumas, e é modulada pela extensão do dano celular, pelo tipo de tecido afetado e pela intensidade da lesão. Esse processo ocorre em uma sequência cronológica constante, orquestrados por elementos celulares e humorais atraídos para a área de acordo com a necessidade em cada momento. Apesar da coincidência de eventos, o processo cicatricial é didaticamente dividido em etapas com base nos aspectos macroscópicos e histológicos predominantes (Figura 2).



2.3.1 Fases da Cicatrização

2.3.1.1 Hemostasia

Imediatamente após a lesão, o sangramento é contido pela ação conjunta da constrição dos vasos lesados e das plaquetas. A vasoconstrição é mediada pela ação de endotelina (liberada pelas próprias células endoteliais lesadas), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), tromboxano A₂, catecolaminas circulantes (adrenalina, noradrenalina), serotonina e prostaglandinas liberadas pelas células lesadas (RODRIGUES et al., 2019).

As plaquetas são células granulares anucleadas circulantes e são as células mais atuantes nesse momento. Elas são atraídas ao local e ativadas pela exposição a agentes trombogênicos do endotélio vascular lesado causando aderência a outras plaquetas e à matriz subendotelial, formando o tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária. Sofrem alteração da conformação dos filamentos de actina do citoesqueleto, modificando sua forma discal para esférica com pseudópodes, facilitando o selamento do orifício do vaso lesado, impedindo o sangramento. A ativação também faz com que os grânulos com mediadores inflamatórios (Adenosina difosfato (ADP), serotonina, cálcio, histamina, integrinas) (MEDEIROS; MEDEIROS; FILHO, 2016) sejam liberados e tenham efeito também em desencadear a cascata da coagulação, para a formação do coágulo definitivo, uma vez que a hipóxia e acidose no local da ferida causariam vasodilatação reflexa e retomada do sangramento em 5 a 10 minutos (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; RODRIGUES et al., 2019).

O coágulo formado pela captura de células do sangue e proteínas na rede de fibrina (ABERTO BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005) preenche o leito da ferida e funciona como uma matriz provisória para a deposição das células inflamatórias atraídas ao local (MEDEIROS; MEDEIROS; FILHO, 2016). As plaquetas presas no tampão plaquetário liberam fatores de crescimento (PDGF, fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)) e citocinas mais intensamente nas primeiras horas, mas continuam secretando por até 7 dias, tendo efeitos também nas fases seguintes da cicatrização (RODRIGUES et al., 2019). As demais células

presentes no trombo também liberam fatores de crescimento e proteínas do complemento, criando um gradiente quimiotático capaz de orientar a continuidade da migração celular (ABERTO BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

2.3.1.2 Fase inflamatória

Após a hemostasia da ferida tem início a inflamação, com o propósito de limitar a infecção e a progressão da lesão. O pico de ação dos mediadores pró-inflamatórios como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) ocorre entre o primeiro e o terceiro dia, sendo evidentes os cinco sinais clássicos da inflamação (calor, rubor, tumor, dor e perda de função). A resposta aguda é gerenciada majoritariamente pelas células sentinelas residentes na pele, mas plaquetas, neutrófilos, células endoteliais e epiteliais também participam (KUMAR et al., 2015). Os macrófagos residentes são ativados por PAMPs e DAMPs e iniciam a produção de quimiocinas (CXCL-1/5/8, CCL-2), citocinas (TNF- α , IFN-gama, IL-1 β , IL-6, IL-33) e fatores de crescimento que iniciarão o recrutamento e a ativação das células inflamatórias (SIM et al., 2022). Todas as células presentes na área lesada também contribuem na produção de mediadores, respondendo de acordo com o estímulo recebido e suas características individuais. Também precocemente, os mastócitos liberam o conteúdo pré-formado de seus grânulos com mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, proteases e citocinas, com ação na coagulação e na circulação. A lentificação do fluxo sanguíneo e o aumento da permeabilidade capilar, decorrentes da dilatação dos vasos, e o aumento da expressão de proteínas de adesão pelas células endoteliais atraem células inflamatórias para a lesão. (BACCI, 2022; RODRIGUES et al., 2019; WULFF et al., 2012).

São recrutados inicialmente neutrófilos e monócitos, que amplificam a resposta inflamatória (KLOC et al., 2019). Apesar de não existirem na pele normal, os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação, migram rapidamente e passam a ser predominantes na lesão nos primeiros dois dias, chegando a constituir 50% do total de células (LEONI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019). Eles depositam-se na matriz provisória de fibrina e migram para preenchê-la, sendo responsáveis por remover restos celulares e eliminar possíveis microrganismos (DEMARQUOY; LE BORGNE, 2014). Atuam por fagocitose e armadilhas extracelulares, liberam grânulos tóxicos contendo enzimas líticas e proteínas granulares, contribuindo para instalação do estresse oxidativo e para a continuidade

da própria migração (NGUYEN; SOULIKA, 2019). Os neutrófilos produzem uma miríade de substâncias: proteases, mieloperoxidase, elastase, metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8), collagenase-2, integrinas, fatores de crescimento, defensinas, óxido nítrico (NO), TGF- β , citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e sofrem apoptose ao concluírem sua função de limpeza do leito da ferida (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016). A falha na eliminação dos neutrófilos pode levar a inflamação exacerbada e crônica e lesão tecidual, pelo estresse oxidativo prolongado e pela ação de proteases que degradam indiscriminadamente proteínas da matriz extracelular (MEC) e de outras importantes para o reparo tecidual (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; RODRIGUES et al., 2019). Eles têm vida curta na circulação, mas quando migram para os tecidos a apoptose é inibida e sobrevivem mais tempo, portanto sua contagem sanguínea não pode ser correlacionada com a evolução cicatricial (LEONI et al., 2015).

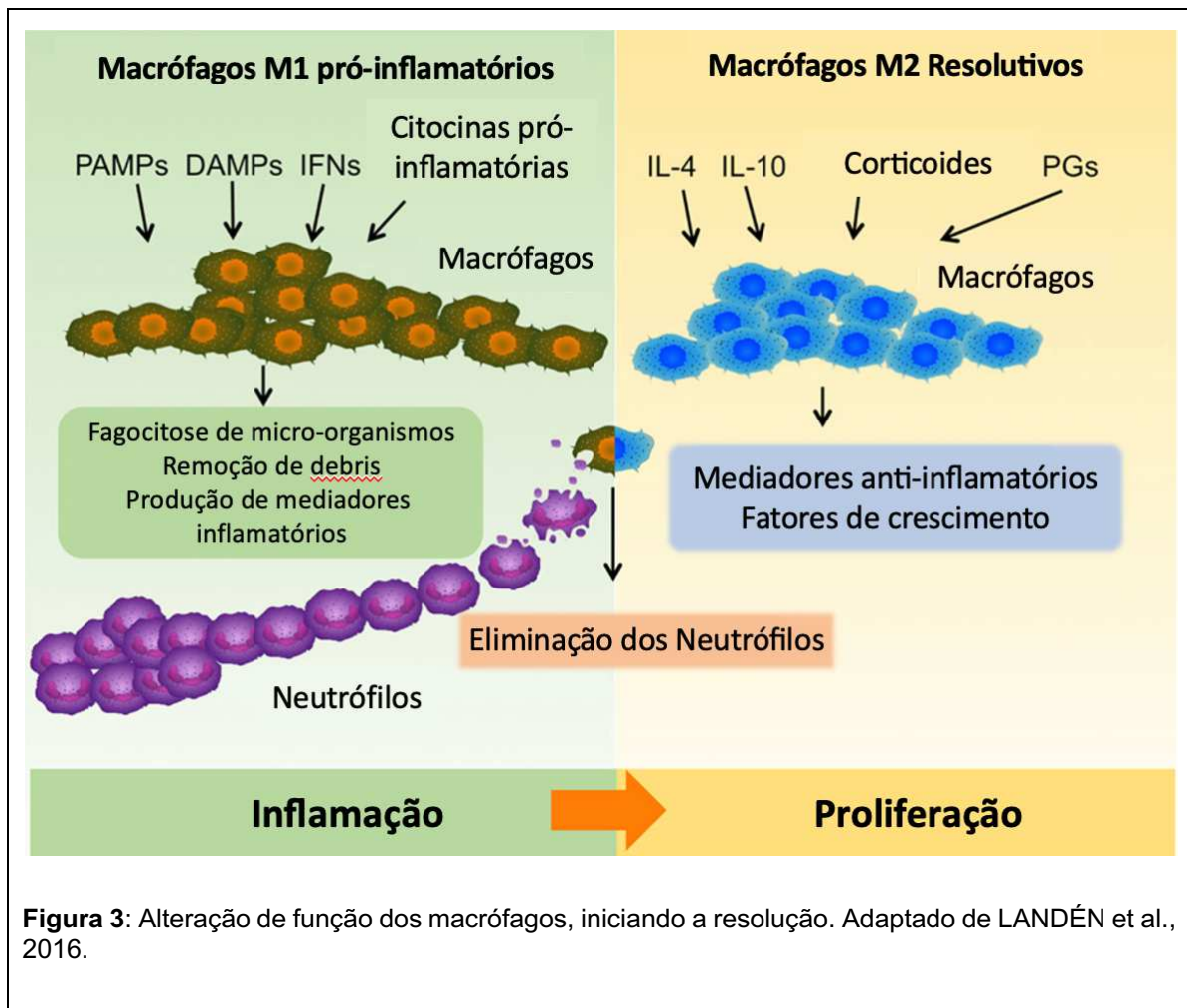
Quando são ativados em resposta a estímulos inflamatórios (IL-1, IFN-gama, PAMPs e DAMPs) os monócitos têm ação tipicamente inflamatória (simplificadamente chamados na literatura de M1 – ativação clássica) e expressam o padrão Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low}. Atuam concomitantemente aos neutrófilos, fagocitando e secretando mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, iNOS, espécies reativas de oxigênio (EROs)) (YADAV; DWIVEDI; TRIPATHI, 2022), porém a alteração das moléculas de adesão da superfície das células endoteliais favorece a migração de monócitos em detrimento de neutrófilos e eles passam a ser as células recrutadas em maior quantidade (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016). Macrófagos também apresentam antígenos ao sistema imune adaptativo através do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e sintetizam metaloproteinases (MMPs) permitindo a digestão do trombo para facilitar a sua própria migração (SIM et al., 2022). Por volta do terceiro ou quarto dia, após a intensa migração de células e a ferida estar consideravelmente livre de microrganismos e restos celulares, os neutrófilos sofrem apoptose e são eliminados por macrófagos num processo chamado eferocitose, ou retornam à circulação (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016). Esse é um dos gatilhos para a transição do fenótipo dos macrófagos indicando o início da fase proliferativa (KOTWAL; CHIEN, 2017; RODERO MP; KHOSROTEHRANI K, 2010; SIPKA et al., 2022).

2.3.1.3 Fase proliferativa

A transição da fase inflamatória para proliferativa é um momento decisivo nesse processo, pois apesar de necessária, a inflamação prolongada ou exacerbada pode ser prejudicial gerando tecido cicatricial excessivo ou inadequado (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016), além de contribuir para surgimento e manutenção de doenças. Observou-se que a resolução envolve a produção de mediadores pró-resolutivos que limitam a infiltração neutrofílica, recrutam monócitos não-flogísticos, promovem a remoção dos debris e microrganismos pelos macrófagos e a eliminação dos fagócitos por via linfática (SERHAN; CHIANG, 2013). Diferentemente do que se acreditava previamente, essa mudança parece depender da produção de mediadores específicos e não da diluição dos mediadores inflamatórios que deixam de ser secretados (SERHAN, 2014). Idealmente, a fase proliferativa ocorre com o aumento coordenado entre proliferação e migração de células epidérmicas, dérmicas, vasculares, nervosas, em um tecido de granulação adequadamente estruturado no leito da lesão, com apropriado suprimento de oxigênio e nutrientes. Esse processo é regulado por fatores de crescimento e possibilitado pela alteração no padrão de adesão celular (desativação de integrinas e ativação de proteases), permitindo que as células se desprendam da membrana basal e de células vizinhas e avancem em direção ao leito da ferida (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

A alteração do status da ferida parece ser induzida por um pico de prostaglandina E2 (PGE2) produzida por PMN apoptóticos, alterando a função da lipoxigenase (LOX), que desvia a produção de leucotrienos para a produção dos LPR (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas) (CHATTERJEE et al., 2014; LAGARDE; GUICHARDANT; BERNOUD-HUBAC, 2020; NORLING et al., 2011; REIS et al., 2017; SERHAN et al., 2015a). A presença de IL-4, IL-13, M-CSF, TGF- β induz a migração de macrófagos alternativamente ativados (também conhecidos de forma simplificada por M2), tipicamente LY6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} (KLOC et al., 2019). Os “M2” tornam-se as células mais abundantes na ferida e estimulam angiogênese, proliferação de fibroblastos e deposição de MEC pela produção de IL-10 e fatores de crescimento – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), TGF β , IGF1. Eles também são responsáveis pela produção dos lipídios pró-resolutivos maresinas

(MaRs), resolvinas (Rvs), e protectinas (LEONI et al., 2015). Tardiamente os M2 atuam na remodelação da MEC, balanceando a secreção de MMPs e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A diversidade de funções dos macrófagos nos diferentes momentos da cicatrização gera a dúvida se eles são subtipos celulares diferentes ou se possuem uma plasticidade de fenótipos e mudam de função de acordo com o estímulo (LEONI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019). A figura 3 ilustra as duas principais formas de ativação dos macrófagos.



Por volta do quinto dia a MEC ocupa grande parte do leito da ferida e funciona como estrutura para ancoragem de proteínas secretadas e por onde migrarão vasos e células, entre elas os fibroblastos, que passam a ser estimulados à proliferação (UD-DIN; WILGUS; BAYAT, 2020). Além da função estrutural, a MEC tem capacidade de

sinalização química e mecânica, criando gradientes quimiotáticos e controlando o comportamento das células migratórias (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Ocorre a gradual substituição da MEC por tecido de granulação, composto por macrófagos, fibroblastos, vasos neoformados, suportados por uma rede frouxa formada pelos produtos dos fibroblastos, mimetizando parcialmente a estrutura da pele lesada. Esse tecido é edemaciado, com estruturas dispersas, friável, com vasos imaturos exsudativos e facilmente rompidos.

Os fibroblastos se proliferam e passam a ser as células predominantes durante a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, aumentando a síntese de colágeno. Os fibroblastos das margens da lesão, por ação do TGF- β 1, passam a expressar actina (α -smooth muscle actin – α -SMA) e passam a ter ação contrátil semelhante à musculatura lisa, são os miofibroblastos (LEONI et al., 2015). Miofibroblastos são células transitórias, se ligam às fibrilas colágenas e de fibronectina através de suas integrinas e os tracionam para a posição perpendicular à borda causando contração da ferida com intuito de aproximação das bordas, mas continuam sintetizando MMPs e seus respectivos inibidores TIMPs (DARBY et al., 2014). Serão eliminados da ferida por apoptose uma vez que a integridade tecidual tenha sido suficientemente recuperada (RODRIGUES et al., 2019).

Nessa fase os mastócitos liberam FGF2, VEGF, TGF- β 1 e promovem a proliferação de vários tipos celulares (células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos) (MOUSAVI et al., 2022; WELLER et al., 2006). Eles também produzem enzimas proteolíticas capazes de degradar a MEC (MMP, ex. MMP-9) e permitir o remodelamento dos tecidos cicatriciais (WELLER et al., 2006). Os queratinócitos da camada basal da epiderme possuem potencial mitótico latente, inibido pelo contato existente entre as células ("inibição por contato"). Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram em processo mitótico, porém, esse processo só será eficaz quando o tecido de granulação fornecer um substrato que permita o adequado deslocamento celular (LEONI et al., 2015). A partir do segundo dia os queratinócitos da membrana basal e as células tronco dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas próximas ao local começam a se proliferar intensamente. Esse processo continua até que haja novamente contato entre as células e conseqüente inibição da multiplicação celular. A epitelização é autorregulada

por mediadores como óxido nítrico, citocinas, fatores de crescimento (epitelial - EGF, de fibroblastos - FGF, neuronal - NGF, vascular - VEGF, semelhante à insulina - IGF-1) (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; LEONI et al., 2015; SORG; KRUEGER; VOLLMAR, 2007).

Quando ocorre o fechamento da ferida, a proliferação celular diminui, os fibroblastos aumentam a secreção de colágeno até a formação de um tecido conjuntivo mais resistente (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016), concomitantemente, o endotélio dos vasos presentes torna-se mais eficaz, deixando o tecido de granulação menos friável (RODRIGUES et al., 2019).

2.3.1.4 Fase de remodelamento

A fase final cursa com a reorganização do material depositado, visando maior resistência e semelhança com o tecido original (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; REINKE; SORG, 2012; RODRIGUES et al., 2019). O tecido conjuntivo resultante ao final da fase proliferativa é composto basicamente por fibroblastos (fusiformes praticamente inativos), colágeno denso, fragmentos de tecido elástico (KUMAR et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019; SINGER; CLARK, 1999). Segue-se a regressão dos vasos e reconstituição do tecido conjuntivo por tecido cicatricial, lise do colágeno tipo III e síntese do tipo I, mais forte e organizado.

Esse estudo tem como foco as fases inflamatória e proliferativa, dessa forma a fase de remodelamento é apresentada de forma breve.

2.3.2 Mediadores

Os mediadores inflamatórios são moléculas responsáveis por coordenar e modular o processo cicatricial, através da ativação e indução de diferenciação celular, são produzidos e liberados por células presentes no local da lesão. Podem ter ação inflamatória ou resolutive e incluem principalmente as citocinas, quimiocinas, eicosanoides, fatores de crescimento, e os LPRs. Os principais mediadores pró-inflamatórios são as citocinas, as quimiocinas e os eicosanoides. Fatores de crescimento e LPRs são basicamente resolutivos, assim como algumas citocinas (BRYAN et al., 2005).

Citocinas são proteínas que afetam o comportamento de células próximas a célula que a produziu (ação parácrina), das próprias células produtoras (ação autócrina) ou de células distantes (ação endócrina). Incluem as interleucinas, linfocinas, fatores estimuladores de colônias e várias outras moléculas sinalizadoras como TNF- α , TNF- β , interferons. Algumas tem ação inflamatória (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF α), atraindo células inflamatórias e estimulando a coagulação (VARELLA; FORTE, 2001). Outras atuam limitando a resposta inflamatória, restringindo a

migração de células inflamatórias (IL-10) e estimulando a proliferação de queratinócitos e fibroblastos.

A IL-1 β é uma das citocinas inflamatórias mais precoces na ferida, produzida principalmente por células imunes e atuante sobre praticamente todos os tipos celulares através do receptor IL-1R1, onde também atua a IL-1 α (PYRILLOU; BURZYNSKI; CLARKE, 2020). A forma clássica de atuação é a ativação da pro-IL-1 β armazenada pela Caspase-1 (que por sua vez é ativada pela formação do inflamossomo – proteína ASC + receptor de reconhecimento de padrão (PRR), sendo o NOD like (NLR) o típico dessa via + pró-caspase-1), com a liberação da IL-1 β ativa. Essa tem ação na proliferação, diferenciação e apoptose celular, ativação da COX-2, causando dor e febre (PYRILLOU; BURZYNSKI; CLARKE, 2020). Existem formas alternativas de ativação, tanto por outras proteínas quanto por outros receptores (KANEKO et al., 2019). Também há outras formas de liberação da IL-1 β da célula, dependentes da intensidade do estímulo, podendo causar morte da célula secretora quando são formados poros na membrana e alteração do gradiente iônico (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Algumas células (linfócitos B, polimorfonucleares) expressam também o IL-1R2, que não inicia a transdução de sinal normalmente, sendo necessária grande quantidade de IL-1 para ativá-lo (KANEKO et al., 2019).

TNF- α também tem grande papel na inflamação, estimulando a expressão de genes inflamatórios e induzindo indiretamente apoptose, é produzido principalmente por macrófagos e linfócitos T e atua em praticamente todos os tecidos através dos receptores TNFR1 e TNFR2 (JANG et al., 2021). É encontrado na circulação em sua forma solúvel, após ser liberado do seu precursor transmembrana por ação da enzima conversora de TNF- α (TACE) (JANG et al., 2021). O TNFR1 é expresso na maioria dos tecidos e sua ativação estimula a formação de complexos de sinalização, os tipos I, IIa, IIb e IIc. O tipo I é formado na membrana celular para ativar as vias de transcrição proteica NF- κ B (fator nuclear kappa B) e MAPK1 (proteína quinase ativada por mitógenos), causando proliferação celular e inflamação. Os complexos II são formados no citoplasma e culminam com a morte da célula produtora. TNFR2 é expresso em células imunes e somente liga à forma transmembrana, necessitando de interação celular para ser ativado, tem maior função na homeostase, e quando ativado não causa morte celular (JANG et al., 2021).

Dentre os mediadores anti-inflamatórios destacam-se os fatores de crescimento e a citocina IL-10. Os fatores de crescimento são um grande grupo e tem ação através de quimiotaxia, estímulo de mitose em células quiescentes, angiogênese, síntese e degradação da MEC. São exemplos PDGF, EGF, IGF, VEGF, FGF, TGF- β . Os membros da família PDGF são secretados por plaquetas, macrófagos, endotélio vascular, fibroblastos, queratinócitos e tem efeito estimulador de mitose em células de origem mesenquimal (BAE; PARK; KIM, 2014). EGF, TGF, FGF são secretados principalmente por macrófagos para promover migração e proliferação de fibroblastos. Macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e musculares secretam VEGF estimulando angiogênese (BAO et al., 2009). IGF parece estimular mitose em queratinócitos e produção de MEC pelos fibroblastos (ACHAR et al., 2014). FGFs têm amplo espectro de ação mitogênica, estimulam a proliferação de células de origem mesodérmica, ectodérmica e endodérmica e de vários tipos celulares presentes no tecido lesado, incluindo fibroblastos e queratinócitos. Representa um grupo de mediadores, do qual faz parte o fator de crescimento de queratinócitos (KGF ou FGF-7) produzido precocemente por fibroblastos causando aumento na expressão de peroxirredoxina-6 e Nrf2 (fator nuclear derivado de eritróide 2) em células epiteliais. Nrf2 é via reguladora de moléculas antioxidantes e está diretamente relacionado à proteção de dano oxidativo. O aumento significativo de Nrf2 em queratinócitos e macrófagos foi descrito em lesões murinas, mas curiosamente sua ablação não causou prejuízos na cicatrização (BEHM et al., 2012).

TGF- β é secretado pela maior parte das células presentes no tecido de granulação (plaquetas, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos), atuando em todas as fases da cicatrização, na degradação, síntese e deposição dos componentes da MEC (KUMAR et al., 2015; PARK; HWANG; YOON, 2017). O principal alvo da ação do TGF- β são os fibroblastos, mas também tem ação sobre macrófagos, leucócitos, queratinócitos e células endoteliais. Há três tipos de TGF- β descritos, TGF- β 1, 2 e 3. As 3 formas são sintetizadas como proformas, processadas e secretadas em forma inativa, necessitando ativação no local de ação para ligarem ao receptor TGFR2, que recruta o TGFR1 (também chamado ALK), que por sua vez fosforila os Smads (proteínas transdutoras de sinais). Os Smads regulados por receptor (RSmads) 1, 2,

3, 5 e 8 ligam a domínios específicos e ao Co-Smad-4, responsável por transportar o complexo ao núcleo celular, para iniciar a transcrição proteica. Os Smads 6 e 7, quando ativados inibem a ação dos RSmads (FINNISON et al., 2013). A via de Smads é a clássica de ação do TGF- β , porém também parece agir em outras vias, inclusive das MAPK1 e NF- κ B (KUBICZKOVA et al., 2012). Além disso, o TGF- β representa uma família ainda maior de mediadores, com estrutura e função relacionadas, subdividida em 2 grupos de acordo com o receptor (ALK) ao qual se ligam e o grupo de (Smads) que ativam. O primeiro grupo é formado por BMP (proteína morfogênica óssea), GDF (fator de crescimento e diferenciação) e MIS (substância inibitória Mülleriana), que se ligam aos ALK-1, 2, 3 ou 6 e ativam os Smad-1, 5 e 8. O Segundo grupo contém TGF- β , activina e fator Nodal que se ligam aos ALK4, 5, e 7, e ativam os Smad-2 e 3 (FINNISON et al., 2013).

O TGF- β 1 é o mais prevalente, é relacionado ao estímulo de produção de MEC e expressão de α -SMA em fibroblastos causando sua diferenciação em miofibroblastos, associados ao desenvolvimento de fibrose cicatricial. A sua falta, contudo, pode levar à dificuldade cicatricial, além do desbalanço nas funções na homeostase, podendo deixar de suprimir tumores e autoimunidade (MOKOENA et al., 2018). O TGF- β 3 atua mais precocemente e parece induzir a cicatrização sem fibrose excessiva, tendo ação oposta à TGF- β 1 em estudos pré-clínicos (LICHTMAN; OTERO-VINAS; FALANGA, 2016). Essa diferença ser explicada pela diferença na forma de ligação ao Smad4 (LICHTMAN; OTERO-VINAS; FALANGA, 2016). O bloqueio da ação do TGF β 1 reduziu a fibrose cicatricial, porém a função exata dos subtipos persiste controversa (EMING; KRIEG, 2006; FRANGOIANNIS, 2020; GROSE; WERNER, 2004).

A família IL-10 corresponde a três grupos de interleucinas, que compartilham estrutura e vias de sinalização semelhantes, produzidas principalmente por células do sistema imune inato e adaptativo, havendo indícios de sua produção também por queratinócitos ativados (KING et al., 2014). A IL-10 é o único membro do primeiro grupo, tendo como função prevenir os danos da inflamação descontrolada principalmente em monócitos e macrófagos. Tem ação supressora na expressão de genes imunomoduladores em células mieloides pela inibição da liberação das citocinas inflamatórias, da apresentação de antígenos, da fagocitose e da ação

fibrogênica do TGF- β (KING et al., 2014; OUYANG; O'GARRA, 2019; SUBRAMANIAN IYER; CHENG, 2012). O segundo grupo contém as IL-19, IL-20, IL-22 IL-24 e IL-26, e o terceiro, IL- 28A, IL-28B, e IL-29 com ações semelhantes aos IFNs (OUYANG; O'GARRA, 2019). A produção de IL-10 é ativada pelos PRRs (receptores de reconhecimento de padrão) e citocinas inflamatórias e sua ação se dá pela ligação ao receptor heterodimérico IL-10R1 / IL-10R2 e à ativação da via de sinalização STAT3. STAT3 fosforilado é translocado ao núcleo celular para ativar genes alvo, porém IL-10 também usa outras vias comuns de sinalização como as MAPKs e NF-kB (OUYANG; O'GARRA, 2019) e pode se autorregular de forma autócrina ativando o STAT3 (KING et al., 2014).

Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais também produzem IL-6, com função em todas as fases da cicatrização. IL-6 promove o recrutamento de células inflamatórias, estimula a proliferação de fibroblastos, tem ação sobre a expressão de moléculas de adesão e a angiogênese. Liga-se ao receptor IL-6Ra ativando a via STAT-JAK (STAT, transdutores de sinal e ativadores de transcrição e JAK, Janus kinase), que induz a produção de IL-1, TGF- β e VEGF (BEHM et al., 2012). Curiosamente a IL-6 também usa a via STAT-3, com efeitos opostos à IL-10 (SUBRAMANIAN IYER; CHENG, 2012).

As quimiocinas são citocinas com capacidade quimiotática para recrutamento de células imunes induzindo a expressão das moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular-1 – ICAM, molécula 1 de adesão celular vascular 1 - VCAM-1, selectina E- SELE) na superfície das células alvo. Desta forma intermediam a aderência das células à parede dos vasos, facilitando a migração para a lesão (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Eicosanoides são mediadores derivados de lipídios, produzidos pelas células imunes e participam do início ao final da inflamação. A maioria é proveniente do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo (AG) mobilizado dos fosfolipídios da membrana citoplasmática pela ação da fosfolipase e metabolizado pela via da cicloxigenase (COX), com ação pró-inflamatória. O AA forma as prostaglandinas (PG), os tromboxanos (TX) e as prostacilinas (PGI). Quando a rota metabólica lipoxigenase (LOX) é ativada ocorre a síntese de leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX). Embora a maioria dos tecidos seja capaz de sintetizar os intermediários PGG2 e PGH2 a partir

do AA livre, o destino destes intermediários varia em cada tecido e depende das enzimas existentes.

As prostaglandinas, são produzidas pelos mastócitos, macrófagos, células endoteliais através da ação da ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2. PGE2 quando em associação com LTB4 ou C5a (do sistema complemento) reforça a inflamação (SERHAN; CHIANG, 2013) induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, estimulando o extravasamento de PMN, causando vasodilatação e dor (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Posteriormente, as PGE2 e PGD2 iniciam o processo resolutivo induzindo mudança de classe dos mediadores lipídicos para ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas. PGE2 também mostrou efeito em aumentar a proliferação e migração dos queratinócitos, facilitando a transição para a fase resolutiva (YASUKAWA; OKUNO; YOKOMIZO, 2020). PGD2 aumenta a adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intracelular em algumas células e pode ter ações anti-inflamatórias. Os produtos de sua degradação não enzimática podem favorecer a resolução atuando em mecanismos apoptóticos e de eliminação de macrófagos pela inibição da ativação do fator nuclear kB (NF-κB) (SERHAN; CHIANG, 2013).

Tromboxanos são produzidos por plaquetas e são vasoconstritores na circulação sistêmica, mas vasodilatadores na circulação pulmonar, tem potente ação hipertensiva e promovem a agregação plaquetária. Prostaciclina são sintetizadas pelas células endoteliais e tem ação vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. Leucócitos secretam leucotrienos, substância quimiotática para neutrófilos (YASUKAWA; OKUNO; YOKOMIZO, 2020), e lipoxinas. As lipoxinas são os primeiros lipídios resolutivos produzidos, quando passam a substituir os leucotrienos com a evolução do processo cicatricial, e inibem o recrutamento de células inflamatórias (SERHAN; CHIANG, 2013; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). A importância dos estudos dos eicosanóides na inflamação se dá ao fato de usarem as mesmas enzimas e rotas metabólicas dos LPRs, ilustrado na figura 4.

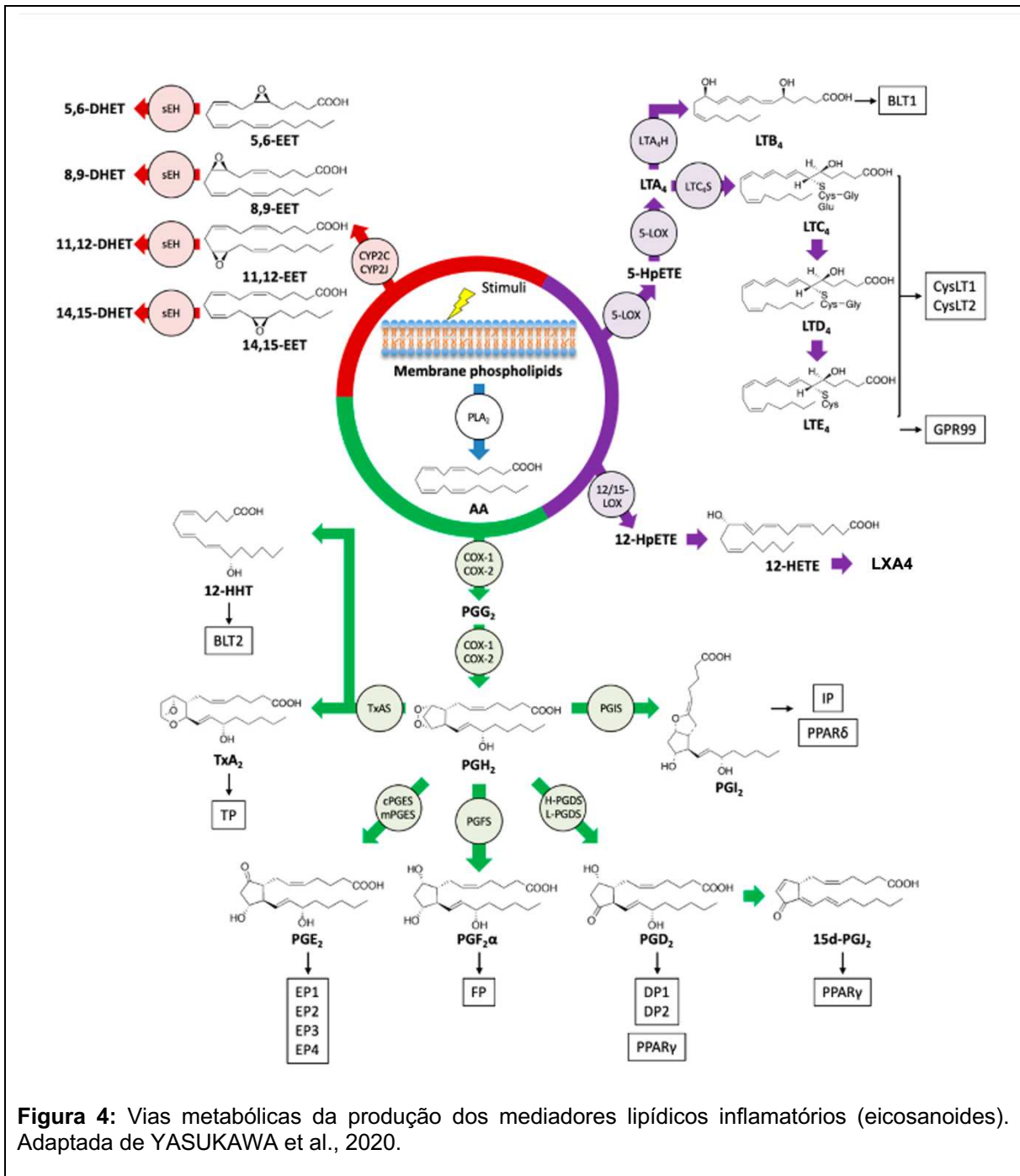


Figura 4: Vias metabólicas da produção dos mediadores lipídicos inflamatórios (eicosanoides). Adaptada de YASUKAWA et al., 2020.

2.4 LIPÍDIOS PRÓ-RESOLUTIVOS

A partir do estudo dos exsudatos resolutivos em modelos animais com inflamação autolimitada, foram descobertos produtos bioativos derivados dos ácidos graxos essenciais, chamados lipídios pró-resolutivos (LRPs). São as lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas. Esses LPRs já foram descritos em células de peixes e parecem ser preservados pelas espécies (SERHAN et al., 2015b). Para melhor compreensão do fármaco em estudo segue uma revisão sobre a estrutura dos lipídios e suas rotas metabólicas.

Os ácidos graxos são os lipídios mais abundantes no corpo humano. Apresentam-se em forma esterificada com glicerol, como ésteres de colesterol e em menor quantidade, como ácidos graxos livres. A estrutura geral é de uma cadeia metil (-CH₃) terminal, hidrocarbonada alifática, hidrofóbica, e uma extremidade hidrofílica, constituída por um grupo carboxila (-COOH). São classificados de acordo com o número de carbonos na cadeia, e com a presença de ligações duplas entre os carbonos. Os AG de cadeia curta tem entre 2 e 4 carbonos, média entre 6 e 10, longa entre 12 e 18, e muito longa acima de 18. Aqueles com uma ou mais ligações duplas entre carbonos são insaturados (monoinsaturados ou poli-insaturados), e os que tem todas as ligações de carbonos preenchidos com átomos de hidrogênio são os saturados. São importante fonte de energia para o corpo, além das funções estruturais (constituintes das membranas celulares) e biológicas (participação em rotas metabólicas) (MARTINHO, 2016). Os AG essenciais são necessários para as funções orgânicas, mas não produzidos pelos mamíferos e precisam ser obtidos a partir da dieta e esterificados em fosfolipídios (DEMARQUOY; LE BORGNE, 2014). Dentre os ácidos graxos as famílias ômega-3 e ômega-6 são de grande importância, são AG poli-insaturados de cadeia muito longa e sua diferença encontra-se na posição da primeira insaturação a partir do grupo metil, no terceiro e sexto carbono, respectivamente. São chamados de maneira simplificada na literatura atual de n-3 e n-6 (MARTIN et al., 2006).

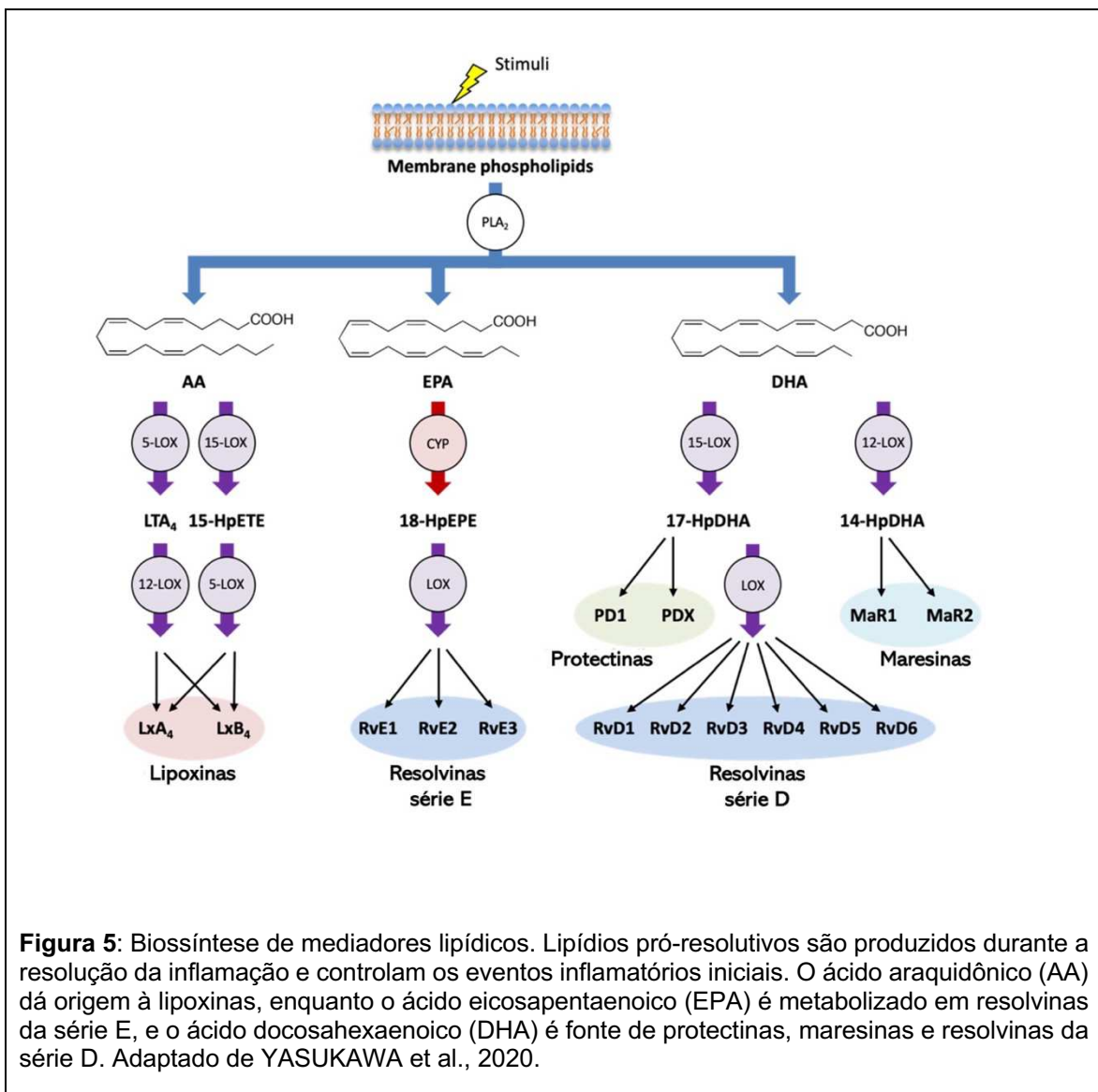
Em linhas gerais, os produtos do metabolismo do n-3 têm comportamento anti-inflamatórios e pró-resolutivos e os do n-6, pró-inflamatórios, porém, ambos competem pelas mesmas rotas enzimáticas (COX, LOX e do citocromo P450 - CYP).

Desta forma, capacidade do organismo humano para converter os AG essenciais em subprodutos ativos é limitada, e a produção de um ou outro pode depender não só do estímulo recebido, como da disponibilidade dos precursores. O metabolismo do n-3, após ativação pelas fosfolipases intracelulares, dá origem aos ácidos α -linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), que direcionados a via da LOX produzem as resolvinas da série E (EPA), protectinas, resolvinas da série D e maresinas (DHA). O AA, quando direcionado a via da LOX produz as lipoxinas, lipídio com potencial pró-resolutivo (FATTORI et al., 2020; LAGARDE; GUICHARDANT; BERNOUD-HUBAC, 2020). A figura 5 ilustra as principais vias metabólica dos LPR.

Vários estudos demonstraram o efeito protetor celular dos LPRs, relacionando seu efeito à inibição da resposta ao estresse oxidativo com a produção de antioxidantes (WANG et al., 2020) e ao bloqueio da transcrição da IL-1 β induzida pelo TNF- α , limitado a inflamação (HERRERA et al., 2015). Os LPRs também têm demonstrado papel no controle da infecção (resolução total ou com ação adjuvante aos antibióticos) (JORDAN; WERZ, 2022) e no tratamento da dor, por ações central e periférica (XU et al., 2010). Menon demonstrou redução do infiltrado neutrofílico e epitelização em menor tempo no grupo tratado topicamente com RvE1, RvD1 e RvD2 exógenas em modelo murino de lesão cutânea (MENON, 2012). A ação da aspirina inativa irreversivelmente as vias metabólicas da COX, limitando seus produtos (eicosanoides) (RATCHFORD et al., 2017), e facilitando a produção de lipoxinas (SERHAN, 2007). Porém também pode acetilar um resíduo sérico da COX-2 tornando sua ação semelhante à da lipoxina, e dessa forma possibilitar a síntese de epímeros de LPRs conhecidos por *aspirin-triggered* (AT) (BALAS et al., 2014; DEMARQUOY; LE BORGNE, 2014; SERHAN et al., 2002).

A coincidência das rotas metabólicas dos eicosanoides e dos lipídios pró-resolutivos instigou o questionamento se o aumento do precursor poderia desviar a produção em favor de LPR (HARTLING et al., 2021; LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016), levando Komprda a estudar o efeito da suplementação oral de EPA e DHA sobre a cicatrização. Ele observou aumento de parâmetros inflamatórios após suplementação de EPA e melhora da cicatrização com DHA (KOMPRDA et al., 2020), reafirmado por outro modelo que também mostrou melhora dos parâmetros cicatriciais com a

suplementação proporcionalmente maior de n-3 em relação a n-6 (HOKYNKOVÁ et al., 2022). Contudo, Schebb acredita que apenas os macrófagos M2 teriam real capacidade de produção de LPR em quantidade significativa, e mesmo com suplementação de n-3, a via COX e a produção de inflamatórios seria sempre prioritária (SCHEBB et al., 2022). Os estudos são recentes e ainda não há consenso que possibilite a recomendação da suplementação oral em larga escala.



2.4.1 PD1

A Protectina D1 ou 17S-protetina D1 (ácido 10R,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenóico), uma protectina da série D (derivado do DHA), foi o primeiro composto dessa família identificado em 2002, tendo seu mecanismo de biossíntese descrito em 2003. Foi inicialmente isolada em neurônios murinos e em células microgliais e sanguíneas humanas, mostrando efeito protetor em tecidos do sistema nervoso, sendo denominada neuroprotectina (SERHAN et al., 2002). Posteriormente, foi identificada em neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e células pigmentares da retina, demonstrado um amplo espectro de ações biológicas fora do SNC e passando a ser chamada apenas de Protectina D1 (SERHAN et al., 2006). PD1 é biosintetizada por lipoxigenação seguida pela formação de epóxidos nos carbonos 16,17, pelas células mononucleares do sangue periférico humano e por células T helper 2 (BALAS et al., 2014).

A PD1 é um agente anti-inflamatório e pró-resolutivo, que age através do receptor GPR37 presente em macrófagos (BANG et al., 2018). PD1 reduz a migração de neutrófilos, previne a apoptose de células expostas ao estresse oxidativo, aumenta a taxa de epitelização, reduz sequelas nas lesões térmicas, tem efeito protetor renal, cardiovascular, pulmonar e tem ação potencializada pela aspirina *in vitro* (SERHAN et al., 2015b). Também reduz a dor inflamatória inativando micróglia e astrócitos e inibe a translocação nuclear de NF- κ B e posterior liberação de TNF- α , IL-1 β , e IL-6 nos neurônios nociceptivos centrais e periféricos (SERHAN et al., 2015a). PD1 potencializa a transformação e a ação dos M2 e aumenta a liberação de β -endorfinas (DEMARQUOY; LE BORGNE, 2014).

2.4.2 PDX

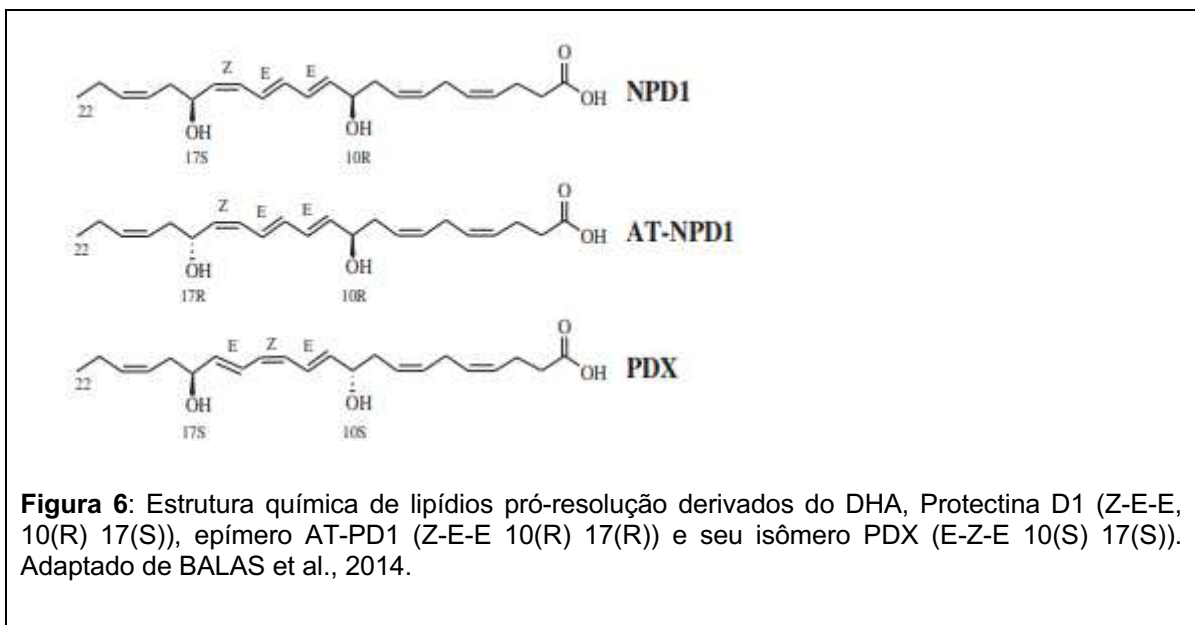
A Protectina DX (PDX ou (ácido 10(S),17(S)Dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenóico)), um estereoisômero da PD1. Apesar de pertencerem à família das protectinas, PD1 e PDX são distintas em sua estrutura e biossíntese, desta forma tem diferentes potência e bioatividade em células alvo. A

diferença estrutural está na dupla ligação no trieno conjugado (E,Z,E na PDX e E,E,Z na PD1) e na configuração assimétrica do carbono 10 (S na PDX e R na PD1), ilustrada na figura 6 (BALAS et al., 2014; CHEN et al., 2009). PDX é obtida a partir da dupla lipoxigenação do ácido docosahexaenóico e foi encontrada endogenamente em pequenas quantidades em modelo murino de peritonite (SERHAN et al., 2006). PDX tem menor potência anti-inflamatória em comparação à PD1 (BALAS et al., 2014) e maior ação antiagregante plaquetária subsequente à exposição ao colágeno (TSAI et al., 2021). Ambas protectinas são catalisadas pelas lipoxigenases, h15-LOX-1 em macrófagos sintetiza PD1, e até o momento não é conhecida isoenzima LOX humana que sintetize PDX (TSAI et al., 2021). Assim como ainda não é conhecido receptor específico no qual se ligue, embora os estudos de Hu e Yang apontem ação sobre os receptores ALX e DP1 (HU et al., 2022; YANG et al., 2020).

Em diferentes modelos de doença, PDX tem apresentado os efeitos pró-resolutivos comuns aos LPRs. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado a limitar o progresso da inflamação interferindo na ativação dos macrófagos, inibindo a agregação plaquetária, a atividade da COX, a infiltração de neutrófilos e a formação de espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2020). PDX inibiu a agregação plaquetária induzida por exposição do colágeno, tanto através da inibição da COX-1 como por ação inibitória direta nos receptores de tromboxano (CHEN et al., 2011). Teve efeito antioxidante reduzindo a produção de EROs e a liberação de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos estimulados *in vitro* (LIU et al., 2014), e aumentando a síntese de proteínas como catalase e superóxido dismutase, por aumento da fosforilação da AMPK (HWANG et al., 2019). Mostrou ação anti-inflamatória suprimindo a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNO) (WHITE et al., 2014), inibindo as vias da COX-1 e COX-2 sem afetar a LOX-5 (LIU et al., 2014), promovendo a fosforilação do AMPK reduzindo a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (JUNG et al., 2018; PIAO et al., 2020), restaurando o equilíbrio Treg/Th17 pela inibição NLRP3 do inflamossomo (JIN et al., 2021).

PDX foi protetor em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos, inibindo citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e aumentando a liberação de IL-10 (TAN et al., 2018). Promoveu a drenagem do fluido alveolar através da via ALX/cAMP (ZHUO et al., 2018) e reduziu a fibrose pulmonar pela

infiltração das células inflamatórias e deposição excessiva de matriz extracelular e colágeno no modelo induzido por bleomicina (LI et al., 2017). Também melhorou edema, fibrose e epitelização pulmonar e reduziu a produção de EROs em modelo de SARA (síndrome da angústia respiratória aguda) (HU et al., 2022; YANG et al., 2020). Melhorou a resistência à insulina em modelo de diabetes e obesidade (JUNG et al., 2018; WHITE et al., 2014). Reduziu a mortalidade em modelo murino de sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP), no qual animais tratados com (300 ng) sobreviveram mais e tiveram maior proporção de macrófagos resolutivos que o grupo controle (XIA et al., 2017). Reduziu a dor em modelo de hérnia de disco por via intratecal (ZHAO et al., 2022), mas não teve o mesmo efeito em modelo de inflamação de pata (FONSECA et al., 2017). PDX foi a primeira protectina comercialmente disponível (BALAS et al., 2014) e mostrou potencial terapêutico em vários modelos de doença, mas ainda não foram publicados estudos sobre seu efeito em modelo de cicatrização cutânea. Tentar induzir os macrófagos a essa mudança de comportamento parece ser uma opção terapêutica promissora (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016).



2.5 MODELOS DESCRITOS NA LITERATURA

Com relação ao estudo da cicatrização das feridas cutâneas, as principais diferenças entre os camundongos e os humanos são a espessura da pele (humano 2-3mm, camundongo 0,4-1mm) e a presença do panículo carnoso no camundongo. O panículo carnoso é uma camada muscular sobre a qual a pele desliza facilmente, determinando o padrão de cicatrização primariamente por contração. No humano a pele é mais aderida aos planos profundos e o padrão de cicatrização é granulação e epitelização (GRAMBOW et al., 2021). A organização estrutural, a constituição celular e a função, contudo, são muito semelhantes nas duas espécies (WEI et al., 2017). Atentar à essas diferenças torna mais fácil o entendimento de como essas informações poderiam ser aplicadas ao ser humano. A dificuldade na análise da contração da ferida não inviabiliza o estudo dos demais aspectos moleculares e celulares.

Os modelos experimentais continuam tendo utilidade por permitem a reprodução dos processos fisiológicos, como o recrutamento de células, a produção de mediadores químicos, a divisão celular, o depósito de substâncias, a evolução temporal e a coincidência dos eventos (GRAMBOW et al., 2021). Embora os animais sejam amplamente utilizados no estudo de feridas e cicatrização, não existe consenso com relação ao modelo ideal de lesão cutânea aguda. Nos estudos publicados há diversidade quanto aos instrumentos utilizados para produzir a lesão, ao tamanho e número de lesões por animal e aos métodos de avaliação da evolução da lesão. Alguns pesquisadores utilizam artefatos para imobilizar as bordas das feridas excisionais na tentativa de driblar a contração da ferida, nem sempre com sucesso. Outros localizam as lesões em áreas não móveis como nas orelhas, onde a pele é aderida à cartilagem subjacente e não permite contração, essa última geralmente em coelhos, porém são animais mais caros e com menor disponibilidade de reagentes (GALIANO et al., 2004). Os camundongos são mais amplamente utilizados pela facilidade de manuseio, baixo custo de manutenção e ampla disponibilidade de reagentes, além da possibilidade de manipulação genética (FANG; MUSTOE, 2008; SAEED; MARTINS-GREEN, 2022).

É bem estabelecido o uso de animais diabéticos no estudo da cicatrização, com inúmeros trabalhos publicados (ACHAR et al., 2014; FANG et al., 2022; FATHI et al., 2022; GREENHALGH et al., 1990; HONG et al., 2014; TELLECHEA et al., 2016), e é crescente a pesquisa com animais geneticamente modificados (GROSE; WERNER, 2004; REID et al., 2004). A ablação específica de proteínas ou genes, assim como a inclusão de marcadores como as proteínas fluorescentes verde (GFP) e vermelha (RFP) possibilitam o entendimento de mecanismos metabólicos (CARINI et al., 2000). Ao encontro desses estudos, outros tentam comparar e validar tipos de lesão e parâmetros de avaliação (ANSELL et al., 2014; BRYAN et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos anti-inflamatório e pró-resolutivo do mediador lipídico protectina DX (PDX) na cicatrização.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de cicatrização em camundongos hairless
- Avaliar o recrutamento de neutrófilos e macrófagos através atividade de mieloperoxidase (MPO) e de N-Acetilglicosaminidase (NAG);
- Avaliar as alterações histológicas do epitélio e infiltração inflamatória pela coloração por hematoxilina eosina
- Avaliar da produção de TNF- α , IL-1 β e TGF- β por ELISA;
- Avaliar a presença de CX3CR1 por fluorescência;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O lipídio utilizado em todos os experimentos foi Protectina DX com pureza \geq 95% (10 (S), 17 (S) - dihidroxi-4Z, 7Z, 11E, 13Z, 15Z,19Z-ácido docosahexaenóico) obtidos da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EUA). Os kits de citocinas foram adquiridos de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Animais Experimentais

Todas as linhagens de camundongos foram fornecidas pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, e mantidos com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água filtrada e ração. Os experimentos foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (registrado no Ofício Circular CEUA nº147/2019, processo CEUA nº 15654.2019.33). Todos os esforços foram feitos para minimizar o uso de animais e seu sofrimento. Para o estudo de fluorescência foram utilizados os animais marcados CX3CR1 – eGFP/+ C57BL/6, fêmeas, adultas pesando em média 25g. Para os demais experimentos foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos (nunca no mesmo experimento), adultos (7 a 9 semanas) pesando entre 25 e 30g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão medindo 30 x 19,5 x 13 cm (Insight®) em grupos de no máximo 5 animais antes e após o procedimento.

4.2.2 Delineamento Experimental

No primeiro momento identificamos o melhor momento de coleta das lesões, seguido pela definição da melhor dose-resposta ao estímulo do modelo, e esses dados foram usados para os experimentos seguintes. Os grupos de estudo foram grupo Sham: sem lesão, tratado com diclofenaco e sem tratamento diário; grupo controle: com lesão, tratamento com diclofenaco e tratamento diário com veículo - solução salina; e grupo de tratamento: com lesão, tratamento com diclofenaco e tratamento diário como fármaco em estudo (Tabela 1). Foram usados três grupos de 6 animais para a análise de MPO, NAG, fluorescência e produção de citocinas, e dois grupos (controle e tratamento) de 8 animais para a avaliação histológica. O n de 6 animais mostrou-se adequado aos nossos experimentos (calculado através do programa G*Power freeware). Os animais foram distribuídos nos grupos em sequência aleatória e tratados por 7 dias, com exceção da quantificação das citocinas, quando houve coleta também no dia 3 (tratamento por 3 dias). Os investigadores estavam cegos para as análises.

Tabela 1- Grupos de estudo

	Diclofenaco (2 doses)	Lesão (2 por animal)	Tratamento
Grupo Sham	Sim	Não	Não
Grupo Controle	Sim	Sim	Veículo
Grupo Tratamento (PDX 10ng)	Sim	Sim	PDX 10 ng

Animais previamente machucados, com malformações ou sinais de doença não foram incluídos no estudo, e os que apresentaram qualquer alteração inesperada durante o período de tratamento foram excluídos. Os animais foram aclimatados com pelo menos 1 hora de antecedência ao ambiente do experimento. Animais CX3CR1 – eGFP/+ C57BL/6 e hairless (HRS/J) foram usados para esse estudo. O Delineamento está ilustrado na figura 7.

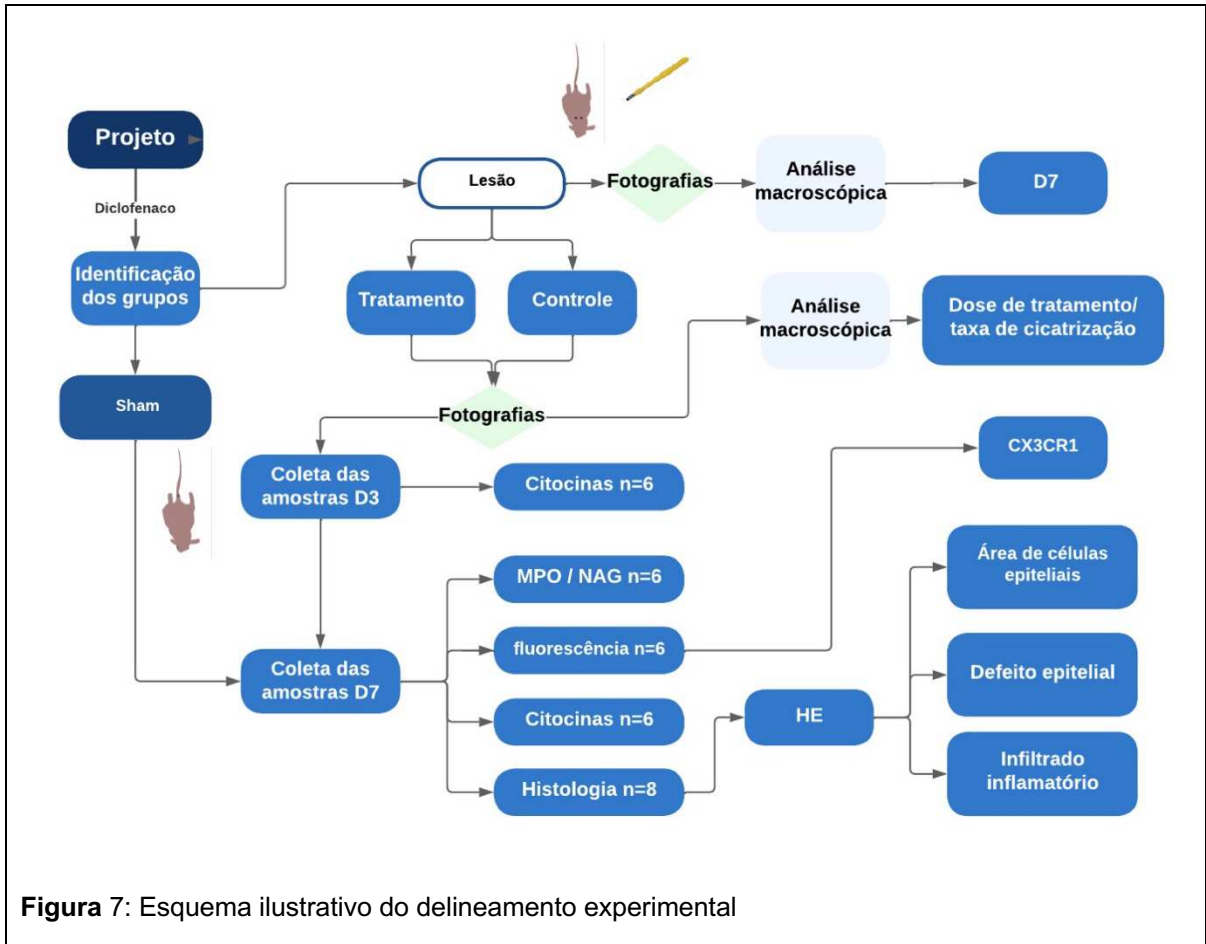


Figura 7: Esquema ilustrativo do delineamento experimental

4.2.3 Protocolo Experimental

Os animais foram tratados com diclofenaco resinato administrado via oral (cânula de gavagem) 30 minutos antes da indução anestésica. Foi administrada anestesia intramuscular (IM) na pata traseira esquerda com 0.02ml de solução combinada de cetamina / xilazina 2:1, complementada com isoflurano inalatório até estarem ausentes os reflexos de dor em patas. Foi realizada antisepsia com solução de clorexidina alcoólica no dorso, e a pele pinçada na linha média para indução das lesões (perfurando a espessura total das 2 camadas de pele simetricamente à linha média) com punch de biópsia descartável de 5mm de diâmetro e instrumental cirúrgico. Foram realizadas o total de duas lesões no dorso de cada animal.

As lesões e os olhos foram hidratados com solução fisiológica 0,9%, e os animais mantidos em superfície aquecida até completa recuperação anestésica. Foram tratados novamente com diclofenaco resinato após 12 horas, via gavagem na mesma dosagem anterior. Após a lesão, a imobilização dos animais precisou ser modificada para administração do fármaco, utilizando apenas a cauda e o pinçamento do pescoço, sem contato com o dorso para evitar possíveis interferências com a cicatrização (BLAISE et al., 2020). As lesões cicatrizaram por segunda intenção sem qualquer intervenção tópica (DEMIDOVA-RICE et al., 2007; TKALČEVIĆ et al., 2009).

Após 24 horas da indução da lesão iniciamos o tratamento com PDX, na dose de 1 ng ou 10 ng, via intraperitoneal (ip), repetida diariamente por 7 dias. Uma hora após o último tratamento os animais foram terminalmente anestesiados (isoflurano 5% seguido de decapitação) e as amostras coletadas com punch de biópsia descartável de 6mm de diâmetro, posicionando a lesão no centro da área de coleta. As peças foram acondicionadas e armazenadas de acordo com o experimento a ser realizado.

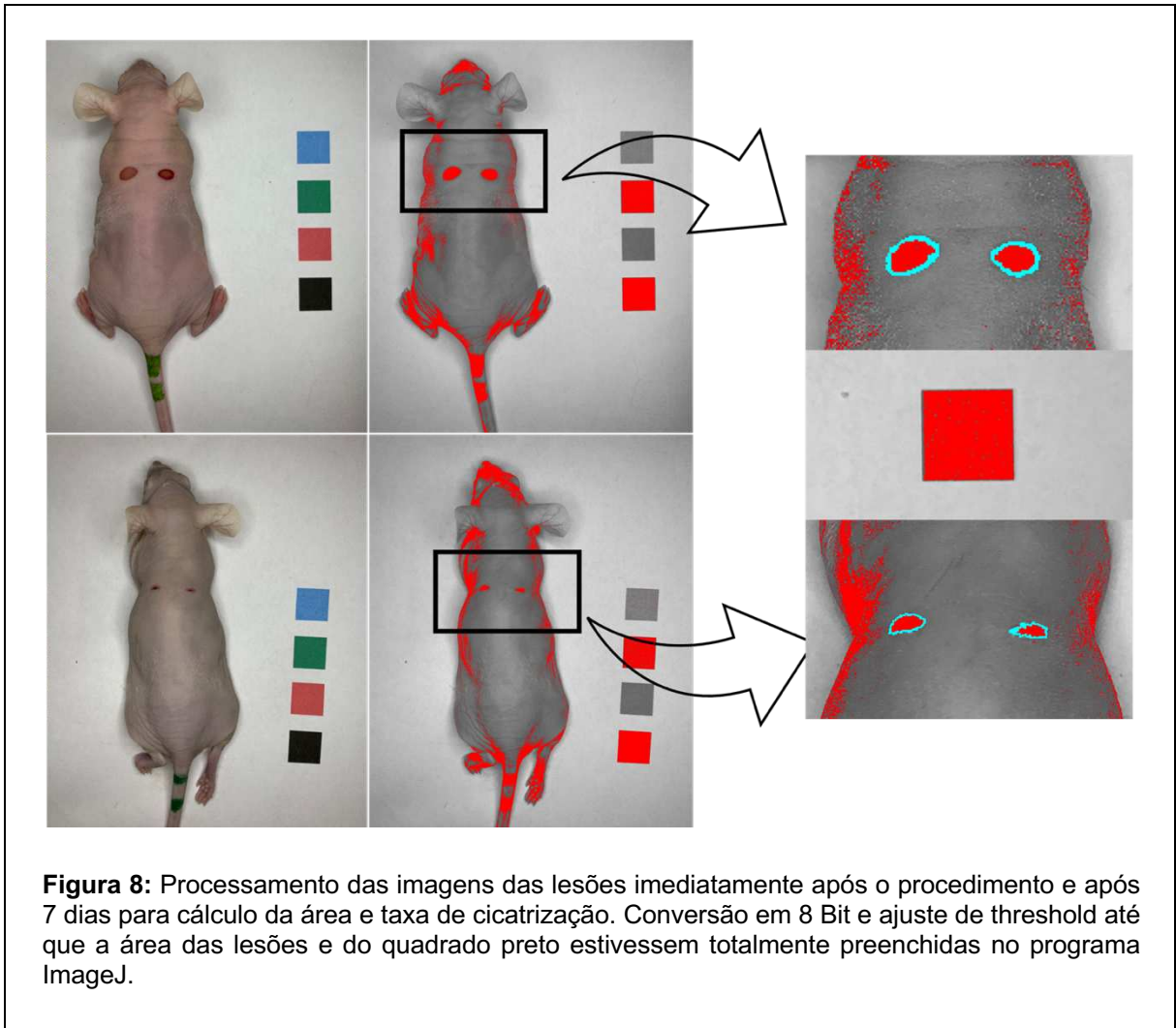
Fotografias digitais foram realizadas imediatamente após a indução da lesão e antes da coleta, em estúdio fotográfico confeccionado especificamente para o modelo. Os animais foram posicionados sobre fundo branco com referência de medida de 1 cm, com iluminação e posicionamento da câmera constantes.

4.2.4 Diluição da Protectina DX (PDX)

Solução de comercial de PDX foi fracionada e armazenada em eppendorf selado a -80°C até o uso. No dia dos experimentos, alíquotas foram diluídas em solução fisiológica 0,9% mantida a 4°C , para que 100 μL (quantidade usada para aplicação intraperitoneal) contivesse 10 ng de PDX. Transportados em caixa térmica com gelo até o local de tratamento.

4.2.5 Avaliação Macroscópica da Lesão

As imagens das lesões foram transformadas em 8 Bit (grayscale), e o limiar (threshold) ajustado até que toda a área do quadrado de medida e as lesões estivessem marcadas no programa ImageJ (NIH v2.9.0/1.53t) (COLLINS, 2007; MASSON-MEYERS et al., 2020; SCHINDELIN et al., 2012). A área da lesão foi calculada em relação à área conhecida do quadrado, ilustrado na figura 8. A medida das duas lesões iniciais e finais de cada animal foram comparadas para determinar a taxa de cicatrização ($100 - (100 * \text{área final} / \text{área inicial})$) (CANESSO et al., 2014; WAHEDI et al., 2016). As lesões foram analisadas individualmente, pois cada uma, ainda que no mesmo camundongo, pode apresentar evolução independente (ANSELL et al., 2014; PARK et al., 2015).



4.2.6 Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A MPO, uma enzima peróxido de hidrogênio oxido redutase, é especificamente encontrada em leucócitos granulócitos, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, basófilos e eosinófilos e contribui para capacidade bactericida destas células. O método baseia-se na oxidação catalisada pela MPO do substrato o-dianisidina com detecção espectrofotométrica em 450nm (XIA; ZWEIER, 1997). O ensaio para dosagem da MPO permite inferir indiretamente o número de neutrófilos presentes no local.

As amostras de pele com lesão foram coletadas em microtubos e mantidas a - 80 °C até o momento da realização do ensaio, quando foram diluídas com tampão de fosfato de potássio (K_2HPO_4) (pH 6,0), contendo 0,5% brometo de hexadecil trimetil amônio (HTAB) e homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado por 2 minutos a 16.100g em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Em microplacas de 96 poços foram depositados 30 μ L do sobrenadante e 200 μ L de solução tampão de fosfato 50 mM em pH 6,0, contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A curva padrão foi preparada na mesma placa, colocando 100 μ L de tampão fosfato 0,05 M e solução com 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1), fazendo a diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). No décimo segundo poço (A12) foi depositado apenas 200 μ L de água deionizada, sendo utilizado como controle negativo (branco). Após 20 minutos a reação colorimétrica foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices) e a atividade da MPO das amostras comparada com a curva padrão. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/mg de proteína).

4.2.7 Avaliação da Atividade da N-Acetilglicosaminidase (NAG)

A NAG é uma enzima produzida preferencialmente por macrófagos e sua dosagem permite inferir indiretamente o número dessas células presentes no local.

As amostras foram processadas e a placa de micropoços preparada da mesma forma do experimento de MPO.

A amostras de pele foram diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e 80 μ L de tampão K_2HPO_4 sem HTAB e 100 μ L de substrato para NAG (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida) e homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Os homogeneizados foram centrifugados por 2 min a 12000 g em temperatura de 4°C. Em cada poço foram depositados 50 μ L de sobrenadante e 50 μ L de 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glicosaminida e a placa foi incubada por 10 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de tampão glicina 0,2 M (pH 10) e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 400 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices). A atividade NAG da amostra foi comparada com a curva padrão de concentração conhecida de macrófagos. Os resultados são apresentados como atividade NAG (número de macrófagos $\times 10^4$ por miligrama de proteína).

4.2.8 Avaliação da Produção de Diferentes Citocinas (IL1- β , TGF- β e TNF- α)

Nesse experimento buscamos quantificar as citocinas presentes nas amostras coletadas. As amostras foram coletadas em microtubos contendo 500 μ L de solução NaCl 0,9% e mantidas a -80°C até a análise, quando foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 3.200rpm em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi retirado para análise. As microplacas com 96 poços foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos de captura contra as proteínas de interesse (100 μ L de anticorpos anti-TGF- β 250x concentrado, 50x para IL1- β e 50x para TNF- α). Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS com 0,05% de Tween 20 três vezes, incubadas com a solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas novamente três vezes. Em cada poço foi colocado 100 μ L da solução preparada de amostra e a placa foi novamente incubada por 2 horas em temperatura ambiente, e posteriormente lavada da mesma forma. Foi colocado 100 μ L da solução diluída de anticorpo de detecção e repetidas a incubação e lavagem,

100 μ L de enzima avidina-peroxidase, repetidas incubação (20 minutos) e lavagem e finalmente 50 μ L de stop-solution para interromper a reação e as absorbâncias foram determinadas em 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices). A curva de proteínas foi usada para comparação e determinação da quantidade de citocinas nas amostras e os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina por miligrama de proteínas (WATERBORG, 2009).

4.2.9 Avaliação Histológica da Lesão

A análise histológica é considerada o padrão ouro para avaliar nível de inflamação tecidual, diferenciar tipos celulares e quantificar deposição de matriz extracelular. Também é útil na mensuração da área da lesão, permitindo medidas em duas dimensões (extensão e profundidade). Ansel et al. comparou a medida planimétrica com a medida histológica de lesões excisionais de 6mm de diâmetro, no dorso de camundongos e verificou que a medida histológica é mais confiável, pois a avaliação macroscópica pode ser prejudicada pela área de transição da borda, pela presença de crostas e de pelos (ANSELL et al., 2014).

As amostras coletadas foram bipartidas no eixo de maior extensão da lesão, fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 95% e 100%) e diafanizadas com xilol para inclusão de parafina. O bloco de parafina contendo a amostra foi seccionado a 5 μ m e corados para as colorações de interesse. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico Olympus CX40, conectado à câmera AmScope MU800 e ao programa AmLite (AmScope versão 2.1.18573.20210304) após calibração com lâmina de medidas. A coloração de hematoxilina eosina (H&E) foi utilizada para avaliar: 1. A presença da falha epitelial na área da lesão – considerada 0 (zero) nos casos que a lesão estava completamente coberta por epitélio (ampliação de 100x); 2. A área das células epiteliais cobrindo a lesão (ampliação de 100x); 3. A quantidade de infiltrado inflamatório (ampliação de 400x). A figura 9 exemplifica a forma de análise histológica das amostras na coloração H&E.

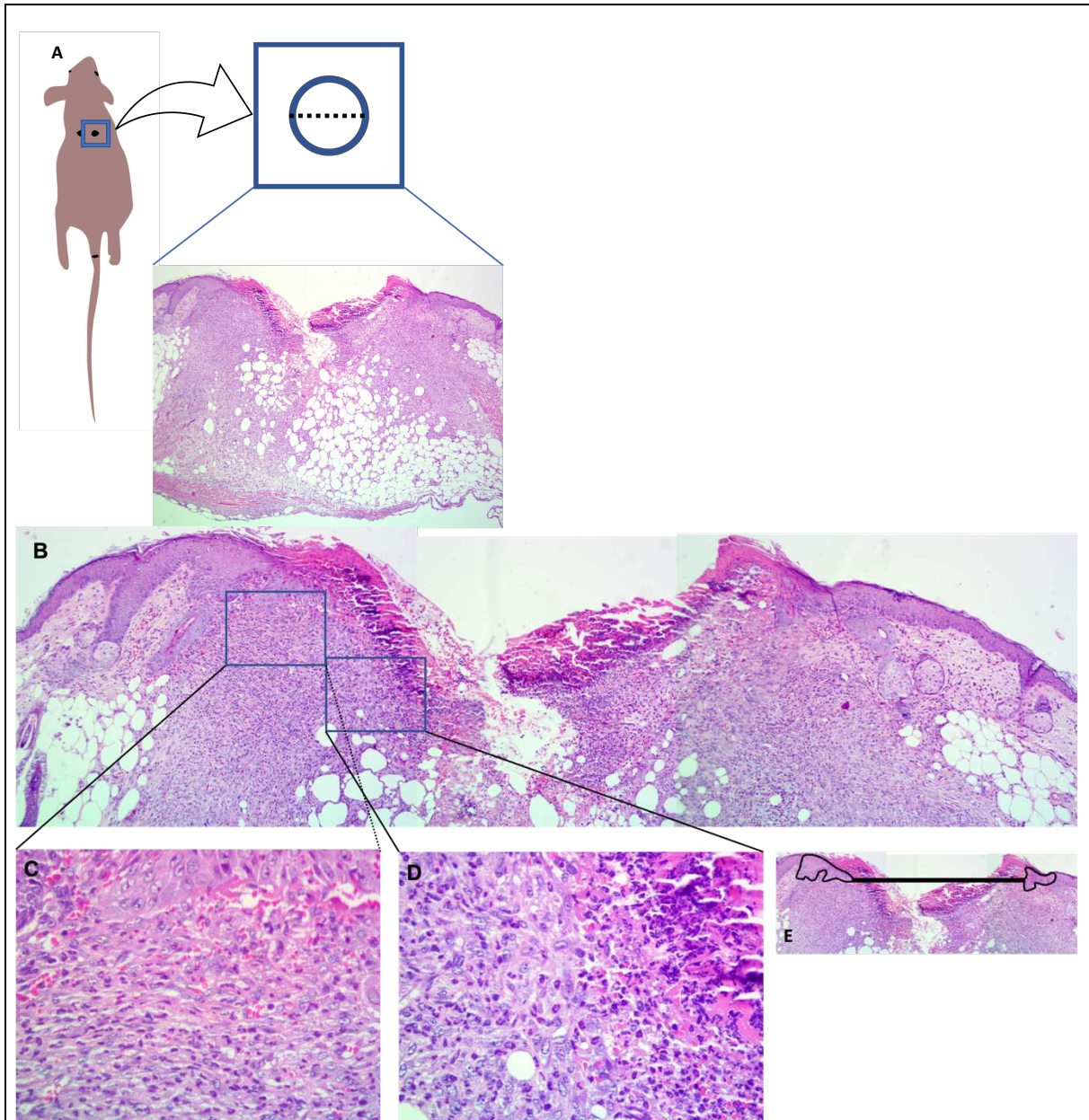


Figura 9: Imagens ilustrativas da avaliação histológica da lesão. A - Área central da lesão corada em HE, magnificação 40x; B esquema ilustrativo em magnificação de 100x; detalhes C e D magnificados 400x para avaliação do infiltrado inflamatório; E magnificada 100x, para avaliação da camada epitelial cobrindo a lesão (re-epitelização) e mensuração da falha de epitelial quando presente.

O defeito epitelial foi medido por uma linha reta entre as bordas internas dos queratinócitos presentes, e a área ocupada por queratinócitos sobre a lesão, pela ferramenta de desenho a mão livre nas margens externas do conjunto de células. A área de infiltrado inflamatório foi medida pela fração da área da imagem ocupada por núcleos celulares. O processamento da imagem para essa análise foi feito no programa ImageJ (NIH v2.9.0/1.53t), através da ferramenta *color deconvolution 2* (ajustada para H&E, *output RGB retain all*). O limiar de coloração (*color threshold*) foi definido para os parâmetros: método – *moments*, *color* – *black* e *space* – *lab*, e ajustado até a completa demarcação dos núcleos celulares. A área de interesse foi demarcada excluindo células epiteliais e eventuais artefatos da lâmina e a porcentagem de superfície corada foi calculada pela função análise de partículas. o resultado do processamento da imagem para estudo do infiltrado inflamatório está ilustrado na figura 10.

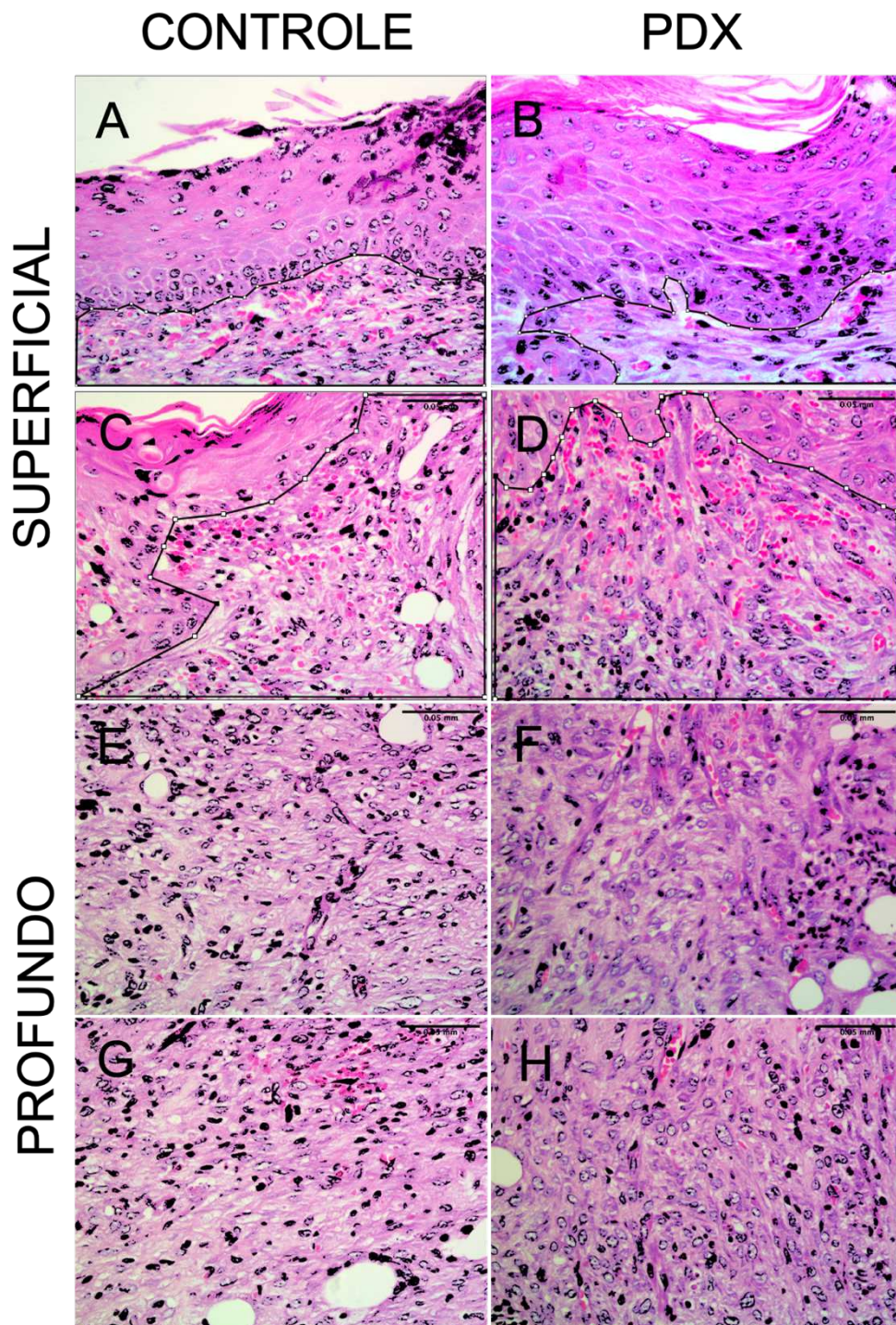


Figura 10: Imagens ilustrativas da avaliação histológica do infiltrado inflamatório. A, C, E e G representam o grupo controle; B, D, F e H representam o grupo tratado com PDX. Imagens em H&E processadas conforme descrição metodológica para cálculo de porcentagem de núcleos marcados.

4.2.10 Ensaio de Fluorescência

Para o ensaio de fluorescência foram usados camundongos CX3CR1-GFP/+ por expressarem a proteína fluorescente verde em macrófagos M2 (pró-resolutivos). Os pelos da área da lesão no dorso foram removidos com tricótomo logo após a indução anestésica e os animais foram tratados conforme o protocolo previamente estabelecido. Após a coleta, as amostras com lesão foram processadas e incluídas em reagente OCT (*optimum cutting temperature*), seccionadas e colocadas em lâminas de vidro sinalizadas com carga positiva para marcação imunológica e analisadas em microscópio confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Alemanha) com objetiva de aumento de 20x. As imagens foram processadas pelo software Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Foi escolhido um campo por amostra para avaliação da presença dos macrófagos M2. A intensidade da fluorescência foi quantificada por um pesquisador “cego” e os resultados são expressos em intensidade de fluorescência eGFP (%).

4.2.11 Análise Estatística dos Resultados

A homogeneidade foi considerada presente pelas características da amostra. Os dados foram analisados pelos testes adequados a cada experimento e de acordo com a normalidade, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, (*one way ANOVA*, seguido por teste de Tukey, Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's, Teste t ou Mann-Whitney). Os resultados comparativos são apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 6 animais em cada grupo por experimento (exceto histologia $n=8$). As análises foram realizadas no software GraphPad Prism Versão 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p<0,05$. [*] Representa diferença estatisticamente significativa do grupo Sham, e [#] representa diferença estatisticamente significativa do grupo controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 EFFICACY OF PROTECTIN DX ON EXCISIONAL WOUND HEALING IN HAIRLESS MICE

PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS

Protectin DX accelerates cutaneous wound healing in mice.

P.D. Ritter^a, S.M. Pierotti^a, C.R. Ferraz^b, T. Zanineli^b, M. Bertozzi^b, T. S. Saraiva^b,
A. Franciosi^b, A.J.C. Bussmann^b, W. A. Verri Jr^b, R. Casagrande^{a*}

^aDepartamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440, Londrina, Paraná, Brazil.

^bDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 80, PR445, Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Brazil.

* Corresponding author. Address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiaca@yaho.com.br or rubiaca@uel.br (R. Casagrande).

Protectin DX accelerates cutaneous wound healing in mice.

Abstract

Skin injuries occur repeatedly, and there is no effective treatment that guarantees proper healing and scarring. PDX is one of the specialized pro-resolving lipid mediators (SPM), omega 3 derived, that has shown beneficial effect in inflammation resolution, pain control, protection against oxidative stress and fibrosis in several disease models. It has not been widely studied in cutaneous lesions, therefore we tested the effect of PDX on excisional wound healing by secondary intention in healthy murine model. Total of 2 lesions, 5 mm of diameter, were created by a biopsy punch tool on the back of each mouse with no topical treatment. Animals were treated with PDX 10ng or saline solution (control group), IP, daily for 7 days, when wound samples were harvested for analysis. PDX treatment provided faster healing and higher reepithelialization, reduced TNF- α , MPO activity and inflammatory infiltrate. It also increased TGF- β , and fluorescence observed in CX3CR1-eGFP⁺ labeled C57BL/6 mice. However, it failed to lower IL1- β (ELISA) and showed no significant difference in epithelial gap count, suggesting that PDX limits inflammation and enhances resolutive and proliferative activities, through still unknown mechanisms. Therefore, it is a candidate for further studies on skin wound healing treatment.

Keywords: inflammation; wounds, macrophage; pro-resolution; specialized lipid mediators; protectin DX.

Introduction

The skin is the largest and outermost human organ, completely covering the organism. It is constantly exposed to environment aggressions and is required to restore integrity of damaged structures (1). Impaired wound healing is a public health concern as it can frustrate daily and work activities, lead to chronic ulceration, cause mobility restriction and frequent hospitalization (1–3). Faster healing with minimal scarring is the goal of wound healing research (4,5).

As injuries occur, a dynamic and overlapping repair process is initiated and advances until homeostasis has been restored. Tissue disruption exposes collagen and subendothelial matrix, immediately attracting and activating circulating platelets. Platelets aggregate to form a platelet plug and stop blood loss (6) and release pre-formed granules that further attract platelets and immune cells and activate the coagulation cascade to form a stable clot (7). Rapidly resident immune skin cells in both epidermis and dermis, such as Langerhans cells, dendritic epidermal T cells (DETCs), mast cells, T cells and macrophage, are triggered by alert signs to coordinate the repair process. Resident macrophages assume an important role, as they express a multitude of pattern recognition receptors (PRRs) and become activated when an injury occur, triggering the inflammatory process. They stimulate inflammation by releasing pro-inflammatory chemokines (e.g., CXCL-1,5,8; CCL2), cytokines (e.g., tumor necrosis factor (TNF), interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-33) and growth factors, which initiate the recruitment and activation of other immune cells (8–10).

Neutrophils infiltrate the wound along with Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low} monocytes (the last differentiate into tissue pro-inflammatory macrophage called in a simplified way of M1) to release inflammatory mediators e.g., IL-1beta, TNF-alfa, iNOS, remove debris and infecting organisms (11). As inflammation has subsided, neutrophils and undergo apoptosis and are removed from the wound by macrophage phagocytosis, increasing PGE2, which induces a lipid-mediator class switching, driving LOX activity from eicosanoids to specialized pro-resolving lipid mediators (SPM) synthesis (12,13). Increased levels of IL-4, IL-13, M-CSF, TGF-beta stimulate LY6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} monocyte recruitment (11), increasing alternatively activated macrophage population (succinctly called M2) shifting the wound environment towards resolution (14,15). M2 macrophage secrete resolute mediators (IL-10, arginase, MMPs, growth factors) stimulating cell proliferation and secretion of structural proteins to form a preliminary scaffold through which endothelial cells, fibroblasts,

keratinocytes, and others will migrate forming the granulation tissue to fill the wound (1,14,16,17). Fibroblasts play a major role in granulation tissue production releasing collagen, growth factors, proteins and metalloproteinases, and regulating granulation tissue substitution (18). Once hemostasis is achieved, deposited matrix is remodeled until a stable, collagen-rich, and mature scar tissue is formed (6,19–21).

To date, it is believed that resolution of inflammation is dynamically coordinated by anti-inflammatory and pro-resolution mediators' synthesis, through a phenotypic modification in inflammatory cells, especially macrophages (22). It is unclear if different macrophage phenotypes are due to special cell types or to change of stimulating factors, as they don't show a static pattern and some variance between actions coexist (23). Studies suggest that several other cells, modify phenotypes and contribute to resolving mediators release (15,24–27). The variation in macrophage activation along with discovering of specialized pro-resolving lipid mediators (SPM) led to search for a more comprehensive understanding of the resolution process. SPMs are the omega-3 products resolvin (Rv), maresin (MaR) and protectin derived from EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid) or omega-6 derived from AA (arachidonic acid), lipoxin (12). They are endogenously synthesized from membrane lipids, mobilized through phospholipases to lipoxygenase (LOX) pathway (9,28,29). Several benefits of exogenous SPMs supplementation have been described in disease models, such as pain control, antibiotic action enhancement, viral replication inhibition, decreased oxidative stress tissue damage, protective effects in lungs, faster re-epithelization and better sacring (26,27,30–37).

Protectin DX (PDX) is an isomer of protectin D1, produced by double lipoxygenation of docosahexaenoic acid (DHA) by several cell types including leukocytes and macrophage (38,39). PDX has shown anti-inflammatory effects (40,41) and to inhibit platelet aggregation (42,43), ROS production (44–46) and insulin resistance in skeletal muscles of obese mice (40). It improved outcome in a rheumatoid arthritis model (47), protected pulmonary tissue by reducing fibrosis and pulmonary edema in a sepsis model (48–52) and diminished replication of influenza virus (26,53,54). It also increased survival in cecal ligation puncture (CLP) sepsis (55), lessened pain in discal hernia model (56), but did not show the same effect in paw inflammation (57). The anti-inflammatory actions of PDX have been demonstrated *in vitro* and in *in vivo* models, but there are no reports of its application in skin wound healing. It is not known a specific receptor for PDX but studies suggest it may act through the ALX/PI3K

pathway (ALX/FRP2 receptor and intracellular signaling protein PI3K, present in several cell types, shown to promote clearance of debris and pro-inflammatory cytokine production) (46,51). This study proposes that the SPM, Protectin DX improves time and quality of skin healing in excisional wounds on a murine model, focus on quality of scar tissue formed, neutrophil, macrophage and inflammatory mediators' alteration.

Material and methods

Drug

PDX (10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15Z,19Z-docosahexaenoic acid) (871826-47-0) was purchased from Cayman chemicals, USA. ELISA kits for determination of cytokine from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, EUA). All other reagents used were from pharmaceutical grade.

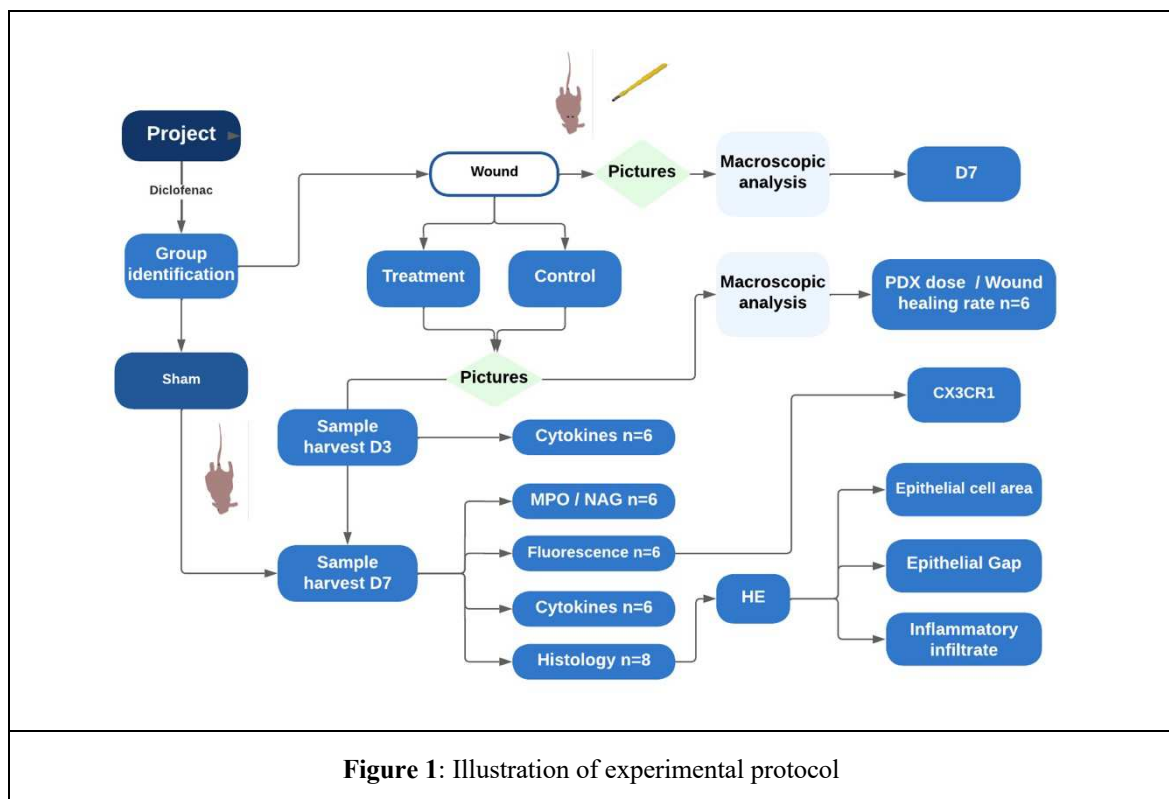
Animals

All experiments were performed *in compliance* with the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals guidelines and were approved by with Ethics Committee on Animal Research and Welfare of the Londrina State University (process numbers 15654.2019.33 - 147/2019). All efforts were made to minimize animal use and their suffering. The experiments were performed in adult (7-9 weeks old) hairless mice (HRS/J) weighing 25-30 g, and in adult (7-9 weeks old) CX3CR1-eGFP⁺ C57BL/6 background mice weighing 20-25 g, obtained from the Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. Mice were housed in maximum number of 5 per cage, at 23°C ± 2 controlled temperature, 12-hour light/dark cycle, in an animal facility and had free access to water and food. All researchers had animal treatment skills and were previously trained for the necessary procedures of the protocol.

Experimental protocol

Mice were acclimatized to experimental environment for at least 1 hour prior to the procedure. Animals were aleatory allocated into three groups with 6 mice each: sham (no intervention), control group (wound, saline solution treatment), PDX group, (wound, PDX 10 ng/day treatment) for MPO, NAG, cytokines and fluorescence assays. Histologic evaluation had no sham group and 8 animals per group. All mice were identified by group color and individual number for wound comparison and healing rate measurement.

Wound samples were harvested from all mice for statistical analysis at day 7, except for cytokines, that were also evaluated on day 3. All animals were the same sex, approximate age and weight and housed under the same environmental conditions. Inclusion criteria was all animals available of the same sex, up to the number necessary. Animals were excluded if exhibited any previous wounds, malformations or signs of illness during the experiment. Investigators were blinded to the analysis. The following parameters were assessed: wound size, MPO and NAG activities, fluorescence activity, cytokines, histology, the experimental protocol is illustrated in Figure 1.



Wound and treatment protocol

Animals were orally medicated with diluted sodium diclofenac (8mg/kg) via gavage cannula 30 minutes prior to surgical procedure. Ketamin-xilazin 2:1 solution was administered intra-muscular (i.m.) at the left hind limb (0.02ml total volume) and complemented with inhalation isoflurane until paw pain reflexes disappeared. In case of C57BL/6 dorsal hair was removed with an electric clipper. Dorsum was swabbed with alcoholic chlorhexidine solution, dorsal skin was pinched at midline and a 5mm dermal biopsy punch (0.1963cm² total area) was used to create two full-thickness excisional skin wounds, symmetrically positioned to midline. Mice were placed at controlled temperature (heated) clean cage until complete anesthesia recovery and returned to previously assigned cage. Eyes were kept moist during recovery time. Diclofenac was orally administered again 12 hours after first dose. PDX treatment with was initiated 24h post procedure, 10 ng of PDX in 0,1 ml was administered intraperitoneally (ip) daily until day 7, control group received the same volume (0.1ml) of saline solution. Wounds were allowed to heal by secondary intention, undressed and without topical treatment (58,59). Mice were terminally anesthetized with isoflurane 5% one hour after the last treatment. Wounded skin was harvested with a 6mm dermal biopsy punch and samples were stored according to the proposed experiment and kept in -80°C until analysis. Digital photography was taken immediately after surgery and before sample harvesting in a custom-made imaging studio where camera, lighting, animal position, background and measurement reference were constant (60).

Macroscopic analysis

Initial and final wound areas of both wounds in each animal were calculated through digital photographs and analyzed using of the ImageJ software v2.9.0/1.53t (NIH, Bethesda, MD, USA) (61), values were plotted for healing rate comparison. Images were converted to 8 Bit (grayscale), threshold was adjusted to fully color fill the wounds and the 1cm² reference square (used to set scale) (62,63).

MPO and NAG activity

The indirect quantity of neutrophils and macrophages presence was evaluated through colorimetric assay of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG), respectively. Samples were processed following previously described protocol (64) and

manufacturer's instructions. Results were compared to a known value standard curve and presented as number of neutrophils $\times 10^4$ per milligram of protein and macrophages 10^4 per milligram of protein.

Cytokines

Skin samples were prepared following previously described protocol (64) and manufacturer's instructions. TGF- β , TNF- α and IL-1 β levels in samples were quantified by ELISA.

Fluorescence assay in CX3CR1-eGFP⁺ mice

Skin samples were prepared following previously described protocol (64). Images were captured using a confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) with a 20x objective. Images were processed using Leica EL6000 software (Leica, Wetzlar, Germany). One image per sample was analyzed for quantification of CX3CR1⁺ recruitment. The results are expressed in eGFP fluorescence intensity.

Histology

Wound samples were bisected at the largest diameter, fixed with 10% neutral-buffered formalin, processed for paraffin-embedding, cut into 5- μ m thick serial sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Images were captured by a digital camera (AmScope MU800, AmLite software) attached to a light microscope (Olympus CX40) and imported into NIH ImageJ software.

Epithelial gap, re-epithelialization area and inflammatory cells infiltration in granulation tissue were analyzed in (H&E) stain. Inflammatory cells recruitment in response to skin wound after 7-day treatment, was measured by nuclei count in area fraction (400x magnification).

Epithelial gap (when present) was measured as a straight line between the internal borders of migrating keratinocytes, and re-epithelialization by keratinocytes area covering the wound, both visualized at 100x magnification.

Statistical analysis

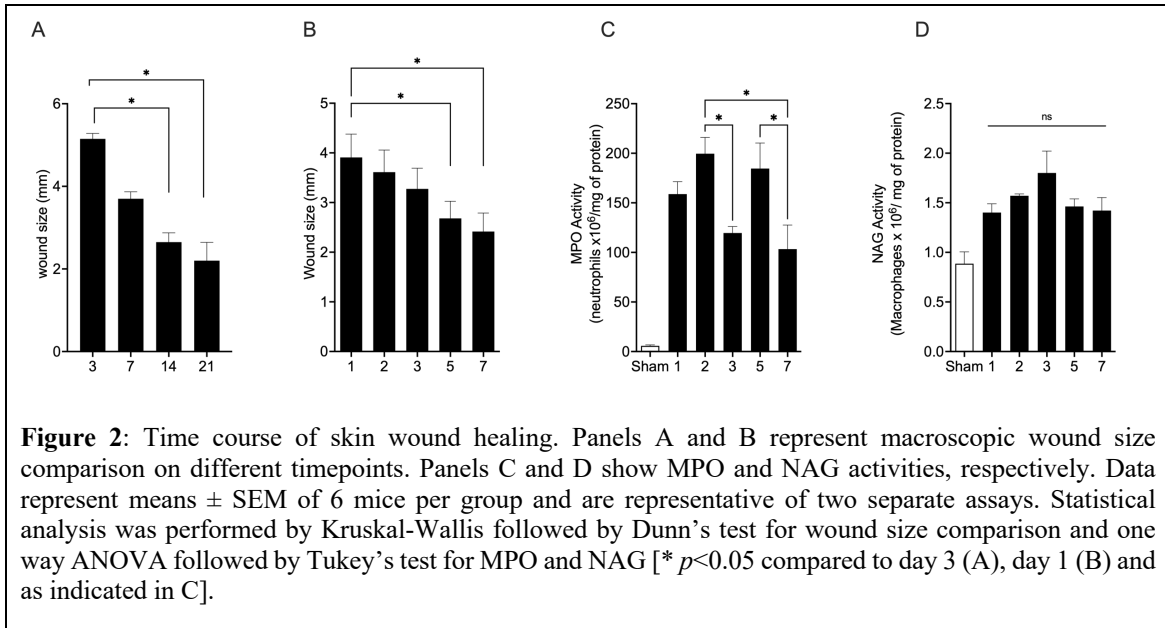
Data was tested for normality and statistical analyses were performed using T test, Mann-Whitney test, One-way ANOVA followed by Tukey or Kruskal-Wallis followed by Dunn's test as appropriate, using GraphPad Prism® software package Version 9.4.1. Results were obtained from different wound and expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and represent two separated experiments. P value <0.05 was the threshold for significance. [*] Represents significant difference from sham, and [#] represents significant difference from control group.

Results

Time course of skin wound healing in mice

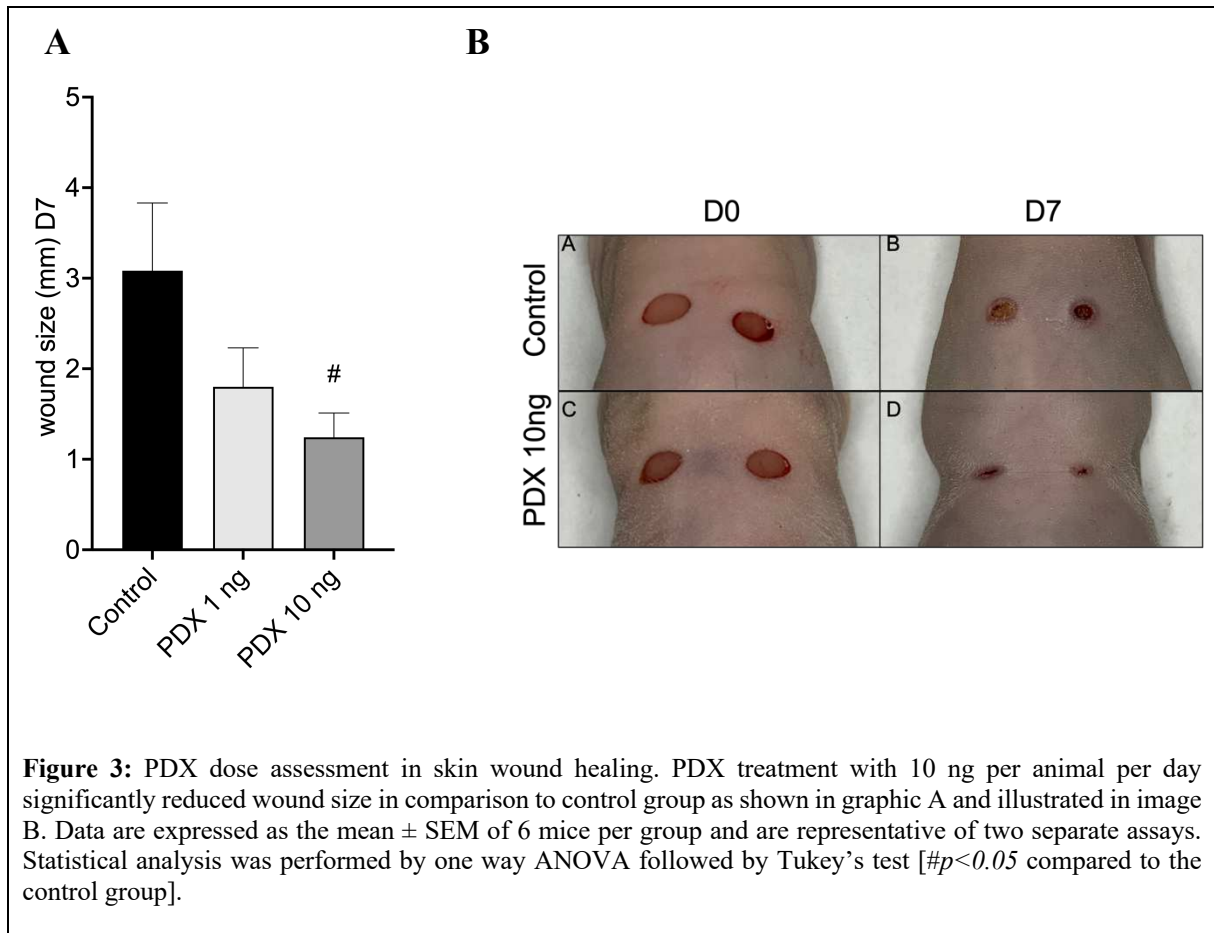
The first part of our study was proposed to define the best day to search for indications of wound shift from inflammation to resolution. We observed wound healing of mice submitted to the wound protocol and not treated (controls), at days 3, 7, 14 and 21. Wound closed fast in the first 7 days and slower thereafter. At day 14, wounds were mostly healed, as at day 21. The 7th day represented an intermediary stage in which the wounds were not entirely closed and not open as well, allowing observation of enhancement or impairment of the healing process by a test compound. This was confirmed examining wound closure associated to MPO and NAG activities measurement at earlier time points (days 1, 2, 3, 5 and 7) (Figure 2).

The wounds were not totally healed at day 7, MPO and NAG were stably elevated indicating that it represents a transitional point in our model, in which tissue repair is occurring along with inflammation, but neither is resolved yet. Thus, it seemed a reasonable time point to study a novel treatment that could be promising to accelerate skin wound healing, but also enable observation of adverse effects, therefore, day 7 was chosen for the following experiments.



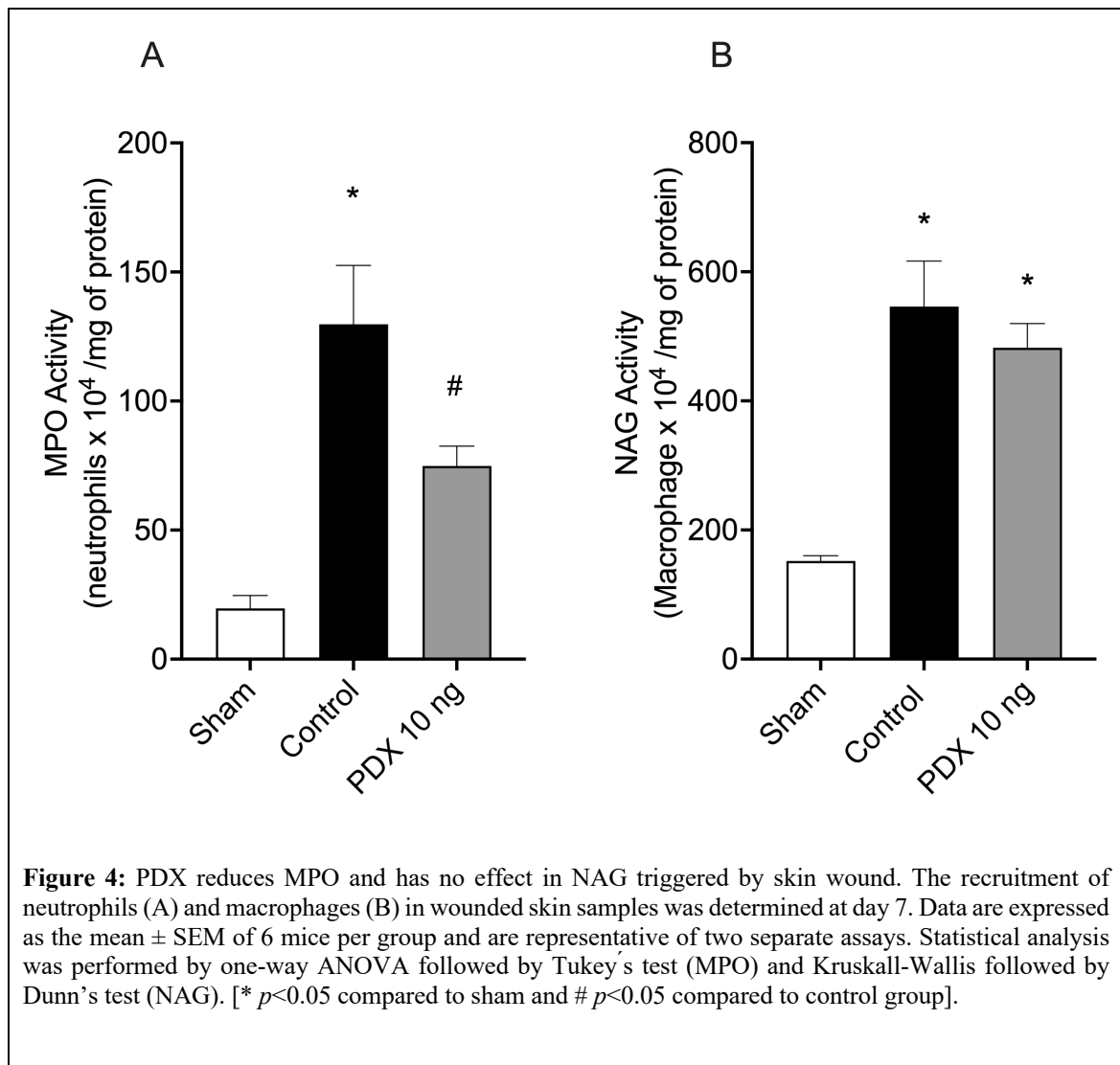
PDX accelerates skin wound healing

The next phase evaluated the appropriate dose of PDX that would interfere with skin wound healing, 1 and 10 ng/animal/day were tested (Figure 3A). Mice treated with 10 ng of PDX showed significantly reduced wound size in comparison to control group, as illustrated in figure 3B, and was selected for further experiments.



PDX treatment reduces MPO without altering NAG activity

MPO (Figure 4A) and NAG (Figure 4B) activities were induced by lesions, observed by increased levels comparing to sham mice, representing the greater presence of infiltrating neutrophils and macrophages within the wounds, and remaining inflammatory activity at the 7th day. PDX treatment reduced MPO activity, compared to control group, showing reduced presence of neutrophils at wound samples. It does not explain if they were less recruited, were recruited by the same amount and eliminated sooner or eliminated in a greater quantity. Analysis of earlier time points are required to elucidate this fact. NAG activity was not different from control group, demonstrating comparable total number of macrophages.

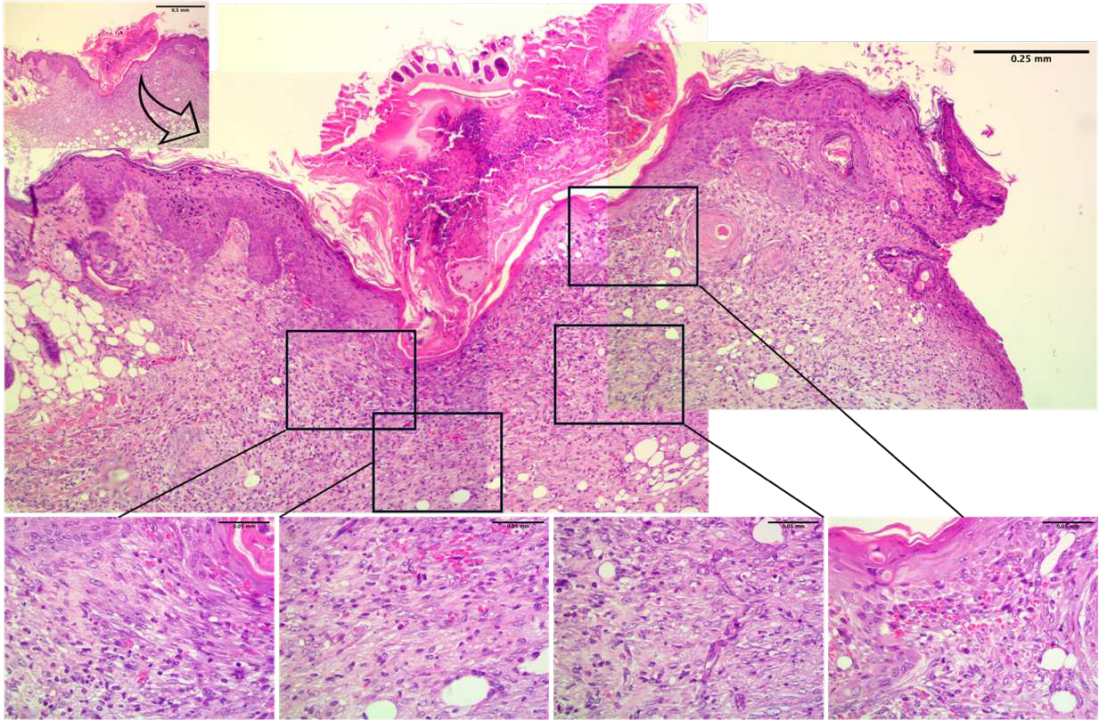


PDX reduced inflammatory cells recruitment

Recruitment of immune cells occurs at the beginning of the healing process, and lasts until total resolution has occurred, varying cell types along its course. Total inflammatory infiltrating cells were analyzed in H&E-stained slides. The presence of inflammatory cells was higher in the control group compared to PDX, due to a higher number of neutrophils, in agreement with MPO result. Figure 5 shows a schematic illustration of inflammatory cells analysis, ranging from total wound section (40x magnification) to 400x detail of superficial and profound areas observed, followed by nuclei staining representation. Figure 6 illustrates the higher number of neutrophils and lymphocytes in control group, irrespective to similar macrophage number.

Reepithelialization was superior in PDX group, observed by total wound area covered by keratinocytes (figure 7). Epithelial gap was not significantly different between control and PDX treated groups, however, PDX group had less wounds not totally covered by keratinocytes (2 out of 8), whereas control group had 4 wounds showing epithelial gap (n=8) data not shown.

A (Control)



B (PDX 10 ng)

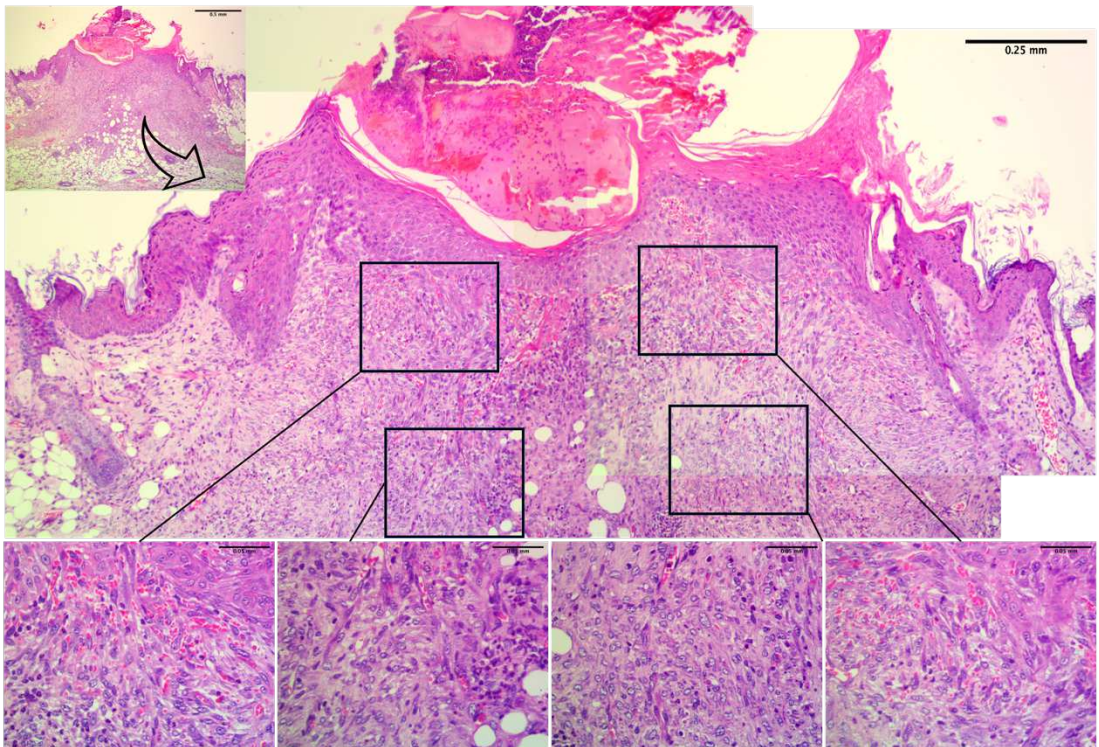


Figure 5 – part 1

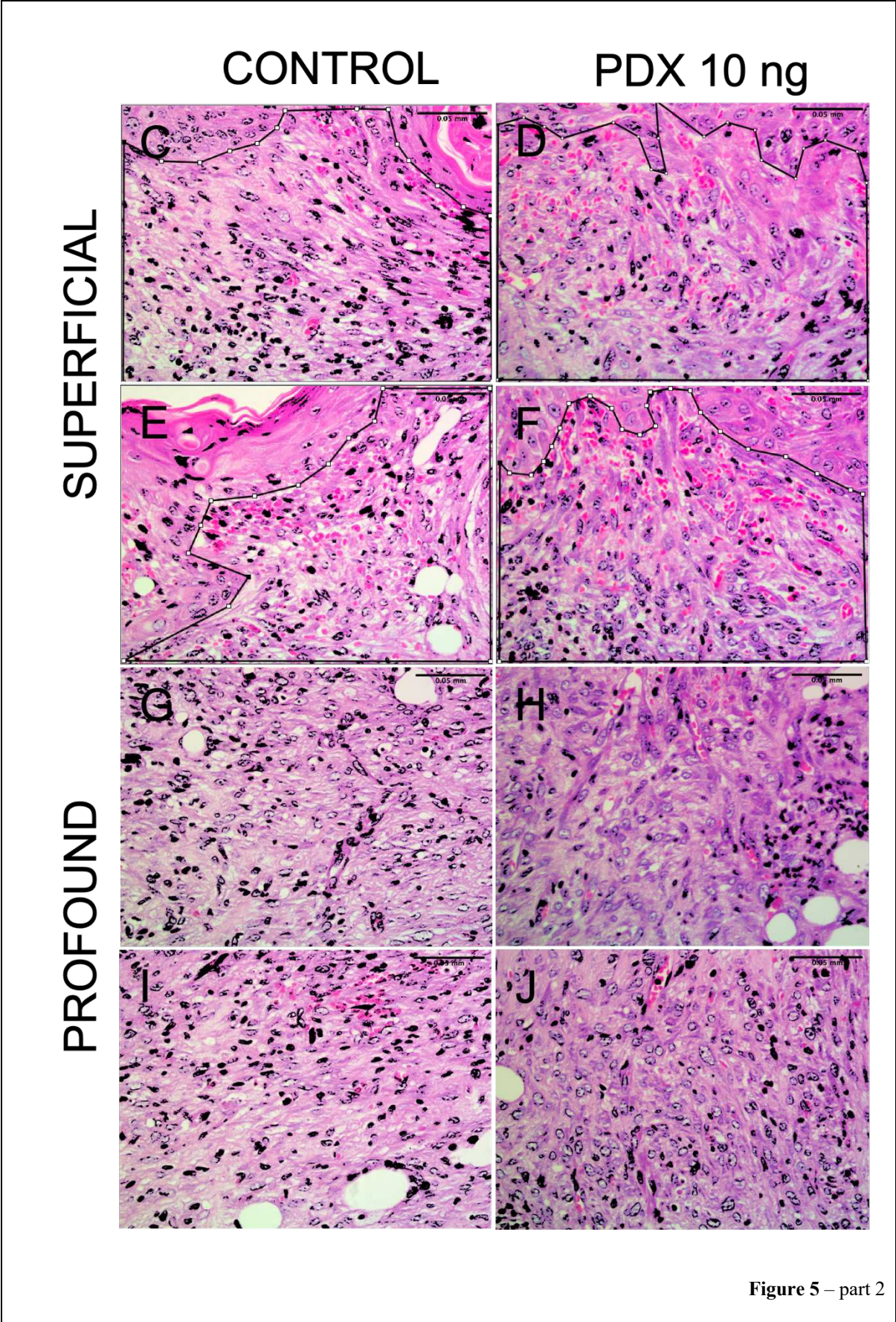
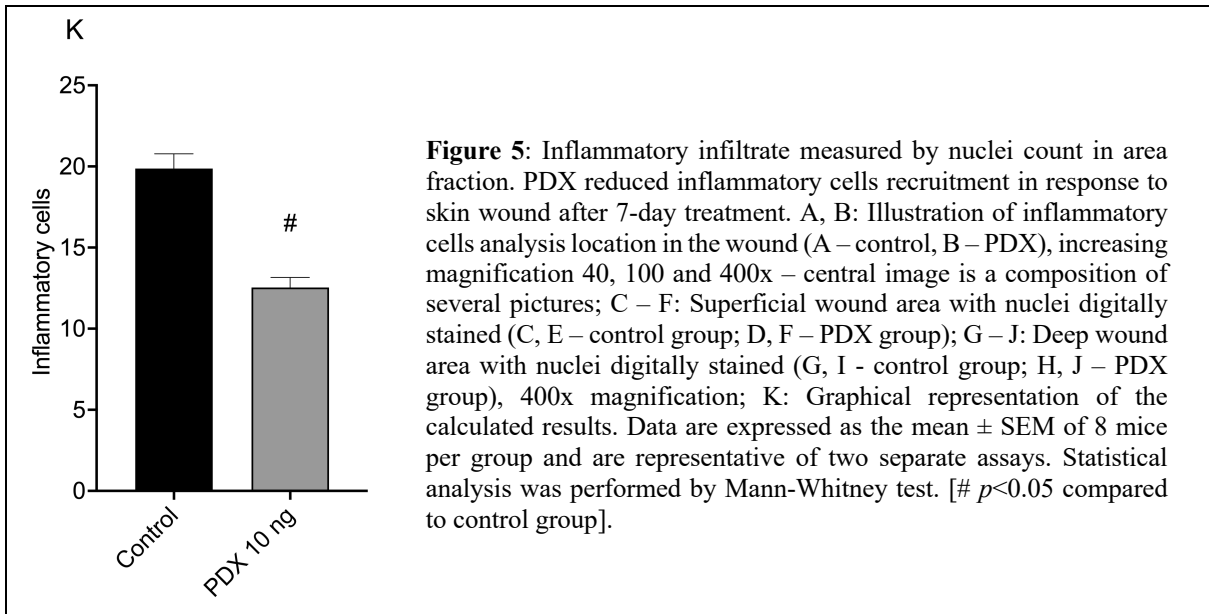
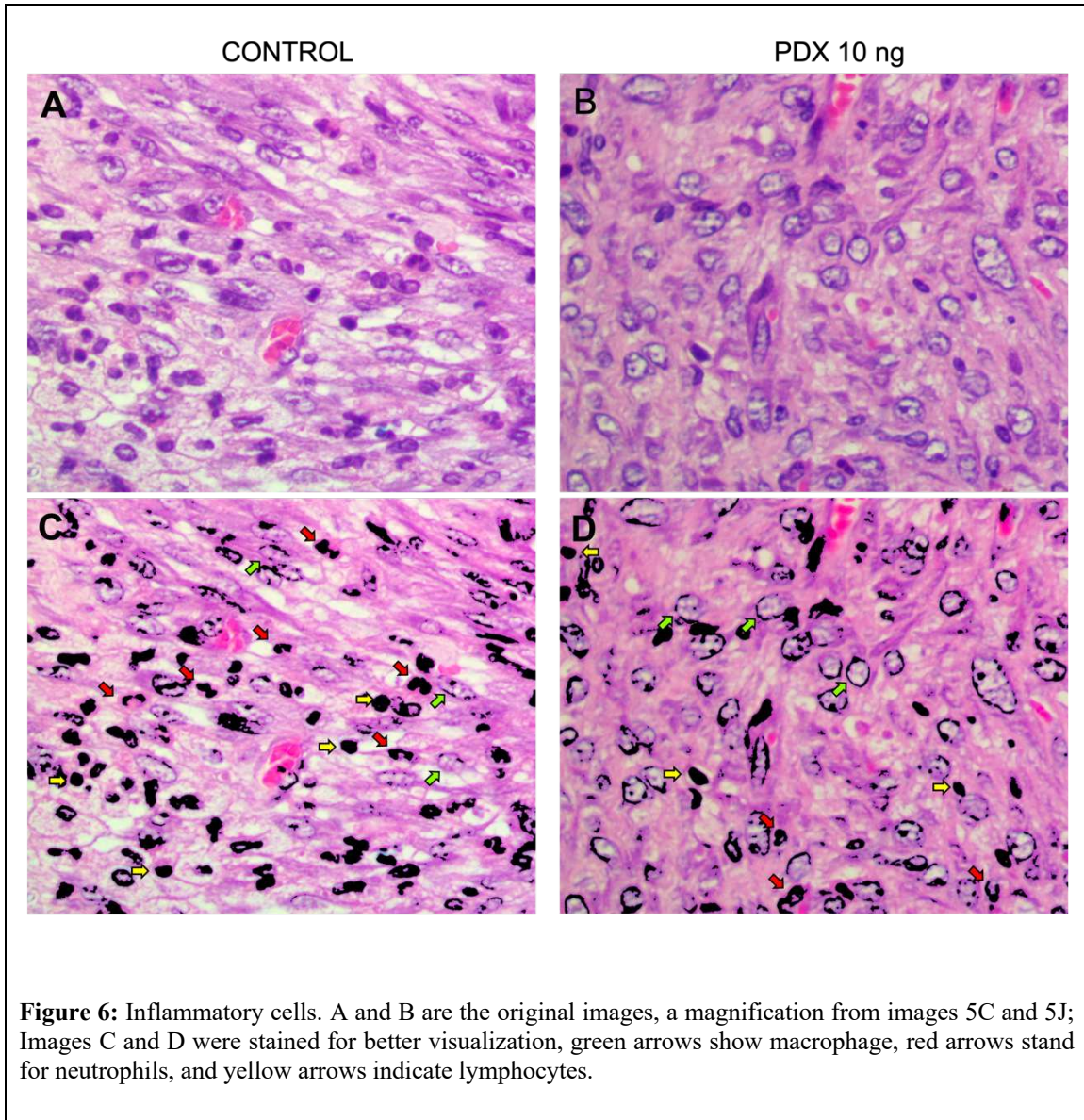
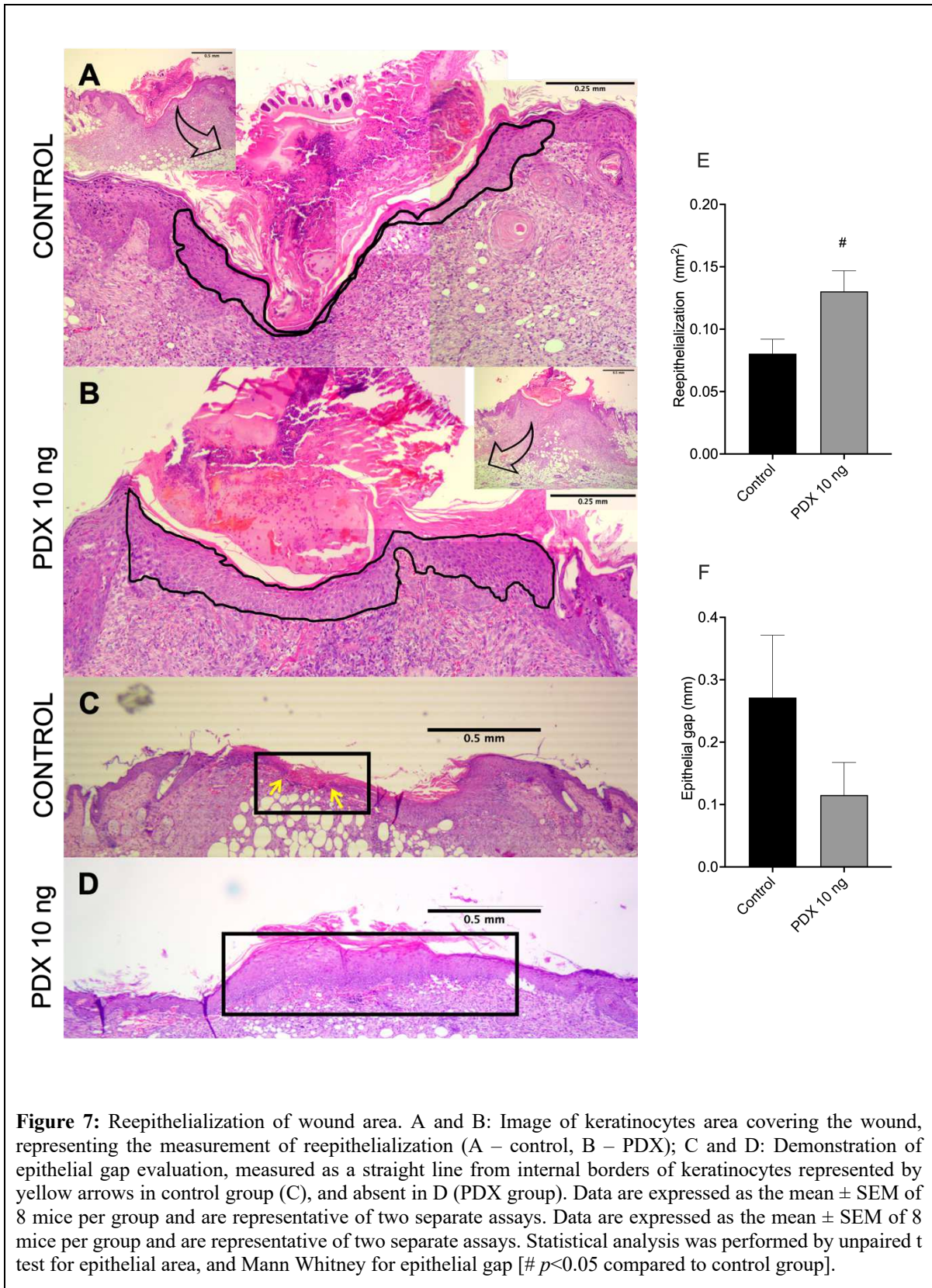


Figure 5 – part 2

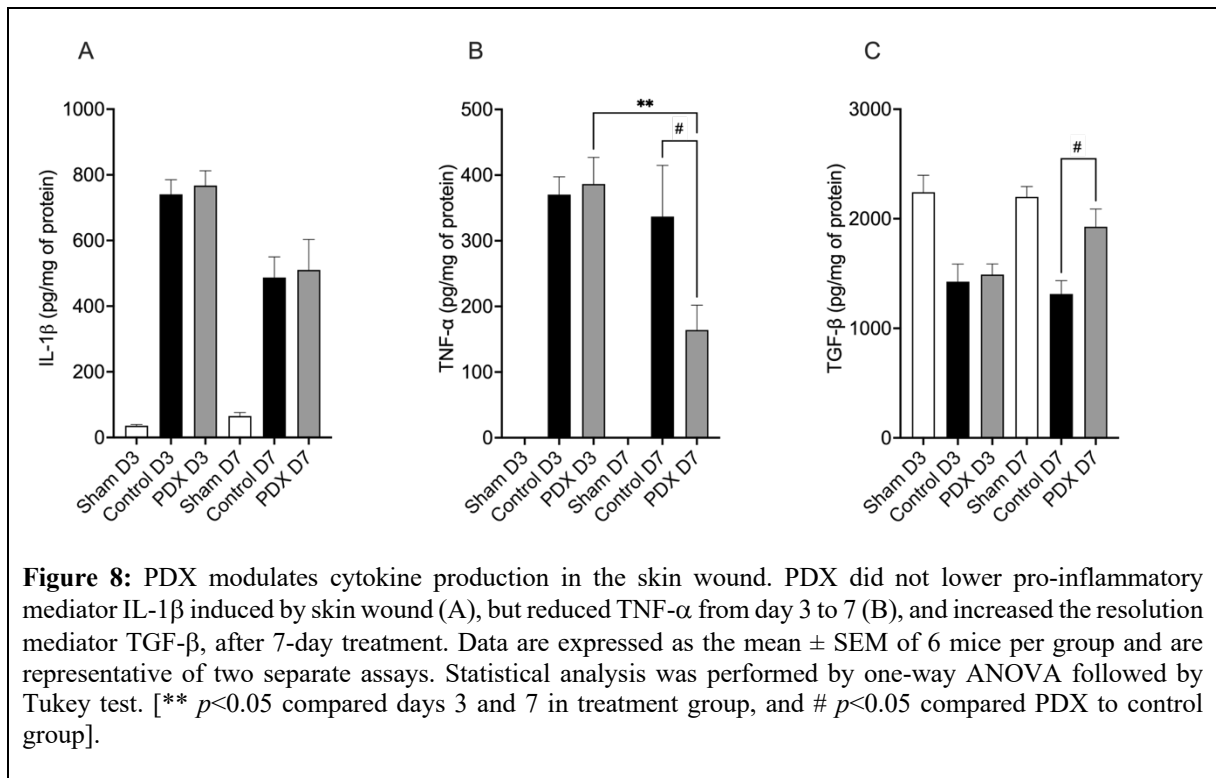






Effect of PDX in the production of cytokines in wounded skin

Cytokines are important regulators of wound healing, inadequate levels determine excessive or insufficient inflammation leading to chronic wounds. We questioned if cytokines production would be affected by PDX in the healing process of healthy mice. IL-1 β is an important mediator to promote initial inflammation, it was increased at post-wound day 3, decreasing partially at day 7, sustaining higher quantities in both wounded groups relative to sham, but not different in between them (Figure 8A). TNF- α , also an inflammatory cytokine that induces inflammatory gene expression (via NF- κ B, MAPK1) and induces cell death, showed a significant decrease from day 3 to 7, while control group supported higher level at day 7. At day 3 there was no difference among wounded groups, sham group samples resulted in negative values and were not considered for comparison (Figure 8B). TGF- β stimulates cellular proliferation and differentiation, acting through the SMAD pathway (not exclusively), has an important role in ECM deposition and myofibroblasts differentiation. TGF- β levels were decreased in the wounded groups, possibly meaning that this model has a higher base line necessity for maintenance of homeostatic functions. PDX treatment did increase TGF- β levels from day 3 to 7 (Figure 8C), showing advance in proliferative activity, though inflammatory activity is still present.



PDX increases cells expressing CX3CR1 receptor in wounded skin

CX3CR1 is a membrane receptor expressed by infiltrating immune cells (monocyte, macrophage, natural killer cells (NK), T cells), and by tissue resident cells, smooth muscle cells, that ligates to Fractalkline (FKN or CX3CL1) chemokine (65). FKN is constitutively expressed by epithelial and dendritic cells (DCs) and can be expressed by endothelial and smooth muscle cells, fibroblasts and neurons under inflammatory conditions (65)(66). It is regulated by IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and TGF- β and released by apoptotic cells to recruit phagocytes and enhance their function (67). FKN is synthesized as a transmembrane molecule attached to a soluble form that is released after cleavage (68). The soluble form has chemoattractive activity for monocytes, NK, and T cells, and the transmembrane form promotes strong adhesion of these leukocytes (69). At the same time FKN increases phagocytes recruitment, it also promotes wound healing by inhibiting fibrotic responses to cell death (67).

CX3CR1 - CX3CL1 binding activates signaling pathways, including PI3K kinases and MAPK kinases (65). CX3CR1 expression is related to FGF- β and VEGF by macrophage and endothelial cells, resulting in collagen deposition and angiogenesis (66–69). Is also related to apoptosis resistance, inhibiting fibrotic responses without immunosuppressive features (68,70). Therefore, we questioned if PDX treatment would be effective in increasing CX3CR1+ cells in the skin lesion. We observed that PDX treatment induced an elevation of CX3CR1-eGFP detection as shown by fluorescence quantitation, significantly higher than control and similar to sham (Figure 9B).

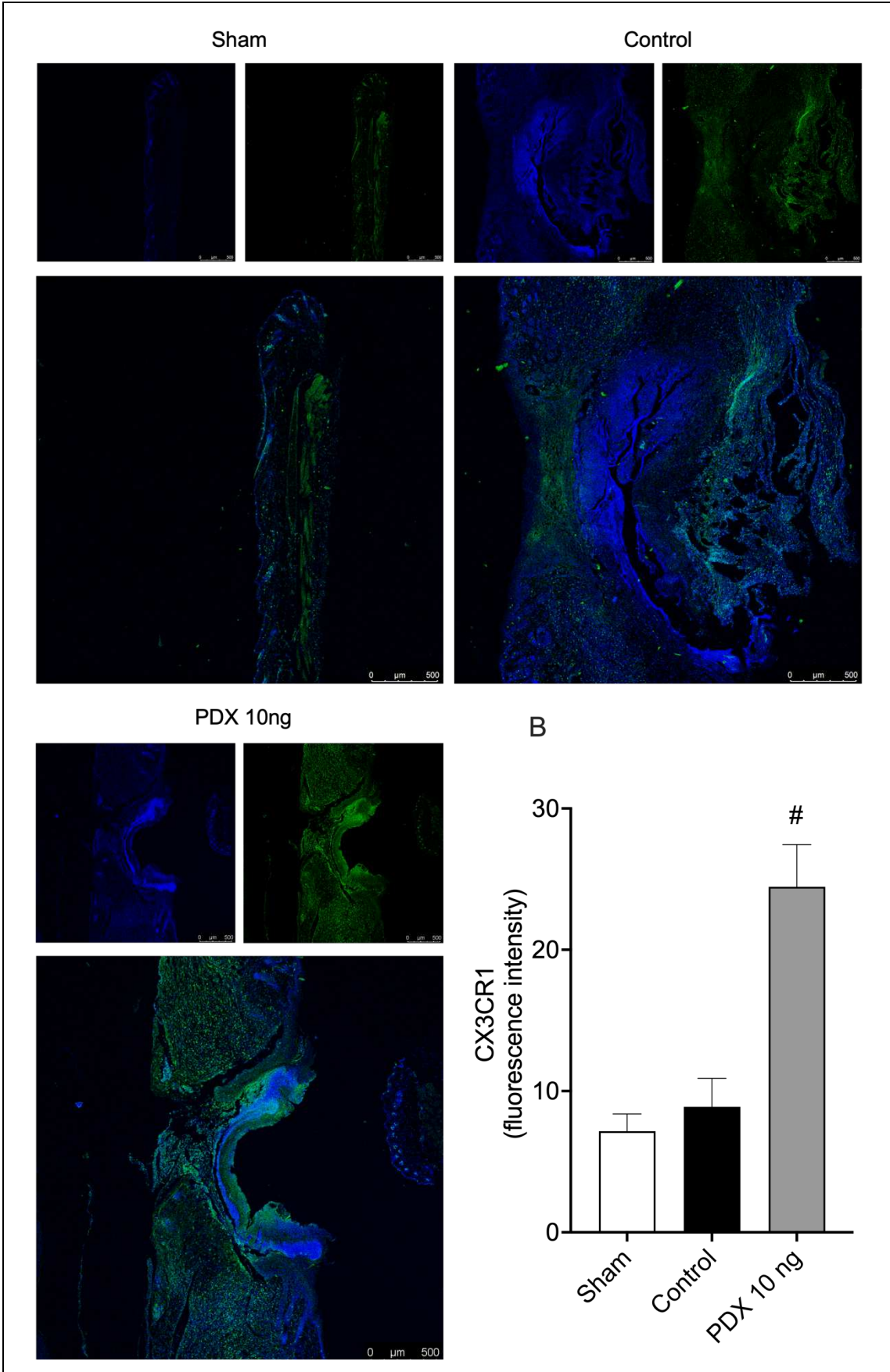


Figure 9: PDX increases tissue repair CX3CR1+ cells in wounded skin. A: Fluorescence assay in CX3CR1 e-GFP/+ C57BL/6 showed increased presence of the receptor in PDX treated group, indicating pro-resolution macrophage activity. B: Higher fluorescence intensity in PDX treatment group compared to naïve and control. Data are expressed as the mean \pm SEM of 6 mice per group and are representative of two separate assays. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. [$p < 0.05$ compared to control group].

Discussion

Skin wound healing is still unknown in many ways, and even though most injuries heal spontaneously and perfectly, in some cases as severe traumas and extensive burns, they are life threatening in otherwise healthy individuals. We can provide topical care, dressings and treat complications, but to the present moment, there's no effective way to improve healing and anticipate a favorable outcome. Many drugs, growth factors, plant extracts and vitamins have been tested, with benefits, but no one has proven to be effective in most cases (71–75). The possibility of alternatively activating cells towards resolution is a different approach for healing studies, with drugs that target a different pathway. Resolvins (37) and lipoxins (24), members of SPM family, were reported to enhance skin wound healing, and PDX showed resolute action on several disease models, for this reason, we experimented PDX in skin wound healing. PDX is different than PD1 in anti-inflammatory potency (15) and platelet aggregation inhibition, through COX-1 and TXA2 antagonism (42,43), but as SMP family members, both PD1 and PDX share a common resolution profile (76).

After determining best day to detect possible interference in wound status from inflammation to resolution, we defined PDX's treatment dose, as its action seems to be dose-dependent and must be modulated for the intensity of the harmful stimuli (55). This was confirmed in our research group when 1 ng of PDX had better antioxidant effect than 0.01, 0.1, and 10 ng in UVB model (data not published). Dose was accessed through healing rate by secondary intention of unsplinted excisional, full thickness wounds on the dorsum, total of 2 wounds per animal, used as their own duplicate (60,77).

The initial inflammatory response to the injury, promoted mainly by neutrophils, must be adequate in time and intensity, as it is vital for defense against invading microorganisms and to effectively support the subsequent proliferative phase (71), any imbalance may lead to impaired healing (6,14). This seems to be a possible cause of healing failure in diabetic wounds, as diabetic organisms are in constant subclinical inflammation, they are unable to promote

satisfactory initial inflammation when wounded (78). The excessive activity and prolonged presence of neutrophils may extinguish proliferative cells by the persistent oxidative stress, cleavage of growth factors and promotion of extracellular matrix degradation (by MMPs secretion), precluding cell migration and granulation tissue formation (79). Neutrophil presence was evaluated by MPO activity and total inflammatory infiltrate cells count.

MPO indirectly accesses neutrophil presence through its detection in primary (azurophilic) neutrophil granules, and was found to be reduced, in accordance with results published in other healing studies, indicating timely inflammatory progress (24,63,71,72,74,80). MPO count was lower than in wound control group, but still elevated compared to healthy skin, confirming that neutrophils were recruited to the wound. Inflammatory infiltrating cells in granulation area is a well-established parameter for inflammatory activity quantification (24,81–85) and was reduced by treatment agreeing with Bae's findings (86). Considering these findings, it is reasonable to assume that PDX acted reducing neutrophil count in the wound at day 7. However, it is not possible to determine whether less neutrophils were recruited initially, if they underwent apoptosis sooner or if macrophage function and resolutive activity were enhanced and eliminated more neutrophils from the wound.

Inflammatory parameters were additionally accessed through cytokine detection, showing decline in inflammatory mediator TNF- α and increase in resolutive TGF- β to normal levels obtained from non-wounded controls, and no effect in inflammatory cytokine IL-1 β . IL-1 β usually has a peak of production at day 3, and reduces thereafter, being important for initial inflammation. It is secreted by immune cells, but also epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts which are highly present at skin and may deceive PDX's anti-inflammatory influence. TGF- β , produced mainly by macrophage, but also by platelets, endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts, is active in homeostasis controlling cell proliferation and its disbalance may lead to cancer, excessive fibrosis and auto-immunity (87). In wound healing setting it regulates cell proliferation and differentiation, influencing angiogenesis, granulation tissue formation, collagen synthesis, tissue remodeling (69). TGF- β showed a significant increase in treatment group at D7 compared to control, as expected for fibroblast stimulation in proliferative phase. The presumed elevated level of TGF- β in sham group, comparable to treatment group at day 7, was also reported by Zhao in a lumbar radicular pain model treated with PDX (56). It could represent the normal TGF- β basal level followed by a drop in the

wounded groups, rather than an elevated basal rate, as a high presence of IL-1 β could be responsible for TGF- β decrease. IL-1 β stimulates NF- κ B transcription route which is presumed to inhibit Smad activation (main TGF- β signaling route) (69). TNF- α is mainly produced by macrophage and T cells to stimulate inflammatory gene transcription, through NF- κ B and MAPK pathways and TNFR1 and TNFR2 receptors. It induces other cytokines and chemokines production, immune cell proliferation, differentiation and apoptosis, very active in the initial inflammatory phase (88). It was significantly reduced by treatment at day 7 comparing to control group and to its own level at day 3. These results suggest that PDX has superior effect in cell proliferation than in inflammation resolution.

Following healing sequence, macrophage indirect presence was investigated through N-acetylglucosaminidase (NAG) activity. NAG was not influenced by PDX treatment, opposing both described results of elevated levels by treatment (24,71,72), and reduced NAG levels (when comparing germ-free mice to not germ-free control healing) (63). Macrophage polarization alters its basal metabolism, when stimulated by pro-inflammatory mediators, glycolysis is stimulated to meet higher energetic needs, and resolutive stimulation favors oxidative phosphorylation (89). This metabolic shift can alter the availability of substrates and reduce NAG production, which could not trustworthily correspond to the total number of macrophages present in the wound (90). It is possible that more resolutive macrophages are present and were not detected, to elucidate this possibility, we tested the model in CX3CR1-eGFP⁺ labeled C57BL/6 mice by fluorescence.

Oposing prompt inflammatory macrophage infiltration (mainly LY6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low}), resolutive macrophage (mainly LY6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high}) infiltrate the wound at the end of inflammation and persist throughout proliferative phase, along with resident macrophage. CX3CR1 presence was demonstrated at wound site by Ishida in α -SMA fibroblasts, CD31⁺ endothelial cells, but the majority of CX3CR1 positive cells were F4/80⁺ macrophage (91). Its importance was demonstrated in a double e-GFP knock in model that showed deficient healing, with reduced macrophage recruitment, fibroblast and endothelial cells proliferation, resulting in deficient vascularization, collagen deposition and reduced TGF- β and VEGF-A levels, while heterozygous did not show healing alterations (91–93). Our fluorescence assay showed increased presence of this receptor in PDX treated group, demonstrating increased number of cells with resolutive functions in the wound (mainly macrophage, but not exclusively),

compared to wounded control group. Macrophage quantification by fluorescence can be overestimated, therefore it is still necessary to further differentiate macrophage within CX3CR1 population. E-GFP protein is an auto fluorescent protein used to observe gene expression, it is stable and has low toxicity, binding to specific cells or parts of the cell. It can maintain fluorescence if GFP itself is not degraded in phagocytes or carried away by lymphatic system, perhaps signaling cells that were recruited earlier and got trapped in the scab, reflecting a summatory of all cells recruited in previous moments (94).

Histological analysis showed greater reepithelialization, as observed by increased number of keratinocytes, organized in a thicker and more extensive layer covering the wounds (increased keratinocytes area) in treated mice. Keratinocytes are stimulated to proliferate mainly by growth factors, but IL-1 β , TNF- α and ECM also play a role (86), so, the combination of increased IL-1 β and TGF- β levels may have further stimulated their proliferation. Total inflammatory infiltrating cells were reduced by treatment, primarily due to neutrophils as observed by MPO quantification and direct microscopic visualization.

Macrophages were widely researched regarding different functions and phenotypes, but other cells related to wound healing and inflammation are also believed to have alternative activation states (13,23,55,66–68,91,95–106). Platelets (107), mast cells (18,108–116) fibroblasts (117) and neutrophils (44,118) have also shown functions other than classical known ones and could be affected by treatment. Many published studies have diverging results, perhaps the model have influence on results, as different organs have particular sets of cells and mediators (119). In skin healing models, there is a great variation in animal type, wound type and number per animal, region of the body the wound is placed, type of dressing, healing parameters accessed and the timing of sample harvest, restricting results comparison (120). Our model observed healthy mice, which normally heal without intervention, which may be an additional limitation for results consideration, and confrontation to literature, as most skin wound healing models refer to diabetic models.

This study shows that PDX effectively reduced inflammatory cells recruitment and, TNF- α and augmented resolutive parameters in an excisional wound healing model at a dose of 10ng/animal/day (i.p.) for 7 days. Hence, PDX is a promising compound in promoting the wound environment to switch from inflammation to resolution, which may be the crucial point for the perfect coordination of the process and growth factor release. Further studies are necessary to better understand its action mechanism.

Conclusion

PDX acts through a different mechanism than classical used drugs, it promotes resolution without being immunosuppressive, and enhances local cells activation. It can be considered an effective therapeutic tool in future wound healing studies, alone or in combination with complimentary acting drugs already established as gold standard in reducing inflammation. This study attempts to contribute to future research in finding a more comprehensive wound management protocol.

Conflicts of interest

The authors declared no potential conflicts of interest concerning the research, authorship, and publication of this article.

References

1. Eming SA, Martin P, Tomic-canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 3 de dezembro de 2014;6(265):265.
2. Ho J, Walsh C, Yue D, Dardik A, Cheema U. Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2017;6(6):191–209.
3. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE. Vol. 17, *Wound Repair and Regeneration.* 2009. p. 763–71.
4. Moysidis M, Stavrou G, Cheva A, Abba Deka I, Tsetis JK, Birba V, et al. The 3-D configuration of excisional skin wound healing after topical probiotic application. *Injury.* 1º de abril de 2022;53(4):1385–93.
5. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? Vol. 22, *Experimental Dermatology.* 2013. p. 507–10.
6. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev [Internet].* 2019;99:665–706. Disponível em: www.prv.org
7. Eisinger F, Patzelt J, Langer HF. The platelet response to tissue injury. Vol. 5, *Frontiers in Medicine.* Frontiers Media S.A.; 2018.
8. Leoni G, Neumann PA, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. Vol. 8, *Mucosal Immunology.* Nature Publishing Group; 2015. p. 959–68.
9. Demarquoy J, le Borgne F. Biosynthesis, metabolism and function of protectins and resolvins. Vol. 9, *Clinical Lipidology.* Future Medicine Ltd.; 2014. p. 683–93.
10. Sim SL, Kumari S, Kaur S, Khosrotehrani K. Macrophages in Skin Wounds: Functions and Therapeutic Potential. *Biomolecules.* 8 de novembro de 2022;12(11).
11. Kloc M, Ghobrial RM, Wosik J, Lewicka A, Lewicki S, Kubiak JZ. Macrophage functions in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 1º de janeiro de 2019;13(1):99–109.
12. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(2).
13. Kotwal GJ, Chien S. Macrophage differentiation in normal and accelerated wound healing. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:353–64.

14. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1º de outubro de 2016;73(20):3861–85.
15. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: Agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):632–40.
16. Medeiros AC, Medeiros A, Filho D. Cicatrização das feridas cirúrgicas Healing of surgical wounds. Vol. 7, *J Surg Cl Res*. 2016 p. 87–102.
17. Aberto Balbino C, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Vol. 41, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005.
18. Ud-Din S, Wilgus TA, Bayat A. Mast Cells in Skin Scarring: A Review of Animal and Human Research. *Front Immunol*. 30 de setembro de 2020;11(552205):1–34.
19. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. agosto de 2012;49(1):35–43.
20. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. Epstein FH, organizador. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2 de setembro de 1999;341(10):738–46. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199909023411006>
21. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional*. Em: 9a Ed Elsevier. 2015.
22. Serhan, C., Chiang N. VDT. Resolution Lipid Mediators. *Nat Rev Immuno*. 2008;8(5):349–61.
23. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol*. 1º de maio de 2018;9(MAY).
24. Reis MB, Pereira PAT, Caetano GF, Leite MN, Galvão AF, Paula-Silva FWG, et al. Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. *PLoS One*. 2017;12(7):1–15.
25. Chatterjee A, Sharma A, Chen M, Toy R, Mottola G, Conte MS. The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells. *PLoS One*. 19 de novembro de 2014;9(11).
26. Lagarde M, Guichardant M, Bernoud-Hubac N. Anti-inflammatory and anti-virus potential of poxytrins, especially protectin DX. *Biochimie*. 1º de dezembro de 2020;179:281–4.

27. Norling L v., Spite M, Yang R, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Cutting Edge: Humanized Nano-Proresolving Medicines Mimic Inflammation-Resolution and Enhance Wound Healing. *The Journal of Immunology*. 15 de maio de 2011;186(10):5543–7.
28. Martinho JP. Neurobiological effects of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids. [Lisboa]: Universidade de Lisboa; 2016.
29. MARTIN CA, ALMEIDA VV, RUIZ MR, VISENTAINER JEL, MATSHUSHITA M, SOUZA NE, et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Rev Nutr*. 2006;19(6):761–70.
30. Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 1º de janeiro de 2016;16(1):51–67.
31. Herrera BS, Kantarci A, Zarrouh A, Hasturk H, Leung KP, van Dyke TE. LXA4 actions direct fibroblast function and wound closure. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;464(4):1072–7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.076>
32. Hartling I, Cremonesi A, Osuna E, Lou PH, Lucchinetti E, Zaugg M, et al. Quantitative profiling of inflammatory and pro-resolving lipid mediators in human adolescents and mouse plasma using UHPLC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med*. 1º de outubro de 2021;59(11):1811–23.
33. Fattori V, Zaninelli TH, Rasquel-Oliveira FS, Casagrande R, Verri WA. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. *Pharmacol Res*. 1º de janeiro de 2020;151.
34. Wang F, Huang S, Xia H, Yao S. Specialized pro-resolving mediators: It's anti-oxidant stress role in multiple disease models. *Mol Immunol*. 1º de outubro de 2020;126:40–5.
35. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med*. maio de 2010;16(5):592–7.
36. Jordan PM, Werz O. Specialized pro-resolving mediators: biosynthesis and biological role in bacterial infections. *FEBS Journal*. 1º de julho de 2022;289(14):4212–27.
37. Menon R. THE EFFECT OF RESOLVINS ON DERMAL WOUND HEALING. [New Brunswick]: The State University of New Jersey; 2012.
38. Balas L, Guichardant M, Durand T, Lagarde M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie*. abril de 2014;99(1):1–7.

39. Serhan CN, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Chiang N. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2015;1851(4):397–413.
40. White PJ, St-Pierre P, Charbonneau A, Mitchell PL, St-Amand E, Marcotte B, et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med*. 2014;20(6):664–9.
41. Jung TW, Chung YH, Kim HC, Abd El-Aty AM, Jeong JH. Protectin DX attenuates LPS-induced inflammation and insulin resistance in adipocytes via AMPK-mediated suppression of the NF- κ B pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1º de outubro de 2018;315(4):E543–51.
42. Chen P, Fenet B, Michaud S, Tomczyk N, Véricel E, Lagarde M, et al. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett*. 3 de novembro de 2009;583(21):3478–84.
43. Chen P, Véricel E, Lagarde M, Guichardant M. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. *The FASEB Journal*. janeiro de 2011;25(1):382–8.
44. Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, et al. Protectin DX, a double lipooxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids*. janeiro de 2014;49(1):49–57.
45. Wang H, Kochevar IE. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF- β biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 2005;
46. Hwang HJ, Jung TW, Kim JW, Kim JA, Lee Y Bin, Hong SH, et al. Protectin DX prevents H₂O₂-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. *Cell Signal*. 1º de janeiro de 2019;53:14–21.
47. Jin S, Sun S, Ling H, Ma J, Zhang X, Xie Z, et al. Protectin DX restores Treg/Th17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome via miR-20a. *Cell Death Dis*. 1º de março de 2021;12(3).
48. Li Y, Zhang J, Yue J, Gou X, Wu X. Epidermal Stem Cells in Skin Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 1º de setembro de 2017;6(9):297–307.
49. Tan W, Chen L, Wang YX, Hu LS, Xiong W, Shang Y, et al. Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)*. 20 de maio de 2018;131(10):1167–73.

50. Zhuo XJ, Hao Y, Cao F, Yan SF, Li H, Wang Q, et al. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp Mol Med*. 1º de abril de 2018;50(4):1–13.
51. Yang JX, Li M, Hu X, Lu JC, Wang Q, Lu SY, et al. Protectin DX promotes epithelial injury repair and inhibits fibroproliferation partly via ALX/PI3K signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 1º de dezembro de 2020;24(23):14001–12.
52. Hu X, Zhang YA, Chen B, Jin Z, Lin ML, Li M, et al. Protectin DX promotes the inflammatory resolution via activating COX-2/L-PGDS-PGD2 and DP1 receptor in acute respiratory distress syndrome. *Int Immunopharmacol*. 1º de janeiro de 2022;102:1–14.
53. Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015;1851(4):496–502.
54. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, et al. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*. 28 de março de 2013;153(1):112–25.
55. Xia H, Chen L, Liu H, Sun Z, Yang W, Yang Y, et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci Rep*. 2017;7(1).
56. Zhao QX, Wang YH, Wang SC, Xue S, Cao ZX, Sun T. Protectin DX Attenuates Lumbar Radicular Pain of Non-compressive Disc Herniation by Autophagy Flux Stimulation via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling. *Front Physiol*. 6 de janeiro de 2022;12(784653).
57. Fonseca FCS, Orlando RM, Turchetti-Maia RMM, de Francischi JN. Comparative effects of the ω 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. *J Inflamm Res*. 29 de agosto de 2017;10:119–33.
58. Demidova-Rice TN, Salomatina E v., Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med*. outubro de 2007;39(9):706–15.
59. Tkalčević VI, Ćužić S, Parnham MJ, Pašalić I, Brajša K. Differential evaluation of excisional non-occluded wound healing in db/db mice. *Toxicol Pathol*. fevereiro de 2009;37(2):183–92.

60. Park SA, Covert J, Teixeira L, Motta MJ, Deremer SL, Abbott NL, et al. Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional wound model. *Wound Repair and Regeneration*. 1º de março de 2015;23(2):251–61.
61. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. julho de 2007;43(1S):S25–30.
62. Wahedi HM, Park YU, Moon EY, Kim SY. Juglone ameliorates skin wound healing by promoting skin cell migration through Rac1/Cdc42/PAK pathway. *Wound Repair and Regeneration*. 2016;24(5):786–94.
63. Canesso MCC, Vieira AT, Castro TBR, Schirmer BGA, Cisalpino D, Martins FS, et al. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. *The Journal of Immunology*. 15 de novembro de 2014;193(10):5171–80.
64. Martinez RM, Fattori V, Saito P, Melo CBP, Borghi SM, Pinto IC, et al. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *J Dermatol Sci*. 1º de agosto de 2018;91(2):164–74.
65. Rivas-Fuentes S, Salgado-Aguayo A, Arratia-Quijada J, Gorocica-Rosete P. Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review. Vol. 12, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2020. p. 571–83.
66. Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. Disclosure of the Culprits: Macrophages—Versatile Regulators of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. setembro de 2013;2(7):357–68.
67. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1º de março de 2011;121(3):985–97.
68. Yang W, Zhao X, Tao Y, Wu Y, He F, Tang L. Proteomic analysis reveals a protective role of specific macrophage subsets in liver repair. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2019;9(1).
69. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. julho de 2012;26(7):812–20.
70. Fogarty CE, Bergmann A. The sound of silence: Signaling by apoptotic cells. *Curr Top Dev Biol*. 2015;114:241–65.
71. Moura FBR, Ferreira BA, Deconte SR, Landim BC, Justino AB, Aro AA de, et al. Wound healing activity of the hydroethanolic extract of the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. *Ex Reis. J Tradit Complement Med*. 1º de setembro de 2021;11(5):446–56.

72. Costa MC, Ferreira BA, Moura FBR, Lima LG, Araujo F de A, Mota FCD. Evaluation of 4% stabilized Sodium Hypochlorite activity in the repair of cutaneous excisional wounds in mice. *Injury*. 1º de agosto de 2021;52(8):2075–83.
73. Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, Dipietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2008;294:179–84. Disponível em: www.ajpregu.org
74. Nam Y, Kim JH, Baek J, Kim W. Improvement of cutaneous wound healing via topical application of heat-killed *Lactococcus chungangensis* cau 1447 on diabetic mice. *Nutrients*. 1º de agosto de 2021;13(8).
75. Wang L, Lu Q, Gao W, Yu S. Recent advancement on development of drug-induced macrophage polarization in control of human diseases. Vol. 284, *Life Sciences*. Elsevier Inc.; 2021.
76. Yasukawa K, Okuno T, Yokomizo T. Eicosanoids in skin wound healing. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–19.
77. Ansell DM, Campbell L, Thomason HA, Brass A, Hardman MJ. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. *Wound Repair Regen*. 2014;22(2):281–7.
78. Hong S, Tian H, Lu Y, Monroe Laborde J, Muhale FA, Wang Q, et al. Neuroprotectin/protectin D1: endogenous biosynthesis and actions on diabetic macrophages in promoting wound healing and innervation impaired by diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2014;307(11):1058–67. Disponível em: www.ajpcell.org
79. Viaña-Mendieta P, Sánchez ML, Benavides J. Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. *Int Wound J*. 1º de janeiro de 2022;19(1):100–13.
80. Wahedi HM, Jeong M, Chae JK, Do SG, Yoon H, Kim SY. Aloesin from *Aloe vera* accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 15 de maio de 2017;28:19–26.
81. Gupta A, Kumar P. Assessment of the histological state of the healing wound. *Plast Aesthet Res*. 2015;2(5):239.
82. Magni G, Tatini F, Siena G de, Pavone FS, Alfieri D, Cicchi R, et al. Blue-LED-Light Photobiomodulation of Inflammatory Responses and New Tissue Formation in Mouse-Skin Wounds. *Life*. 1º de outubro de 2022;12(10).

83. Sorg H, Grambow E, Eckl E, Vollmar B. Oxytocin effects on experimental skin wound healing. *Innov Surg Sci*. 2017;2(4):219–32.
84. Mitani O, Nishikawa A, Kurokawa I, Gabazza EC, Ikeda M, Mizutani H. Enhanced wound healing by topical application of ointment containing a low concentration of povidone-iodine <http://www.magonlinelibrary.com/doi/pdf/10.12968/jowc.2016.25.9.521>. *J Wound Care*. 2016;25(9):521–9.
85. Pereira LX, Silva HKC, Longatti TR, Silva PP, di Lorenzo Oliveira C, de Freitas Carneiro Proietti AB, et al. *Achyrocline alata* potentiates repair of skin full thickness excision in mice. *J Tissue Viability*. 1º de novembro de 2017;26(4):289–99.
86. Bae IH, Park JW oo, Kim DY. Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4551–67.
87. Mokoena D, Dhilip Kumar SS, Houreld NN, Abrahamse H. Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 1º de dezembro de 2018;189:138–44.
88. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci*. 1º de março de 2021;22(5):1–16.
89. Nonnenmacher Y, Hiller K. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. Vol. 75, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2018. p. 2093–109.
90. Martinez P, Denys A, Delos M, Sikora AS, Carpentier M, Julien S, et al. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology*. 1º de maio de 2015;25(5):502–13.
91. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and Function. *The Journal of Immunology*. 1º de janeiro de 2008;180(1):569–79.
92. Zaid A, Tharmarajah K, Mostafavi H, Freitas JR, Sheng KC, Foo SS, et al. Modulation of monocyte-driven myositis in alphavirus infection reveals a role for CX3CR1+ macrophages in tissue repair. *mBio*. 1º de março de 2020;11(2).
93. Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, Colegio OR. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Arch*. 1º de abril de 2017;469(3–4):455–63.

94. Cousin NC, Parker A, Sidler K. The Use of Fluorescence in Genetically Modified Animals The role of the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) in Genetic Engineering.
95. Murray PJ. Macrophage Polarization. Vol. 79, Annual Review of Physiology. Annual Reviews Inc.; 2017. p. 541–66.
96. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2010;3(7):643–53. Disponível em: www.ijcep.com
97. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, et al. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One*. 10 de maio de 2012;7(5).
98. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DMW. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. Vol. 61, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press; 2017. p. 3–11.
99. Sipka T, Park SA, Ozbilgic R, Balas L, Durand T, Mikula K, et al. Macrophages undergo a behavioural switch during wound healing in zebrafish. *Free Radic Biol Med*. 1º de novembro de 2022;192:200–12.
100. Tymen SD, Rojas IG, Zhou X, Fang ZJ, Zhao Y, Marucha PT. Restraint stress alters neutrophil and macrophage phenotypes during wound healing. *Brain Behav Immun*. fevereiro de 2013;28:207–17.
101. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *American Journal of Pathology*. 2009;175(6):2454–62.
102. Burgess M, Wicks K, Gardasevic M, Mace KA. Cx3CR1 Expression Identifies Distinct Macrophage Populations That Contribute Differentially to Inflammation and Repair. *Immunohorizons*. 1º de julho de 2019;3(7):262–73.
103. Werz O, Gerstmeier J, Libreros S, de La Rosa X, Werner M, Norris PC, et al. Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02538-5>
104. Ramon S, Dalli J, Sanger JM, Winkler JW, Aursnes M, Tungen JE, et al. The Protectin PCTR1 Is Produced by Human M2 Macrophages and Enhances Resolution of Infectious Inflammation. *Am J Pathol* [Internet]. abril de 2016;186(4):962–73. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944016000316>

105. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park C, Xu Z, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *The FASEB Journal*. abril de 2012;26(4):1755–65.
106. Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, et al. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* [Internet]. 15 de novembro de 2008;112(10):4117–27. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-129767>
107. Lagarde M, Calzada C, Guichardant M, Véricel E. Dose-effect and metabolism of docosahexaenoic acid: Pathophysiological relevance in blood platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. janeiro de 2013;88(1):49–52.
108. Shiota N, Nishikori Y, Kakizoe E, Shimoura K, Niibayashi T, Shimbori C, et al. Pathophysiological role of skin mast cells in wound healing after scald injury: Study with mast cell-deficient W/W^v mice. *Int Arch Allergy Immunol*. janeiro de 2009;151(1):80–8.
109. Bacci S. Fine Regulation during Wound Healing by Mast Cells, A Physiological Role Not Yet Clarified. *Int J Mol Sci*. 1º de fevereiro de 2022;23(3).
110. Zhang J, Shi GP. Mast cells and metabolic syndrome. Vol. 1822, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2012. p. 14–20.
111. Oskeritzian CA. Mast Cells and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. fevereiro de 2012;1(1):23–8.
112. Tellechea A, Leal EC, Kafanas A, Auster ME, Kuchibhotla S, Ostrovsky Y, et al. Mast cells regulate wound healing in diabetes. *Diabetes*. 1º de julho de 2016;65(7):2006–19.
113. Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, Dipietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(2):458–65.
114. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M, Weller K, et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *The FASEB Journal*. novembro de 2006;20(13):2366–8.
115. Mousavi M, Khanifar A, Mousavi N, Anbari K, Chehelcheraghi F. Coactivity of Mast Cells and Stem Cells on Angiogenesis and Antioxidants' Potentials at Inflammation, Proliferation, and Tissue Remodeling Phases of Wound. *Arch Plast Surg*. 1º de maio de 2022;49(3):462–70.

116. Fathi AN, Student M, Babaei S, Baazm M, Sakhaie H, Babaei S. Effect of bromelain on mast cell numbers and degranulation in diabetic rat wound healing. *Journal of Wound Care - Supplement*. 2022;31(8):S4–11.
117. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277–81.
118. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*. 2000;
119. Kobayashi T, Naik S, Nagao K. Choreographing Immunity in the Skin Epithelial Barrier. Vol. 50, *Immunity*. Cell Press; 2019. p. 552–65.
120. Galiano RD, Michaels V J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2004;12(4):485–92.

6 CONCLUSÃO

Na prática cirúrgica lidamos com dificuldade cicatriciais em múltiplas situações clínicas. Existe a possibilidade de haver alteração no processo mesmo em ocasiões de aplicação de técnica meticulosa, mínimo grau de contaminação, ausência de comorbidades e pequeno trauma cirúrgico, quando uma boa cicatrização é esperada. A complexidade e a coincidência de mecanismos envolvidos no processo cicatricial, associada aos múltiplos fatores de interferência estimulam seu estudo por diferentes aspectos.

Vários estudos relataram o potencial efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo dos mediadores lipídicos, nos quais a protectina DX se encontra. Muitos desses trabalhos foram referidos juntamente com seus principais achados, e mecanismos de ação propostos. A busca pela compreensão das vias de sinalização é importante para prever o efeito da medicação e as possíveis interferências. A maior vantagem da PDX seria a possibilidade de estimular vias endógenas à produção de mediadores resolutivos *in locu* e no momento exato de sua necessidade, sem causar imunossupressão por não bloquear indiscriminadamente todas as vias inflamatórias.

Nesse estudo *in vivo* observamos uma aceleração moderada da cicatrização após o tratamento, com um padrão geral de melhora nos parâmetros avaliados. O percentual de fechamento da ferida foi maior no período avaliado, sendo a diferença significativa para a maior dose testada, condizendo com a literatura que aponta efeito dose-dependente. Houve redução na produção de TNF- α e na presença de neutrófilos (verificada pela atividade de MPO e diferença no padrão histológico), e aumento da produção de FGF- β , indicando ter efeito anti-inflamatório. A presença do receptor CX3CR1 aumentou com o tratamento, correspondendo a ação pró-resolutiva. A produção de IL-1 β , a atividade de NAG e o defeito epitelial de cobertura da ferida se mantiveram no nível do grupo controle.

Nossa percepção é que a PDX tenha maior interferência na proliferação celular e atividade resolutiva em relação à anti-inflamatória, sem comprometimento do resultado esperado. Trata-se de droga em estudo, cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, sendo possível haver particularidades desconhecidas relacionadas à cicatrização cutânea. Mais estudos são necessários para a elucidação

das questões ainda não respondidas e a PDX é opção terapêutica potencial no tratamento das lesões cutâneas.

7 REFERÊNCIAS

- ABERTO BALBINO, C.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. **Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [s.l: s.n.].
- ACHAR, R. A. N. et al. Use of insulin-like growth factor in the healing of open wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 125–131, 2014.
- ANSELL, D. M. et al. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 22, n. 2, p. 281–287, 2014.
- BACCI, S. Fine Regulation during Wound Healing by Mast Cells, A Physiological Role Not Yet Clarified. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, 1 fev. 2022.
- BAE, I. H.; PARK, J. W. OO; KIM, D. Y. Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 4551–4567, 2014.
- BALAS, L. et al. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie*, v. 99, n. 1, p. 1–7, abr. 2014.
- BANG, S. et al. GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain. *Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 8, p. 3568–3582, 1 ago. 2018.
- BAO, P. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, v. 153, n. 2, p. 347–358, 15 maio 2009.
- BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 1, p. 51–67, 1 jan. 2016.
- BEHM, B. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 26, n. 7, p. 812–820, jul. 2012.
- BLAIR, M. J. et al. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Advances in Wound Care*, v. 9, n. 3, p. 127–143, 2020.
- BLAISE, O. et al. A murine model of a burn wound reconstructed with an allogeneic skin graft. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2020, n. 162, p. 1–13, 2020.
- BRYAN, D. et al. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *Cytokine*, v. 31, n. 6, p. 429–438, 21 set. 2005.

- CANESSO, M. C. C. et al. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5171–5180, 15 nov. 2014.
- CARINI, M. et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Farmaco**, v. 85, p. 21–27, 2000.
- CHATTERJEE, A. et al. The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 19 nov. 2014.
- CHEN, P. et al. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. **FEBS Letters**, v. 583, n. 21, p. 3478–3484, 3 nov. 2009.
- CHEN, P. et al. Poxytins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 382–388, jan. 2011.
- CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.
- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. 1S, p. S25–S30, jul. 2007.
- DARBY, I. A. et al. **Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing**. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology** Dove Medical Press Ltd., , 6 nov. 2014.
- DAS, U. N. Ageing: Is there a role for arachidonic acid and other bioactive lipids? A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 67–79, 2018.
- DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986–995, 2013.
- DEMARQUOY, J.; LE BORGNE, F. **Biosynthesis, metabolism and function of protectins and resolvins**. **Clinical Lipidology** Future Medicine Ltd., , 1 dez. 2014.
- DEMIDOVA-RICE, T. N. et al. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 9, p. 706–715, out. 2007.
- EMING, S. A.; KRIEG, T. **Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair**. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. **Anais...**set. 2006.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 265, p. 265, 3 dez. 2014.

- FANG, L. et al. Improvement of Skin Wound Healing for Diabetic Mice with Thermosensitive Hydrogel Combined with Insulin Injection. **International Journal of Endocrinology**, v. 2022, 2022.
- FANG, R. C.; MUSTOE, T. A. Animal models of wound healing: Utility in transgenic mice. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 8, p. 989–1005, 1 ago. 2008.
- FATHI, A. N. et al. Effect of bromelain on mast cell numbers and degranulation in diabetic rat wound healing. **Journal of Wound Care - Supplement**, v. 31, n. 8, p. S4–S11, 2022.
- FATTORI, V. et al. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological Research**, v. 151, 1 jan. 2020.
- FINNISON, K. W. et al. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 5, p. 195–214, jun. 2013.
- FONSECA, F. C. S. et al. Comparative effects of the ω 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. **Journal of Inflammation Research**, v. 10, p. 119–133, 29 ago. 2017.
- FRANGOIANNIS, N. G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 1 mar. 2020.
- GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485–492, 2004.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. **Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, 2011.
- GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. Physiological roles of macrophages. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 469, n. 3–4, p. 365–374, 1 abr. 2017.
- GRAMBOW, E. et al. Experimental Models to Study Skin Wound Healing with a Focus on Angiogenesis. **Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 55, 25 ago. 2021.
- GREENHALGH, D. G. et al. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 6, p. 1235–1246, 1990.
- GROSE, R.; WERNER, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 147–166, 2004.

- HARTLING, I. et al. Quantitative profiling of inflammatory and pro-resolving lipid mediators in human adolescents and mouse plasma using UHPLC-MS/MS. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 59, n. 11, p. 1811–1823, 1 out. 2021.
- HAVRAN, W. L.; JAMESON, J. M. Epidermal T Cells and Wound Healing. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5423–5428, 15 maio 2010.
- HERRERA, B. S. et al. LXA4 actions direct fibroblast function and wound closure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 4, p. 1072–1077, 2015.
- HO, J. et al. Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 6, n. 6, p. 191–209, 2017.
- HOKYNKOVÁ, A. et al. Fatty Acid Supplementation Affects Skin Wound Healing in a Rat Model. **Nutrients**, v. 14, n. 11, 1 jun. 2022.
- HONG, S. et al. Neuroprotectin/protectin D1: endogenous biosynthesis and actions on diabetic macrophages in promoting wound healing and innervation impaired by diabetes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 307, n. 11, p. 1058–1067, 2014.
- HU, X. et al. Protectin DX promotes the inflammatory resolution via activating COX-2/L-PGDS-PGD2 and DP1 receptor in acute respiratory distress syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 102, p. 1–14, 1 jan. 2022.
- HWANG, H. J. et al. Protectin DX prevents H₂O₂-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. **Cellular Signalling**, v. 53, p. 14–21, 1 jan. 2019.
- JANG, D. I. et al. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–16, 1 mar. 2021.
- JIN, S. et al. Protectin DX restores Treg/Th17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome via miR-20a. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2021.
- JORDAN, P. M.; WERZ, O. Specialized pro-resolving mediators: biosynthesis and biological role in bacterial infections. **FEBS Journal**, v. 289, n. 14, p. 4212–4227, 1 jul. 2022.
- JUNG, T. W. et al. Protectin DX attenuates LPS-induced inflammation and insulin resistance in adipocytes via AMPK-mediated suppression of the NF- κ B pathway. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 4, p. E543–E551, 1 out. 2018.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

- KANEKO, N. et al. **The role of interleukin-1 in general pathology. Inflammation and Regeneration** BioMed Central Ltd., , 6 jun. 2019.
- KING, A. et al. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 4, p. 315–323, abr. 2014.
- KLOC, M. et al. Macrophage functions in wound healing. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 99–109, 1 jan. 2019.
- KOMPRDA, T. et al. Comparison of dietary oils with different polyunsaturated fatty acid n-3 and n-6 content in the rat model of cutaneous wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–22, 1 nov. 2020.
- KOTWAL, G. J.; CHIEN, S. Macrophage differentiation in normal and accelerated wound healing. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 62, p. 353–364, 2017.
- KUBICZKOVA, L. et al. TGF- β -an excellent servant but a bad master. 2012.
- KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.
- LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M.; BERNOUD-HUBAC, N. Anti-inflammatory and anti-virus potential of poxytrins, especially protectin DX. **Biochimie**, v. 179, p. 281–284, 1 dez. 2020.
- LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 1 out. 2016.
- LEIDER, M. ON THE WEIGHT OF THE SKIN*. **J Invest Dermatol**, v. 12, n. 3, p. 187–191, mar. 1949.
- LEONI, G. et al. **Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. Mucosal Immunology** Nature Publishing Group, , 19 set. 2015.
- LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**, v. 20, n. 4, p. 108–120, nov. 2011.
- LI, H. et al. Posttreatment with protectin DX ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and lung dysfunction in mice. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- LI, Y. et al. Functions of V γ 4 T cells and dendritic epidermal T cells on skin wound healing. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 4 jun. 2018.

- LICHTMAN, M. K.; OTERO-VINAS, M.; FALANGA, V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 2, p. 215–222, 1 mar. 2016.
- LIU, M. et al. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ros production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 49–57, jan. 2014.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. **Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine and Growth Factor Reviews**, ago. 2011.
- MARTIN, C. A. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Rev. Nutr**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.
- MARTINHO, J. P. **Neurobiological effects of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids**. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2016.
- MASSON-MEYERS, D. S. et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 1–2, p. 21–37, 1 fev. 2020.
- MEDEIROS, A. C.; MEDEIROS, A.; FILHO, D. **Cicatrização das feridas cirúrgicas Healing of surgical wounds** *J Surg Cl Res*. [s.l: s.n.].
- MENON, R. **THE EFFECT OF RESOLVINS ON DERMAL WOUND HEALING**. New Brunswick: The State University of New Jersey, 2012.
- MINUTTI, C. M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 61, p. 3–11, 1 jan. 2017.
- MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2454–2462, 2009.
- MOKOENA, D. et al. Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 138–144, 1 dez. 2018.
- MOUSAVI, M. et al. Coactivity of Mast Cells and Stem Cells on Angiogenesis and Antioxidants' Potentials at Inflammation, Proliferation, and Tissue Remodeling Phases of Wound. **Archives of Plastic Surgery**, v. 49, n. 3, p. 462–470, 1 maio 2022.
- MOYSIDIS, M. et al. The 3-D configuration of excisional skin wound healing after topical probiotic application. **Injury**, v. 53, n. 4, p. 1385–1393, 1 abr. 2022.

- MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 541–566, 10 fev. 2017.
- NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. **The dynamics of the skin's immune system. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2 abr. 2019.
- NORLING, L. V. et al. Cutting Edge: Humanized Nano-Proresolving Medicines Mimic Inflammation-Resolution and Enhance Wound Healing. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5543–5547, 15 maio 2011.
- OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 378–391, 1 jun. 2016.
- OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 16 abr. 2019.
- PARK, J. W.; HWANG, S. R.; YOON, I. S. advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. **Molecules**, v. 22, n. 8, 1 ago. 2017.
- PARK, S. A. et al. Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional wound model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 251–261, 1 mar. 2015.
- PIAO, S. et al. Protectin DX attenuates IL-1 β -induced inflammation via the AMPK/NF- κ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model. **International Immunopharmacology**, v. 78, 1 jan. 2020.
- PYRILLOU, K.; BURZYNSKI, L. C.; CLARKE, M. C. H. **Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 18 dez. 2020.
- RATCHFORD, S. M. et al. Aspirin as a COX inhibitor and anti-inflammatory drug in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 123, p. 1610–1616, 2017.
- REID, R. R. et al. The future of wound healing: Pursuing surgical models in transgenic and knockout mice. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 199, n. 4, p. 578–585, out. 2004.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, ago. 2012.
- REIS, M. B. et al. Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2017.

- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103–120, 2016.
- RODERO MP; KHOSROTEHRANI K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 3, n. 7, p. 643–653, 2010.
- RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**, v. 99, p. 665–706, 2019.
- SAEED, S.; MARTINS-GREEN, M. Animal models for the study of acute cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 1 jan. 2022.
- SCHEBB, N. H. et al. Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What is the Evidence so far? **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. 838782, p. 1–22, 2 mar. 2022.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 2012.
- SEN, C. K. et al. **Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE.** **Wound Repair and Regeneration**, nov. 2009.
- SERHAN, C. N. et al. Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 8, p. 1025–1037, 2002.
- SERHAN, C. N. et al. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1848–1859, 2006.
- SERHAN, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 101–137, 6 nov. 2007.
- SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.
- SERHAN, C. N. et al. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, 2015a.

- SERHAN, C. N. et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 397–413, 2015b.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: Agonists of resolution. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 632–640, 2013.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, maio 2008.
- SHIOTA, N. et al. Pathophysiological role of skin mast cells in wound healing after scald injury: Study with mast cell-deficient W/W^v mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 151, n. 1, p. 80–88, jan. 2010.
- SIM, S. L. et al. Macrophages in Skin Wounds: Functions and Therapeutic Potential. **Biomolecules**, v. 12, n. 11, 8 nov. 2022.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.
- SIPKA, T. et al. Macrophages undergo a behavioural switch during wound healing in zebrafish. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 192, p. 200–212, 1 nov. 2022.
- SORG, H.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. **Journal of Anatomy**, v. 211, n. 6, p. 810–818, dez. 2007.
- SUBRAMANIAN IYER, S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. 2012.
- TAN, W. et al. Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Chinese Medical Journal**, v. 131, n. 10, p. 1167–1173, 20 maio 2018.
- TELLECHEA, A. et al. Mast cells regulate wound healing in diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 7, p. 2006–2019, 1 jul. 2016.
- TKALČEVIĆ, V. I. et al. Differential evaluation of excisional non-occluded wound healing in db/db mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, n. 2, p. 183–192, fev. 2009.
- TAI, W. C. et al. In Vitro Biosynthetic Pathway Investigations of Neuroprotectin D1 (NPD1) and Protectin DX (PDX) by Human 12-Lipoxygenase, 15-Lipoxygenase-1, and 15-Lipoxygenase-2. **Biochemistry**, v. 60, n. 22, p. 1741–1754, 8 jun. 2021.

- UD-DIN, S.; WILGUS, T. A.; BAYAT, A. Mast Cells in Skin Scarring: A Review of Animal and Human Research. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 552205, p. 1–34, 30 set. 2020.
- VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, v. 24, n. 4, p. 146–154, jul. 2001.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 2009.
- WAHEDI, H. M. et al. Juglone ameliorates skin wound healing by promoting skin cell migration through Rac1/Cdc42/PAK pathway. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 5, p. 786–794, 2016.
- WANG, F. et al. Specialized pro-resolving mediators: It's anti-oxidant stress role in multiple disease models. **Molecular Immunology**, v. 126, p. 40–45, 1 out. 2020.
- WATERBORG, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. Em: WALKER, J. M. (Ed.). **The Protein Protocols Handbook**. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 7–10.
- WEI, J. C. J. et al. Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: From mice, rats, rabbits, pigs to humans. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017.
- WEISHEIT, C. K.; ENGEL, D. R.; KURTS, C. Dendritic cells and macrophages: Sentinels in the kidney. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 10, p. 1841–1851, 7 out. 2015.
- WELLER, K. et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 13, p. 2366–2368, nov. 2006.
- WHITE, P. J. et al. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver gluco-regulatory axis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 664–669, 2014.
- WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. **Open Biology**, v. 10, n. 9, 1 set. 2020.
- WOLF, A. A.; GOODRIDGE, H. S. Mast Cells Reveal Their Past Selves. **Immunity**, v. 48, n. 6, p. 1065–1067, 19 jun. 2018.
- WULFF, B. C. et al. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 458–465, 2012.

- WULFF, B. C.; WILGUS, T. A. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 8, p. 507–510, ago. 2013.
- XIA, H. et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues 1 Myeloperoxidase (MPO), 2 a hydrogen peroxide (H₂O₂). **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 245, n. 1, p. 93–96, fev. 1997.
- XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature Medicine**, v. 16, n. 5, p. 592–597, maio 2010.
- YADAV, S.; DWIVEDI, A.; TRIPATHI, A. Biology of macrophage fate decision: Implication in inflammatory disorders. **Cell Biology International**, v. 46, n. 10, p. 1539–1556, 1 out. 2022.
- YANG, J. X. et al. Protectin DX promotes epithelial injury repair and inhibits fibroproliferation partly via ALX/PI3K signalling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 23, p. 14001–14012, 1 dez. 2020.
- YASUKAWA, K.; OKUNO, T.; YOKOMIZO, T. **Eicosanoids in skin wound healing. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2 nov. 2020.
- YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Em: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.
- ZHAO, Q. X. et al. Protectin DX Attenuates Lumbar Radicular Pain of Non-compressive Disc Herniation by Autophagy Flux Stimulation via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 784653, 6 jan. 2022.
- ZHUO, X. J. et al. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p. 1–13, 1 abr. 2018.
- ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. **Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. Journal of Dermatological Science** Elsevier Ireland Ltd, , 1 abr. 2018.