



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SORAIA MENDES PIEROTTI

**MARESINA 2 ACELERA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
EM MODELO MURINO DE LESÃO CUTÂNEA EM DORSO**

Londrina
2023

SORAIA MENDES PIEROTTI

**MARESINA 2 ACELERA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
EM MODELO MURINO DE LESÃO CUTÂNEA EM DORSO**

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

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

Pierotti, Soraia.

MARESINA 2 ACELERA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE LESÃO CUTÂNEA EM DORSO / Soraia Pierotti. - Londrina, 2023.
74 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. Estudo experimental para avaliar os efeitos e os mecanismos de ação do mediador lipídico pró-resolutivo MaR2 sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso (LCD) - 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

SORAIA MENDES PIEROTTI

MARESINA 2 ACELERA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM MODELO MURINO DE LESÃO CUTÂNEA EM DORSO

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

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Telma Saraiva Santos
Washington University School of medicine in
Saint Louis - WashU

Dr. Tiago Henrique Zaninelli
Washington University School of medicine in
Saint Louis - WashU

Londrina, 28 de julho de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por ser minha base espiritual, por ter me dado fé que conseguiria atingir meus objetivos pessoais e profissionais.

Agradeço a minha família, pai, mãe, irmãs e meu marido, os quais sempre me apoiaram e incentivaram incondicionalmente, de qualquer lugar, sempre juntos.

Agradeço a minha orientadora prof^a. Dra. Rubia Casagrande por ter me aceito como orientanda, por me conduzir no aprimoramento das minhas habilidades científicas, pela paciência e dedicação para meu crescimento na vida acadêmica.

Agradeço ao prof. Dr. Waldiceu A. Verri Jr. por todas as oportunidades proporcionadas durante os anos do mestrado, pelo conhecimento e dedicação compartilhados.

Agradeço a Telma S., Mariana B., Tiago Z., Camila F. e Anelise F. por toda a paciência e ajuda com os experimentos durante estes anos, sem eles eu não teria conseguido. Serei eternamente grata pelo apoio.

Agradeço também a todos do CEPPOS, do LPG e principalmente do Labdor, pelo acolhimento, pelas ajudas em experimentos, ensinamentos e por tornarem mais leves e divertidos os momentos desafiadores e cansativos.

Agradeço a Patrícia R., minha companheira de mestrado, com quem pude dividir as dificuldades e felicidades da pós-graduação.

Agradeço a todos os membros da banca pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço, por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, e aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

*“Na vida não existe nada a temer,
mas a entender”*

Marie Curie

RESUMO

PIEROTTI, Soraia Mendes. **Maresina 2 acelera o processo de cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso**. 2023. 74 f. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

A maresina 2 (MaR2), derivada do ácido docosahexaenóico (DHA) e biossintetizada por macrófagos é um dos mais recentes mediadores lipídicos pró-resolução (MLPR) descritos. Embora reduza a fagocitose do zimosan e o recrutamento neutrofílico não se sabe se essas ações anti-inflamatórias podem ser usadas para tratar feridas na pele. A má cicatrização de feridas é responsável por complicações diversas e elevados índices de mortalidade, sendo que esse agravante aumenta no caso de doença pré-existente, infecções e deficiências nutricionais. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos e os mecanismos de ação do mediador lipídico pró-resolutivo MaR2 sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea em dorso (LCD). O modelo consiste na indução de duas lesões cutâneas no dorso de camundongos hairless e pós tratamento diário via intraperitoneal com MaR2. O tratamento com 100 pg/animal de MaR2 acelerou o processo de cicatrização mostrando maior eficiência no fechamento da lesão, diminuiu alterações histopatológicas inflamatórias, recrutamento de neutrófilos (MPO e migração de células LysM-eGFP positivas), diminuiu níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e a expressão de RNAm de MMP-1, MMP-9 e TIMP-1. Em conclusão nosso estudo sugere a MaR2 como uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de feridas cutâneas.

Palavras-chave: Lesão cutânea; Resolução de inflamação; MLPR; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

PIEROTTI, Soraia Mendes. **Maresin 2 accelerates the wound healing process in a murine model of dorsal skin lesion**. 2023. 74 p. Dissertation (Master's degree in Health Sciences – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023).

Maresin 2 (MaR2) is one of the last described specialized pro-resolving lipid mediators. Although it reduces phagocytosis of zymosan and neutrophil recruitment, it is not known whether these anti-inflammatory actions can be used to treat skin wounds. Unsuccessful healing of wounds is responsible for several complications and high mortality rates, and this aggravating factor increases in the case of pre-existing disease, infections, and nutritional deficiencies. The aim of this study was to analyze the effects and action mechanisms of the pro-resolutive lipid mediator MaR2 on wound healing in a murine model of dorsal skin lesion (LCD). The model consists of induction of two skin lesions on the dorsum of hairless mice and post daily intraperitoneal treatment with MaR2. Treatment with 100 pg/animal of MaR2 accelerated the healing process showing higher efficiency in lesion closure, decreased inflammatory histopathological changes, neutrophil recruitment (MPO and migration of LysM-eGFP positive cells), decreased levels of inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and mRNA expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1. In conclusion our study suggests MaR2 as a promising therapeutic approach in the treatment of skin wounds.

Keywords: wound healing, resolving inflammation, Specialized Pro-resolving Mediators (SPMs), oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais eventos do processo cicatricial	20
Figura 2 – Biossíntese de mediadores lipídicos	29
Figura 3 – Biossíntese detalhada das maresinas	30
Figura 4 – Método de avaliação da medida e fechamento das lesões	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers	37
Tabela 2 – Critério dos escores utilizados para avaliação histológica	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DHA	Ácido docosahexaenoico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
H&E	Hematoxilina&eosina
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil amônio
IFNs	<i>Interferons</i>
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
NO	Óxido nítrico sintase induzível
LOX	Lipoxigenase
LPR	Lipídios pró-resolutivos
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MaR2	Maresina 2
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
NAG	N-acetil-glucosamina
NF-κB	Factor nuclear kappa B

NO	Oxido nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PG	Prostaglandinas
PMN	Polimorfonuclear
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Rvs	Resolvinas
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TUB α	Alfa tubulina
TX	Tromboxanos
UVB	Luz ultravioleta B
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	PELE	17
2.2	FERIDA	18
2.3	CICATRIZAÇÃO	19
2.3.1	FASES DA CICATRIZAÇÃO	20
2.3.1.1	HEMOSTASIA	20
2.3.1.2	FASE INFLAMATÓRIA	21
2.3.1.3	FASE PROLIFERATIVA	23
2.3.1.4	FASE DE REMODELAMENTO	25
2.4	TRATAMENTOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA CICATRIZAÇÃO	26
2.5	LIPÍDEOS PRÓ-RESOLUÇÃO	26
2.5.1	MARESINA 2	29
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVOS GERAIS	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	33
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.3	MEDIDA E AVALIAÇÃO DO FECHAMENTO DAS LESÕES	34
5.4	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	35
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	36
5.6	FLUORESCÊNCIA	37
5.7	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS	38
5.8	RT-qPCR	38
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	41
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	74
	ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais	75

1 1 INTRODUÇÃO

2 A pele humana possui uma ligação singular com os demais órgãos e está
3 diretamente associada ao equilíbrio dinâmico de todo nosso organismo com o
4 ambiente externo. Por funcionar como uma barreira, a pele frequentemente sofre a
5 ação de agentes agressores externos que são responsáveis por desencadear várias
6 reações físico-químicas, ativando o sistema imune e conseqüentemente a liberação
7 de mediadores, mudanças estruturais no tecido e diversas interações celulares e
8 moleculares, promovendo assim o processo de cicatrização (BALBINO; PEREIRA;
9 CURI, 2005).

10 Dentre as agressões sofridas pela pele, existem as que geram feridas
11 cutâneas, seja por acidentes com objetos perfuro cortantes em graus variados,
12 queimaduras ou por incisões cirúrgicas/biópsia. Em todos esses casos há inflamação
13 e normalmente posterior reparo tecidual (TOTTOLI, et al. 2020; KOLIMI et al. 2022).
14 As feridas cutâneas são classificadas como feridas agudas, as quais são geralmente
15 curadas dentro de um processo de reparo organizado e apropriado, por meio da
16 capacidade que a própria pele tem em restaurar sua integridade funcional e anatômica
17 através cicatrização ou em feridas crônicas, as quais evoluem de forma inadequada
18 ou deixam de cicatrizar, levando a alteração da função do local (KOLIMI, et al. 2022;
19 BLAIR, et al. 2020). Toda via, existem fatores sistêmicos, como idade do paciente,
20 presença de doenças vasculares, metabólicas e autoimunes, bem como terapia
21 medicamentosa em andamento, tabagismo e desnutrição que podem afetar o
22 processo de cicatrização de feridas (ANDERSON; HAMM, 2012).

23 Considerando que grandes lesões cutâneas e feridas crônicas afetam milhões
24 de pessoas (NUSSBAUM et al., 2018; OLSSON, et al. 2019) prejudicando a
25 integridade funcional e estrutural da pele, e por serem lentas e difíceis de cicatrizar
26 devido a suscetibilidade a infecções e perda de fluidos fazendo com que os
27 tratamentos geralmente necessitem de anti-inflamatórios e antibióticos como
28 coadjuvantes, afetando a qualidade de vida dos pacientes e o aumento da
29 morbimortalidade, estas representam um imenso desafio econômico e social para os
30 sistemas de saúde em todo o mundo (KOLIMI et al, 2022; SEN et al. 2009).

31 O mecanismo de cicatrização de feridas ainda não foi totalmente elucidado e
32 seu tratamento é meticulosamente longo e requer assistência médica especializada.
33 Atualmente as abordagens terapêuticas abrangem as convencionais, como terapia

34 celular, terapia genética, administração de fator de crescimento, curativos de feridas
35 e enxertos de pele. No entanto, nem sempre as terapias convencionais são
36 satisfatórias (KOLIMI et al, 2022). Diante disso, é importante a compreensão dos
37 mecanismos de reparo tecidual para o desenvolvimento de novas terapias que
38 atendam demandas específicas, minimize os **efeitos adversos** presentes em terapias
39 atuais, como a utilização de antibióticos e acelerem o processo de reparo tecidual.

40 A resolução da inflamação é mediada pela síntese local endógena de
41 mediadores lipídicos pró-resolução (MLPR). Os MLPR compõem uma classe de
42 moléculas derivadas da transformação dos ácidos graxos essenciais. Até o momento
43 foram descritas quatro famílias: as lipoxinas, as resolvinas (série D e E), as protectinas
44 e as maresinas. Estes mediadores apresentam funções analgésicas, anti-
45 inflamatórias e atuam na defesa do hospedeiro contra infecções (SERHAN, et al.,
46 2014).

47 A maresina 2 (MaR2) é um dos principais membros da família das maresinas.
48 Derivada do ácido docosahexaenóico (DHA) e biossintetizada por macrófagos, que
49 exhibe efeitos anti-inflamatório, pró-resolutivo e anti-aterosclerótico (JADAPALLI;
50 HALADE, 2018). Em um experimento *in vivo*, foi demonstrado que a MaR2 tem um
51 potencial efeito anti-inflamatório na peritonite de camundongos (DENG et al. 2014).
52 Recentemente foi demonstrado que a administração intravenosa de MaR2 apresentou
53 efeito terapêutico em um modelo murino de asma brônquica induzida por
54 ovoalbumina, propondo que o mecanismo da MaR2 pode envolver a inibição da
55 resposta imune do tipo Th2, ativação do inflamassoma NLRP3 e estresse oxidativo
56 (YU, et al., 2022). A MaR2 também demonstrou efeito analgésico em diversos
57 modelos de dor em camundongos, inibindo o recrutamento de neutrófilos e monócitos,
58 a ativação dos neurônios nociceptores TRPV1 e TRPA1, bem como liberação de
59 CGRP (FATTORI et al. 2022). Seu efeito benéfico foi demonstrado no reparo da
60 mucosa intestinal em modelo de colite induzida por sulfato de dextrana sódica e em
61 modelo de ferida por biopsia, nesse mesmo modelo foi observado um aumento
62 significativo da biossíntese da MaR2 (MIRANDA, 2023).

63 Na literatura não há evidências do papel da MaR2 na cicatrização de feridas
64 cutâneas, no entanto, trabalhos demonstraram o efeito potencial de outros MLPR,
65 como lipoxina A4 (LXA4) endogenamente produzida no olho aumentando a
66 cicatrização de feridas na córnea (GRONERT, 2005) e quando microencapsuladas
67 induzindo cicatrização de feridas cutâneas no dorso de ratos (REIS, et al. 2017). Foi

68 demonstrada também, a redução do infiltrado neutrofílico e epitelização em menor
69 tempo no grupo tratado topicamente com RvE1, RvD1 e RvD2 exógenas em modelo
70 murino de lesão cutânea (MENON, 2017). Diante desses achados, é possível
71 observar um potencial efeito de mediadores na cicatrização de feridas, cujo
72 mecanismos ainda não foram amplamente explorados.

73 Desta forma este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do mediador
74 lipídico pró-resolução MaR2 administrado via intraperitoneal no processo de
75 cicatrização em modelo murino de lesão cutânea no dorso (LCD).

76 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

77

78 2.1 PELE

79 A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha diversas funções
80 importantes, como a proteção contra lesões e patógenos, regulação da temperatura
81 corporal, produção de vitamina D, além de possuir funções sensoriais e estéticas. A
82 pele é composta por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (WANG,
83 et al., 2021).

84 A epiderme é a camada mais externa da pele e é composta por várias
85 subcamadas, incluindo a camada córnea, a camada granulosa e a camada basal
86 (CHAUHAN, et al., 2022). A camada córnea é composta por células mortas e serve
87 como barreira protetora contra o meio ambiente. A camada granulosa é responsável
88 pela produção de queratina, uma proteína que confere resistência à pele. A camada
89 basal é a mais profunda e contém células que se dividem continuamente para formar
90 novas células da pele (LAWTON, 2019).

91 A derme é a camada intermediária da pele e contém diversas estruturas
92 importantes, como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas,
93 vasos sanguíneos e fibras de colágeno e elastina (KHIAO, et al., 2019). Essas fibras
94 de colágeno e elastina conferem elasticidade e resistência à pele. As glândulas
95 sudoríparas produzem suor para regular a temperatura corporal e as glândulas
96 sebáceas produzem sebo para manter a pele hidratada (KARIM; ARYANI, 2021).

97 A hipoderme é a camada mais profunda da pele e é composta por tecido
98 adiposo e tecido conjuntivo. Essa camada é importante para isolar o corpo e proteger
99 os órgãos internos (WOO, 2019).

100 Por funcionar como uma barreira, a pele frequentemente sofre a ação de
101 agentes agressores externos que são responsáveis por desencadear várias reações
102 físico-químicas, ativando o sistema imune e conseqüentemente a liberação de
103 mediadores, mudanças estruturais no tecido e diversas interações celulares e
104 moleculares, promovendo assim o processo de cicatrização (BALBINO; PEREIRA;
105 CURI, 2005).

106 Dentre as agressões sofridas pela pele, existem as que geram feridas

107 cutâneas, seja por acidentes com objetos perfuro cortantes em graus variados,
108 queimaduras ou por incisões cirúrgicas/biópsia. Em todos esses casos há inflamação
109 e normalmente posterior reparo tecidual (TOTTOLI, et al. 2020; KOLIMI et al. 2022).
110 Entretanto, algumas se tornam crônicas ou patológicas, resultando na alteração da
111 função da região afetada, feridas abertas e cicatrizes que limitem a mobilidade dos
112 indivíduos interferem com as atividades diárias e a saúde, constituem um problema
113 de saúde pública (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; HO et al., 2017; SEN et
114 al., 2009).

115 Diante disso, é importante a compreensão dos mecanismos de reparo tecidual
116 para o desenvolvimento de novas terapias que atendam demandas específicas,
117 minimize os efeitos adversos presentes em terapias atuais, acelerem o processo de
118 reparo tecidual.

119

120 2.2 FERIDAS

121 Feridas são causadas pela ruptura da estrutura anatômica com perda de função
122 da área afetada. Podem ser agudas, quando evoluem de maneira adequada e dentro
123 do período temporal esperado, ou crônicas, quando evoluem de forma inadequada ou
124 deixam de cicatrizar. Quanto ao tipo de cicatrização podem ser classificadas como
125 fechamento por primeira intenção, quando as bordas da ferida são aproximadas de
126 forma imediata por pontos de sutura, grampos, cola ou fita adesiva. Feridas extensas
127 onde houve perda de substância que não permita aproximação de bordas geralmente
128 são deixadas abertas, protegidas por curativos, e cicatrizam por segunda intenção,
129 epitelizando a partir das bordas ou do leito, se houver queratinócitos remanescentes
130 na camada basal do epitélio ou nos anexos cutâneos. O fechamento por terceira
131 intenção ocorre quando se torna possível a aproximação tardia das bordas de uma
132 ferida inicialmente deixada aberta (NAWAZ; BENTLEY, 2011).

133 Todavia, existem também condições clínicas como diabetes, deficiências
134 nutricionais e doenças vasculares que contribuem para um déficit de reparo tecidual.
135 Fatores como o uso de tabaco, obesidade, idade avançada e terapias
136 medicamentosas também podem influenciar negativamente a cicatrização (TOTTOLI,
137 et al 2020; ANDERSON; HAMM, 2012). Complicações como a deiscência da ferida,
138 que ocorre quando as bordas de uma incisão cirúrgica se separam antes que a

139 cicatrização adequada ocorra podem levar a infecção e consequente dificuldade de
140 cicatrização (BOATENG; CATANZANO, 2015).

141 Além disso, um processo de cicatrização inadequado pode levar a formação de
142 cicatrizes hipertróficas ou queloides que são tipos de cicatrizações anormais, as quais
143 resultam em uma cicatriz elevada e espessa, podendo causar desconforto, coceira e
144 afetar a aparência estética (FERGUSON; O'KANE 2004). Portanto uma cicatrização
145 excessiva devido a um desequilíbrio entre biossíntese e degradação, a qual é mediada
146 por apoptose e degradação da matriz extracelular (MEC), levando a uma fase
147 inflamatória persistente, uma fase de proliferação prolongada e remodelação
148 reduzida, pode gerar cicatrizes hipertróficas, quando não se estendem além da área
149 da lesão, ou a queloides, que são uma forma mais grave de cicatrização anormal, na
150 qual o tecido cicatricial se estende além dos limites da ferida original, podendo ser
151 mais dolorosas e pruriginosas do que as cicatrizes hipertróficas (TOTTOLI et al. 2020).

152 O processo normal de cicatrização de feridas inclui um processo muito bem
153 orquestrado e regulado que consiste em uma série de eventos como hemostasia,
154 inflamação, proliferação e remodelamento da MEC (CHOUHAN et al., 2019).

155

156 2.3 CICATRIZAÇÃO

157 A cobertura cutânea não aceita permanecer com falhas, para exercer
158 adequadamente suas funções, as lesões precisam ser reparadas e a continuidade
159 reestabelecida. A modulação da resposta do organismo ao trauma é afetada pela
160 extensão do dano celular, o tipo de tecido afetado e a intensidade da lesão. A
161 cicatrização envolve elementos celulares e humorais que são atraídos para a lesão
162 de acordo com a necessidade em cada momento, e é dividida em etapas (com base
163 nos aspectos macroscópicos e histológicos predominantes) (CHOUHAN et al.,2019).

164 O processo cicatricial ocorre em uma sequência cronológica constante, porém,
165 vários eventos ocorrem concomitantemente, resultando no completo preenchimento
166 do defeito por tecido fibroso cicatricial e cobertura epitelial, provendo estabilidade
167 estrutural e recuperação parcial da função (Figura 1).

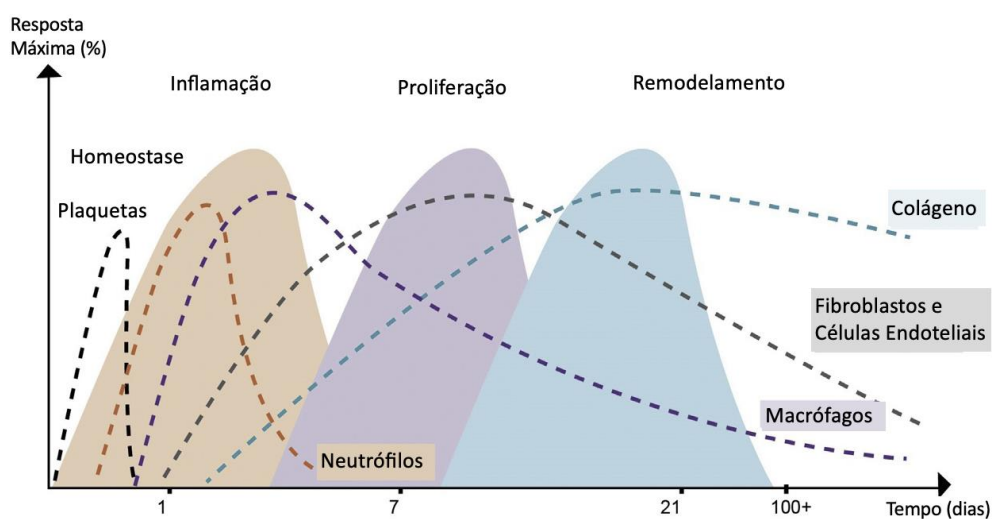


Figura 1: Principais eventos do processo cicatricial, o tempo de surgimento, pico e desaparecimento de células e colágeno em linha tracejada e das fases da cicatrização em área colorida. Adaptada de Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research (Zomer & Trentin, 2018b).

168
169
170
171
172

2.3.1 Fases da cicatrização

174

2.3.1.1 Hemostasia

176

Na ocorrência da lesão, o sangramento é imediatamente controlado por meio da ação combinada de plaquetas e da constrição dos vasos lesionados. A vasoconstrição é desencadeada pela ação da endotelina, a qual é liberada pelas células endoteliais danificadas, juntamente com o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), as catecolaminas circulantes (como a adrenalina e noradrenalina), as prostaglandinas liberadas pelas células lesionadas, além de bradicinina, fibrinopeptídeos, serotonina e tromboxano (RODRIGUES et. al. 2019).

183

As plaquetas são células circulantes que formam o tampão plaquetário em resposta à exposição a agentes trombogênicos do endotélio vascular lesado, impedindo o sangramento. Elas sofrem alterações em sua forma e liberam grânulos com mediadores inflamatórios que desencadeiam a cascata de coagulação para formar o coágulo definitivo (MEDEIROS et al., 2016; LANDÉN et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019).

189

O coágulo formado pela combinação de células do sangue e proteínas na rede de fibrina é crucial para a hemostasia primária. Esse preenche a ferida e serve como uma matriz provisória para as células inflamatórias que são atraídas para o local

190
191

192 (MEDEIROS et al., 2016; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). As plaquetas, que estão
193 envolvidas na formação do tampão plaquetário, liberam fatores de crescimento como
194 PDGF, fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento
195 epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e
196 citocinas, mais intensamente nas primeiras horas após a lesão, mas continuam a
197 secretar esses mediadores por até 7 dias, afetando todas as fases da cicatrização.
198 Além disso, outras células presentes no coágulo liberam fatores de crescimento e
199 proteínas do complemento, criando um gradiente quimiotático que guia a migração
200 celular (RODRIGUES et al., 2019; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

201

202 2.3.1.2 Fase inflamatória

203

204 Após a hemostasia da ferida, ocorre o início da fase inflamatória, que tem como
205 objetivo principal limitar a progressão da lesão. As células sentinelas residentes na
206 pele, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos, são as principais
207 responsáveis pela resposta aguda. Além disso, outras células como plaquetas,
208 neutrófilos, células endoteliais e epiteliais também participam (LANDÉN et al., 2016).
209 Durante essa fase, há um pico de ação dos mediadores pró-inflamatórios, como a
210 interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que geralmente
211 ocorre entre o primeiro e o terceiro dia (XU, et al., 2019). Nesse período, tornam-se
212 evidentes os cinco sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de
213 função (EFRON, 2017).

214 A inflamação é desencadeada por alterações vasculares que aumentam a
215 permeabilidade capilar e reduzem o fluxo sanguíneo, atraindo células inflamatórias
216 para a lesão. A primeira célula a chegar é o neutrófilo, o leucócito mais abundante na
217 circulação, que se deposita na matriz de fibrina e migra para preenchê-la, atuam
218 liberando grânulos tóxicos, enzimas líticas, proteínas granulares, fazendo estresse
219 oxidativo, fagocitose e armadilhas extracelulares para eliminar debris e
220 microrganismos (CRUVINEL, et al., 2010). As células inflamatórias também produzem
221 substâncias como proteases, mieloperoxidase, elastase, metaloproteinase de matriz
222 (MMP), collagenase-2, integrinas, fatores de crescimento, defensinas, óxido nítrico
223 (NO), TGF- β , citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 (SOLIMAN; BARREDA, 2022).

224 Após concluírem sua função de fagocitar microrganismos invasores e debris
225 celulares, os neutrófilos passam por um processo programado de morte celular

226 chamado apoptose. Esse mecanismo é crucial para evitar a inflamação crônica e a
227 lesão tecidual. No entanto, quando ocorre uma falha na eliminação adequada dos
228 neutrófilos apoptóticos, podem surgir consequências prejudiciais. Os neutrófilos que
229 não são removidos continuam a liberar substâncias químicas inflamatórias e enzimas
230 proteolíticas, como proteases, que degradam indiscriminadamente proteínas da MEC.
231 Essas proteases, incluindo elastase, collagenases e gelatinases, podem causar danos
232 ao tecido circundante, pois a MEC é uma estrutura que dá suporte e mantém a
233 integridade do tecido. A degradação excessiva da MEC resulta na perda de sua função
234 estrutural, o que pode levar a uma inflamação crônica e lesão tecidual crônica
235 (RODRIGUES et al., 2019).

236 Além disso, os neutrófilos que não são eliminados corretamente também
237 podem liberar espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a apoptose. Essas EROs
238 incluem radicais livres como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, que causam
239 estresse oxidativo prolongado no tecido circundante, o que pode levar à oxidação e
240 danos em moléculas importantes, como lipídios, proteínas e DNA, contribuindo para
241 a inflamação crônica e lesão tecidual (AZZAM; JAY-GERIN; PAIN, 2012).

242 A partir do segundo dia até o quinto dia após a lesão, ocorre o recrutamento
243 dos monócitos, que são transformados em macrófagos teciduais ativados ao
244 migrarem para o local da lesão. Esse processo de ativação ocorre em resposta a
245 estímulos inflamatórios, tais como citocinas, interferons (IFNs) e padrões moleculares
246 associados a danos (DAMPs), e resulta na ação pró-inflamatória dos macrófagos,
247 também conhecidos como M1 (ARNOLD, et al., 2007). Esses macrófagos secretam
248 substâncias como TNF- α , IL-6 e IL-1, IL-12 e EROs (SIPKA et al., 2022).

249 Os macrófagos são uma população importante de células imunes residentes
250 na pele, representando a maior população de leucócitos nesse tecido. Além de
251 atuarem como sentinelas imunológicas, os macrófagos têm a capacidade de se
252 reproduzir e manter a população local estável em condições normais. Em condições
253 de lesão, no entanto, a população de macrófagos aumenta em resposta à migração
254 de monócitos circulantes para o local. Tanto os macrófagos residentes quanto os
255 migratórios são ativados e assumem um perfil pró-inflamatório para realizar funções
256 como a eliminação de debris e apresentação de antígenos ao sistema imune
257 adaptativo (LANDÉN et al., 2016; SIPKA et al., 2022).

258 Durante a fase aguda da inflamação, a migração de leucócitos é mediada por
259 diversos fatores. Dentre eles estão os eicosanoides, tais como leucotrienos,

260 tromboxanos e prostaglandinas, além de citocinas como IL-1 β e TNF- α , que são
261 responsáveis por expressar moléculas de adesão nas células endoteliais. Outros
262 mediadores importantes incluem o PDGF e TGF- β 1, liberados durante a degranulação
263 das plaquetas, bem como os produtos da degranulação dos mastócitos e do sistema
264 complemento (RODRIGUES et al., 2019). Os mastócitos, que residem no tecido
265 conjuntivo perivascular da pele e mucosas, liberam histamina e metabólitos do ácido
266 araquidônico, que promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, e
267 recrutamento e ativação de células inflamatórias circulantes. Esses mediadores
268 podem estar pré-formados em grânulos dos mastócitos ou serem produzidos sob
269 demanda. Sua presença estratégica e numerosa favorece a participação dessas
270 células em todas as fases da cicatrização (BACCI, 2022).

271

272 2.3.1.3 Fase proliferativa

273

274 A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa é um momento crítico
275 no processo de cicatrização, já que a inflamação prolongada ou exacerbada pode
276 levar à formação excessiva de tecido cicatricial e contribuir para o surgimento e
277 manutenção de doenças (LANDÉN et al., 2016).

278 Estudos demonstraram que a resolução da inflamação envolve a produção de
279 mediadores pró-resolutivos (SERHAN, 2014) que limitam a infiltração neutrofílica
280 (DALLI; SERHAN, 2019), recrutam monócitos não-flogísticos (SERHAN, 2014) e
281 promovem a remoção dos debris e microrganismos pelos macrófagos (DALLI;
282 SERHAN, 2017; CHIANG; SERHAN, 2020; WANG et al., 2018), além da eliminação
283 dos fagócitos por via linfática (SERHAN; CHIANG, 2008).

284 Essa resolução anteriormente tida como uma evolução passiva é induzida por
285 um pico de prostaglandina E2 (PGE2) que altera a função da lipoxigenase (LOX),
286 desviando a produção de leucotrienos para a produção de MLPR, como as lipoxinas,
287 resolvinas, protectinas e maresinas, descritos por Serhan (BASIL; LEVY, 2016;
288 SERHAN, 2017).

289 O processo proliferativo ideal envolve a proliferação e migração coordenadas
290 de células epiteliais, dérmicas, vasculares e nervosas, em um tecido de granulação
291 bem estruturado no leito da ferida, com adequado suprimento de oxigênio e nutrientes.
292 Esse processo é regulado por fatores de crescimento e possibilitado pela alteração no
293 padrão de adesão celular, incluindo a desativação de integrinas e a ativação de

294 proteases, permitindo que as células se desprendam da membrana basal e das
295 células vizinhas e avancem em direção ao leito da ferida (RODRIGUES et al., 2019).

296 Os macrófagos das feridas são tradicionalmente separados em dois
297 subconjuntos principais: M1 e M2 (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016), porém esta
298 classificação tornou-se desatualizada, recentemente os macrófagos foram descritos
299 como ativados classicamente (pró-inflamatórios) e ativados alternativamente (anti-
300 inflamatórios) (WILKINSON; HARDMAN, 2020). Eles atingem o pico de infiltração da
301 ferida 72 h após a lesão em camundongos (BAUM; ARPEY, 2005), exercem a
302 eferocitose, removendo os neutrófilos indicando o início da resolução da inflamação.
303 Esse evento estimula a mudança de fenótipo para anti-inflamatório com ação
304 resolutive (LANDÉN et al., 2016). São células predominantes na ferida neste momento
305 e atuam também no estímulo à angiogênese, proliferação de fibroblastos e deposição
306 de MEC, através da produção de IL-10 e fatores de crescimento, como o fator de
307 crescimento do endotélio vascular (VEGF), TGF β e IGF1. Eles também atuam na
308 produção de MLPR, como as maresinas (MaRs), resolvinas (Rvs) e protectinas
309 (LEONI et al., 2015).

310 A MEC, que alcança o seu pico no quinto dia, é responsável por preencher o
311 leito da ferida e oferece suporte para a ancoragem de proteínas secretadas,
312 permitindo a migração de células, como os fibroblastos. Além da sua função estrutural,
313 a MEC também atua na sinalização química e mecânica, criando gradientes
314 quimiotáticos e controlando o comportamento das células migrantes (POTEKAEV et
315 al, 2021). Mais tarde, os macrófagos ativados alternativamente, que possuem
316 características anti-inflamatórias, atuam na remodelação da MEC, regulando a
317 secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de inibidores teciduais de
318 metaloproteinases (TIMPs) (LIU; KHALIL, 2017).

319 Os fibroblastos têm uma variedade de funções durante a cicatrização de
320 feridas. Eles são recrutados para a deposição e reorganização da MEC, produzem
321 fatores de crescimento e citocinas, imuno modulam e contraem a ferida. Durante esse
322 processo, eles secretam MMPs para degradar a matriz provisória, enquanto produzem
323 diversos componentes da MEC, incluindo colágeno, elastina, glicoproteínas,
324 proteoglicanos, fibronectina e ácido hialurônico. Gradualmente, a MEC é substituída
325 pelo tecido de granulação, que é composto por uma rede frouxa formada pelos
326 produtos dos fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos neoformados. Esse tecido
327 é edemaciado, friável e facilmente rompido. Conforme os fibroblastos proliferam,

328 tornam-se as células predominantes durante a substituição do tecido de granulação
329 pelo tecido cicatricial, aumentando a síntese de colágeno até a formação de um tecido
330 conjuntivo mais resistente. Os fibroblastos das margens da lesão, por ação do TGF-
331 1, passam a expressar actina (smooth muscle actin – SMA) e tornam-se
332 miofibroblastos, com ação contrátil semelhante à musculatura lisa. Eles se ligam às
333 fibrilas colágenas e de fibronectina e as tracionam para a posição perpendicular à
334 borda, causando a contração da ferida com o objetivo de aproximar as bordas. Embora
335 continuem a sintetizar MMPs e seus respectivos inibidores, os miofibroblastos são
336 células transitórias e serão eliminados da ferida por apoptose uma vez que a
337 integridade tecidual tenha sido suficientemente recuperada (POTEKAEV et al, 2021).

338 Após uma lesão, as células basais da epiderme que normalmente são inibidas
339 pelo contato entre elas, perdem essa inibição e iniciam o processo de mitose.
340 Contudo, para que a mitose seja eficiente, é necessário que haja um substrato
341 adequado fornecido pelo tecido de granulação que permita a migração celular. Os
342 queratinócitos presentes nas bordas da ferida começam a migrar no primeiro dia após
343 a lesão, e a partir do segundo dia, as células-tronco dos folículos pilosos e glândulas
344 sudoríparas próximas ao local iniciam uma proliferação intensa. Esse processo de
345 proliferação é autorregulado por mediadores como óxido nítrico, citocinas e fatores de
346 crescimento, incluindo o EGF, FGF, NGF, VEGF e IGF-1. A proliferação celular
347 continua até que ocorra o contato entre as células e a consequente inibição da
348 multiplicação celular (LANDÉN ET AL., 2016; LEONI ET AL., 2015; SORG ET AL.,
349 2007).

350

351 2.3.1.4 Fase de remodelamento

352

353 A fase final cursa com a reorganização do material depositado, visando maior
354 resistência e semelhança com o tecido original (LANDÉN et al., 2016; REINKE;
355 SORG, 2012; RODRIGUES et al. 2019). O tecido conjuntivo resultante ao final da fase
356 proliferativa é composto basicamente por fibroblastos (fusiformes praticamente
357 inativos), colágeno denso e fragmentos de tecido elástico (RODRIGUES et al., 2019;
358 SINGER; CLARK, 1999). Segue-se a regressão dos vasos e reconstituição do tecido
359 conjuntivo por tecido cicatricial, lise do colágeno tipo III e síntese do tipo I, mais forte
360 e organizado (TOTTOLI et al. 2020).

361 2.4 TRATAMENTOS DESCRITOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

362 Qualquer falha em uma das fases da cicatrização de feridas resulta em
363 formação de cicatriz anormal e/ou estado crônico, o qual além de ser mais suscetível
364 a infecções afeta a qualidade de vida dos pacientes, juntamente com o aumento da
365 morbimortalidade requerendo tratamento biomédico intensivo especializado para seu
366 manejo. Apesar dos avanços no desenvolvimento de diversos regimes terapêuticos,
367 a avaliação clínica e o manejo de feridas crônicas continuam sendo um desafio
368 (KOLMI et al. 2022).

369 Atualmente, o foco do tratamento das feridas vai além de facilitar a resolução
370 da lesão, restaurar a integridade e a função da pele, é necessário que isso ocorra
371 rapidamente e que minimize os impactos sociais e estéticos. Várias abordagens
372 convencionais, como terapia celular, terapia genética, administração de fator de
373 crescimento, curativos de feridas e enxertos de pele estão sendo utilizados para
374 promover a cicatrização em diferentes tipos de feridas. Recente desenvolvimento em
375 tecnologia avançada de tratamento de feridas inclui nanoterapêutica, terapia com
376 células-tronco, enxertos de pele de bioengenharia e bioimpressão 3D (KOLMI et al.
377 2022; UCHIDA; BRUSCHI, 2023).

378 Foi demonstrado ser possível a bioimpressão de folhas de tecido da pele
379 usando um cartucho microfluídico em modelo de ferida suína e murina. Essa
380 tecnologia pode ser utilizada em casos de emergência como traumas por queimaduras
381 e o fato de serem portáteis permitem que sejam transportadas em ambulâncias para
382 atendimento imediato em tempo real (HAKIMI, et al. 2018). Vale destacar que há
383 evidências de que a baixa viabilidade das células-tronco na região da ferida após
384 implantação/enxerto devido a um ambiente inflamatório severo limita o potencial
385 terapêutico da terapia baseada em células-tronco (KRISP, et al. 2013). Portanto ainda
386 se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias que auxiliem na cicatrização
387 e no processo de regeneração da pele.

388

389

390 2.5 Lipídeos Pró-resolução

391

392 O processo de resolução da inflamação, antes considerado um processo
393 passivo, o qual ocorria em decorrência da diluição de mediadores inflamatórios, com

394 a identificação dos MLPR, é tida hoje como um processo ativo que promove a
395 restauração da homeostasia. Estes mediadores são sintetizados biologicamente a
396 partir dos ácidos graxos (AG) (XU et al., 2010; SERHAN, 2014; FATTORI et al., 2020).

397 Os AG são os lipídios mais abundantes no corpo humano. Apresentam-se em
398 forma esterificada com glicerol, como ésteres de colesterol e em menor quantidade,
399 como ácidos graxos livres. A estrutura geral é de uma cadeia metil (-CH₃) terminal,
400 hidrocarbonada alifática, hidrofóbica e uma extremidade hidrofílica, constituída por um
401 grupo carboxila (-COOH). São classificados de acordo com o número de carbonos na
402 cadeia, e com a presença de ligações duplas entre os carbonos (MARTINHO, 2016).

403 Os AG de cadeia curta tem entre 2 e 4 carbonos, de cadeia média entre 6 e 10,
404 de cadeia longa entre 12 e 18, e muito longa acima de 18 carbonos. Aqueles com uma
405 ou mais ligações duplas entre carbonos são insaturados (monoinsaturados ou poli-
406 insaturados), e os que tem todas as ligações de carbonos preenchidos com átomos
407 de hidrogênio são os saturados. São importante fonte de energia para o corpo, além
408 das funções estruturais (constituintes das membranas celulares) e biológicas
409 (participação em rotas metabólicas) (MARTINHO, 2016). Os AG essenciais são
410 necessários para as funções orgânicas, mas não são produzidos pelos mamíferos e
411 precisam ser obtidos a partir da dieta e esterificados em fosfolipídios (DEMARQUOY;
412 LE BORGNE, 2014). Dentre os ácidos graxos as famílias ômega-3 e ômega-6 são de
413 grande importância, são AG poli-insaturados de cadeia muito longa e sua diferença
414 encontra-se na posição da primeira insaturação a partir do grupo metil, no terceiro e
415 sexto carbono, respectivamente. São chamados de maneira simplificada na literatura
416 atual de n-3 e n-6 (MARTIN et al., 2006). No geral, os produtos do metabolismo do n-
417 3 têm comportamento anti-inflamatórios e pró-resolutivos e os do n-6, pró-
418 inflamatórios, porém, ambos competem pelas mesmas rotas enzimáticas (COX, LOX
419 e do citocromo P450 - CYP). Desta forma, a capacidade do organismo humano para
420 converter os AG essenciais em subprodutos ativos é limitada, e a produção de um ou
421 outro pode depender não só do estímulo recebido, como da disponibilidade dos
422 precursores (LAGARDE; GUICHARDANT; BERNOUD-HUBAC, 2020)O metabolismo
423 do n-3, após ativação pelas fosfolipases intracelulares, dá origem aos ácidos α -
424 linolênico (ALA), eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) e
425 docosapentaenoico (DPA). Quando direcionados a via da LOX, o EPA produz as
426 resolvinas da série E e o DHA produz as protectinas, resolvinas da série D e
427 maresinas. O metabolismo do n-6 da origem ao ácido araquidônico (AA), que apesar

428 de normalmente terem características pró-inflamatórias, quando direcionado a via da
429 LOX produzem as lipoxinas, lipídio com potencial pró-resolutivo (FATTORI et al.,
430 2020; LAGARDE; GUICHARDANT; BERNOUD-HUBAC, 2020). A figura 2 ilustra as
431 principais vias metabólicas dos MLPR.

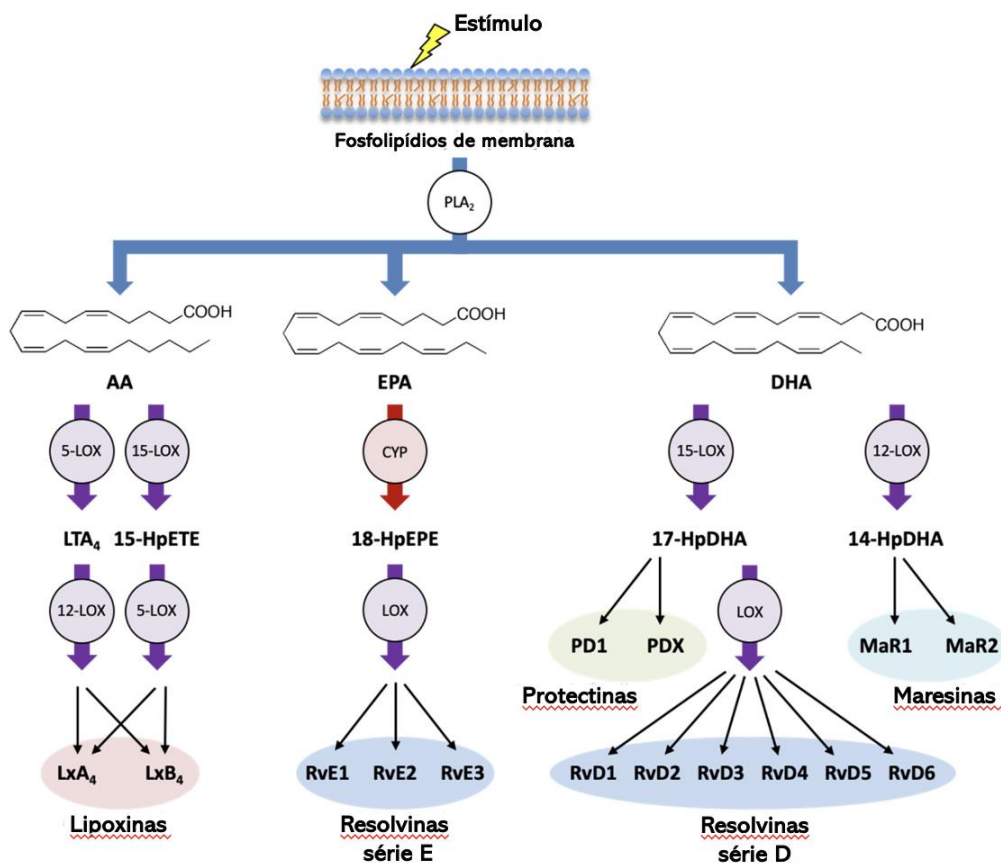
432 Estudos demonstram o efeito protetor celular dos MLPRs, relacionando seu
433 efeito à inibição da resposta ao estresse oxidativo com a produção de antioxidantes
434 (WANG et al., 2018) e ao bloqueio da transcrição da IL-1 β induzida pelo TNF- α ,
435 limitado a inflamação (MANCILLA-HERRERA et al., 2015). Os MLPRs também têm
436 demonstrado papel no controle da infecção (resolução total ou com ação adjuvante
437 aos antibióticos) (JORDAN; WERZ, 2022) e no tratamento da dor, por ações central e
438 periférica (XU et al., 2010).

439 Em um modelo de artrite induzida por titânio (TiO₂) a lipoxina A₄ (LXA₄), um
440 MLPR derivado do AA, demonstrou exercer atividade analgésica e anti-inflamatória
441 (SARAIVA-SANTOS, et al. 2023). Ainda há evidência de que a LXA₄, é produzida
442 endogenamente no olho para induzir uma resposta de cicatrização mais rápida de
443 feridas na córnea (GRONERT, 2005) e quando microencapsuladas promove a
444 cicatrização de feridas cutâneas no dorso de ratos (REIS, et al. 2017). Foi
445 demonstrada também, uma redução do infiltrado neutrofílico *in vitro* e a epitelização
446 em menor tempo nos grupos tratados topicamente com RvE1, RvD1 e RvD2 exógenas
447 em modelo murino de lesão cutânea, sendo a RvE1 a mais eficaz delas apresentando
448 o fechamento da ferida em menor tempo e uma organização de colágeno mais maduro
449 quando comparada a RvD1 e RvD2 (MENON, 2017). Recentemente foi demonstrado
450 que o MLPR MaR2 conduz a migração epitelial e o reparo da mucosa após colite
451 induzida por sulfato de dextrana sódica ou lesão da mucosa colônica induzida por
452 biópsia mecânica (MIRANDA et al. 2023).

453

454

455



456
457
458
459
460
461
462
463

Figura 2: Biossíntese de mediadores lipídicos. Lipídios pró-resolutivos são produzidos durante a resolução da inflamação e controlam os eventos inflamatórios iniciais. O ácido araquidônico (AA) dá origem à lipoxinas, enquanto o ácido eicosapentaenoico (EPA) é metabolizado em resolvinas da série E, e o ácido docosahexaenoico (DHA) é fonte de protectinas, maresinas e resolvinas da série D. Adaptado de YASUKAWA et al., 2020.

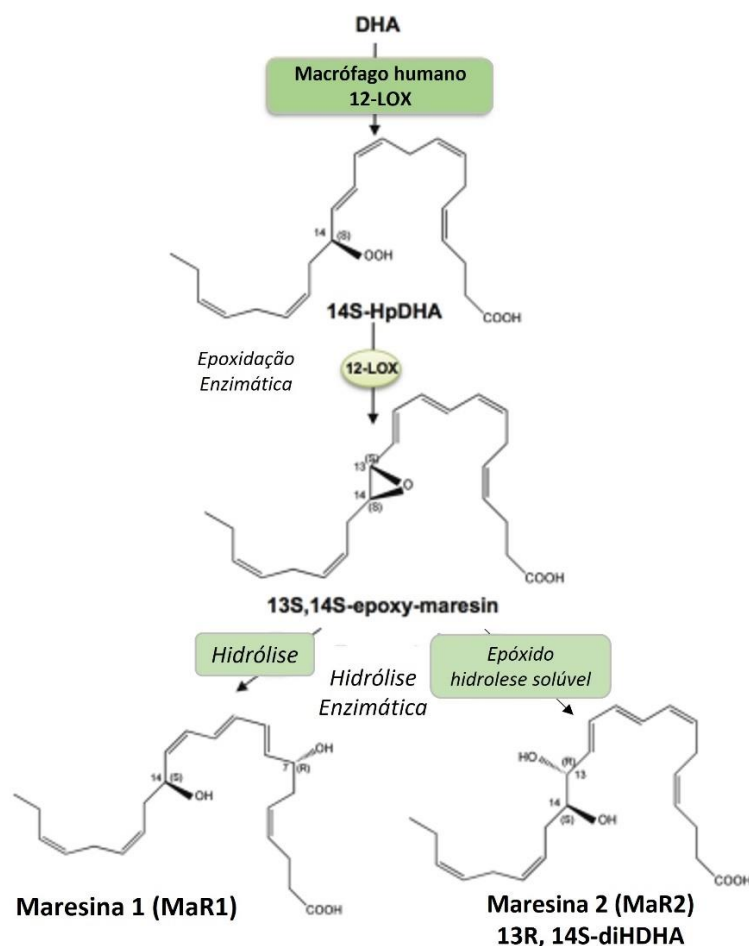
464

465 2.5.1 Maresina 2

466 A família das maresinas é composta pela maresina 1 (MaR1) e pela maresina
467 2 (MaR2), ambas derivadas DHA e biossintetizadas por macrófagos. A cascata para
468 a biossíntese de MaR2 começa com a conversão de DHA a 13S,14S-epoxi-maresina
469 com o intermédio da 12-LOX. Posteriormente, se a 13S,14S-epoxi-maresina seguir
470 pela rota catalítica da enzima epóxido hidrolase dará origem a MaR1 (ABDULNOUR
471 et al., 2014) e se seguir pela rota catalítica da enzima epóxido hidrolase solúvel dará
472 origem a MaR2 (DENG et al., 2014; FATTORI et al., 2022). A figura 3 demonstra com
473 mais detalhes a biossíntese das maresinas a partir do DHA.

474 As maresinas tem demonstrado ação anti-inflamatória, pró-resolutiva e anti-
475 aterosclerótica (SERHAN et al. 2015; DENG et al, 2014). Na literatura há evidencias
476 de um experimento *in vivo* demonstrando que a MaR2 tem um potencial efeito anti-
477 inflamatório na peritonite de camundongos (DENG et al., 2014). Yu e colaboradores

478 demonstraram que a administração intravenosa de MaR2 apresentou efeito
 479 terapêutico em um modelo murino de asma brônquica induzida por ovoalbumina,
 480 propondo que o mecanismo da MaR2 pode envolver a inibição da resposta imune do
 481 tipo Th2, ativação do inflamassoma NLRP3 e estresse oxidativo (YU, et al., 2022).
 482 Ainda há evidências de que a MaR2 possui ação analgésica em diversos modelos de
 483 dor induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), capsaicina e AITC em camundongos. O
 484 tratamento também inibiu a ativação de canais TRPA1 e TRPV1, bem como inibiu
 485 recrutamento leucocitário próximo a fibras CGRP⁺ no tecido plantar induzido por LPS
 486 (FATTORI et al. 2022).
 487



488

489

490 **Figura 3:** Biossíntese detalhada das maresinas a partir do ácido docosahexaenóico (DHA). Adaptado
 491 de (DENG et al., 2014).

492

493

494 3 JUSTIFICATIVA

495 O processo inflamatório é a primeira resposta do sistema imunológico à
496 infecção ou lesão tecidual, tem função protetora e é necessário para garantir a
497 continuidade da saúde do organismo. No entanto, respostas inflamatórias excessivas
498 ou inadequadas contribuem para uma série de patologias (DUVALL; LEVY, 2016;
499 SEKI et al., 2010). O fracasso na resolução da inflamação aguda leva à inflamação
500 crônica, ao excesso de dano tecidual, a desregulação da cicatrização de tecidos e tem
501 sido implicada em múltiplos tipos de doença (SERHAN, 2014; SOMMER; BIRKLEIN,
502 2011).

503 Como a pele funciona como uma barreira do organismo com o meio externo, a
504 cicatrização inadequada de feridas cutâneas pode ser responsável por complicações
505 diversas e elevados índices de mortalidade, sendo que esse agravante aumenta
506 significativamente quando analisado em pacientes portadores de diabetes mellitus. O
507 processo de cicatrização é complexo e a compreensão sobre tal ainda não é
508 completamente conhecida, com isso, a busca e testes sobre novos compostos
509 cicatrizantes é constante (KOLIMI et al., 2022).

510 Tendo em vista o importante potencial terapêutico dos MLPR em modelos pré-
511 clínicos, os quais induzem um fenótipo de macrófago que mantém a atividade
512 microbicida, não causa aumento da inflamação e ainda induzem a regeneração e
513 poucos estudos com MLPR em modelo de cicatrização justificamos a seleção do
514 MLPR MaR2, para o desenvolvimento desse estudo. Vale destacar ainda que, os
515 MLPR são moléculas atrativas para a indústria farmacêutica, pois apresentam
516 atividade farmacológica na escala de picogramas.

517

518 4 OBJETIVOS

519 4.1 OBJETIVOS GERAIS

520 Avaliar o efeito do mediador lipídico pró-resolução maresina 2 (MaR2)
521 administrado via intraperitoneal no processo de cicatrização em modelo murino de
522 lesão cutânea no dorso (LCD).

523

524 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

525 I. Avaliar os efeitos terapêuticos da MaR2 quando administrada por via
526 intraperitoneal em camundongos com enfoque na (o):

527

- 528 • Avaliação do tamanho da lesão;
- 529 • Escore histopatológico e infiltrado de células inflamatórias no tecido
530 cicatricial;
- 531 • Avaliação da mieloperoxidase;
- 532 • Presença/ausência de células LysM+ e CX3CR1+ por fluorescência.
- 533 • Níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β) e anti-inflamatórias
534 (TGF β);
- 535 • Expressão de RNAm para o Fator de Crescimento Endotelial
536 Vascular (VEGF), Metaloproteinases de Matriz 1 e 9 (MMP-1 e MMP-9) e
537 Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1 (TIMP-1) por reação em cadeia da
538 polimerase (PCR) quantitativo;

539

540

541 5 MATERIAIS E MÉTODOS

542 5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

543 Foram utilizados camundongos da linhagem HRS/J (hairless), machos e fêmeas,
544 adultos, pesando em média 30g e camundongos C57Bl/6, Lysm e-GFP/+ e CX3CR1
545 e-GFP/+, fêmeas pesando em média 23g provenientes do Biotério do Centro de
546 Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram
547 mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UEL onde era utilizado ciclo
548 de claro/escuro (12/12 h). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno
549 padrão medindo 30 x 19,5 x 13 cm (Insight®) de acordo com os grupos experimentais,
550 com livre acesso à água e ração e eram adaptados aos ambientes e condições
551 experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos.
552 O uso dos animais seguiu a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais
553 para fins científicos e didáticos condizente com os protocolos internacionais. Este
554 projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) desta
555 Universidade sob o protocolo 147/2019. O mediador lipídico MaR2 foi disponibilizado
556 comercialmente pela Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA.

557

558 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

559 Primeiramente foi avaliada a dose resposta da MaR2, para isso os animais foram
560 divididos em grupos (sham, lesão sem tratamento, e lesão tratados com MaR2 1, 10,
561 100 e 1000 pg/animal), cada grupo com um total de 6 animais por experimento. Os
562 animais foram tratados com diclofenaco de sódio (8mg/kg, via oral), antes da indução
563 da LCD e 12h após. A anestesia foi realizada com a combinação de cetamina/xilazina
564 (80mg/kg e 10mg/kg, respectivamente), em seguida a LCD foi realizada com o auxílio
565 de um punch de biópsia circular com 5 mm de diâmetro (com área total de 0,1963cm²).
566 Os animais foram tratados diariamente com a MaR2, via intraperitoneal, conforme a
567 dose de tratamento de cada grupo ou com o veículo salina, no caso do grupo com a
568 lesão sem tratamento, durante 7 dias. A dose de MaR2 (100 pg/animal) foi utilizada
569 para os experimentos seguintes baseada na sua melhor resposta na avaliação do

570 fechamento das lesões.

571 Para os estudos subsequentes, os grupos variaram de 6 a 8 animais e
572 eventualmente continham o grupo sham, sem lesão e sem tratamento, apenas com a
573 administração do diclofenaco de sódio no primeiro dia. Quando necessária era feita
574 avaliação entre os 3 grupos, sham, lesão sem tratamento e lesão tratados diariamente
575 com MaR2 100 pg/animal. Quando o grupo sham não exercia influencia na análise
576 dos dados, comparou-se apenas os animais lesionados sem tratamento e tratados
577 diariamente com MaR2 100 pg/animal. Para cada experimento os animais foram
578 anestesiados e eutanasiados (isoflurano 5% seguido de decapitação), a pele foi
579 coletada com punch de biópsia de 6 mm e processada de acordo com protocolo de
580 cada análise.

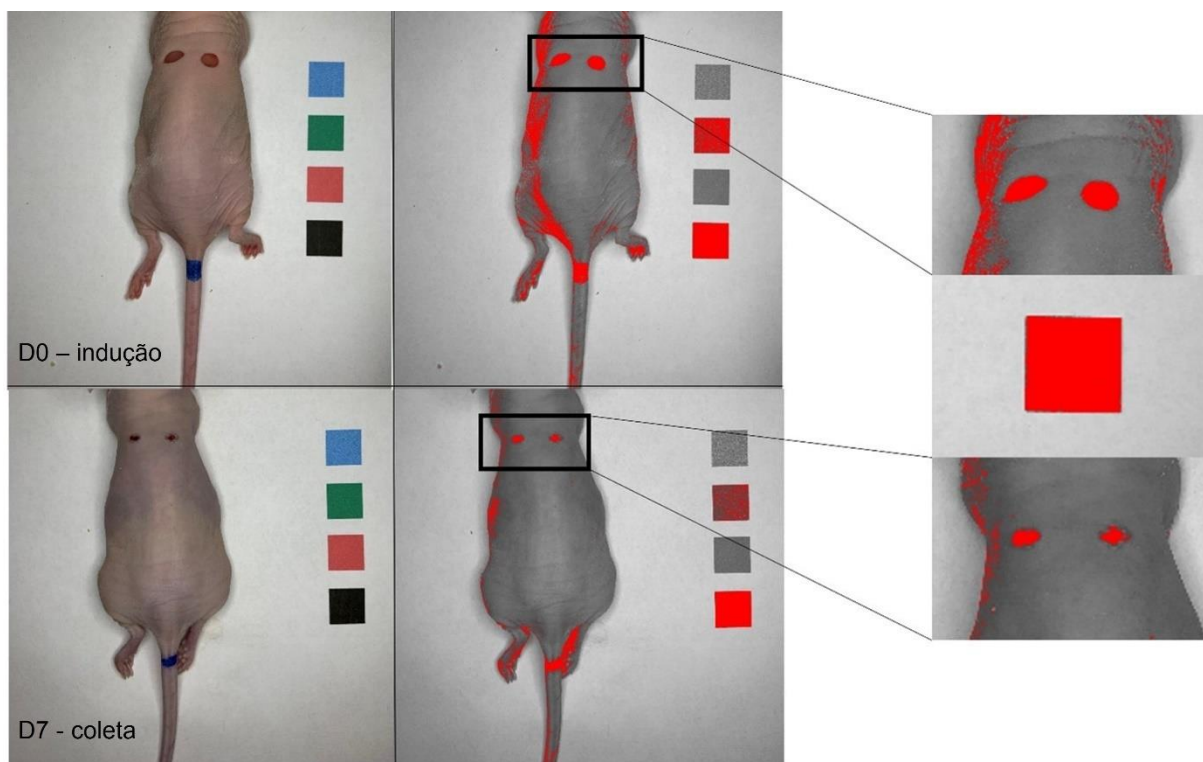
581

582

583 5.3 MEDIDA E AVALIAÇÃO DO FECHAMENTO DAS LESÕES

584 As lesões foram fotografadas sobre fundo branco com referência padrão preta
585 de 1cm², no momento da indução da lesão e 7 dias depois, antes da coleta das
586 amostras. As imagens das lesões foram transformadas em 8 Bit (*grayscale*), e o limiar
587 (*threshold*) ajustado até que toda a área do quadrado de medida e as lesões
588 estivessem marcadas no programa ImageJ (NIH v2.9.0/1.53t) (COLLINS, 2007;
589 MASSON-MEYERS et al., 2020; SCHINDELIN et al., 2012). A área da lesão foi
590 calculada em relação à área conhecida do quadrado, ilustrado na figura 4. A medida
591 das duas lesões iniciais e finais de cada animal foram comparadas para determinar o
592 tamanho do fechamento da lesão. **As lesões foram analisadas individualmente**, pois
593 cada uma, ainda que no mesmo camundongo, pode apresentar evolução
594 independente (ANSELL et al., 2014; PARK et al., 2015).

595



596

597

598

599

600

601

602

Figura 4: Método de avaliação da medida e fechamento das lesões. Processamento das imagens das lesões fotografadas imediatamente após o procedimento e após 7 dias para cálculo da área de fechamento da lesão. Conversão em 8 Bit e ajuste de threshold até que a área das lesões e do quadrado preto estivessem totalmente preenchidas no programa ImageJ.

603

5.4 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

As amostras de pele foram coletadas e fixadas em formaldeído (10%) por 24 h em seguida foram processadas para inclusão em parafina. Seções longitudinais (5 μ m) foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens das seções histológicas foram adquiridas digitalmente e analisadas por um experimentador cego ao tratamento utilizando um microscópio de luz na objetiva de 40x (Olympus CX31RTSF, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital de alta-resolução. As análises de recrutamento leucocitário foram realizadas através do software ImageJ 1.53 para Windows (software em domínio público: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) usando a ferramenta threshold e executadas em imagens RGB sem tratamento adicional. O recrutamento de leucócitos foi determinado pela intensidade de marcação por % de área demarcada. Os escores histopatológicos também foram avaliados nos parâmetros de infiltrados inflamatórios e proliferação vascular (FERRAZ et al. 2021), como descritos na **Tabela 2**.

617

618 **Tabela 2.** Critério dos escores utilizados para avaliação histológica.

Parâmetro histológico	Escore
Infiltrado Inflamatório	0 = sem inflamação 1 = inflamação leve 2 = inflamação moderada 3 = inflamação severa
Proliferação Vascular	0 = sem proliferação vascular 1 = proliferação vascular leve 2 = proliferação vascular moderada 3 = PROLIFERAÇÃO VASCULAR SEVERA

619 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

620 A MPO é uma das principais enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos.
621 O método baseia-se na oxidação catalisada pela MPO do substrato o-dianisidina com
622 detecção espectrofotométrica em 450nm (XIA; ZWEIER, 1997). O ensaio para
623 dosagem da MPO permite inferir indiretamente o número de neutrófilos presentes no
624 local.

625 As amostras de pele foram coletadas em microtubos e mantidas a - 80 °C até
626 o momento da realização do ensaio, quando foram diluídas com tampão de fosfato de
627 potássio (K₂HPO₄) (pH 6,0), contendo 0,5% brometo de hexadecil trimetil amônio
628 (HTAB) e homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor
629 (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado por 2 minutos a 16.100g em
630 temperatura de 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Em microplacas de
631 96 poços foram depositados 30 µL do sobrenadante e 200µL de solução tampão de
632 fosfato 50 mM em pH 6,0, contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina e
633 0,015% de peróxido de hidrogênio. A curva padrão foi preparada na mesma placa,
634 colocando 100 µL de tampão fosfato 0,05 M e solução com 200.000 neutrófilos no
635 primeiro poço (A1), fazendo a diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). No
636 décimo segundo poço (A12) foi depositado apenas 200 µL de água deionizada, sendo
637 utilizado como controle negativo (branco). Após 20 minutos a reação colorimétrica foi

638 determinada em espectrofotômetro a 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices)
639 e a atividade da MPO das amostras comparada com a curva padrão. Os resultados
640 foram apresentados como número de neutrófilos x 10⁴/mg de proteína.

641 5.6 FLUORESCÊNCIA

642 Para o ensaio de fluorescência, foram usados camundongos LysM-eGFP/+ e
643 CX3CR1-eGFP/+ C57BL/6. As amostras de pele foram coletadas e mantida em
644 paraformaldeído a 4% (PFA, por 24 horas), depois em sacarose a 30% (24 horas) e
645 sacarose a 30% + OCT (1:1) (24 horas) antes da inclusão no reagente OCT (Tissue-
646 Tek 1, O. C.T. Compound IA018, Austrália). Seções de 15 µm foram cortadas em
647 criostato e processadas para fluorescência (C.T. Compound, IA018, ProSciTech,
648 Austrália). Depois disso, as lâminas foram lavadas com tampão de bloqueio (PBS,
649 0,5% Triton) com albumina de soro bovino (BSA) 5% por 3 vezes e incubadas com
650 DAPI (1:500) para marcação nuclear. As imagens foram obtidas em um microscópio
651 confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) com uma objetiva de 5x e zoom
652 de 1,0. As imagens foram processadas com o software LAS X Software (Leica
653 Microsystems, Mannheim, Germany). Foi quantificada a intensidade de fluorescência
654 por área, delimitando apenas o local da lesão, sem quantificar a fluorescência
655 apresentada na área da pele saudável.

656 5.7 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS

657 Foi utilizada a técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) com kits comerciais
658 R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, EUA para TNF-α e IL-1β e Invitrogen™ para
659 TGF-β de acordo com as instruções de uso dos fabricantes.

660 As amostras de pele foram coletadas em microtubos contendo 500µL de
661 solução NaCl 0,9% e mantidas a -80°C até a análise, quando foram trituradas com o
662 triturador (Turrax Tissue-Tearor - Biospec). Em seguida, foram centrifugadas por 5
663 minutos a 3.200rpm em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi retirado para análise.
664 As microplacas com 96 poços foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos
665 de captura contra as proteínas de interesse (100 µL de anticorpos anti-TGF-β 250x
666 concentrado, 50x para IL-1β e 50x para TNF- α). Após o período de incubação, as
667 placas foram lavadas com PBS com 0,05% de Tween 20 três vezes, incubadas com

668 a solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas novamente três
669 vezes. Em cada poço foi colocado 100 μ L da solução preparada de amostra e a placa
670 foi novamente incubada por 2 horas em temperatura ambiente, e posteriormente
671 lavada da mesma forma. Foi colocado 100 μ L da solução diluída de anticorpo de
672 detecção e repetidas a incubação e lavagem, 100 μ L de enzima avidina-peroxidase,
673 repetidas incubação (20 minutos) e lavagem e finalmente 50 μ L de *stop-solution* para
674 interromper a reação e as absorbâncias foram determinadas em 450 nm (Spectra MAX
675 3 250, Molecular Devices). A curva de proteínas foi usada para comparação e
676 determinação da quantidade de citocinas nas amostras e os resultados foram
677 expressos em picogramas (pg) de citocina por miligrama de proteínas (LOWRY et al.,
678 1951)

679 5.8 RT-qPCR

680 As amostras de pele foram coletadas no 7° dia após a indução da lesão,
681 trituradas com nitrogênio líquido em reagente TRIzol® (Life Technologies) com o
682 auxílio de um pistilo e homogeneizadas, o RNAm total foi isolado de acordo com as
683 instruções do fabricante. A pureza do RNA foi confirmada pela razão 260/280 (VERRI,
684 2008). Todas as reações foram realizadas em triplicatas utilizando as seguintes
685 condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 60 ciclos de 95°C
686 por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O RT-PCR e PCR quantitativo foram realizados
687 usando GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) em um StepOnePlus™ Real-
688 Time PCR System (Applied Biosystems®). A Tabela 1 apresenta as sequências dos
689 primers. Foi verificado previamente que alguns genes que são utilizados como
690 controle para a reação de PCR têm sua expressão alterada na ferida cutânea
691 (TURABELIDZE et al., 2010). Nós não conhecemos um gene que possa ser utilizado
692 sozinho como controle de expressão normal no modelo de ferida cutânea. Para
693 minimizar esta dificuldade, utilizamos a média geométrica de três genes controles sem
694 o grupo controle negativo de tecido normal, porque os genes controles usuais são
695 alterados no grupo ferida cutânea em relação ao grupo controle negativo de tecido
696 normal. Esses 3 genes (GAPDH, TUB α e TBP) foram recomendados após análise de
697 expressão em modelo de ferida cutânea (KARNAM et al., 2020;
698 TURABELIDZE et al., 2010).
699

Tabela 1. Sequência dos primers.

Gene	Primer sense	Primer antisense
VEGF	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGC T
TIMP-1	GCAACTCGGACCTGGTCATAA	CTGGTATAAGGTGGTCTCGTTGATT
MMP-9	CTGGACAGCCAGACACTAAAG	CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG
MMP-1	CCTCGTTGGACCAAACACA	GCGATGGCATCTTCCACAA
TUB α	TGGAACCCACAGTCATTGATGA	TGATCTCCTTGCCAATGGTGTA
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGAAGTCTTCACTCTTGGC
GAPDH	GCCATCAACGACCCCTTCATTG	TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC
CX3CL1	ATTGGAAGACCTTGCTTTGG	GCCTCGGAAGTTGAGAGAGA
CX3CR1	CACCATTAGTCTGGGCGTCT	GATGCGGAAGTAGCAAAGC

700

701

702 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

703 A homogeneidade foi considerada a partir das características da amostra. Os
704 dados foram analisados pelos testes adequados a cada experimento e de acordo com
705 a normalidade, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, (*one way* ANOVA, seguido por
706 teste de Tukey, Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's, Teste t ou Mann-
707 Whitney). Os resultados comparativos são apresentados pela média \pm erro padrão da
708 média (EPM) de mensurações feitas com 6-8 animais em cada grupo por experimento.
709 As análises foram realizadas no software GraphPad Prism Versão 8.0 (GraphPad
710 Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente
711 diferentes para $p < 0,05$. [*] Representa diferença estatisticamente significativa do
712 grupo sham, e [#] representa diferença estatisticamente significativa do grupo controle
713 (lesão sem tratamento).

714 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

715

716 O presente trabalho foi realizado no laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia
717 e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista *Life*
718 *Sciences* ([https://www.elsevier.com/journals/life-sciences/0024-3205/guide-for-](https://www.elsevier.com/journals/life-sciences/0024-3205/guide-for-authors)
719 [authors](https://www.elsevier.com/journals/life-sciences/0024-3205/guide-for-authors)). Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “Maresin 2
720 accelerates the wound healing process in a murine model of dorsal skin lesion”.

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747 **Maresin 2 accelerates the wound healing process in a murine model of dorsal**
748 **skin lesion (DLS)**

749

750 **Soraia Mendes Pierotti^{a, 1}; Telma Saraiva-Santos^b, Tiago H. Zaninelli^b, Mariana M.**
751 **Bertozzi^b, Patricia D. Ritter^a, Anelise Franciosi^b, Camila R. Ferraz^a, Allan**
752 **Bussmann^a, Waldiceu A. Verri Jr, Rubia Casagrande^{a, 2*}**

753

754 ^a Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,
755 Brasil

756 ^b Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer, Department of
757 Pathology, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

758

759 1 Aluna de mestrado do Centro de Ciências da Saúde

760 2 Doutora em Ciências Farmacêuticas; Professora Orientadora do Programa de
761 Ciências da Saúde

762

763 * Author correspondence

764 Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de
765 Ciências Farmacêuticas.

766 Rodovia Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380. Campus Universitário 86051-990 -

767 Londrina, PR - Brasil - Caixa-postal: 6001

768 Telefone: (43) 33714565

769 rubiacasa@uel.br

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781 **Abstract**

782

783 Maresin 2 (MaR2) is a newly discovered specialized pro-resolving lipid mediator with
784 known anti-inflammatory and analgesic effects, acting in the reducing of neutrophil
785 recruitment in zymosan peritonitis. However, the specific impact of MaR2 on skin
786 wound healing remains unclear. Unsuccessful healing of wounds is responsible for
787 several complications and high mortality rates, and this aggravating factor increases
788 in the case of pre-existing disease, infections, and nutritional deficiencies. The aim of
789 this study was to analyze the effects and action mechanisms of the pro-resolutive lipid
790 mediator MaR2 on wound healing in a murine model of dorsal skin lesion (DSL). The
791 model consists of induction of two skin lesions on the dorsum of hairless mice and post
792 daily intraperitoneal treatment with MaR2. Treatment with 100 pg/animal of MaR2
793 accelerated the healing process showing higher efficiency in lesion closure, decreased
794 inflammatory histopathological changes, neutrophil recruitment (MPO and migration of
795 LysM-eGFP positive cells), decreased levels of inflammatory cytokines (IL-1 β and
796 TNF- α) and mRNA expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1. In conclusion our study
797 suggests MaR2 as a promising therapeutic approach in the treatment of skin wounds.

798

799 **Keywords:** wound healing, resolving inflammation, Specialized Pro-resolving
800 Mediators (SPMs), oxidative stress.

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819 Introduction

820

821 The human skin has a unique connection with the other organs and is directly
822 associated with the dynamic balance of our entire organism with the external
823 environment. Because it works as a barrier, the skin often suffers the action of external
824 aggressors that are responsible for triggering various physical and chemical reactions,
825 activating the immune system and consequently the release of mediators, structural
826 changes in the tissue and various cellular and molecular interactions, thus promoting
827 the healing process [2].

828 Among the aggressions suffered by the skin, there are those that generate skin
829 wounds, either by accidents with sharp objects of varying degrees, burns or by surgical
830 incisions/biopsy. In all these cases there is inflammation and usually subsequent tissue
831 repair [3,4]. All the way, there are systemic factors, such as patient age, presence of
832 vascular, metabolic and autoimmune diseases, as well as ongoing drug therapy,
833 smoking and malnutrition that can affect the wound healing process [5].

834 Considering that large skin lesions and chronic wounds affect millions of people
835 [6,7] impairing the functional and structural integrity of the skin, and because they are
836 slow and difficult to heal due to susceptibility to infections and fluid loss, making
837 treatments usually require anti-inflammatories and antibiotics as adjuncts, affecting
838 patients' quality of life and increasing morbidity and mortality, they represent an
839 immense economic and social challenge for health systems worldwide [4,8].

840 Resolution of inflammation is mediated by endogenous local synthesis of
841 specialized pro-resolving mediators (SPM). SPMs comprise a class of molecules
842 derived from the transformation of omega-3 essential fatty acids, such as
843 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Four families have
844 been described so far, the lipoxins, resolvins (D and E series), protectins and maresins.
845 As a common factor, these mediators exhibit analgesic, anti-inflammatory functions
846 and act in host defense against infection [9].

847 Maresin 2 (MaR2) is a DHA derivative and biosynthesized by macrophages,
848 exhibits anti-inflammatory, pro-resolving and anti-atherosclerotic effects [10,11]. In
849 addition to therapeutic effect in a murine model of bronchial asthma induced by
850 ovalbumin [12], analgesic effect in several models of pain in mice [13] and in the
851 repair of the intestinal mucosa, in a model of colitis induced by dextran sulfate sodium
852 and in a biopsy wound model [14]. In the literature there is no evidence of the role of

853 MaR2 in skin wound healing.

854 Therefore, this research aimed to evaluate the impact of the MaR2 administered
855 intraperitoneally on the healing process in a murine model of dorsal skin lesion (DSL).

856

857 **Material and Methods**

858

859 *Animals*

860

861 All experiments were performed *in compliance* with the National Research
862 Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals guidelines and were
863 approved by with Ethics Committee on Animal Research and Welfare of the Londrina
864 State University (process numbers 15654.2019.33 - 147/2019). All efforts were made
865 to minimize animal use and their suffering. The experiments were performed in adult
866 (7-9 weeks old) hairless mice (HRS/J) weighing 25-30 g, and in adult (7-9 weeks old)
867 CX3CR1-eGFP/+ and LysM e-GFP/+, C57BL/6 background mice weighing 20-25 g,
868 obtained from the Londrina State University (UEL). Mice were housed at the cage, at
869 23°C ± 2 controlled temperature, 12-hour light/dark cycle, in an animal facility and had
870 free access to water and food. All researchers had animal treatment skills and were
871 previously trained for the necessary procedures of the protocol.

872

873 *Experimental Procedures*

874 The animals were divided into groups (sham, control wound without treatment
875 and wound treated with MaR2), each group with a total of 6-8 animals per experiment
876 and were treated with diluted sodium diclofenac (8mg/kg) via gavage cannula, before
877 the surgical procedure and 12h after. Anesthesia was performed with the combination
878 of ketamine/xylazine (80mg/kg and 10mg/kg, respectively) and complemented with
879 inhalation isoflurane until paw pain reflexes disappeared. In case of C57BL/6, dorsal
880 hair was removed with an electric clipper, then the dorsal skin was pinched at midline
881 and a 5mm dermal biopsy punch (0.1963cm² total area) was used to create two full-
882 thickness excisional skin wounds, symmetrically positioned to midline.

883 The animals were treated daily with MaR2 (1, 10, 100 or 1000pg/animal), via
884 intraperitoneal route, according to the treatment dose of each group or with saline
885 vehicles in the case of the group with the untreated lesion, for 7 days. The best dose

886 of MaR2 (100 pg/animal) was defined from the clinical evolution of the lesion
887 measurements at the end of the experiment.

888 For the collection of the subsequent studies, the animals were anesthetized and
889 euthanized (isoflurane 5% followed by decapitation), the lesioned skin was collected
890 with 6 mm biopsy punch and processed for each of the analyses.

891

892 *Measurement and evaluation of lesion closure*

893 The lesions were photographed on a white background with a black standard
894 reference of 1cm², at the time of lesion induction and 7 days later, before sample
895 collection. The lesion images were transformed into 8 Bit (grayscale), and the threshold
896 adjusted until the entire area of the measurement square and the lesions were marked
897 in the ImageJ program (NIH v2.9.0/1.53t) [15,16]. The lesion area was calculated
898 relative to the known area of the square, illustrated in figure 1. The measurement of
899 the initial and final two lesions of each animal were compared to determine the size of
900 the lesion closure. The lesions were analyzed individually, as each one, even in the
901 same mouse, may present independent evolution [17,18].

902

903

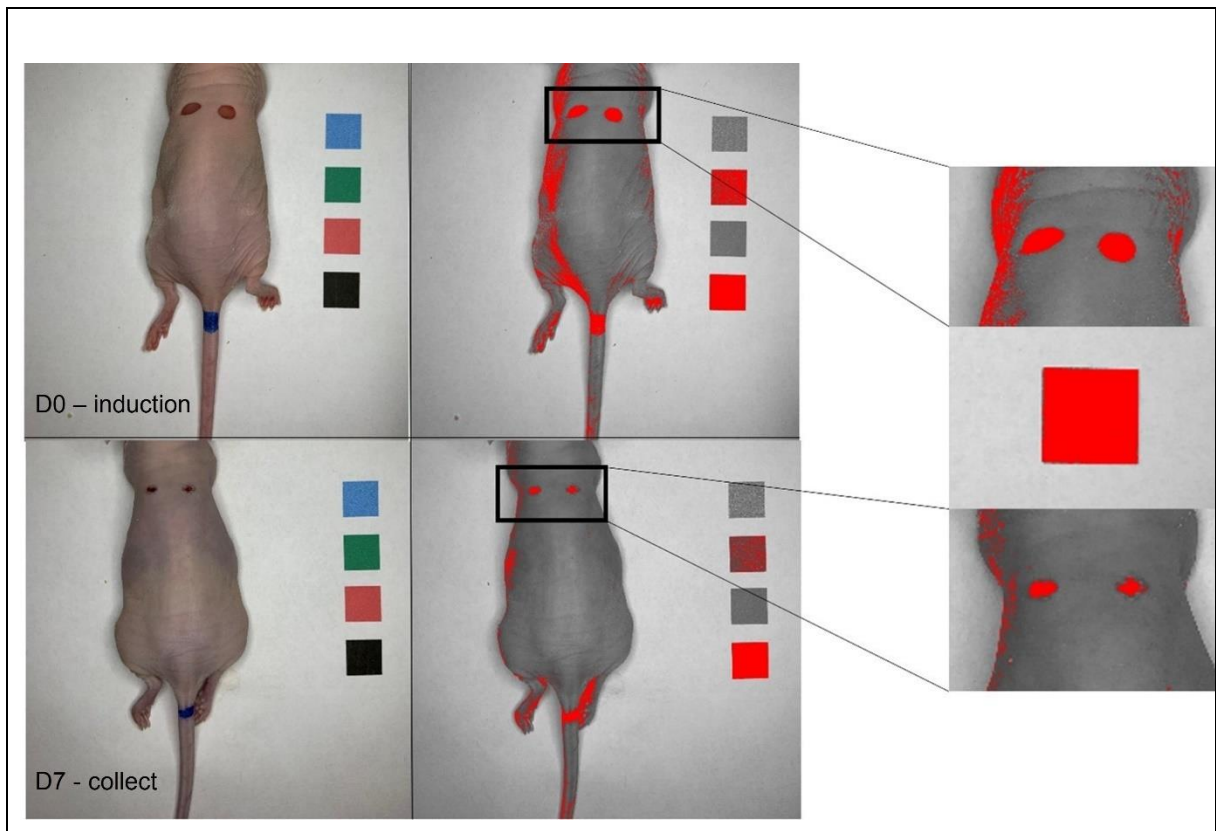


Figure 1: Method for evaluation of lesion measurement and closure. Processing of the images of the lesions photographed immediately after the procedure and after 7 days to calculate the area of lesion closure. Conversion into 8 Bit and threshold adjustment until the area of the lesions and the black square were completely filled on the ImageJ program.

904

905

906 *Histological analysis*

907

908 After 7 days the dorsal skin from lesion was dissected, fixed in 10% formaldehyde
909 prior to embedding in paraffin and then processed for hematoxylin and eosin (H&E)
910 staining. The images were digitally acquired using a conventional light microscope (40x
911 objective) (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan) coupled to a high-resolution digital
912 camera. Analyses were performed on ImageJ 1.53 software for Windows (Software in
913 the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using the threshold tool and performed on
914 RGB images without further treatment. The leukocyte recruitment was determined by
915 the intensity of staining per % of the delimited area. The histopathological score
916 parameters were inflammatory infiltrate from: no inflammation (score 0), mild (score 1),
917 moderate (score 2), and severe inflammation (score 3) and vascular proliferation from:
918 no vascular proliferation (score 0), mild (score 1), moderate (score 2) and severe
919 vascular proliferation (score 3) [19].

920

921

922 *Myeloperoxidase activity assay*

923 The indirect quantity of neutrophils presence was evaluated through colorimetric
924 assay of myeloperoxidase (MPO). Skin samples were collected in microtubes and kept
925 at - 80°C until assay time, when they were diluted with potassium phosphate buffer
926 (K₂HPO₄) (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB)
927 and homogenized using the Tissue-Tearor tissue homogenizer (Biospec 985370). The
928 homogenate was centrifuged for 2 min at 16,100g at 4°C and the supernatant was
929 used for the assay. In 96-well microplates, 30 µL of the supernatant and 200µL of 50
930 mM phosphate buffer solution at pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine
931 dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide were deposited. The standard curve
932 was prepared on the same plate by placing 100 µL of 0.05 M phosphate buffer and

933 200,000 neutrophils solution in the first well (A1), serially diluting to the eleventh well
934 (A11). In the twelfth well (A12) only 200 μ L of deionized water was deposited, being
935 used as a negative control (blank). After 20 minutes the colorimetric reaction was
936 determined in a spectrophotometer at 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices)
937 and the MPO activity of the samples was compared with the standard curve. The
938 results were presented as number of neutrophils $\times 10^4$ /mg protein.

939

940 *Fluorescence*

941

942 For fluorescence assay, LysM-eGFP/+ and CX3CR1-eGFP/+ C57BL/6 mice
943 were used, the dorsal skin lesion (DSL) were collected on day 7 and maintained in 4%
944 paraformaldehyde (PFA, for twenty-four hours), then in 30% sucrose (twenty-four
945 hours) and 30% sucrose + OCT (1:1) (twenty-four hours) before inclusion with
946 Optimum cutting temperature reagent (Tissue-Tek 1, O.C.T. Compound, IA018,
947 ProSciTech, Australia) and 15 μ m sections were cut in a cryostat and processed for
948 fluorescence. After that, the slides were washed with blocking buffer (PBS, 0.5%
949 Triton) with bovine serum albumin (BSA) 5% for 3 times and incubated with DAPI
950 (1:500) for nuclear staining. Imaging was performed using a confocal microscope
951 (Leica TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) with a 5x objective with a zoom-in of 1.0.
952 Images were processed using LAS X Software (Leica Microsystems, Mannheim,
953 Germany). The fluorescence intensity per area was quantified, delimiting only the
954 lesion site, without quantifying the fluorescence presented in the healthy skin area.

955

956 *Cytokine menstruation*

957

958 The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique was used with
959 commercial kits R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA for TNF- α and IL-1 β and
960 Invitrogen™ for TGF- β according to the manufacturers' instructions for use.

961 *Skin samples were collected in microtubes containing 500 μ L of 0.9% NaCl solution*
962 *and kept at -80°C until analysis, when they were ground with the grinder (Turrax*
963 *Tissue-Tearor - Biospec). They were then centrifuged for 5 minutes at 3,200 rpm at*
964 *4°C and the supernatant was removed for analysis. The 96-well microplates were*
965 *incubated overnight at 4°C with capture antibodies against the proteins of interest (100*
966 *μ L of anti-TGF- β antibodies 250x concentrate, 50x for IL-1 β and 50x for TNF- α). After*

967 *the incubation period, the plates were washed with PBS with 0.05% Tween 20 three*
 968 *times, incubated with the blocking solution for 1 hour at room temperature and washed*
 969 *again three times. In each well, 100 μ L of the prepared sample solution was placed*
 970 *and the plate was again incubated for 2 hours at room temperature, and then washed*
 971 *in the same way. 100 μ L of diluted detection antibody solution was placed and repeated*
 972 *incubation and washing, 100 μ L of avidin-peroxidase enzyme, repeated incubation (20*
 973 *minutes) and washing and finally 50 μ L stop-solution to stop the reaction and the*
 974 *absorbances were determined at 450 nm (Spectra MAX 3 250, Molecular Devices).*
 975 *The protein curve was used for comparison and determination of cytokines in the*
 976 *samples and the results were expressed as picograms (pg) of cytokine per milligram*
 977 *of protein (LOWRY et al., 1951).*

978

979 *RT-qPCR*

980 Skin samples were collected at the 7th day after lesion induction, ground with liquid
 981 nitrogen in TRIzol® reagent (Life Technologies) with the aid of a pestil and
 982 homogenized. Total RNA was extracted by using the SV Total RNA Isolation System
 983 (Promega). The purity of total RNA was measured using a spectrophotometer
 984 (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Vantaa,
 985 Finland) and the wavelength absorption relationship (260/280) was between 1.8 and
 986 2.0 for all preparations. Reverse transcription of total RNA to cDNA and qPCR was
 987 carried out using GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) and specific primers.
 988 The qPCR reaction was performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System
 989 (Applied Biosystems®). The relative gene expression was measured using the
 990 comparative 2^{- $\Delta\Delta$ Cq} method relative to wound healing group. Table 1 shows the
 991 primer sequences. Since the expression of house-keeping genes are also affected in
 992 wound healing model [20,21]. The geometric mean of the expression of 3 genes
 993 (GAPDH, TUB α and TBP) were used for normalization.

994

Table 2. Primer sequences for RT-qPCR.

Gene	Primer sense	Primer antisense
VEGF	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGCT
TIMP-1	GCAACTCGGACCTGGTCATAA	CTGGTATAAGGTGGTCTCGTTGATT
MMP-9	CTGGACAGCCAGACACTAAAG	CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG

MMP-1	CCTCGTTGGACCAAAACACA	GCGATGGCATCTTCCACAA
TUB α	TGGAACCCACAGTCATTGATGA	TGATCTCCTTGCCAATGGTGTA
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGACTGTTCTTCACTCTTGGC
GAPDH	GCCATCAACGACCCCTTCATTG	TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC
CX3CL1	ATTGGAAGACCTTGCTTTGG	GCCTCGGAAGTTGAGAGAGA
CX3CR1	CACCATTAGTCTGGGCGTCT	GATGCGGAAGTAGCAAAAGC

995

996

997

998 *Statistical Analysis*

999

1000 Data was tested for normality and statistical analyses were performed using T
 1001 test, Mann-Whitney test, One-way ANOVA followed by Tukey or Kruskall-Wallis as
 1002 appropriate, using GraphPad Prism® software package Version 9.4.1. Results were
 1003 obtained from different animals and expressed as mean \pm standard error of the mean
 1004 (SEM) and represent two separated experiments. P value <0.05 was the threshold for
 1005 significance. [*] Represents significant difference from sham, and [#] represents
 1006 significant difference from control wound group.

1007

1008

1009 **Results**

1010

1011 ***MaR2 accelerates the healing process by reducing wound size in HRS/J***
 1012 ***(hairless) mice***

1013 To evaluate the effects of MaR2 on wound healing, animals were subjected to a
 1014 dorsal skin lesion (DSL) using a 5 mm diameter circular biopsy punch (with a total area
 1015 of 0.1963cm²) and treated daily with MaR2 via intraperitoneal at doses of 1; 10; 100
 1016 and 1000 pg/animal or saline vehicle in the case of the group with the untreated lesion;
 1017 for 7 days (Fig. 2). The doses of 100 and 1000 pg/animal demonstrated significant
 1018 wound area reduction compared to the untreated group. The dose of 100 pg/animal
 1019 was chosen for continuity of the experiments considering that there was no significant
 1020 difference in wound area reduction between the doses of 100 and 1000 pg/animal.

1021

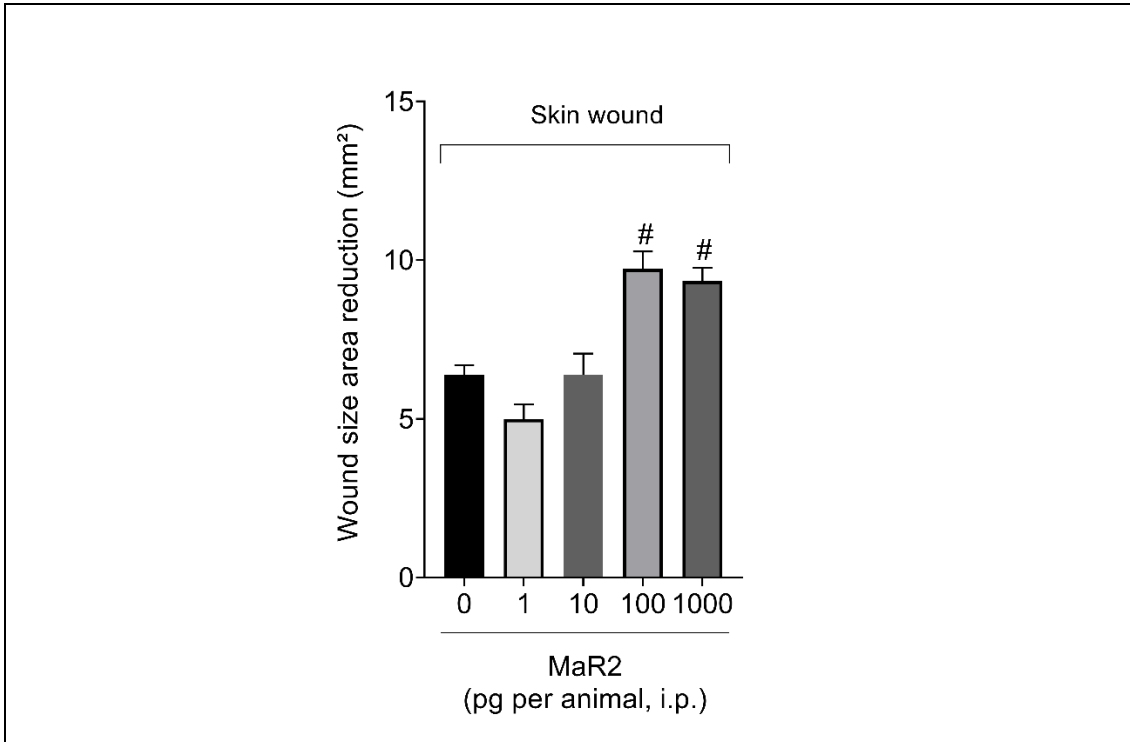


Fig 2. MaR2 accelerates *healing process*. The lesion on dorsum was induced with a 5 mm diameter punch. The animals were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 at doses of 1, 10, 100 and 1000 pg/animal. The lesion area was photographed on the day of lesion induction and after 7 days of treatment. The photos were analyzed with ImageJ open source software. Results are presented as the mean \pm SEM, n = 6 (#p < 0.05 compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1022

1023 ***MaR2 reduce neutrophil recruitment and inflammatory histopathological***
 1024 ***changes in the dorsal skin lesion***

1025

1026 The skin samples from lesion were stained with hematoxylin-eosin (HE),
 1027 histopathological score and leucocyte recruitment to the local of the lesion was
 1028 assessed. MaR2 100 pg/animal reduced score parameters (inflammatory infiltration
 1029 and vascular proliferation) (Fig. 3A) and leucocyte infiltration (Fig. 3B). Considering
 1030 that reduction, we further evaluated its effect in neutrophil recruitment to the location
 1031 of the lesion in MPO (Fig. 4) and fluorescence (Fig. 5) analyses.

1032

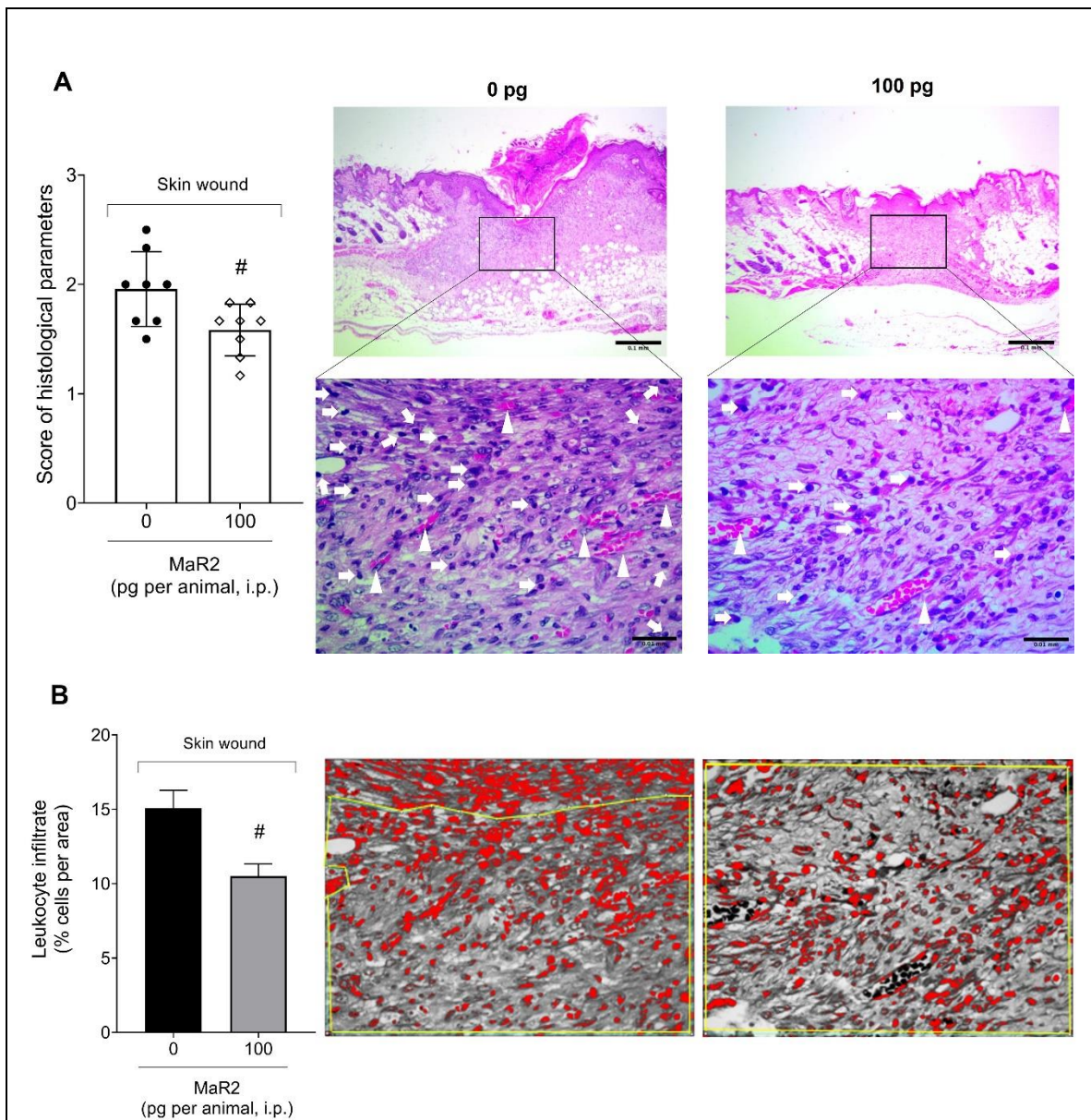


Fig 3. Treatment with MaR2 100 pg/animal reduces histopathological score at the lesion site (A) and the leukocyte infiltration (B). The wound was collected 7 days after lesion induction for HE analyses. Images were obtained digitally using a conventional light microscope (40x objective) (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan) coupled with a high-resolution digital camera. The blind score was analyzed and 2 parameters were observed, inflammatory infiltrate and vascular proliferation. Arrows point to leukocytes and arrowheads to vascular proliferation. For leukocyte infiltration the images were also evaluated by ImageJ software and quantified in % of the delineated area, highlighted in yellow. Results are presented as mean \pm SEM of measurements, $n = 8$ (# $p < 0.05$ compared to control wound)

without treatment group; Mann-Whitney (A) or one-way ANOVA followed by Tukey's post-test) (B).

1033

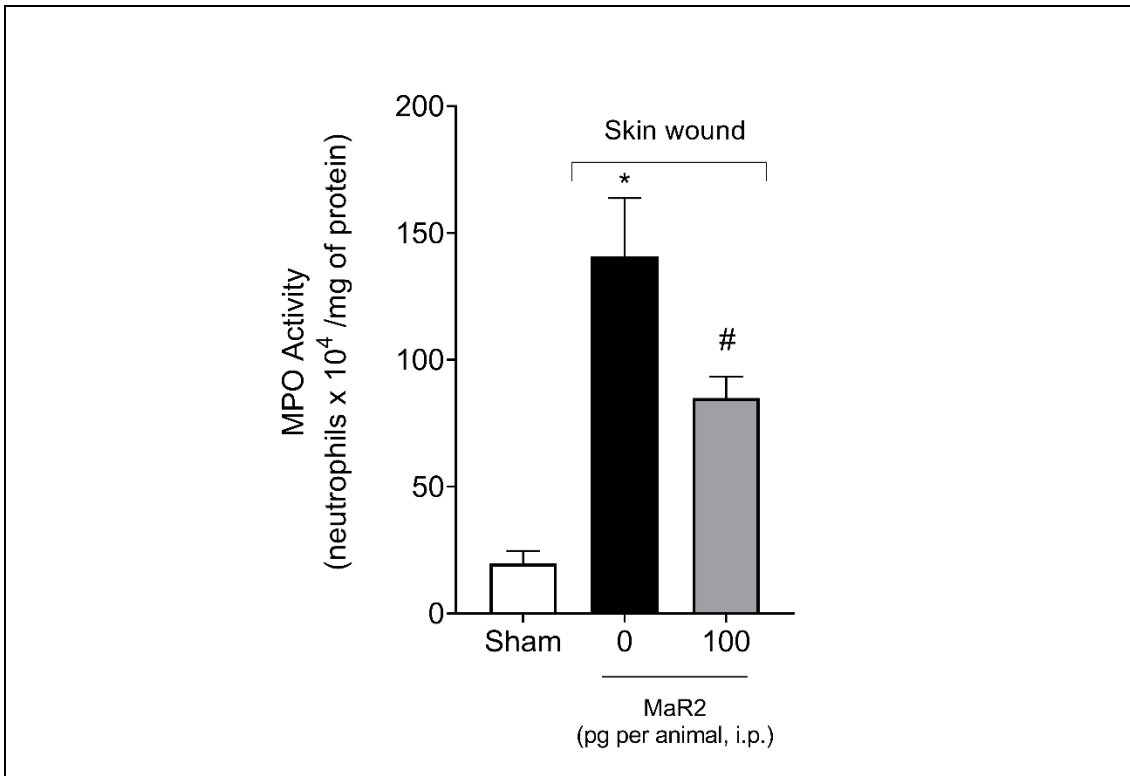


Fig 4. MaR2 reduces neutrophil recruitment at the lesion site. The DSL was induced with a 5 mm diameter punch. Animals were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for MPO assay. Results are presented as the mean \pm SEM, $n = 7$ (* $p < 0.05$ compared to sham group; # $p < 0.05$ compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

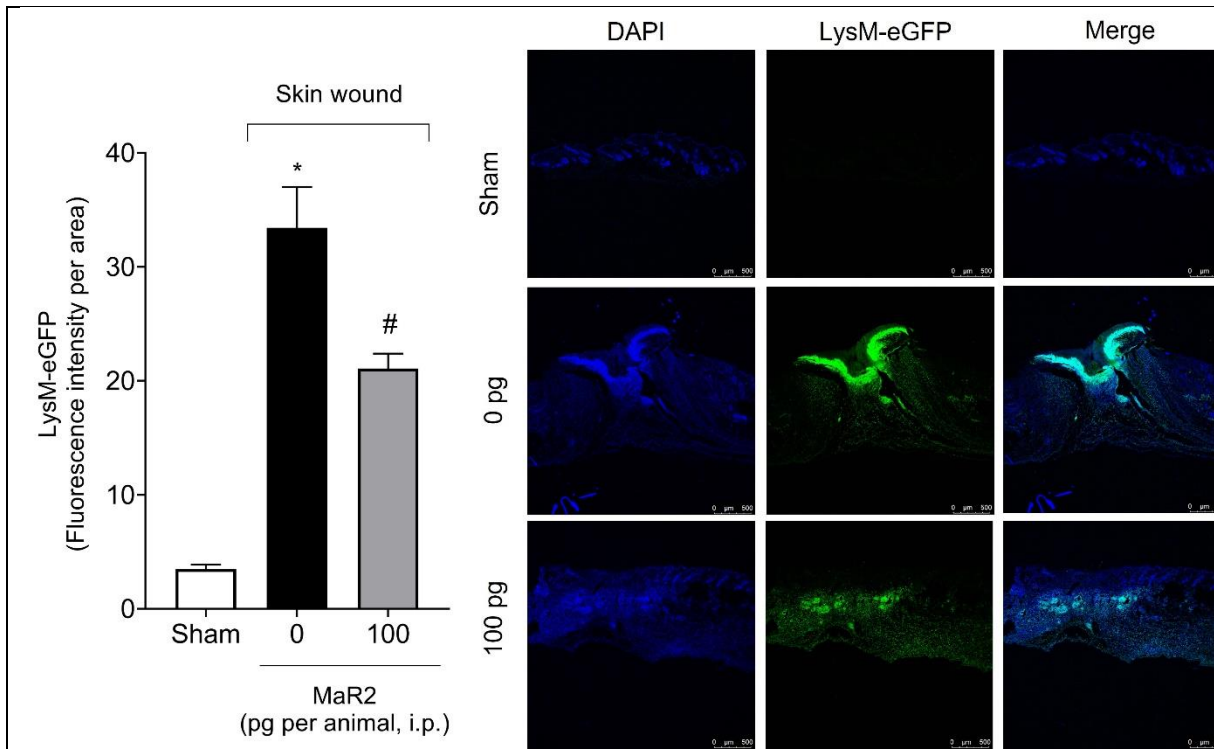


Fig 5. MaR2 reduces neutrophil recruitment to injury location. The dorsal skin was dissected 7 days after lesion induction and processed for fluorescence analysis. Neutrophil recruitment was assessed using LysM-eGFP mice and fluorescence intensity (in duplicate) was quantified. Results are presented as the mean \pm SEM, $n = 8$ (* $p < 0.05$ compared to the sham group; # $p < 0.05$ compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1034 ***MaR2 reduces the levels of inflammatory cytokines in the dorsal skin lesion***

1035

1036 The transition from the inflammatory phase to the proliferative phase is a critical
 1037 moment in the healing process, as prolonged or exacerbated inflammation can lead to
 1038 excessive scar tissue formation and contribute to the emergence and maintenance of
 1039 pathologies [22]. In order to verify if inflammatory cytokine production would be affected
 1040 by MaR2 treatment in the healing process of mice, we evaluated the production of two
 1041 cytokines consolidated as pro-inflammatory, IL-1 β and TNF- α . Both were significantly
 1042 decreased in the group treated with MaR2 100 pg/animal compared to the group
 1043 treated with saline vehicle (Fig. 6A and 6B), possibly indicating an advance in the
 1044 wound healing process in animals treated with MaR2, since on the seventh day they
 1045 are less inflamed.

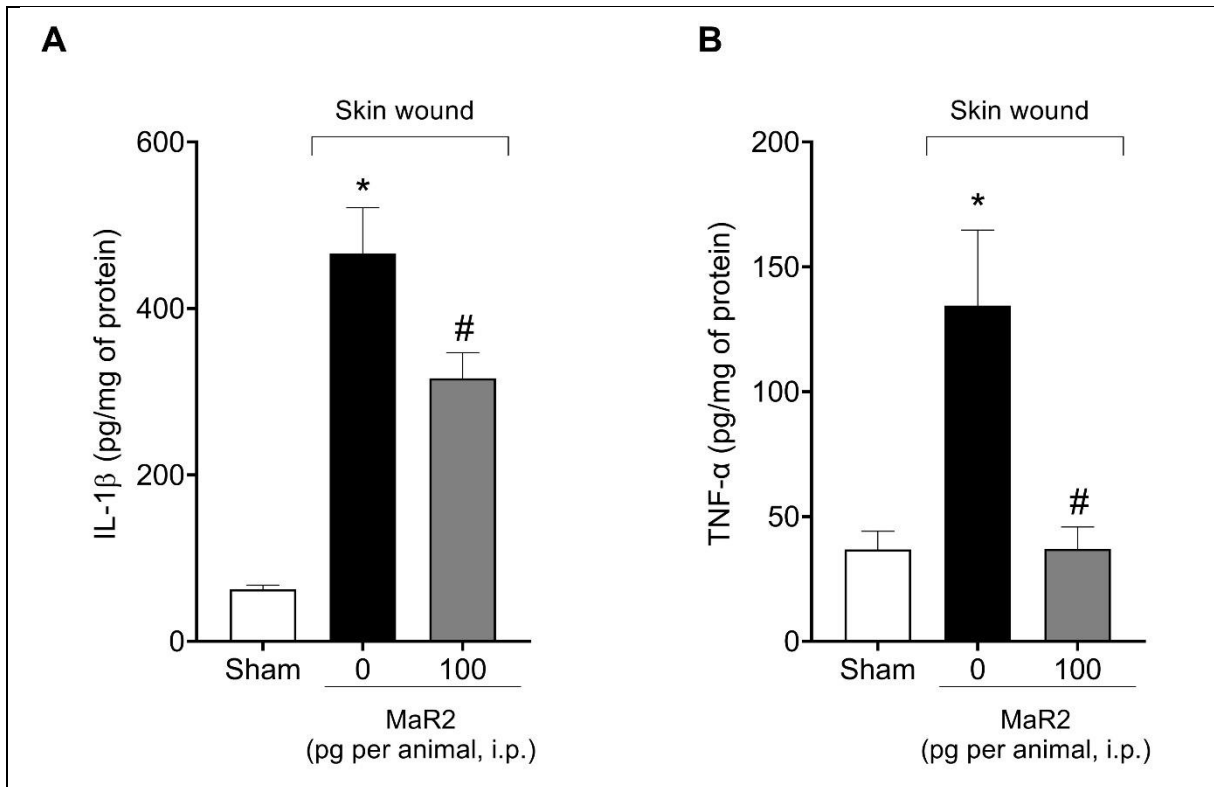


Fig 6. MaR2 decreased IL-1 β (A) and TNF- α (B) levels induced by dorsal skin lesion. The lesion was induced with a 5mm diameter punch and mice were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm Punch and processed for cytokine assay. Results are presented as the mean \pm SEM, n = 7; (*p < 0.05 compared to sham group; #p < 0.05 compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1046 **MaR2 reduced TGF- β production and VEGF mRNA expression in dorsal skin**
 1047 **lesion**

1048 To our knowledge, there is no gene that can be used alone as a control for normal
 1049 expression in the skin wound model. To minimize this difficulty, we used the geometric
 1050 mean of three control genes without the negative control group of normal tissue, again,
 1051 because the usual control genes are altered in the skin wound group compared to the
 1052 negative control group of normal tissue. These 3 genes were recommended after
 1053 expression analysis in skin wound model [20,21]. In the analysis of mRNA expression
 1054 for VEGF, a growth factor cited as beneficial for healing in some papers [23–25], we
 1055 observed that on day 7 after the induction of DSL, this parameter was decreased in
 1056 the group treated with MaR2 100 pg/animal compared to the animal treated with saline

1057 vehicle (Fig 7B). Also, along with the inflammatory cytokine analyses, we analyzed
 1058 TGF- β , a cytokine considered anti-inflammatory, and the result was intriguing since it
 1059 was also decreased in the group treated with MaR2 100 pg/animal compared to the
 1060 animal treated with saline vehicle (Fig 7A).
 1061

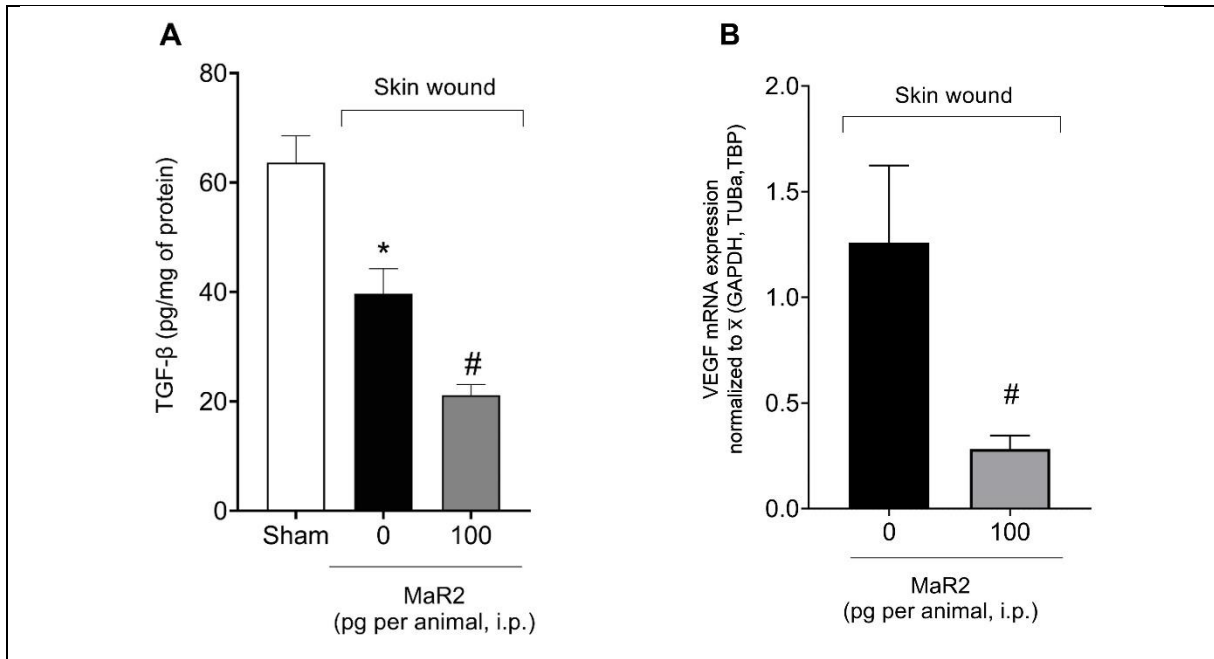
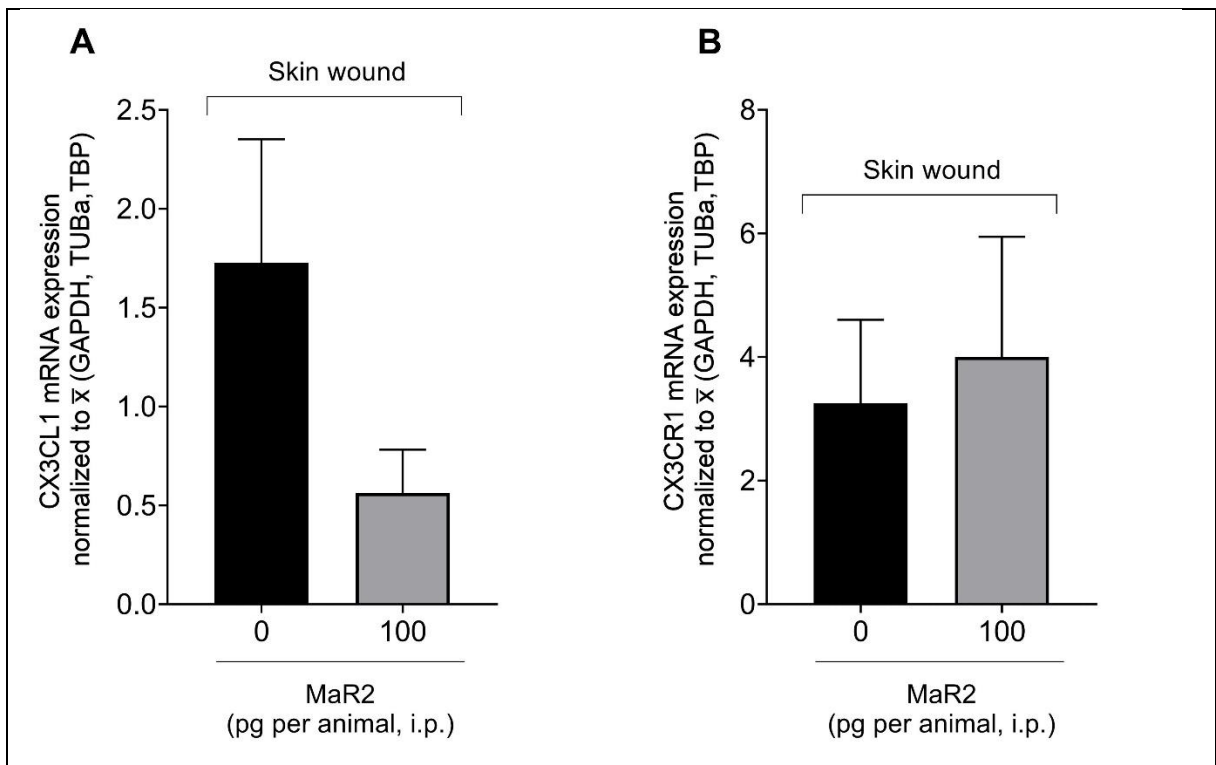


Fig 7. MaR2 decreased TGF- β production (A) and VEGF mRNA expression (B). The lesion was induced with a 5 mm diameter punch and mice were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for cytokine assay (A) or RT-qPCR (B). Results are mean \pm SEM, n = 7 mice per group per experiment. Two independent experiments were performed. (*p < 0.05 compared to sham group; #p < 0.05 compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1062 ***MaR2 does not affect the mRNA expression of CX3CL1 and CX3CR1, and neither***
 1063 ***the presence/absence of CX3CR1 positive cells***

1064 In order to evaluate the activity of MaR2 in the balance of the CX3CL1/CX3CR1
 1065 axis, we performed a RT qPCR CX3CL1 and CX3CR1 expression and quantitated
 1066 CX3CR1 positive cells. We observed no difference in the mRNA expression of CX3CL1
 1067 (Fig. 8A) and CX3CR1 (Fig. 8B) between control wound without treatment group and
 1068 treatment with MaR2 100pg/animal, although it has a tendency, so we also chose to
 1069 directly verify the presence/absence of CX3CR1 positive cells using CX3CR1 eGFP/+
 1070 reporter mice. Although, we observed an increase in CX3CR1 positive cells in control

1071 wound without treatment group compared to sham group, there was also no difference
1072 in the presence of CX3CR1 positive cells comparing the group treated with MaR2 100
1073 pg/animal and the group control wound without treatment (Fig. 8C and 8D). Therefore,
1074 we conclude that MaR2 is not acting by modulating this cell population, either by its
1075 recruitment or phenotype alteration in this model.
1076
1077



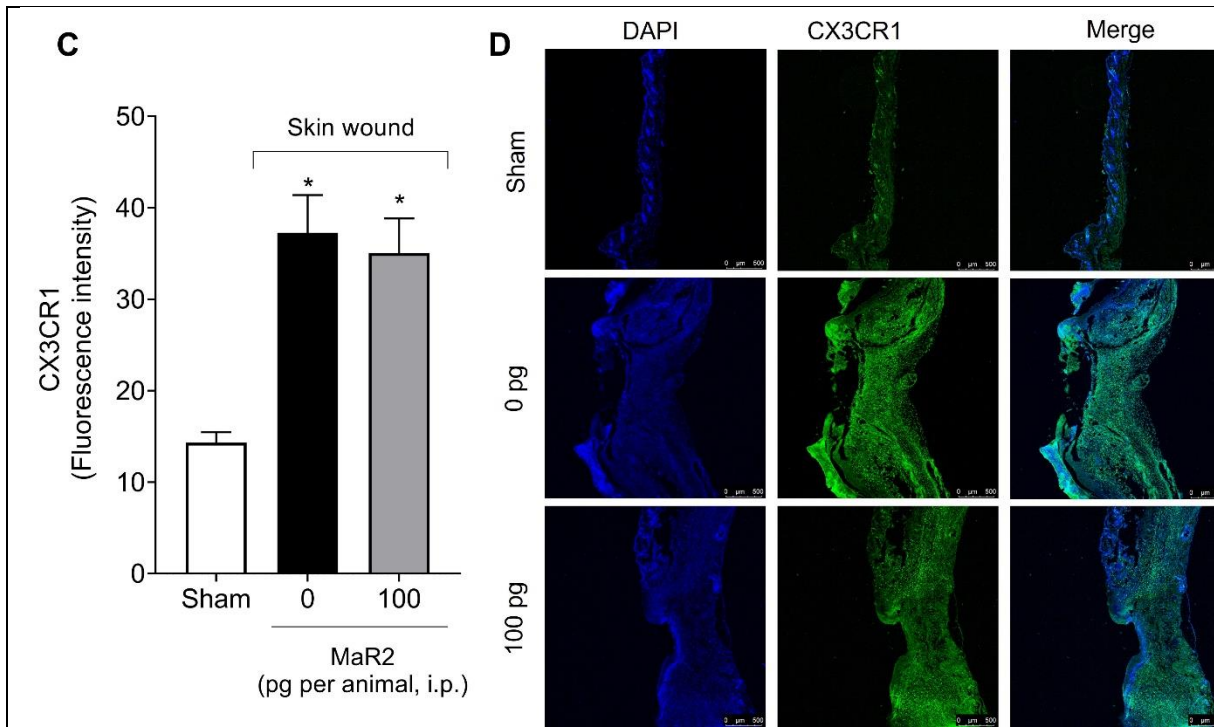


Fig 8. MaR2 does not affect the mRNA expression of the CX3CL1 ligand receptor (A) nor the expression of its receptor CX3CR1 (B). There was also no difference in the presence/absence of CX3CR1 positive cells, analyzed by fluorescence intensity (C). The dorsal skin lesion was induced with a 5 mm diameter punch and mice were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 at a dose of 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for RT-qPCR assay (A and B) or fluorescence analysis (C and D). Results are mean \pm SEM, $n = 7$ mice per group per experiment. Two independent experiments were performed. (* $p < 0.05$ compared to sham; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1078 ***MaR2 reduces the mRNA expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in the dorsal***
 1079 ***skin lesion***

1080 MMPs can be produced by a variety of inflammatory cells including macrophages
 1081 and neutrophils [26]. The activity of MMPs is also controlled by specific inhibitors,
 1082 known as tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). The balance between the production of
 1083 MMPs and that of TIMPs represents a crucial point to maintain the homeostasis of the
 1084 extracellular matrix. It is known that a pathological process of the extracellular matrix
 1085 can be established when there is excess activity of MMPs in tissues [27]. The mRNA
 1086 expression of MMP-1 (Fig. 9A), MMP-9 (Fig. 9B) and TIMP-1 (Fig. 9C) was quantified

1087 in the cutaneous lesion on the dorsum and the 3 parameters are decreased in the
 1088 animal treated with MaR2 100 pg/animal in relation to the animal treated with saline
 1089 vehicle.

1090 The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) enzyme will also be determined through
 1091 the gelatinase activity in the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel zymography
 1092 (SDS-PAGE) method [28] in order to complement this data.

1093

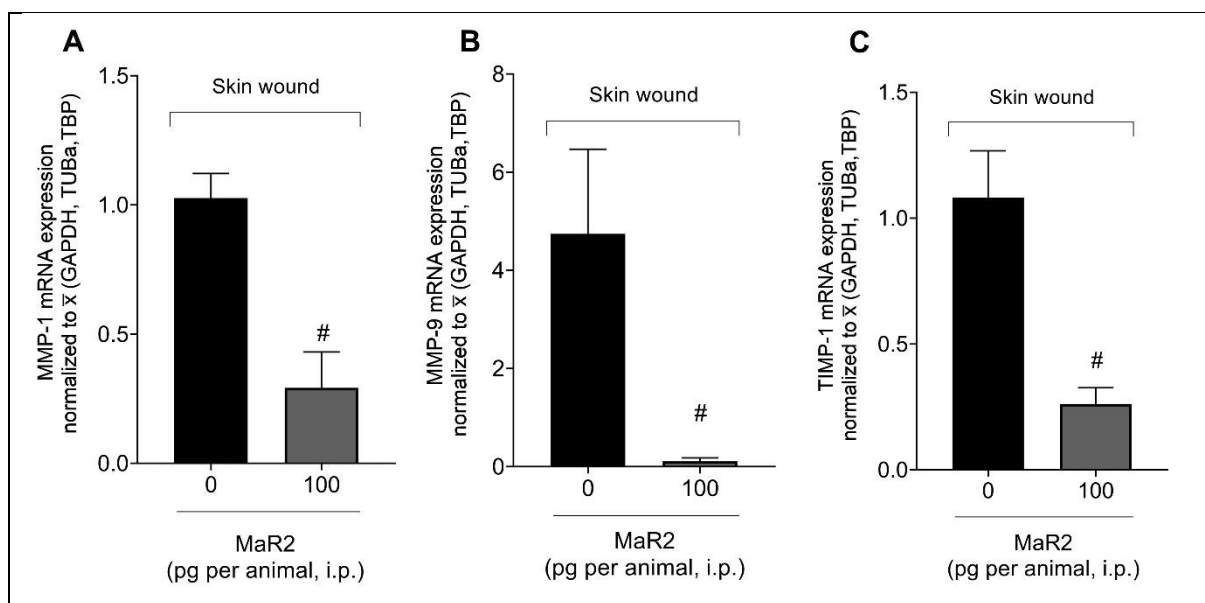


Fig 9. MaR2 decreased the mRNA expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1. Dorsal skin lesion was induced with a 5 mm diameter punch and mice were treated daily for 7 days via intraperitoneal (i.p.) with MaR2 100 pg/animal. Lesions were collected with a 6 mm punch and processed for RT-qPCR assay. Results are the mean \pm SEM, $n = 7$ mice per group (# $p < 0.05$ compared to control wound without treatment group; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test).

1094

1095

1096 Discussion

1097 Studies in wound healing have demonstrated that resolvins [29] and lipoxins
 1098 [30], members of the SPMs family, improve skin wound healing. MaR2 demonstrated
 1099 resolving and anti-inflammatory action in an egg albumin-induced model of bronchial
 1100 asthma [12], analgesic action in pain models [13] and was effective in intestinal
 1101 mucosal repair in a DSS (dextran sulfate sodium) induced colitis model [14].

1102 One of the parameters for evaluating inflammation is the number of recruited
 1103 neutrophils, and healing is impaired with an increase in this cell population. Wong and

1104 co-workers demonstrated that extracellular neutrophil trapping (NET) increased the
1105 degradation of matrix collagen, impairing wound healing [31]

1106 In our study, different doses of MaR2 were analyzed by macroscopic evaluation
1107 of lesion size and the doses of 100 and 1000 pg/animal demonstrated a statistically
1108 significant difference when compared to the lesion group treated with saline vehicle
1109 and the dose of 100 pg/animal was chosen for continuity of the study. Treatment with
1110 MaR2 not only accelerated the repair process, showing greater wound closure, but
1111 also reduced neutrophil recruitment, indicating that the healing process is in a stage
1112 closer to resolution.

1113 The resolution of inflammation, enabling tissue repair was demonstrated by
1114 lower cell recruitment in histopathological analysis, lower number of cells in LysM-
1115 eGFP and MPO activity, while not significantly altering cells expressing CX3CR1,
1116 which is a receptor expressed on macrophages, which contributes to the healing
1117 process. Although this receptor is related to the wound healing cells, as demonstrated
1118 by Ishida and co-workers, where knockout animals for the CX3CR1 receptor had
1119 impaired healing [32], we believe that this population of cells may not have been
1120 different in the treated group and in the untreated lesion group due to the healing
1121 capacity of healthy animals, since these animals do not present pathophysiological
1122 mechanisms that prevent them from recruiting these cells and promoting tissue repair
1123 after the injury.

1124 In the sense that we would have a smaller inflammatory process, MaR2 also
1125 reduced the levels of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , corroborating with
1126 the lower neutrophil recruitment. Although initially we expected an increase in
1127 cytokines that are involved in this orchestration of tissue repair, such as TGF- β and
1128 VEGF [33–36] the protein and mRNA level respectively was reduced in the MaR2
1129 treatment. The reduction of inflammation and the more closed wound profile indicate
1130 that the tissue repair is in the final phase, corroborating with the levels of TGF- β and
1131 VEGF also reduced, since the increase in these cytokines would indicate a phase in
1132 which intense vascularization would still be required for the recruitment of cells and
1133 nutrients, as well as oxygenation to the tissue being repaired [37].

1134 When the repair progresses to the wound maturation phase, there is a
1135 regression in the number of inflammatory cells and the induction of vascularization.
1136 There is a reduction in polymorphonuclear cells, such as neutrophils, as has been
1137 observed, and there is a maintenance of mononuclear cells, such as macrophages,

1138 which will orchestrate the balance between stimulating the fibroblast to produce
1139 extracellular matrix via TGF- β and the activity of proteases and tissue protease
1140 inhibitors that are responsible for remodeling [22,38].

1141 Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes responsible for the degradation
1142 of extracellular matrix (ECM) components such as collagen [36,39]. The activity of
1143 MMPs can be controlled by means of specific inhibitors, known as tissue inhibitors of
1144 MMPs (TIMPs). The regulation between the production of MMPs and that of TIMPs
1145 represents a crucial point to maintain the balance between extracellular matrix
1146 production and degradation. It is known that a pathological process of the extracellular
1147 matrix can set in when there is excess activity of MMPs in tissues [3,40]. Evaluating
1148 the mRNA expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 all reduced, indicating that the
1149 tissue treated with MaR2 is at a different stage than the group that did not receive
1150 MaR2 treatment.

1151

1152

1153 **Conclusion**

1154

1155 Through the present data, we suggest that MaR2 accelerates the repair process of
1156 tissue in murine model of dorsal skin lesion. Treatment with MaR2 decreased lesion
1157 size, inflammatory parameters, leukocyte recruitment and mRNA expression of MMP-
1158 1, MMP-9 and TIMP-1. These combined results indicate that MaR2 can be considered
1159 as a promising therapeutic approach in the treatment of cutaneous wounds. Moreover,
1160 the study in a murine model provides a solid basis for future clinical investigations in
1161 humans. However, further research is needed to fully understand the mechanism of
1162 action of MaR2 and to evaluate its efficacy and safety in clinical settings. Should the
1163 therapy be validated in future studies, it could represent a significant advance in the
1164 treatment of skin lesions and potentially contribute to improving the quality of life of
1165 patients with wounds in various medical settings.

1166

1167 **Acknowledgments**

1168 This work is supported by grants from National Council for Scientific and Technological
1169 Development (CNPq, Brazil) and Soraia Mendes Pierotti acknowledges master degree
1170 scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel
1171 (CAPES, Brazil).

1172

1173 **Conflict of interest**

1174 The authors declare no conflict of interest.

1175

1176

1177 **References**

1178

- 1179 [1] B. Deng, C.W. Wang, H.H. Arnardottir, Y. Li, C.Y.C. Cheng, J. Dalli, C.N.
1180 Serhan, Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory
1181 and pro-resolving mediator from human macrophages, *PLoS One*. 9 (2014).
1182 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>.
- 1183 [2] K. Kaplani, S. Koutsi, V. Armenis, F.G. Skondra, N. Karantzelis, S. Champeris
1184 Tsaniras, S. Taraviras, Wound healing related agents: Ongoing research and
1185 perspectives, *Adv Drug Deliv Rev*. 129 (2018) 242–253.
1186 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.007>.
- 1187 [3] E.M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, B. Conti, Skin wound
1188 healing process and new emerging technologies for skin wound care and
1189 regeneration, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–30.
1190 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>.
- 1191 [4] P. Kolimi, S. Narala, D. Nyavanandi, A.A.A. Youssef, N. Dudhipala, Innovative
1192 Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent
1193 Advancements, *Cells*. 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/cells11152439>.
- 1194 [5] K. Anderson, R.L. Hamm, Factors that impair wound healing, *Journal of the*
1195 *American College of Clinical Wound Specialists*. 4 (2012) 84–91.
1196 <https://doi.org/10.1016/j.jccw.2014.03.001>.
- 1197 [6] M. Olsson, ; Krister Järbrink, U. Divakar, R. Bajpai, ; Zee Upton, A. Schmidtchen,
1198 J. Car, The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic
1199 review, (2018). <https://doi.org/10.1111/wrr.12683>.
- 1200 [7] S.R. Nussbaum, M.J. Carter, C.E. Fife, J. DaVanzo, R. Haught, M. Nusgart, D.
1201 Cartwright, An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy
1202 Implications of Chronic Nonhealing Wounds, *Value in Health*. 21 (2018) 27–32.
1203 <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>.
- 1204 [8] C.K. Sen, G.M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T.K. Hunt, F. Gottrup,
1205 G.C. Gurtner, M.T. Longaker, Human skin wounds: A major and snowballing
1206 threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE, *Wound*
1207 *Repair and Regeneration*. 17 (2009) 763–771. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>.
- 1209 [9] C.N. Serhan, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology,
1210 *Nature*. 510 (2014) 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.
- 1211 [10] J.K. Jadapalli, G. V. Halade, Unified nexus of macrophages and maresins in
1212 cardiac reparative mechanisms, *FASEB Journal*. 32 (2018) 5227–5237.
1213 <https://doi.org/10.1096/fj.201800254R>.
- 1214 [11] B. Deng, C.W. Wang, H.H. Arnardottir, Y. Li, C.Y.C. Cheng, J. Dalli, C.N. Serhan,
1215 Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory
1216 and pro-resolving mediator from human macrophages, *PLoS One*. 9 (2014).
1217 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>.
- 1218 [12] C. xiu Yu, Z. an Shi, G. chun Ou, X. ju Chen, Q. Liu, D. Zeng, X. ju Nie, J. jun

- 1219 Chen, Maresin-2 alleviates allergic airway inflammation in mice by inhibiting the
1220 activation of NLRP3 inflammasome, Th2 type immune response and oxidative
1221 stress, *Mol Immunol.* 146 (2022) 78–86.
1222 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.03.118>.
- [13] 1223 V. Fattori, T.H. Zaninelli, C.R. Ferraz, L. Brasil-Silva, S.M. Borghi, J.M. Cunha,
1224 J.G. Chichorro, R. Casagrande, W.A. Verri, Maresin 2 is an analgesic
1225 specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and
1226 monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and
1227 CGRP release, *Neuropharmacology.* 216 (2022).
1228 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>.
- [14] 1229 J. Miranda, J.C. Brazil, A.H. Morris, C.A. Parkos, M. Quiros, A. Nusrat, Maresin-
1230 2 promotes mucosal repair and has therapeutic potential when encapsulated in
1231 thermostable nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 120 (2023).
1232 <https://doi.org/10.1073/pnas.2218162120>.
- [15] 1233 D.S. Masson-Meyers, T.A.M. Andrade, G.F. Caetano, F.R. Guimaraes, M.N.
1234 Leite, S.N. Leite, M.A.C. Frade, Experimental models and methods for
1235 cutaneous wound healing assessment, *Int J Exp Pathol.* 101 (2020) 21–37.
1236 <https://doi.org/10.1111/iep.12346>.
- [16] 1237 T.J. Collins, ImageJ for microscopy, *Biotechniques.* 43 (2007) S25–S30.
1238 <https://doi.org/10.2144/000112517>.
- [17] 1239 S.A. Park, J. Covert, L. Teixeira, M.J. Motta, S.L. Deremer, N.L. Abbott, R.
1240 Dubielzig, M. Schurr, R.R. Isseroff, J.F. McNulty, C.J. Murphy, Importance of
1241 defining experimental conditions in a mouse excisional wound model, *Wound
1242 Repair and Regeneration.* 23 (2015) 251–261.
1243 <https://doi.org/10.1111/wrr.12272>.
- [18] 1244 D.M. Ansell, L. Campbell, H.A. Thomason, A. Brass, M.J. Hardman, A statistical
1245 analysis of murine incisional and excisional acute wound models, *Wound Repair
1246 Regen.* 22 (2014) 281–287. <https://doi.org/10.1111/wrr.12148>.
- [19] 1247 C.R. Ferraz, M.F. Manchope, K.C. Andrade, T. Saraiva-Santos, A. Franciosi,
1248 T.H. Zaninelli, J. Bagatim-Souza, S.M. Borghi, D.M. Cândido, I. Knysak, R.
1249 Casagrande, F.H. Kwasniewski, W.A. Verri, Peripheral mechanisms involved in
1250 *Tityus bahiensis* venom-induced pain, *Toxicon.* 200 (2021) 3–12.
1251 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.06.013>.
- [20] 1252 K. Karnam, K. Sedmaki, P. Sharma, G. Routholla, S. Goli, B. Ghosh, V.V.K.
1253 Venuganti, O.P. Kulkarni, HDAC6 inhibitor accelerates wound healing by
1254 inhibiting tubulin mediated IL-1 β secretion in diabetic mice, *Biochim Biophys
1255 Acta Mol Basis Dis.* 1866 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165903>.
- [21] 1256 A. Turabelidze, S. Guo, L.A. Dipietro, Importance of housekeeping gene
1257 selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain
1258 reaction in a wound healing model, *Wound Repair and Regeneration.* 18 (2010)
1259 460–466. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x>.
- [22] 1260 N.X. Landén, D. Li, M. Stähle, Transition from inflammation to proliferation: a
1261 critical step during wound healing, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 73
1262 (2016) 3861–3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>.
- [23] 1263 M. Ram, V. Singh, S. Kumawat, D. Kumar, M.C. Lingaraju, T. Uttam Singh, A.
1264 Rahal, S. Kumar Tandan, D. Kumar, Deferoxamine modulates cytokines and
1265 growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats, *Eur J
1266 Pharmacol.* 764 (2015) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.029>.
- [24] 1267 B. Behm, P. Babilas, M. Landthaler, S. Schreml, Cytokines, chemokines and
1268 growth factors in wound healing, *Journal of the European Academy of*

- 1269 Dermatology and Venereology. 26 (2012) 812–820.
1270 <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x>.
- 1271 [25] K. Reyes-Gordillo, J. Segoviab, M. Shibayama, V. Tsutsumic, P. Vergara, M.G.
1272 Moreno, P. Muriel, Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile
1273 duct obstruction or CCl₄ in rats: Role of TGF- β modulation and oxidative stress,
1274 *Fundam Clin Pharmacol.* 22 (2008) 417–427. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00611.x>.
- 1276 [26] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, M.J.V.
1277 Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against
1278 UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J Photochem Photobiol B.* 84
1279 (2006) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>.
- 1280 [27] I. Human, P. Diseases, H. Birkedal-Hansen, Role of Matrix Metalloproteinases,
1281 n.d.
- 1282 [28] M.J.V. Fonseca, Y.M. Fonseca, F. Marquele-Oliveira, F.T.M.C. Vicentini,
1283 N.A.J.C. Furtado, J.P.B. Sousa, Y.M. Lucisano-Valim, Evaluation of the potential
1284 of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress, *Evidence-Based
1285 Complementary and Alternative Medicine.* 2011 (2011).
1286 <https://doi.org/10.1155/2011/863917>.
- 1287 [29] R. Menon, P. Krzyszczyk, F. Berthiaume, Pro-Resolution Potency of Resolvins
1288 D1, D2 and E1 on Neutrophil Migration and in Dermal Wound Healing, *Nano
1289 Life.* 07 (2017) 1750002. <https://doi.org/10.1142/s1793984417500027>.
- 1290 [30] M.B. Reis, P.A.T. Pereira, G.F. Caetano, M.N. Leite, A.F. Galvão, F.W.G. Paula-
1291 Silva, M.A.C. Frade, L.H. Faccioli, Lipoxin A4 encapsulated in PLGA
1292 microparticles accelerates wound healing of skin ulcers, *PLoS One.* 12 (2017).
1293 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182381>.
- 1294 [31] S.L. Wong, M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A.B. Goldfine, C.R.
1295 Kahn, D.D. Wagner, Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which
1296 impairs wound healing, *Nat Med.* 21 (2015) 815–819.
1297 <https://doi.org/10.1038/nm.3887>.
- 1298 [32] Y. Ishida, J.-L. Gao, P.M. Murphy, Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin
1299 Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and
1300 Function, *The Journal of Immunology.* 180 (2008) 569–579.
1301 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.569>.
- 1302 [33] S.P. Huang, M.S. Wu, C.T. Shun, H.P. Wang, C.Y. Hsieh, M.L. Kuo, J.T. Lin,
1303 Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial
1304 growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma, *J Biomed Sci.* 12
1305 (2005) 229–241. <https://doi.org/10.1007/s11373-004-8177-5>.
- 1306 [34] A. Fantin, J.M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhozhij, F. Peri,
1307 S.W. Wilson, C. Ruhrberg, Tissue macrophages act as cellular chaperones for
1308 vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell
1309 induction, *Blood.* 116 (2010) 829–840. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257832>.
- 1311 [35] P. Kumar, S. Kumar, E.P. Udupa, U. Kumar, P. Rao, T. Honnegowda, Role of
1312 angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing, *Plast
1313 Aesthet Res.* 2 (2015) 243. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.165438>.
- 1314 [36] M.J. Bae, F. Karadeniz, B.N. Ahn, C.S. Kong, Evaluation of effective MMP
1315 inhibitors from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells,
1316 *Prev Nutr Food Sci.* 20 (2015) 153–161.
1317 <https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.3.153>.
- 1318 [37] H.N. Wilkinson, M.J. Hardman, Wound healing: cellular mechanisms and

- 1319 pathological outcomes, *Open Biol.* 10 (2020).
1320 <https://doi.org/10.1098/RSOB.200223>.
- 1321 [38] T.J. Koh, L.A. DiPietro, Inflammation and wound healing: the role of the
1322 macrophage., *Expert Rev Mol Med.* 13 (2011).
1323 <https://doi.org/10.1017/S1462399411001943>.
- 1324 [39] A.I.G. Lima, J. Mota, S.A.V.S. Monteiro, R.M.S.B. Ferreira, Legume seeds and
1325 colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon
1326 cancer cell migration, *Food Chem.* 197 (2016) 30–38.
1327 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.063>.
- 1328 [40] M.A. Mofazzal Jahromi, P. Sahandi Zangabad, S.M. Moosavi Basri, K. Sahandi
1329 Zangabad, A. Ghamarypour, A.R. Aref, M. Karimi, M.R. Hamblin, Nanomedicine
1330 and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound
1331 healing, *Adv Drug Deliv Rev.* 123 (2018) 33–64.
1332 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001>.
1333

1334 7 CONCLUSÃO

1335

1336 Através dos presentes dados, sugerimos que a MaR2 acelera o processo de
1337 reparo tecidual em modelo murino de lesão cutânea em dorso. O tratamento com a
1338 MaR2 diminuiu o tamanho da lesão, parâmetros inflamatórios, o recrutamento
1339 leucocitário e a expressão de RNAm de MMP-1, MMP-9 e TIMP-1. Esses resultados
1340 combinados indicam que a MaR2 pode ser considerada como uma abordagem
1341 terapêutica promissora no tratamento de feridas cutâneas. Além disso, o estudo em
1342 um modelo murino oferece uma base sólida para futuras investigações clínicas em
1343 seres humanos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender
1344 completamente o mecanismo de ação da MaR2 e avaliar sua eficácia e segurança em
1345 contextos clínicos. Caso a terapia seja validada em estudos futuros, ela pode
1346 representar um avanço significativo no tratamento de lesões cutâneas e
1347 potencialmente contribuir para a melhoria da qualidade de vida de pacientes com
1348 feridas em diversos cenários.

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

1359

1360

1361

1362

1363

REFERÊNCIAS

1364

1365

1366 ABDULNOUR, Raja-Elie E. et al. Maresin 1 biosynthesis during platelet–neutrophil
1367 interactions is organ-protective. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,
1368 v. 111, n. 46, p. 16526-16531, 2014.

1369

1370 ANDERSON, Kristin; HAMM, Rose L. Factors that impair wound healing. **Journal of**
1371 **the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 4, n. 4, p. 84-91, 2012.

1372

1373 AZZAM, Edouard I.; JAY-GERIN, Jean-Paul; PAIN, Debkumar. Ionizing radiation-
1374 induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, v. 327, n.
1375 1-2, p. 48-60, 2012.

1376

1377 BACCI, S. Fine Regulation during Wound Healing by Mast Cells, A Physiological Role
1378 Not Yet Clarified. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, 1 fev. 2022.

1379

1380 BASIL, Maria C.; LEVY, Bruce D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous
1381 regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p.
1382 51-67, 2016.

1383

1384 BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mechanisms
1385 involved in wound healing: a revision. **Revista Brasileira de Ciências**
1386 **Farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51, 2005.

1387

1388 BAUM, Christian L.; ARPEY, Christopher J. Normal cutaneous wound healing: clinical
1389 correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic surgery**, v. 31, n. 6, p.
1390 674-686, 2005.

1391

1392 BLAIR, Michael J. et al. Skin structure–function relationships and the wound healing
1393 response to intrinsic aging. **Advances in wound care**, v. 9, n. 3, p. 127-143, 2020.

1394

1395 BOATENG, Joshua; CATANZANO, Ovidio. Advanced therapeutic dressings for
1396 effective wound healing—a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 104, n. 11,
1397 p. 3653-3680, 2015.

1398

1399 CHAUHAN, Ravi et al. Advancing of zinc oxide nanoparticles for cosmetic applications.
1400 In: **Handbook of Consumer Nanoproducts**. Singapore: Springer Singapore, 2022.
1401 p. 1-16.

1402

1403 CHIANG, Nan; SERHAN, Charles N. Specialized pro-resolving mediator network: an
1404 update on production and actions. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 443-462,
1405 2020.

1406

1407 CHOUHAN, Dimple et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and
1408 skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, v. 216, p. 119267, 2019.

1409

1410 COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, v. 43, n. 1S, p. S25–S30, jul.

- 1411 2007.
1412
1413 CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate
1414 immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory
1415 response. *Revista brasileira de reumatologia*, v. 50, p. 434-447, 2010.
1416
1417 DALLI, Jesmond; SERHAN, Charles N. Identification and structure elucidation of the
1418 pro-resolving mediators provides novel leads for resolution pharmacology. **British**
1419 **journal of pharmacology**, v. 176, n. 8, p. 1024-1037, 2019.
1420
1421 DENG, Bin et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-
1422 inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. **PloS one**, v. 9,
1423 n. 7, p. e102362, 2014.
1424
1425 DUVALL, M. G., LEVY, B. D. DHA-and EPA-derived resolvins, protectins, and
1426 maresins in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**. v.785, p144-
1427 155, 2016.
1428
1429 EFRON, Nathan. Contact lens wear is intrinsically inflammatory. *Clinical and*
1430 *Experimental Optometry*, v. 100, n. 1, p. 3-19, 2017.
1431
1432 EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and
1433 regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*,
1434 v. 6, n. 265, p. 265sr6-265sr6, 2014.
1435
1436 ESTIMATION OF PROTEIN BY LOWRY'S METHOD, n.d.; Walker & Press, n.d
1437
1438 FATTORI, Victor et al. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid
1439 mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron
1440 TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release. **Neuropharmacology**, v. 216, p.
1441 109189, 2022.
1442
1443 FERGUSON, Mark WJ; O'KANE, Sharon. Scar-free healing: from embryonic
1444 mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philosophical Transactions of the**
1445 **Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1445, p. 839-
1446 850, 2004.
1447
1448 FERRAZ, Camila R. et al. Peripheral mechanisms involved in *Tityus bahiensis* venom-
1449 induced pain. *Toxicon*, v. 200, p. 3-12, 2021.
1450
1451 GINHOUX, Florent; GUILLIAMS, Martin. Tissue-resident macrophage ontogeny and
1452 homeostasis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 439-449, 2016.
1453
1454 GRONERT, Karsten et al. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in
1455 promoting epithelial wound healing and host defense. *Journal of Biological Chemistry*,
1456 v. 280, n. 15, p. 15267-15278, 2005.
1457
1458 HAKIMI, Navid et al. Handheld skin printer: in situ formation of planar biomaterials and
1459 tissues. *Lab on a Chip*, v. 18, n. 10, p. 1440-1451, 2018.
1460

- 1461 MANCILLA-HERRERA, Ismael et al. Activated endothelial cells limit inflammatory
1462 response, but increase chemoattractant potential and bacterial clearance by human
1463 monocytes. **Cell Biology International**, v. 39, n. 6, p. 721-732, 2015.
1464
- 1465 JADAPALLI, Jeevan Kumar; HALADE, Ganesh V. Unified nexus of macrophages and
1466 maresins in cardiac reparative mechanisms. *The FASEB Journal*, v. 32, n. 10, p. 5227,
1467 2018.
1468
- 1469 JORDAN, Paul M.; WERZ, Oliver. Specialized pro-resolving mediators: biosynthesis
1470 and biological role in bacterial infections. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 14, p. 4212-
1471 4227, 2022.
1472
- 1473 KARNAM, Kalyani et al. HDAC6 inhibitor accelerates wound healing by inhibiting
1474 tubulin mediated IL-1 β secretion in diabetic mice. *Biochimica et Biophysica Acta*
1475 (BBA)-Molecular Basis of Disease, v. 1866, n. 11, p. 165903, 2020.
1476
- 1477 KARIM, Putri Laksmi et al. Anatomy and histologic of intrinsic aging skin. *Bioscientia*
1478 *Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, v. 5, n. 11, p. 1065-
1479 1077, 2021.
1480
- 1481 KOLIMI, Praveen et al. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing:
1482 trajectory and recent advancements. *Cells*, v. 11, n. 15, p. 2439, 2022.
1483
- 1484 KRISP, Christoph et al. Proteome analysis reveals antiangiogenic environments in
1485 chronic wounds of diabetes mellitus type 2 patients. *Proteomics*, v. 13, n. 17, p. 2670-
1486 2681, 2013.
- 1487
- 1488 LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M.; BERNOUD-HUBAC, N. Anti-inflammatory and
1489 anti-virus potential of poxytrins, especially protectin DX. *Biochimie*, v. 179, p. 281–284,
1490 1 dez. 2020.
1491
- 1492 LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a
1493 critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 20,
1494 p. 3861–3885, 1 out. 2016.
1495
- 1496 LAWTON, S. Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nurs. Times*, v. 115, p. 30-
1497 33, 2019.
1498
- 1499 LEONI, G. et al. Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. *Mucosal*
1500 *Immunology* Nature Publishing Group, , 19 set. 2015.
1501
- 1502 LIU, Jie; KHALIL, Raouf A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigational and
1503 therapeutic tools in unrestrained tissue remodeling and pathological disorders.
1504 *Progress in molecular biology and translational science*, v. 148, p. 355-420, 2017.
1505
- 1506 MARTIN, C. A. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance
1507 and occurrence in foods. *Rev. Nutr*, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.
1508
- 1509 MARTINHO, J. P. Neurobiological effects of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids.

- 1510 Lisboa: Universidade de Lisboa, 2016.
- 1511
- 1512 MASSON-MEYERS, D. S. et al. Experimental models and methods for cutaneous
1513 wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 101,
1514 n. 1–2, p. 21–37, 1 fev. 2020.
- 1515
- 1516 MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das
1517 feridas cirúrgicas. *Journal of surgical and clinical research*, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.
- 1518
- 1519 MENON, Riyesh; KRZYSZCZYK, Paulina; BERTHIAUME, François. Pro-resolution
1520 potency of resolvins D1, D2 and E1 on neutrophil migration and in dermal wound
1521 healing. *Nano Life*, v. 7, n. 01, p. 1750002, 2017.
- 1522
- 1523 MIRANDA, Jael et al. Maresin-2 promotes mucosal repair and has therapeutic
1524 potential when encapsulated in thermostable nanoparticles. *Proceedings of the
1525 National Academy of Sciences*, v. 120, n. 4, p. e2218162120, 2023.
- 1526
- 1527 NAWAZ, Zuhair; BENTLEY, George. Surgical incisions and principles of wound
1528 healing. *Surgery (Oxford)*, v. 29, n. 2, p. 59-62, 2011.
- 1529
- 1530 NORLING, L. V. et al. Cutting Edge: Humanized Nano-Proresolving Medicines Mimic
1531 Inflammation-Resolution and Enhance Wound Healing. *The Journal of Immunology*, v.
1532 186, n. 10, p. 5543–5547, 15 maio 2011.
- 1533
- 1534 OLSSON, Maja et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A
1535 systematic review. *Wound Repair and Regeneration*, v. 27, n. 1, p. 114-125, 2019.
- 1536
- 1537 PARK, S. A. et al. Importance of defining experimental conditions in a mouse excisional
1538 wound model. *Wound Repair and Regeneration*, v. 23, n. 2, p. 251–261, 1 mar. 2015.
- 1539
- 1540 POTEKAEV, Nikolai N. et al. The role of extracellular matrix in skin wound
1541 healing. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 5947, 2021.
- 1542
- 1543 REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *European Surgical
1544 Research*, v. 49, n. 1, p. 35–43, ago. 2012.
- 1545
- 1546 REIS, M. B. et al. Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound
1547 healing of skin ulcers. *PLoS ONE*, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2017.
- 1548
- 1549 RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*, v. 99, p.
1550 665–706, 2019.
- 1551
- 1552 SARAIVA-SANTOS, Telma et al. Therapeutic activity of lipoxin A4 in TiO₂-induced
1553 arthritis in mice: NF- κ B and Nrf2 in synovial fluid leukocytes and neuronal TRPV1
1554 mechanisms. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 949407, 2023.
- 1555
- 1556 SEKI, Hiroyuki et al. Resolvins as regulators of the immune
1557 system. *TheScientificWorldJOURNAL*, v. 10, p. 818-831, 2010.
- 1558
- 1559 SEN, C. K. et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health

- 1560 and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE. *Wound Repair and Regeneration*, nov.
1561 2009.
1562
- 1563 SERHAN, Charles N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints
1564 from decoding resolution mediators and mechanisms. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 4,
1565 p. 1273, 2017.
1566
- 1567 SERHAN, Charles N.; CHIANG, Nan; VAN DYKE, Thomas E. Resolving inflammation:
1568 dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews*
1569 *Immunology*, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.
1570
- 1571 SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution
1572 physiology. *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.
1573
- 1574 SERHAN, Charles N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints
1575 from decoding resolution mediators and mechanisms. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 4,
1576 p. 1273, 2017.
1577
- 1578 SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology.
1579 *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.
1580
- 1581 SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis.
1582 *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 2012.
1583
- 1584 SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of*
1585 *Medicine*, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.
1586
- 1587 SIPKA, T. et al. Macrophages undergo a behavioural switch during wound healing in
1588 zebrafish. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 192, p. 200–212, 1 nov. 2022.
1589 SOLIMAN, Amro M.; BARREDA, Daniel R. Acute inflammation in tissue healing.
1590 *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, p. 641, 2022.
1591
- 1592 SOMMER, Claudia; BIRKLEIN, Frank. Resolvins and inflammatory pain. *F1000*
1593 *medicine reports*, v. 3, 2011.
1594
- 1595 SOLIMAN, Amro M.; BARREDA, Daniel R. Acute inflammation in tissue healing.
1596 *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, p. 641, 2022.
1597
- 1598 SORG, H.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Intravital insights in skin wound healing using
1599 the mouse dorsal skin fold chamber. *Journal of Anatomy*, v. 211, n. 6, p. 810–818, dez.
1600 2007
1601
- 1602 TOTTOLI, Erika Maria et al. Skin wound healing process and new emerging
1603 technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 8, p. 735,
1604 2020.
1605
- 1606 TURABELIDZE, Anna; GUO, Shujuan; DIPIETRO, Luisa A. Importance of
1607 housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative
1608 polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound repair and regeneration*,

- 1609 v. 18, n. 5, p. 460-466, 2010.
1610
- 1611 UCHIDA, Denise Tiemi; BRUSCHI, Marcos Luciano. 3D Printing as a Technological
1612 Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, v.
1613 24, n. 1, p. 41, 2023.
1614
- 1615 WANG, Qian et al. Specialized pro-resolving mediators regulate alveolar fluid
1616 clearance during acute respiratory distress syndrome. *Chinese Medical Journal*, v.
1617 131, n. 08, p. 982-989, 2018.
1618
- 1619 WANG, Ming et al. Artificial skin perception. *Advanced Materials*, v. 33, n. 19, p.
1620 2003014, 2021.
1621
- 1622 WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: Cellular mechanisms
1623 and pathological outcomes. *Open biology*, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020.
1624
- 1625 WOO, Wei-Meng. Skin structure and biology. *Imaging Technologies and Transdermal*
1626 *Delivery in Skin Disorders*, p. 1-14, 2019.
1627
- 1628 XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing
1629 Tissues 1 Myeloperoxidase (MPO), 2 a hydrogen peroxide (H₂O₂). *ANALYTICAL*
1630 *BIOCHEMISTRY*, v. 245, n. 1, p. 93–96, fev. 1997.
1631
- 1632 XU, Yunlong et al. Thymosin alpha-1 inhibits complete freund's adjuvant-induced pain
1633 and production of microglia-mediated pro-inflammatory cytokines in spinal cord.
1634 *Neuroscience bulletin*, v. 35, p. 637-648, 2019.
1635
- 1636 YU, Cheng-xiu et al. Maresin-2 alleviates allergic airway inflammation in mice by
1637 inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome, Th2 type immune response and
1638 oxidative stress. *Molecular Immunology*, v. 146, p. 78-86, 2022.
1639
- 1640 ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges
1641 in translational research. *Journal of Dermatological Science* Elsevier Ireland Ltd, 1 abr.
1642 2018.
1643
1644
- 1645
- 1646
- 1647
- 1648
- 1649

1650

1651

1652

1653

1654

1655

1656

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663

1664

ANEXOS

1665

1666

1667

1668

1669

1670

1671

1672

1673

1674

1675

1676

1677

1678

1679

1680

1681

1682

1683
1684
1685
1686

ANEXO A
Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
OF. CIRC. CEUA N° 147/2019

Londrina, 09 de outubro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação dos efeitos e mecanismos de ação dos mediadores lipídicos pró-resolução 15-epi-lipoxina A4 (é uma "Aspirin-Triggered Lipoxin" A4, ATLA4), lipoxina A4 (LXA4), Resolvina D1 (RvD1), Resolvina D5 (RvD5), Protectina D1 (PD1), Maresina 1 (Mar1) e Maresina 2 (Mar2) sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea" protocolo CEUA n° 15654.2019.33 sob a responsabilidade de Rúbia Casagrande, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) em reunião do dia 08/10/2019.

Este projeto tem por objetivo a avaliação dos efeitos e mecanismos de ação dos mediadores lipídicos pró-resolução 15-epi-lipoxina A4 (é uma "Aspirin-triggered Lipoxin" A4, ATLA4), lipoxina A4 (LXA4), Resolvina D1 (RvD1), Resolvina D5 (RvD5), protectina D1 (PD1), maresina 1 (Mar1) e a maresina 2 (Mar2) sobre a cicatrização em modelo murino de lesão cutânea de dorso. Grau de Invasividade: 2.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/11/2019 a 31/10/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico/Hairless
N° de animais	924
Peso/ Idade	20-25g/ 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UEL
Amostras a serem coletadas	Pele (tecido cutâneo do dorso)

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UDEL

**Profª Drª Maria Fernanda
 Rodrigues Graciano**
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais
 Universidade Estadual de Londrina
 ceua@uel.br / (43) 3371-5454

**Ilmo.(a) Sr.(a)
 Prof. (a) Dr (a). Rúbia Casagrande**
Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS
 C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS
 C/C para a Direção do Centro de Ciências da Saúde/CCS