



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

**Marco Aurélio dos Santos Silva**

**Efeitos do calor induzido por luz visível sobre a pele e o reparo tecidual  
cutâneo de camundongos**

Rio de Janeiro

2016

Marco Aurélio dos Santos Silva

**Efeitos do calor induzido por luz visível sobre a pele e o reparo tecidual  
cutâneo de camundongos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos-Silva, Marco Aurélio dos.

Efeitos do calor induzido por luz visível sobre a pele e o reparo tecidual cutâneo de camundongos / Marco Aurélio dos Santos Silva. – 2016.  
76 f.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dra. Andréa Monte Alto Costa  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental .

1. Pele – Teses. 2. Calor – Efeitos fisiológicos – Teses. 3. Cicatrização de ferimentos - Teses. 4. Pele- envelhecimento – Teses. 5. Ferimentos e lesões. 6. Camundongos. I. Costa, Andréa Monte Alto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

CDU 616.5-001.011

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Marco Aurélio dos Santos Silva

**Efeitos do calor induzido por luz visível sobre a pele e o reparo tecidual  
cutâneo de camundongos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Monte Alto Costa (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fellows

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Universidade Federal de Ouro Preto

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

A minha família, meus amigos e meus mestres.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, sou Dou graças a Deus, a quem sirvo com a consciência limpa, como o serviram os meus antepassados, lembrando-me constantemente Dele, noite e dia, durante minha caminhada até aqui.

Aos meus pais que se abdicaram de tudo e dispuseram esforços de onde pareci não haver mais em prol de nos oferecer educação e a oportunidade de estudar.

A minha esposa Celine Fortes dos Santos Silva pelo companheirismo, respeito, carinho e por entender meus momentos de ausência.

A minha filha Manuella Fortes dos Santos Silva por me fazer entender realmente o significado da palavra amor.

A meu enteado, filho que a vida me deu, Gustavo Fortes por me ajudar em todas as horas sem medir esforços.

A minha sogra Sra. Nelice, a meu sogro Sr. Fortes e ao meu Pastor Edson pelo companheirismo e ensinamento.

A minha orientadora Andréa Monte Alto Costa pela oportunidade, orientação, paciência e enriquecimento profissional. Muito obrigado professora!

À professora Bruna Romana pelo incentivo, sugestões e aprendizado.

A amiga Fernanda Schanuel por me apoiar, ajudar nos experimentos e análises, pelos conselhos e pela amizade construída.

As amigas do Laboratório de Reparo Tecidual (LRT) Bianca, Isabella, Aline, Jeanine, Raquel, Raissa e Luana por me ajudarem a chegar até aqui.

Aos meus “irmãos” Eduardo Trajano, Larissa Trajano, Jackson Nogueira e Akinori Nagato pela amizade.

A todos que de maneira direta e indireta colaboraram e acreditaram nessa etapa da minha vida. Sou muito grato.

Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem é tão pequeno que não possa ensinar.

*Carlos Bernardo González Pecotche*

## RESUMO

SANTOS-SILVA, Marco Aurélio. *Efeitos do calor induzido por luz visível sobre a pele e o reparo tecidual cutâneo de camundongos*. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O papel do calor sobre a pele e reparo tecidual permanece pouco esclarecido. Nosso objetivo foi investigar os efeitos desse calor sobre a pele e cicatrização cutânea. Camundongos machos foram submetidos a uma lesão excisional cutânea, divididos em dois grupos (n=10/grupo) e expostos a 23°C ou 43°C numa câmara térmica por 30 minutos, durante 13 dias. No 14º dia após a lesão, os animais foram eutanasiados, as lesões e as amostras de pele normal foram coletadas e processadas para análises. Na pele, o calor aumentou a espessura da epiderme, da derme, a expressão gênica e proteica do TGF- $\beta$ . Aumentou a área de fibras de colágeno, diminuiu a expressão gênica da Col1a1 e a expressão proteica do colágeno tipo I. Aumentou a expressão de proteínas carboniladas, expressão gênica da Col3a1 e proteica do colágeno tipo III. Aumentou a área das fibras elásticas, a expressão gênica da fibrilina-1 e da elastina. Na lesão cutânea aumentou a área da lesão no 11º e 14º dias após a lesão e diminuiu a porcentagem de lesões reepitelizadas no 14º dia após a lesão. Aumentou o comprimento gap epidérmico, a densidade de volume de miofibroblastos e o número de macrófagos. Aumentou a expressão proteica do colágeno tipo III e MMP-1, diminuiu a do colagénio tipo I e a atividade de MMP-2, aumentou a expressão proteica da fibrilina-1, MMP-12, TGF $\beta$ -1/2/3 e da ERK. Conclui-se que o calor pode apresentar efeitos anti-envelhecimento para a pele, entretanto, atrasa a cicatrização de lesões cutâneas de camundongos.

Palavras-chave: Calor. Pele. Reparo tecidual. Camundongos *Swiss*.



## ABSTRACT

SANTOS-SILVA, Marco Aurélio. *Effects of heat induced by visible light in skin and tissue repair in mice*. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The role of heat induced by visible light on the skin and tissue repair remains unclear. Our goal was to investigate the heat effects on skin and cutaneous healing. Male mice were submitted to an excisional cutaneous lesion, divided into two groups (n=10/group) and exposed at 23°C or 43°C in a thermal chamber for 30 minutes for 13 days. On the 14th day after the injury, the animals were euthanized, lesions and samples of normal skin were collected and processed for analysis. In the skin, the heat induced by visible light increased the thickness of the epidermis, the dermis, the gene and protein expression of TGF- $\beta$ . It increased the area of collagen fibers, decreased the gene expression of Col1a1 and the protein expression of type I collagen. Increased protein carbonylation, gene expression of Col3a1 and protein of collagen type III. It increased the area of elastic fibers, the gene expression of fibrillin-1 and elastin. In the cutaneous lesion, the area of the lesion increased on the 11th and 14th days after the lesion and the percentage of reepithelialized lesions decreased on the 14th day after the lesion. The epidermal gap length, the volume density of myofibroblasts and the number of macrophages were estimated. It increased the protein expression of type III collagen and MMP-1, decreased collagen type I and MMP-2 activity, increased the protein expression of fibrillin-1, MMP-12, TGF $\beta$ -1/2/3 and ERK. In conclusion, heat may have anti-aging effects on the skin, however, it delays the healing of skin lesions in mice.

Keywords: Heat. Skin. Tissue repair. Swiss mice.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fases da cicatrização .....	20
Figura 2 -	Penetração da luz solar na pele .....	21
Figura 3 -	Câmara para exposição térmica .....	26
Figura 4 -	Desenho experimental e protocolo de lesão e exposição ao calor .....	27
Tabela 1 -	Anticorpos primários .....	31
Tabela 2 -	Sequências dos iniciadores para os genes amplificados pelo qPCR ...	34
Figura 5 -	Temperatura e espectrometria da câmara e temperatura superficial da pele dos camundongos expostos ao calor .....	36
Figura 6 -	Análise microscópica da pele de camundongos expostos ao calor .....	37
Figura 7 -	Efeito do calor na resposta inflamatória da pele de camundongos .....	38
Figura 8 -	Efeito de calor na deposição de fibras de colágeno na pele de camundongos .....	40
Figura 9 -	Efeitos de calor sobre a deposição de fibras do sistema elástico da pele de camundongos .....	41
Figura 10 -	Análise da cicatrização cutânea de camundongos expostos ao calor ...	43
Figura 11 -	A análise microscópica da cicatrização da lesão cutânea de camundongos expostos ao calor .....	45
Figura 12 -	Expressão de proteínas da matriz extracelular durante a cicatrização de lesões cutâneas de camundongos expostos ao calor .....	47
Figura 13 -	Ativação de ERK durante a cicatrização de lesões em camundongos expostos ao calor .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
Arg1	Arginase 1
BCA	Ácido bicinconínico
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
DNPH	2,4-dinitrodinifilidrazina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
IV	Radiação infravermelha
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JDE	Junção dermo-epidérmica
MAPK	MAP Quinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NOS2	Óxido nítrico sintase induzível
ON	Óxido nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RS	Radiação solar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS	Tris tampão salino
TGF	Fator de crescimento transformante
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
UV	Radiação ultravioleta

VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VIS	Luz visível
Vv	Densidade de volume
$\alpha$ -SMA	alfa-actina de músculo liso.

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>PELE</b> .....	15
2	<b>REPARO TECIDUAL CUTÂNEO</b> .....	17
3	<b>LUZ SOLAR E CALOR</b> .....	21
3.1	<b>Efeitos do calor sobre a pele e sobre o reparo tecidual</b> .....	22
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
4.1	<b>Geral</b> .....	24
4.2	<b>Específicos</b> .....	24
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
5.1	<b>Animais</b> .....	25
5.2	<b>Termometria da câmara e espectrometria da lâmpada</b> .....	25
5.3	<b>Desenho experimental</b> .....	27
5.3.1	<u>Protocolo de lesão e exposição ao calor</u> .....	28
5.4	<b>Análise macroscópica</b> .....	28
5.5	<b>Coleta de tecido, histoquímica e microscopias</b> .....	28
5.6	<b>Imunohistoquímica e quantificações</b> .....	29
5.7	<i>Western Blotting</i> .....	30
5.8	<b>Expressão de proteínas carboniladas (derivatização pós-eletroforese)</b> .....	31
5.9	<b>Zimografia</b> .....	32
5.10	<b>Isolamento de RNA e PCR em tempo real (qPCR)</b> .....	33
5.11	<b>Análises Estatísticas</b> .....	34
6	<b>RESULTADOS</b> .....	35
6.1	<b>Temperatura e espectrometria da câmara e temperatura superficial da pele dos camundongos expostos ao calor</b> .....	35
6.2	<b>O calor induz alterações histológicas na pele dos camundongos</b> .....	37

6.3	<b>O calor aumenta a expressão de Arg1, VEGF e Tnf</b> .....	37
6.4	<b>Efeitos do calor sobre a deposição e degradação de fibras colágenas</b> .....	39
6.5	<b>Efeitos do calor na deposição do sistema de fibras do sistema elástico</b> .....	41
6.6	<b>Análise macroscópica e microscópica da cicatrização cutânea de camundongos expostos ao calor</b> .....	42
6.7	<b>Exposição ao calor retarda a formação do tecido de granulação</b> .....	44
6.8	<b>Efeito da exposição ao calor sobre os componentes da matriz extracelular na área de cicatrização da lesão</b> .....	46
6.9	<b>O calor induz a ativação de ERK</b> .....	48
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
	<b>APÊNDICE</b> – Heat delays skin wound healing in mice (artigo publicado) .....	62
	<b>ANEXO A</b> – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ) .....	71
	<b>ANEXO B</b> – Carta de submissão do artigo intitulado “ <i>Heat induced by visible light promotes anti-aging effects in mice skin</i> ” a revista Mechanism of Ageing and Development .....	72
	<b>ANEXO C</b> – Carta de submissão do artigo intitulado “ <i>Digital microscopy implementation in histology course and comparison with conventional microscopy</i> ” à revista Life Science Education .....	74
	<b>ANEXO D</b> – Mensão Honrosa FeSBE 2014 .....	75

## INTRODUÇÃO

A pele funciona como barreira protetora cuja perda da integridade, como resultado de uma lesão, pode levar à grave incapacidade ou até mesmo à morte (1). O envelhecimento da pele é um processo biológico complexo influenciado pela combinação de fatores intrínsecos (passagem do tempo, genética, metabolismo celular e hormonal) e extrínsecos (exposição à luz solar, poluição, fumaça de cigarro, produtos químicos, toxinas, estressores psicológicos) (2, 3). Enquanto a pele envelhecida é lisa, seca, pálida e com rugas finas, a pele fotoenvelhecida, torna-se espessa com rugas profundas e hiperpigmentada. Já a pele lesionada deve ser reparada imediatamente através do processo de reparo tecidual (1) que consiste em três fases distintas que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelamento (5). A idade, a fumaça de cigarro e o estresse psicológico representam alguns fatores que aceleram o envelhecimento da pele e, ao mesmo tempo atrasam o reparo tecidual.

A exposição à radiação solar (RS) é um importante fator de risco ambiental para os organismos vivos, entretanto, mesmo representando aproximadamente apenas 7% do espectro de luz solar, a maioria dos estudos investigaram os efeitos adversos da radiação ultra-violeta (UV) sobre a pele (5). Os 93% da radiação solar restante compreendem a radiação infravermelha (IV) e a luz visível (VIS) que diferentemente da radiação UV são capazes de gerar calor. Por exemplo, a pele é exposta a uma dose de 75 J/cm<sup>2</sup>/hora de radiação infra-vermelha (IV) no verão em Munique, Alemanha (6).

A radiação infravermelha A (IVA) penetra no tecido subcutâneo sem elevar a temperatura da pele. Entretanto as radiações infravermelhas B e C (IVB e IVC) são absorvidas nas camadas epidérmicas e elevam a temperatura da pele até 45°C, sendo que a temperatura normalmente varia entre 27,6 e 33,1°C (7). Estudos recentes indicaram que a pele humana exposta à radiação IV apresenta aumento da atividade de metaloproteínases da matriz (MMPs) como a MMP-1, diminui o pró-colágeno tipo I, aumenta a neoangiogênese, o infiltrado inflamatório e o dano oxidativo no DNA da célula (6, 7). O calor aumenta a expressão de MMP-1, MMP-3, MMP-12 e modula a síntese de elastina e fibrilina na pele humana *in vivo* (8, 9). Além destes resultados do calor induzido pela radiação IV sobre a pele saudável, um estudo comparou o efeito do calor com e sem radiação IVA sobre a cicatrização de lesões cutâneas de ratos mostrou que o calor isolado atrasou o fechamento de feridas da pele (4). Entretanto, não está esclarecido se a pele saudável ou a lesão responderam aos efeitos do espectro de radiação ou propriamente dito ao calor. E, principalmente, pouco se sabe dos efeitos biológicos

da luz visível sobre a pele. Vandersee e cols mostraram que a luz visível (azul-violeta), é capaz de produzir radicais livres na pele humana (10) . No nosso estudo veremos o que o calor é capaz de provocar na matriz extracelular (MEC) da pele normal e no tecido cicatricial.

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do calor sobre a pele saudável e a cicatrização de lesões cutâneas excisionais em camundongos.



## 1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% do peso total do corpo de um adulto. Apresenta múltiplas funções, dentre as quais destaca-se a de proteção física, química, biológica do meio interno, além de prevenção contra perda de água, atrito e termorregulação (11, 12). Ainda assim, geralmente esta importância da pele é subestimada e até negligenciada tanto na saúde quanto nas doenças. Entretanto, com o aumento da expectativa de vida, o cuidado adequado da pele aparece como uma prioridade dermatológica (13).

A pele é composta pela epiderme e derme (14), e a espessura dessas camadas varia consideravelmente, dependendo da topografia anatômica do corpo. A pálpebra, por exemplo, tem a camada epidérmica mais fina, medindo menos de 0,1 mm, enquanto que as palmas das mãos e as plantas dos pés têm a camada epidérmica mais espessa, medindo cerca de 1,5 mm. A derme é mais espessa das camadas da pele onde é cerca de 30-40 vezes mais espessa que a epiderme sobreposta (15).

A derme é um sistema integrado de tecido conjuntivo que acomoda os vasos, anexos derivados da epiderme, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Outras células sanguíneas, incluindo linfócitos, células plasmáticas e outros leucócitos, entram na derme em resposta a vários estímulos (11, 12). A derme compreende a maior parte da pele fornecendo sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Ela protege o corpo de lesões mecânicas, auxilia na regulação térmica e contém receptores de estímulos sensoriais. A derme interage com a epiderme na manutenção das propriedades de ambos os tecidos. As duas regiões colaboram para o desenvolvimento na morfogênese e interagem durante o reparo e remodelação da pele (11, 12). Os componentes da MEC da derme, incluindo fibras colágenas e do sistema elástico variam de forma e profundidade dependendo também da região do corpo, da idade e a fase do reparo tecidual (1).

A pele envelhece por um processo complexo e multifatorial de base genética, mas que pode ser acelerado por fatores ambientais, mecânicos e socioeconômicos (16). Com o envelhecimento, a fragilidade da pele aumenta, os efeitos esteticamente indesejáveis, como rugas e pigmentação irregular aparecem, o risco de lesões aumenta, a capacidade da pele cicatrizar diminui, a probabilidade de doenças cutâneas associadas à lesão aumenta (17). O que gera duas frentes distintas de estudos onde alguns pesquisadores preocupados com o envelhecimento da pele buscam compreendê-lo para aplicar estratégias antienvhecimento,

enquanto outros pesquisadores estudam os fatores que prejudicam a cicatrização para prevenção e tratamento de lesões cutâneas.

O envelhecimento da pele é um processo biológico influenciado pela combinação de fatores intrínsecos (passagem do tempo, genética, metabolismo celular, hormonal e processos metabólicos) e fatores extrínsecos (exposição à luz solar, ultravioleta e exposição à radiação infravermelha, poluição, fumaça de cigarro, produtos químicos, toxinas, estressores psicológicos) (2, 3). Entretanto, dependendo da dose e do tempo de exposição da pele a estes fatores extrínsecos, como por exemplo, ao calor e à luz solar, podem contribuir para a homeostase da pele.

Por outro lado quando há perda da integridade da pele, ela deve ser imediatamente reparada através do processo de reparo tecidual (1). Esse processo consiste em três fases distintas que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelamento (Figura 1), que levam a pelo menos a reconstrução parcial do tecido lesado e ao restabelecimento da barreira funcional da pele (5). Contudo, a exposição da pele a fatores extrínsecos pode prolongar estas fases proporcionando atraso da cicatrização das lesões.

## 2 REPARO TECIDUAL CUTÂNEO

A fase representa o início do reparo tecidual e a restauração da sua função de barreira. A resposta inflamatória pode ser subdividida em resposta celular e vascular. No início do processo inflamatório, ocorre vasodilatação local, com extravasamento de sangue e líquido para o espaço extravascular. Em seguida ocorre a hemostasia com formação de coágulo de fibrina e coagulação (18). O coágulo serve como proteção do tecido lesionado (1). As funções das plaquetas na hemostasia são de aderir, agregar e liberar mediadores que facilitam a coagulação (18). Este coágulo de fibrina serve um arcabouço provisório para a migração celular de neutrófilos, monócitos, fibroblastos, entre outras células, até a área da lesão (19).

O influxo de leucócitos para área da lesão caracteriza a resposta celular e este influxo ocorre em resposta a diversos sinais quimiotáticos e fatores de crescimento liberados pela degranulação das plaquetas (5). Alguns minutos após o trauma, os neutrófilos são recrutados para o local da lesão (1), onde desempenham um papel bactericida fagocitando as bactérias, e degradam os componentes da MEC danificados. Essas células são as mais atuantes nos estágios iniciais da inflamação (18). A menos que a lesão esteja infectada, o infiltrado de neutrófilos desaparece após poucos dias; o prolongamento da presença de neutrófilos no local da lesão pode estar relacionado com o atraso do reparo tecidual (1, 18).

Monócitos são atraídos ao local da lesão e se transformam em macrófagos ativados (20). Os macrófagos desempenham um papel crucial nos eventos tardios do reparo tecidual (5). Estas células removem os debris teciduais, destroem os neutrófilos remanescentes e liberam os fatores de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e de crescimento vascular endotelial (VEGF) que estimulam migração e proliferação celular, angiogênese e produção da MEC (18). O aumento da expressão de enzimas intracelulares nos macrófagos influencia na sua polaridade e função. Macrófagos classicamente ativados (M1) apresentam aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e desempenham funções pró-inflamatórias, enquanto macrófagos alternativamente ativados (M2) expressam a arginase-1 (Arg1) e desempenham funções anti-inflamatórias e de reparo tecidual (21, 22). Como os macrófagos sintetizam e liberam fatores de crescimento no local da lesão, como o TGF- $\beta$  e VEGF (18), são considerados células atuantes na resolução da inflamação, desempenhando um papel importante na transição entre a fase inflamatória e a proliferativa (18, 20). A diminuição do número de macrófagos durante a fase inflamatória pode atrasar o reparo de lesões (1).

A fase proliferativa é caracterizada pela proliferação celular e migração de diferentes tipos celulares (5). Nesta fase ocorre a formação do tecido de granulação e eventos como a reepitelização, angiogênese, deposição de MEC e diferenciação miofibroblástica (19, 23).

A reepitelização é o processo de restauração da epiderme que se inicia algumas horas após a lesão (20). Geralmente envolve a migração de queratinócitos, a proliferação de queratinócitos formando a língua migratória, a diferenciação de novo epitélio em epiderme estratificada e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme com a derme subjacente (18). A migração dos queratinócitos ocorre a partir das bordas da lesão (18). Células tronco epidérmicas dos anexos da pele, tais como folículos pilosos da pele adjacente, servem de reservatório de queratinócitos para a cicatrização (18). Queratinócitos alteram seu fenótipo, desfazendo a maioria de seus desmossomos, ficando alongados e desenvolvendo filamentos de actina citoplasmáticos, que permitem sua movimentação (1, 18, 20). A reepitelização também envolve o aumento da proliferação de queratinócitos localizados perto da língua migratória, assegurando um fornecimento adequado de células para migrar e cobrir a lesão. Quando a migração cessa, há a ligação ao substrato subjacente, reconstituindo a membrana basal, retomando o processo de estratificação do epitélio, restaurando a função de barreira (18). A reepitelização é induzida por liberação local de fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante-alfa (TGF- $\alpha$ ) produzido pelas plaquetas e macrófagos; e o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), sintetizado pelos fibroblastos (19). Os macrófagos estimulados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo TGF- $\beta$ , secretam EGF juntamente com as plaquetas, induzindo a migração e proliferação de fibroblastos no tecido adjacente à lesão (24, 25).

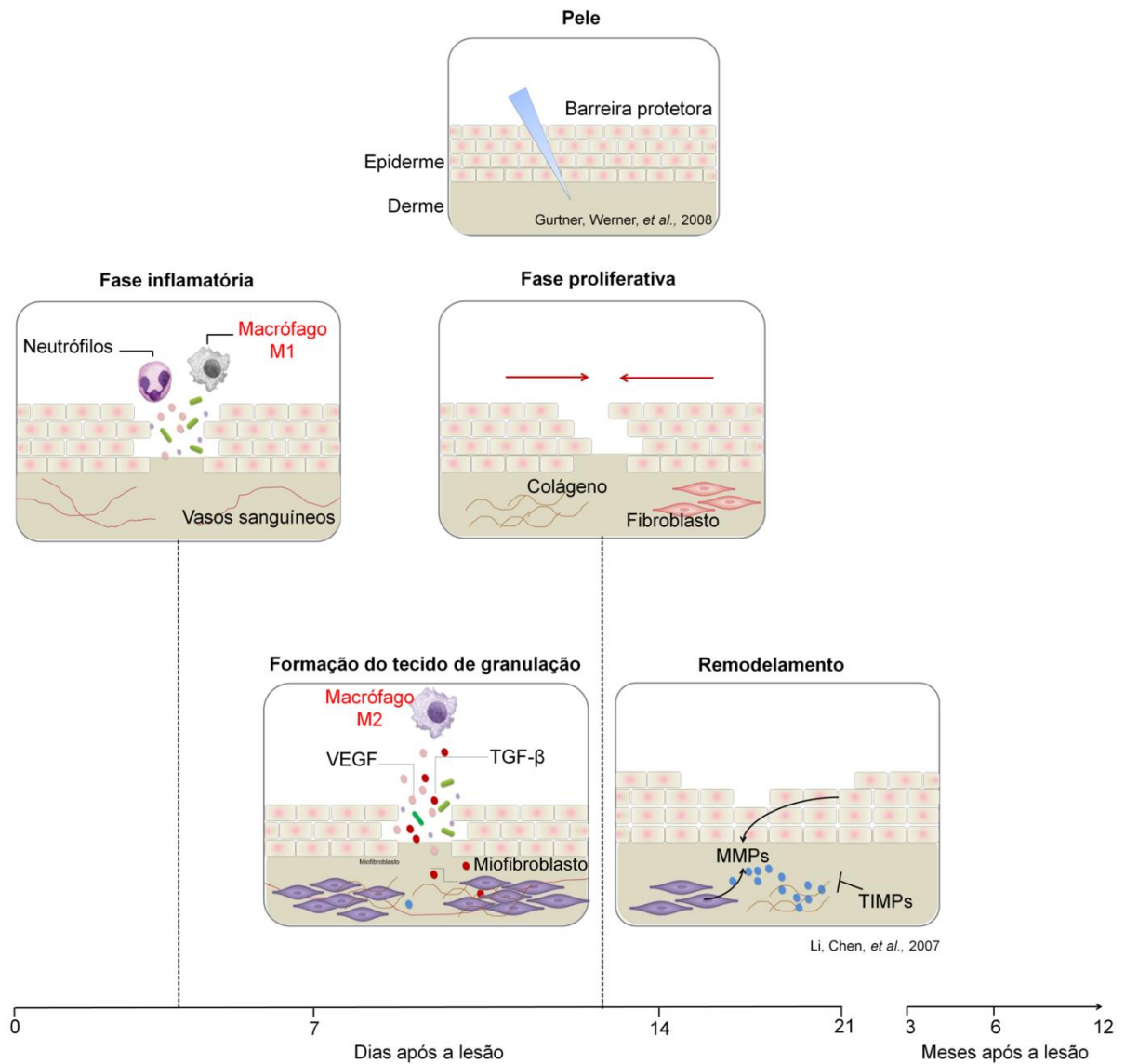
A formação do tecido de granulação é constituída pela angiogênese e fibroplasia (18). Os fibroblastos que migraram do tecido adjacente se tornam ativados pela ação do PDGF e EGF, e começam a produzir a matriz provisória, que é constituída, principalmente, por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina (19). Pela ação do TGF- $\beta$  os fibroblastos são ativados e adquirem a expressão de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), e se tornam miofibroblastos. Estas células depositam e sintetizam componentes da MEC que vão substituir a matriz provisória. Estas células possuem propriedades contráteis, desempenhando um papel importante na contração e maturação do tecido de granulação (20, 23).

A neovascularização é necessária para sustentar a formação do novo tecido de granulação (20). Células endoteliais se proliferam pela ação do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e VEGF, formando novos vasos a partir de vasos pré-existentes (1). A liberação do FGF no local da lesão é feita por células endoteliais danificadas e macrófagos. Muitos tipos

de células como queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais são responsáveis pela síntese de VEGF (5, 18). Assim, a regulação do processo de angiogênese pode representar um meio para melhorar a cicatrização (23).

O terceiro estágio do processo cicatricial, a fase de remodelamento, é caracterizada pela deposição e degradação de MEC e redução na celularidade. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose, reduzindo a celularidade do tecido de granulação (5, 26). Nesta fase a síntese de proteínas da MEC é reduzida e atividade de proteases aumenta para remodelar. Progressivamente, o colágeno do tipo III, o maior componente do tecido de granulação é substituído pelo colágeno do tipo I, principal componente da derme (23). Este processo é controlado pelas MMPs, que são secretadas pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (5, 20). A atividade das MMPs é controlada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Para um reparo tecidual normal, é importante o balanço entre as atividades das MMPs e TIMPs (18). Por último, a elastina, que contribui para a elasticidade da pele, reaparece; entretanto, o tecido cicatricial não apresenta as mesmas propriedades de um tecido não lesionado (5, 23).

Figura 1 - Fases da cicatrização.



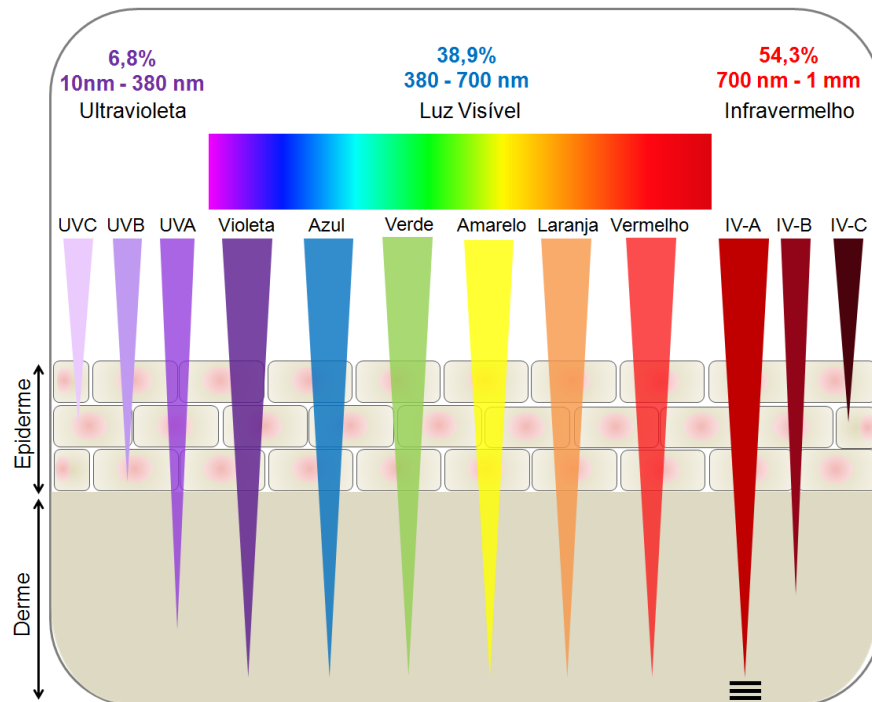
Legenda: Fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento da cicatrização da pele. VEGF = fator de crescimento endotelial vascular, TGF- $\beta$  = fator de crescimento transformante beta, MMPs = metaloproteinases da matriz e TIMPs = inibidores teciduais das metaloproteinases. Adaptado de Gurtner, 2008 (5).

Fonte: O Autor, 2016.

### 3 LUZ SOLAR E CALOR

A radiação solar (RS) é essencial para a vida na Terra, contudo, é um importante fator de risco ambiental para os organismos vivos. O comprometimento da camada de ozônio expõe Sul da Austrália, Nova Zelândia e América do Sul a altas intensidades de RS (27). O espectro de luz solar sobre a superfície da Terra é 290-3000 nm sendo 6,8% deste espectro formado por radiação ultravioleta (UV) (28) (UVB: 290-320nm e UVA: 320-400 nm), 38,9% de luz visível (VIS: 380-760 nm) e 54,3% de radiação infravermelha (IV-A: 760-1440 nm, o IV-B: 1440-3000 nm e IV-C: 3000 nm a 1 mm) (29). Os efeitos induzidos pela radiação UV sobre a pele incluem elastose solar, queratose, câncer de pele e fotoenvelhecimento (30).

Figura 2 - Penetração da luz solar na pele.



Legenda: nm = nanômetro, UV = comprimento de onda do ultravioleta, IV= comprimento de onda do infravermelho

Fonte: O Autor, 2016.

Embora a maioria dos estudos sobre os efeitos adversos da radiação solar sobre a pele envolva a radiação UV (28, 31, 32), a pele pode ser exposta a uma dose de 75 J/cm<sup>2</sup>/hora de radiação IV no verão em Munique, Alemanha (33). Enquanto a radiação IV-A penetra o tecido subcutâneo sem elevar a temperatura da pele, as radiações IV-B e IV-C são absorvidas nas camadas epidérmicas e são capazes de aumentar a temperatura, que normalmente, varia entre 27,6° e 33,1°C, até a 45°C (6, 34, 35). Estudos têm demonstrado que doses elevadas de IV podem danificar a pele humana, enquanto que doses mais baixas são amplamente utilizadas para o tratamento de processos inflamatórios (36-39).

### 3.1 Efeitos do calor sobre a pele e sobre o reparo tecidual

O espectro visível é a parte da radiação electromagnética visível ao olho humano, o qual responde aos comprimentos de onda de 380 a 700 nm. Alguns indivíduos podem perceber comprimentos de onda até 780 nm. O termo usado frequentemente, luz UV, é tecnicamente incorreto. O termo "luz" é melhor usado para comprimentos de onda de radiação que resulta em uma sensação de visão. Assim, o termo preferido é a radiação UV (40). Ainda que representem cerca de 39% do espectro de luz solar, a luz visível e seus efeitos sobre a pele foram pouco estudados. A luz visível, semelhantemente à radiação IV, penetra a derme, é então absorvida e eleva a temperatura da pele (28).

Estudos recentes indicam que a exposição de pele humana à radiação IV estimula a expressão de MMPs, diminui a expressão de pro-colágeno do tipo I, aumenta neoangiogênese e induz a infiltração de células inflamatórias e ao estresse oxidativo (6, 7). O calor aumenta a expressão de MMP-1, MMP-3, MMP-12 e modula a síntese de elastina e fibrilina-1 (8, 9). Em contraste com a radiação UV e IV, que são conhecidas por induzir fotoenvelhecimento cutâneo, formar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), poucos estudos demonstraram os efeitos da luz visível sobre a pele. Dentre estes estudos, Vandersee e cols. mostraram que a luz visível pode também produzir radicais livres e ERO na pele humana. Eles demonstraram *in vivo* que a combinação de radiação IV e luz visível ativa MMPs, causando a degradação da MEC e danos para a pele saudável (10).

A luz visível é capaz de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de MMPs na pele induzindo degradação da MEC e o envelhecimento precoce da pele de maneira semelhante ao que é observado com a radiação UV (28). Um estudo realizado por



Mahmoud e cols. em 2008 demonstraram que a luz visível pode induzir pigmentação escura (40) enfatizando assim, a necessidade de filtros solares para o espectro de luz visível (41).

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram desenvolvidas no campo do rejuvenescimento não-ablativo da pele. Alguns estudos utilizaram um sistema de luz visível pulsada (20-30 J/cm<sup>2</sup>) cujo calor induz uma desnaturação de colágeno dérmico e a subsequente síntese reativa (42-46). Lubart e cols sugeriram em 2007 um mecanismo diferente para o fotorejuvenescimento com base na indução de ERO por luz visível *in vitro*. Eles observaram que a exposição do colágeno à luz visível (20-30 J/cm<sup>2</sup>) produz grandes quantidades de ERO, que destroem as fibras colágenas. E por outro lado, nas regiões mais profundas da pele, onde a intensidade da luz é mais fraca, baixas quantidades de ERO são formadas, e estimulam a proliferação de fibroblastos, assim melhorando a textura da pele (47). Além disso a luz visível aumenta a microcirculação da pele por induzir a síntese local de óxido nítrico (48).

Um estudo comparou o efeito do calor isolado e calor associado à IV-A sobre a cicatrização de lesões cutâneas em ratos. Os autores observaram que os ratos expostos ao calor isolado atrasaram o fechamento das lesões (49). Entretanto, outro estudo demonstrou que um ligeiro aumento na temperatura ambiente pode melhorar a cicatrização de lesões em pacientes diabéticos (associada com estimulação elétrica) (50). Também foi demonstrado em um estudo *in vitro* que o aumento na temperatura da pele pode acelerar o processo de cicatrização de lesões, através da aceleração da migração de fibroblastos (51). Entretanto, novos estudos são necessários para o melhor entendimento dos efeitos do calor sobre a pele saudável e o reparo tecidual.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Investigar os efeitos do calor na pele saudável e sobre a cicatrização de lesões excisionais cutâneas em camundongos.

### 4.2 Específicos

Avaliar os efeitos do calor na:

- a. espessura da derme e da epiderme da pele;
- b. densidade de volume de macrófagos e neutrófilos na pele;
- c. polarização dos macrófagos da pele;
- d. degradação e deposição de colágeno na pele;
- e. deposição de fibras do sistema elástico na pele;
- f. contração e a re-epitelização das lesões;
- g. número de neutrófilos, macrófagos e a densidade de volume miofibroblastos no tecido de granulação;
- h. degradação e deposição de colágeno nas lesões.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

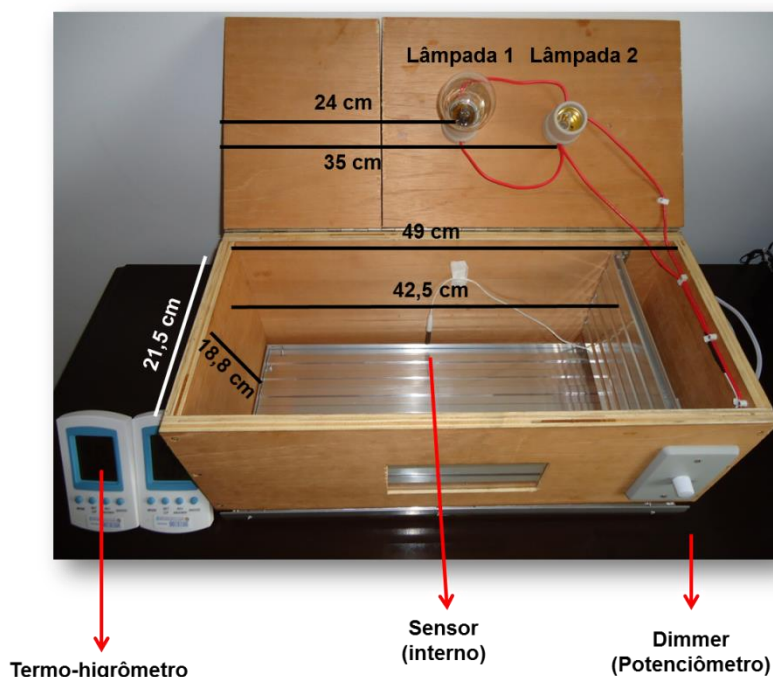
### 5.1. Animais

Camundongos suíços machos com idade entre 8-10 semanas (25-35 g) foram mantidos em uma sala a 23°C e com ciclo invertido de claro e escuro (12 h de luz / 12 h de escuridão) com livre acesso à comida e água no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) da UERJ. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Legislação Brasileira em Relação à Experimentação Animal (n. 11.794, de 8 de Outubro de 2008). Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ) (Anexo I - CEUA / 022 / 2014).

### 5.2. Termometria da câmara e espectrometria da lâmpada

Para expor os camundongos ao calor, foi confeccionada uma câmara de madeira compensada (15 mm de espessura) com as seguintes dimensões externas (52 cm de comprimento, 24 cm de largura e 21 cm de altura) e internas (42,5 cm de comprimento, 21,5 cm de largura e 18,8 cm de altura) (52). A elevação da temperatura interna da câmara foi induzida através de duas lâmpadas incandescentes 100 W (Philips Padrão, 100 W, 127 V, temperatura de cor de 2.700 K, Barueri, Brasil) e a temperatura foi controlada por um *dimmer* (Pratis – Pial Le-grand, São Paulo, Brasil). Para medir a temperatura e a umidade dentro e fora da caixa, foi utilizado um termo-higrômetro digital (INCOTERM, Porto Alegre, Brasil).

Figura 3 – Câmara para exposição térmica



Legenda: Dimensões da câmara em cm = centímetros  
 Fonte: O Autor, 2016.

A intensidade da luz visível e radiação infravermelha foi medida com um espectrômetro (Ocean Optics Maré Vermelha 650, média de 50 varreduras, Dunedin, USA). O fluxo luminoso das lâmpadas dentro da câmara foi de 1350 Lm e o lux médio  $35,5 \pm 0,4$  lux. A luximetria foi avaliada a cada 5 minutos por 30 minutos (medidor de luz digital - MLM-1332 Minipa, São Paulo, Brasil).

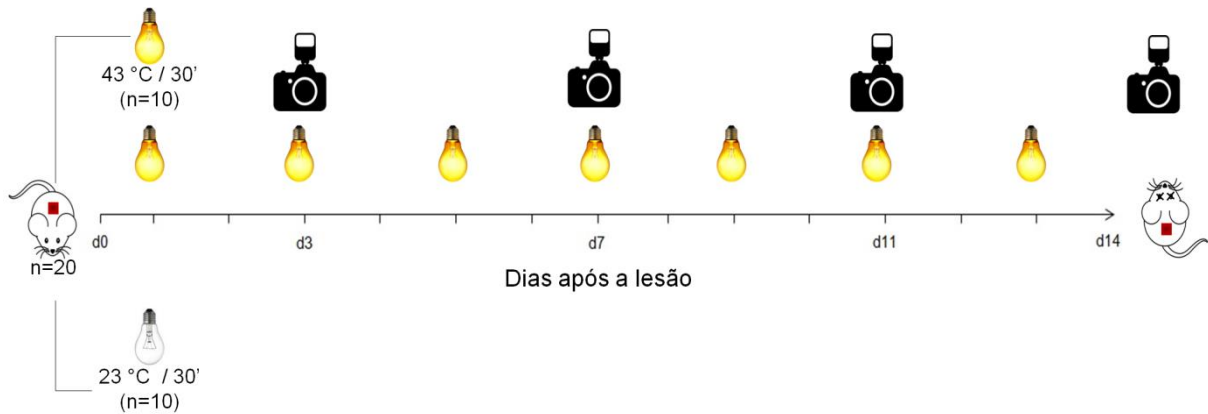
Com base no estudo de Shin e cols., foi estabelecido o tempo de 30 minutos de exposição à temperatura de  $43^{\circ}\text{C}$  (53). Foi realizado um estudo piloto (dados não mostrados), onde os camundongos foram expostos à  $43^{\circ}\text{C}$  diariamente durante os três primeiros dias após a lesão apenas. Nós observamos tanto no estudo piloto como no presente estudo que a exposição ao calor retardou fechamento de lesões da pele. Assim, optamos por realizar a exposição em dias alternados.

Para a exposição ao calor, as duas lâmpadas foram acesas na potência máxima até a temperatura interna de  $43^{\circ}\text{C}$  ser atingida, e, em seguida, através do *dimmer* a potência foi elevada ou reduzida até estabilizar a temperatura. Somente após a estabilidade da temperatura a  $43^{\circ}\text{C}$ , os animais foram colocados na câmara para serem expostos ao calor por 30 minutos.

### 5.3. Desenho Experimental

O primeiro estudo buscou investigar efeitos do calor e da luz sobre a pele saudável (pele adjacente às lesões excisionais cutâneas). Já o segundo estudo investigou os efeitos desse calor sobre a cicatrização de lesões excisionais cutâneas. Os animais foram submetidos à lesão excisional cutânea, 24 horas após a lesão iniciaram as exposições ao calor e 14 dias depois da lesão foi realizada a eutanásia para retirada de duas amostras: a) lesão e b) pele saudável adjacente à lesão.

Figura 4 – Desenho experimental e protocolo de lesão e exposição ao calor



Legenda: d = dia; n = número; 30' = 30 minutos. No d0 foi realizada a lesão excisional cutânea, 24 horas depois começou a exposição ao calor e no d14 foi realizado a eutanásia para retirar as amostras de pele saudável e de lesão.

Fonte: O autor, 2016.

### 5.3.1. Protocolo de lesão e exposição ao calor

Os camundongos (n=20) foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (150 mg/kg b.p.) e xilazina (15 mg/kg b.p.). O dorso foi tricotomizado e submetido a uma lesão excisional cutânea total de 1 cm<sup>2</sup> expondo o panículo carnosos (54). A lesão não foi suturada ou coberta e cicatrizou por segunda intenção (não teve suas margens aproximadas). Após a lesão, os animais foram divididos em: o grupo de 23°C (n=10) – camundongos que foram colocados na câmara de exposição, com as lâmpadas desligadas durante 30 minutos; e o grupo de 43°C (n=10) - expostos a 43°C dentro da câmara durante 30 minutos. A exposição ao calor começou no primeiro dia após a lesão e ocorreu durante 13 dias alternados (53).

A temperatura da superfície da pele foi medida usando um termômetro infravermelho de não-contato (OEM, Beijing, China) 5 minutos antes dos animais serem expostos, durante os 30 minutos de exposição (medidas com intervalo de 5 minutos) e 5 minutos depois da exposição (55).

### 5.4. Análise macroscópica

Para avaliar a macroscopia da contração e da re-epitelização da lesão, imediatamente após a lesão, no 3°, 7°, 11° e 14° dias depois da lesão, uma folha de plástico transparente foi colocado sobre a área da lesão e as margens da lesão foram desenhadas (56). A área da lesão foi digitalizada medida usando o software Image J<sup>®</sup> (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Os resultados da contração da lesão foram expressos em percentagem de área ferida original (média ± erro padrão médio). A porcentagem de re-epitelização foi identificada pelo número de camundongos com lesões fechadas por grupo no 14° dia após a lesão.

### 5.5. Coleta de tecido, histoquímica e microscopia

No 14° dia após a lesão, os camundongos foram eutanasiados por exposição ao CO<sub>2</sub>. Cinco lesões com pele adjacente (Estudo lesão) e cinco fragmentos de pele normal (Estudo

pele) do dorso (distante da lesão) por grupo foram recolhidas, fixadas em formalina tamponada (pH 7,2), processadas e embebidas em parafina para análises histológicas. E em outros cinco animais de cada grupo, as lesão e um fragmento de pele normal foram congelados a -80°C para posteriores análises bioquímicas e biomoleculares.

As lâminas com os cortes foram submetidas às colorações de hematoxilina e eosina (H&E) para as análises: a) da espessura em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) da epiderme e da derme (pele normal), b) da área da lesão, c) do comprimento do gap da lesão (distância em  $\mu\text{m}$  entre os bordos da lesão); de vermelho de Picro Sírius para histoarquitetura e área de fibras colágenas e de Weigert com prévia oxidação para a análise da área ocupada pelas fibras do sistema elástico. O comprimento do gap e as espessuras da epiderme e da derme foram medidas utilizando software de visualização panorâmica (Panoramic Viewer, 3D Histech Ltd., Budapeste, Hungria). Já as áreas de fibras colágenas e do sistema elástico foram analisadas pelo software Image J<sup>®</sup>. Todas as lâminas foram digitalizadas usando um scanner de slides Pannoramic Digital (3DHistech Ltd., Budapeste, Hungria).

## 5.6. Imunohistoquímica e quantificações

Para as análise imunohistoquímicas uma ferramenta de estereologia (ponto de contagem) foi empregada como descrito anteriormente pelo nosso grupo (56). A imunohistoquímica foi utilizada para investigar o número de neutrófilos contando o número células positivas para mieloperoxidase (neutrófilos MPO<sup>+</sup>) e o número de macrófagos pelo número de células positivas para F4/80 (macrófagos F4/80<sup>+</sup>). Foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de rato para mieloperoxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1: 500) e anticorpo monoclonal de rato para F4/80 (Serotec Inc., Raleigh, NC; 1: 500), como previamente descrito (57, 58). Para quantificar o número de células imunomarcadas, cinco campos aleatórios por animal (14978  $\mu\text{m}^2$ ) foram analisados como descrito anteriormente. Os resultados foram apresentados como células por  $\text{mm}^2$ .

Além da análise do número de neutrófilos e macrófagos, investigamos o a densidade de volume ( $V_v$ ) de miofibroblastos em secções imunomarcadas com anticorpo monoclonal de camundongos contra  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha\text{SMA}$ ; Dako, Carpinteria, CA; 1: 100) e o sistema anti-camundongo EnVision (DAKO; 1:20), tal como descrito anteriormente (54). A densidade de volume dos miofibroblastos ( $V_v$  [miofibroblastos]%) foi avaliada utilizando contagem

de ponto e um sistema de vídeomicroscopia, como descrito (57, 59, 60). Os resultados foram apresentados como a porcentagem da  $Vv_{[miofibroblastos]}$  (56).

### 5.7. Western Blotting

Cinco fragmentos de pele saudável e cinco lesões por grupo foram descongeladas e maceradas em tampão de lise (Sigma - Aldrich, St Louis, MO). Em seguida foram centrifugadas e a concentração total de proteína foi determinada utilizando um ensaio de proteína do ácido bicinconínico (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN). Após a determinação da concentração das proteínas totais, 30 ou 50  $\mu\text{g}$  de proteínas das amostras misturadas com a solução de blotting foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato sódio (SDS-PAGE) à 8%, 10% ou 12%. Para identificação das proteínas pelo peso molecular (KDa) foram incluídos padrões de pesos moleculares de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) durante a eletroforese das amostras de pele e lesão. Em seguida as proteínas dos géis foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou nitrocelulose.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em pó (Nestlé, São Paulo, Brasil) dissolvido em tampão de fosfato contendo 0,05% de Tween-20 (T-PBS) por 45 minutos. Em seguida foram imunomarcadas por 12 horas (*overnight*) a 4°C com os seguintes anticorpos primários (Tabela 1).



Tabela 1 - Anticorpos primário utilizados

Anticorpo	Fornecedor e diluição
de coelho anti-precursor do colágeno de tipo I (Col-1)	(Millipore, Temecula, CA, 1:1000)
de camundongo anti-colágeno do tipo III (Col-3)	(Millipore, 1: 600),
de coelho anti-fator de crescimento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ 1/2/3)	(Santa Cruz Biotechnology/1:200)
de camundongo anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Santa Cruz Biotechnology/1:200)
de coelho anti-óxido nítrico sintase induzível (iNOS / NOS2)	(Santa Cruz Biotechnology/1:100)
de camundongo anti-arginase-1(Arg-1)	(Santa Cruz Biotechnology/1:100)
de camundongo anti-MMP-1	(Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
de camundongo anti-MMP-8	(Sigma-Aldrich/1:100),
de coelho anti-MMP-12	(Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
de cabra anti-fibrilina-1	(Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
de coelho anti-pERK	(Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
de camundongo anti-ERK	(Santa Cruz Biotechnology, 1:200)

Fonte: O autor, 2016

As membranas foram então lavadas e incubadas com os anticorpos secundários: anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:100) (DAKO) e anti-cabra (1:100) ou anti-coelho (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos ligados a membrana foram detectados utilizando um kit comercial de quimioluminescência (Santa Cruz Biotechnology). Para a detecção de quimioluminescência foi utilizado o sistema de ChemiDoc TM XRS (Bio-Rad Laboratories). Subsequentemente, as membranas foram incubadas com um anticorpo de camundongo anti- $\beta$ -actina (42 kDa, Sigma-Aldrich/1:1000). A  $\beta$ -actina foi usada como proteína controle para todos *immunoblottings*. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica utilizando o software ImageJ® e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### 5.8. Expressão de proteínas carboniladas (derivatização pós-eletroforese)

A determinação das proteínas carboniladas através do protocolo de derivatização pós-eletroforese foi determinada por Conrad, e cols em 2000 (61). Seguido a dosagem da concentração das proteínas totais 30  $\mu$ g de proteínas das amostras da pele saudável misturada com a solução de blotting foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE à 10%. Para identificação das proteínas pelo peso molecular (kDa) foi incluído o mesmo padrão de pesos moleculares de proteínas utilizados no *immunoblotting* anteriormente descrito. Em seguida as pro-

teínas dos géis foram transferidas para membranas de PVDF. Após a transferência as proteínas foram derivatizadas pelos seguintes passos: (a) imersão da membrana por 15 segundos em metanol seguido de secagem da membrana a temperatura ambiente; (b) equilíbrio da membrana onde a membrana foi colocada numa solução de metanol + TBS por 5 minutos; (c) submissão da membrana a um banho de 5 minutos em HCL 2N; (d) derivatização propriamente dita onde a membrana foi incubada com a solução de dinitrodinifilhidrazina (DNPH) por 5 minutos seguidas de 3 lavagens de 5 minutos com HCL 2N e de 5 lavagens de 5 minutos com metanol PA. Após a derivatização, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em pó (Nestlé) dissolvido em T-PBS por 45 minutos. Em seguida foram imunomarcadas por 1 hora com o anticorpo de camundongo anti-DNP (Sigma-Aldrich/1:1000). As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-Rabbit (conjugado com a enzima peroxidase de rábano (HRP)). Os anticorpos ligados a membrana foram detectados utilizando um kit comercial de quimioluminescência (Santa Cruz Biotechnology). Para a detecção de quimioluminescência foi utilizado o sistema de ChemiDoc TM XRS.

### 5.9. Zimografia

A atividade gelatinolítica da metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) foi analisada por zimografia em cinco amostras da lesão por grupo, tal como descrito anteriormente (62). Os fragmentos descongelados da lesão foram colocados em 1 ml de tampão de lise (Tris-HCl a 20 mM, pH 7,5, NaCl 138 mM, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 2 mM de EDTA, 10 mg/ml de leupeptina, e 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil), macerados e centrifugados a 3.864 g durante 30 min a 4°C. Os lisados foram recolhidos e armazenados a -80°C. Vinte microgramas de proteína de cada lisado foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 8% contendo 1 mg/ml gelatina (Sigma-Aldrich). O lisado proveniente de placenta humana foi utilizado como controle positivo para a atividade gelatinolítica (63). Foram incluídos padrões de pesos moleculares de proteínas (Bio-Rad, Laboratories) para o cálculo do peso molecular. Após separação das proteínas, o gel foi lavado em 2,5% de Triton X-100 e incubado em tampão de desenvolvimento pH 8,4 (50 mM Tris-HCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 2 mM ZnCl<sub>2</sub>) durante 12 horas a 37°C sem agitação. O gel foi então corado com a solução de Azul Brilhante de Coomassie a 0,25% (Coomassie Brilliant Blue R) durante

30 minutos e depois descorado (50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água destilada) para obter um contraste entre as bandas gelatinolíticas e o fundo do gel. As imagens foram capturadas e digitalizadas com o sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) para posterior detecção e densitometria utilizando o software Adobe Photoshop versão 7.01 (Adobe Systems, San Jose, CA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

#### 5.10. Isolamento de RNA e PCR em tempo real (qPCR)

Para extrair o RNA total, amostras de tecido foram maceradas em reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo as instruções do fabricante. Após a síntese de cDNA utilizando o kit de alta capacidade de transcrição reversa de cDNA (Invitrogen), os níveis de RNAm foram determinados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA) usando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de reação foram: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos (desnaturação) e 60°C durante 1 minuto e o protocolo de fusão da curva começou imediatamente após amplificação. A 60S proteína ribossomal L10 (RFL-10) foi usada como controle endógeno. Os iniciadores (*primers*) utilizados foram: cadeia  $\alpha$ 1 das fibras de colágeno do tipo I (Col1a1), cadeia  $\alpha$ 1 das fibras de colagénio do tipo III (Col3a1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (Tnfa), fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (Tgfb1), fibrilina-1 (Fbn1) e elastina (Eln) e a proteína ribossômica L10 60S (RPL10) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores para os genes amplificados pelo qPCR.

Gene alvo (Target Gene)	Sequência do iniciador de sentido direto (Forward primer sequence)	Sequência iniciadora reversa (Reverse primer sequence)
<i>Coll1a1</i>	F5'-GGC AAG CCT GGT GAA CA-3'	R5'-CTT GGC ACC ATC GTT GC-3'
<i>Col3a1</i>	F5'-ATT CTG CCA CCC CGA ACT CAA-3'	R5'-GCT TAC GTG GGA CAG TCA TGG-3'
<i>Tnfa</i>	F5'-GCT CTT CTG TCT ACT GAA CTT CG-3'	R5'-CCA TAG AAC TGA TGA GAG GGA-3'
<i>Tgfb1</i>	F5'-CAA CAT GTG GAA CTC TAC CAG AA-3'	R5'-CAC TCA GGC GTA TCA GTG G-3'
<i>Fbn1</i>	F5'-TTC ATG ACC AAC GGA GCA GAT A-3'	R5'-ACA GAT GCA GTG ATA GGA CCC-3'
<i>Eln</i>	F5'-GCA CAG GAG TCA AAG CCA A-3'	R5'-GGT ATA ATT GGG CAG TCC GTA G-3'
<i>RPL-10</i>	F5'-CTT TCA TAT CCG AGT GAG GCT-3'	R5'-CCA ATG TGA ACC CTG GC-3'

Fonte: O autor, 2016

### 5.11. Análise estatística

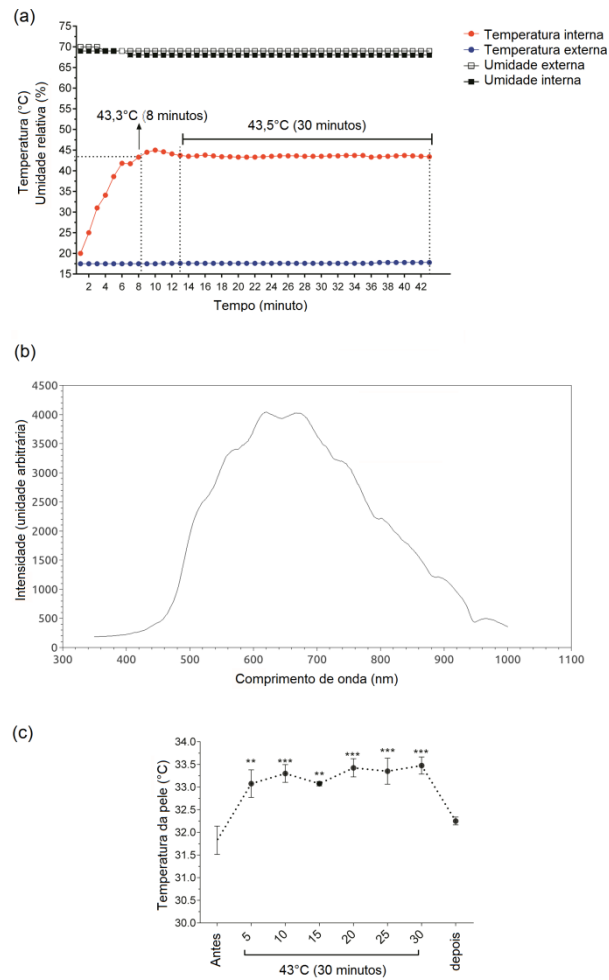
Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A normalidade de todos os dados foi testada por meio do teste de Kolmogorv-Smirnov. A análise dos dados foi realizada usando ANOVA de medidas repetidas (Geisser-Greenhouse), com pós-teste de Dunn para a contração da lesão e teste *t* não pareado ou teste de Mann Whitney para os outros parâmetros com valor de  $p < 0,05$  como nível de significância. O software GraphPad InStat foi usado para realizar a análise estatística (GraphPad InStat versão 6.00, GraphPad Software, San Diego, CA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Temperatura e espectrometria da câmara e temperatura superficial da pele dos camundongos expostos ao calor

Durante o período de exposição, a temperatura e a umidade da câmara foram constantes (Figura 5a). A luz visível e a radiação infravermelha utilizada para aquecer a câmara e expor os camundongos ao calor apresentou máximo de emissão espectral entre 614-628 e 661-677 nm (Figura 5b). A temperatura média do corpo dos camundongos antes da exposição foi de  $31,8 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$  e durante a exposição a  $43^{\circ}\text{C}$  atingiu um máximo de  $33,5 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$  em trinta minutos. Cinco minutos após exposição aos  $43^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, a temperatura corporal dos camundongos foi de  $32,3 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$  (Figura 5c).

Figura 5 - Temperatura e espectrometria da câmara e temperatura superficial da pele dos camundongos expostos ao calor



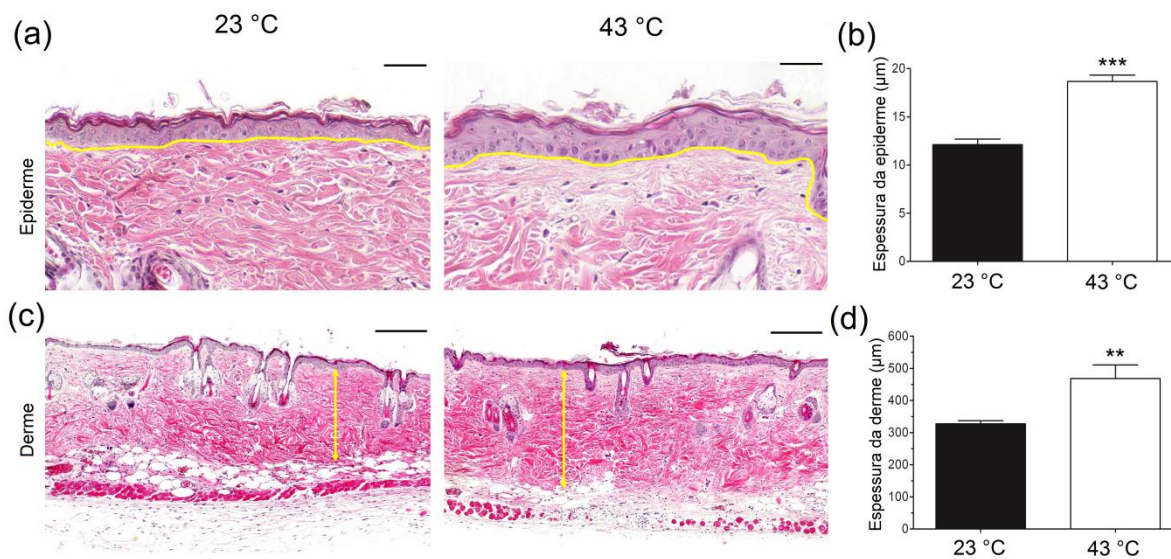
Legenda: a) temperatura e umidade da câmara durante a exposição. b) Comprimento de onda do espectro de luz emitido pelas lâmpadas na câmara e c) Temperatura da pele dos camundongos durante a exposição ao calor.

Fonte: O autor, 2016.

## 6.2. O calor induz alterações histológicas na pele dos camundongos

Investigamos se o calor e a luz afeta a espessura epidérmica e dérmica e observamos que a pele dos camundongos do grupo 43°C aumentou a espessura da epiderme ( $p < 0,001$ , Figuras 6a e 6b) e da derme ( $p < 0,01$ , Figuras. 6c e 6d) no 13º dia após a primeira exposição.

Figura 6 - Análise microscópica da pele de camundongos expostos ao calor.



Legenda: (a) e (c) nas secções coradas com hematoxilina-eosina, a pele dos camundongos apresentam uma alteração na espessura epidérmica e dérmica aos 13 dias de exposição ao calor. A linha amarela em (a) mostra os limites da epiderme e na linha amarela em (b) mostra a espessura da derme. Barra - 50 µm (a) e 200 µm (c). (b) Espessuras da epiderme e (d) da derme em micrômetros (µm) 13 dias após o início da exposição ao calor. Coluna preenchida representa os dados do grupo 23°C e a coluna vazia o grupo 43°C. Os dados (n = 5) são expressos como a média ± SEM. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs. 23°C (teste t não pareado com nível de significância de  $p < 0,05$ ).

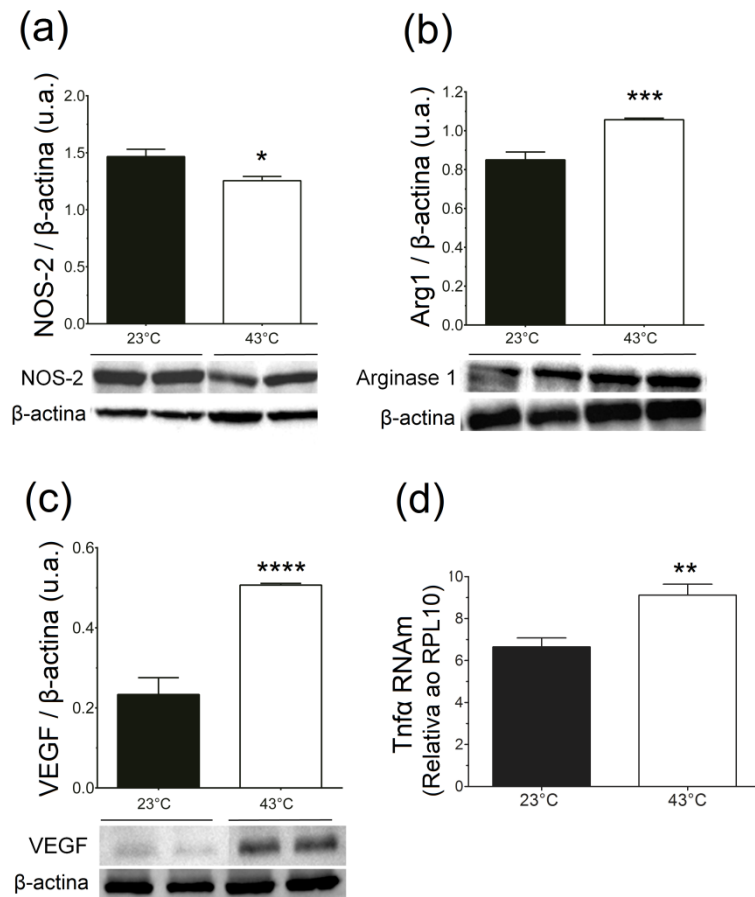
Fonte: O autor, 2016.

## 6.3. O calor aumenta a expressão de Arg1, VEGF e Tnf

Os dois grupos experimentais apresentaram um número semelhante de macrófagos F4/80-positivos e neutrófilos MPO-positivos. No entanto, os camundongos do grupo 43°C tiveram a expressão proteica de NOS2 reduzida ( $p < 0,05$ , Figura 7a) e elevação da expressão proteica da Arg1 ( $p < 0,001$ , Figura 7b) e do VEGF ( $p < 0,0001$ , Figura 7c). Entretanto, a

expressão gênica de *Tnfa* foi 4 vezes (QR = 5,54) maior no grupo de 43°C ( $p < 0,01$ ) que no grupo de 23°C 13 dias após o início da exposição ao calor (Figura 7d).

Figura 7 - Efeito do calor na resposta inflamatória da pele de camundongos.



Legenda: (a) Expressão proteica da enzima óxido nítrico sintase (NOS-2) (130 kDa) na pele são mais baixos no grupo de 43°C 13 dias após o início da exposição. (b) Expressão proteica de arginase-1 (Arg1) (35-38 kDa) na pele são mais elevados no grupo de 43°C 13 dias após o início da exposição. (c) Os níveis de proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (42 kDa) na pele são mais elevados no grupo de 43°C 13 dias após o início da exposição ao calor. (d) Expressão gênica do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (*Tnfa*) na pele é maior no grupo de 43°C 13 dias após o início da exposição. A densitometria foi expressa em unidades arbitrárias (a.u.) para todos os *immunoblottings*.  $\beta$ -actina (21 kDa) foi utilizada como proteína constitutiva para normalização. As diferenças de RT-PCR foram normalizados para a proteína ribossômica L10 60S (Rpl10). Os dados ( $n=5$  por grupo) foram expressos como a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (teste t não pareado ou teste de Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ ).

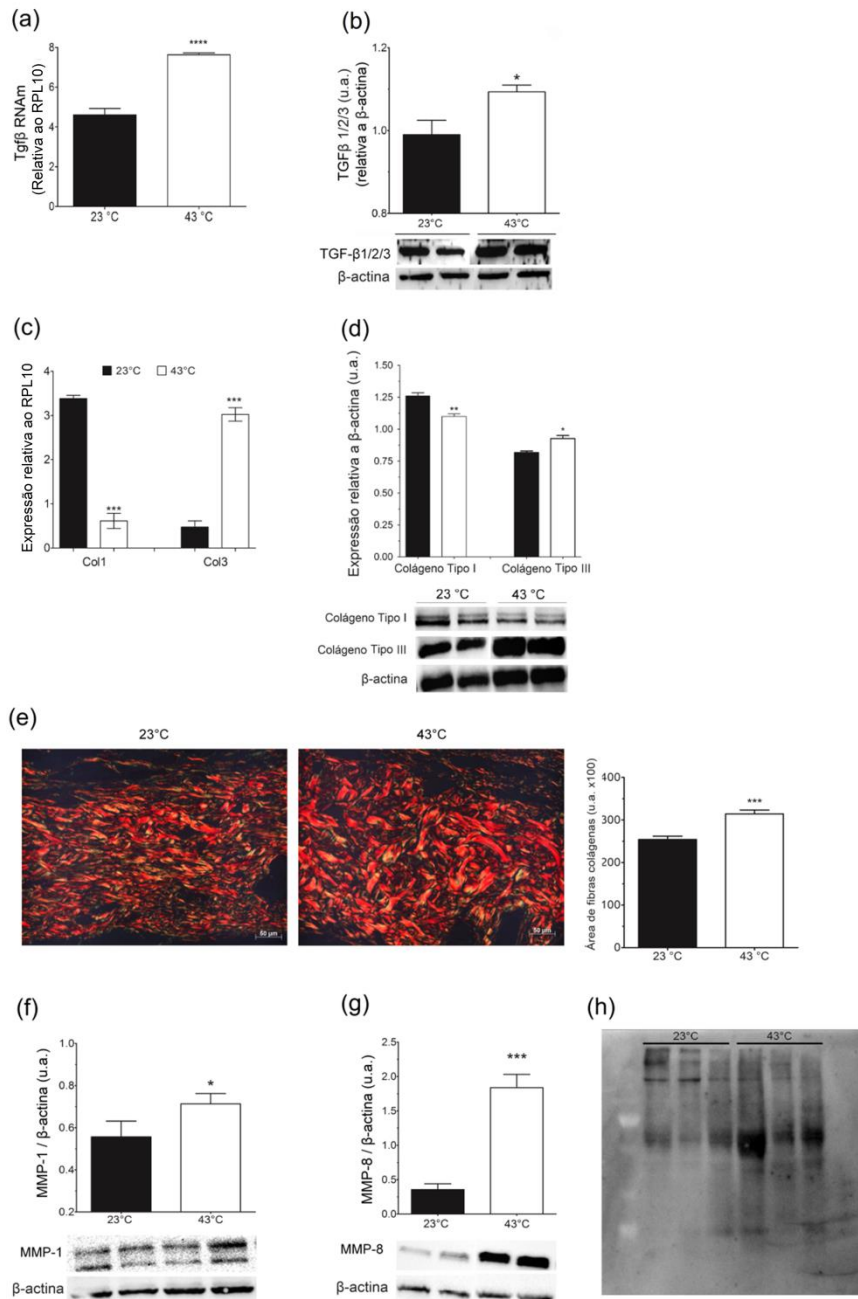
Fonte: O autor, 2016.



#### 6.4. Efeito do calor sobre a deposição e degradação de fibras colágenas

Investigamos o papel do calor e a luz na deposição e degradação do colágeno da pele de camundongos. A expressão gênica de *Tgfb1* foi 21 vezes (QR = 22,6) maior no grupo de 43°C ( $p < 0,001$ ) do que no grupo de 23°C 13 dias após o início da exposição ao calor (Figura 8a). A expressão protéica de TGF- $\beta$ 1/2/3 latente ( $p < 0,05$ ) foi maior no grupo de 43°C quando comparado com o grupo de 23°C (Figura 8b). A expressão gênica da *Colla1* foi 14 vezes (QR = 15,6) menor no grupo de 43°C ( $p < 0,001$ ). Associado a isso, observamos que a expressão protéica do colágeno tipo I também reduziu ( $p < 0,01$ ). No entanto, o calor aumentou em 3 vezes (QR = 4,06) a expressão gênica da *Col3a1* ( $p < 0,001$ ) e a expressão proteica do colágeno tipo III ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo de 23°C (Figuras 8c e 8d). Em 43°C, as fibras de colágeno de longa duração, espessas e dispostas em uma cesta estavam presentes. O grupo de 43°C também apresentou um aumento na área de fibras de colágeno quando comparado ao grupo de 23°C, mantendo a histoarquitetura da derme normal, 13 dias após o início da exposição ao calor (Figura 8e). Estes resultados corroboram com o aumento da expressão proteica da MMP-1 ( $p < 0,05$ ) e MMP-8 ( $p < 0,001$ ) observados no grupo de 43°C (Figuras 8f e 8g). Ao investigar o efeito do calor sobre a carbonilação de proteínas, observamos aumento no arrasto da expressão proteica de proteínas carboniladas no grupo 43°C comparado com o grupo 23°C (Figura 8h).

Figura 8 - Efeitos de calor na deposição de fibras de colágeno na pele de camundongos.



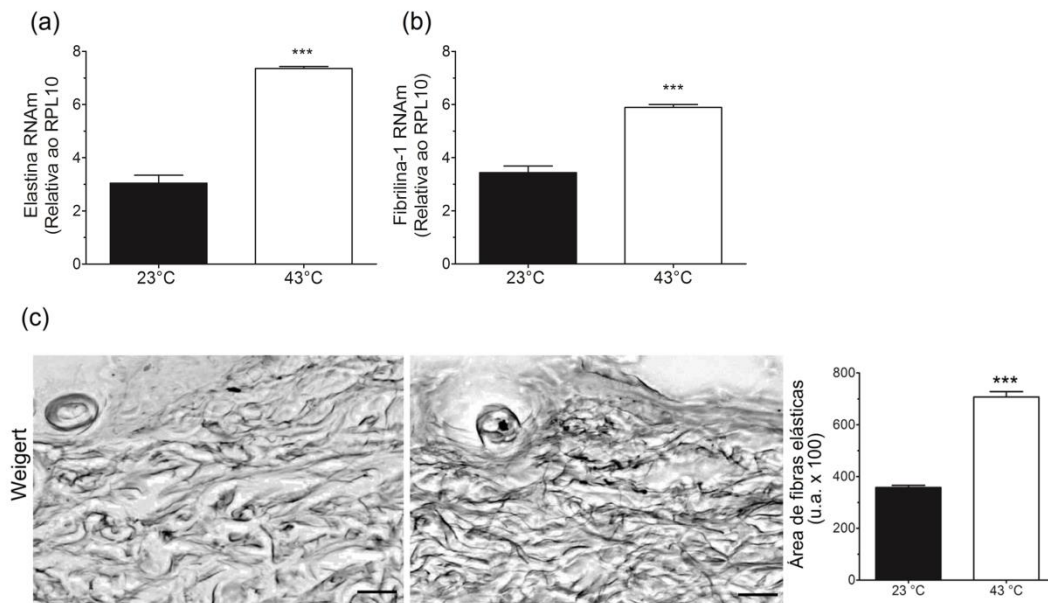
Legenda: (a) A expressão gênica do fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (Tgfb1) e (b) a expressão proteica de TGF- $\beta$  1/2/3 (47 kDa) na pele é mais elevada no grupo de 43°C, 13 dias após o início da exposição ao calor. (c) Expressão gênica da cadeia  $\alpha$ 1 do colágeno tipo I (Col1a1) e tipo III (Col3a1). (d) Expressão proteica do colágeno tipo III (138 kDa) e tipo I (140-210 kDa). (e) Seções coradas com vermelho Picro-Sirius, a pele de 23°C e 43°C camundongos apresentou fibras colágenas espessas avermelhadas dispostas em forma de cesto 13 dias após a primeira exposição ao calor. Quantificação da área das fibras colágenas. Barra - 50  $\mu$ m. (f) Expressão proteica de metaloproteinasas da matriz-1 (MMP-1) (52 kDa), (g) -8 (MMP-8) (60 kDa) e (h) expressão de proteínas carboniladas na pele são maiores nos grupos de 43°C 13 dias após o início da exposição ao calor. A densitometria foi expressa como unidades arbitrárias (a.u.) para todos os *immunoblottings*.  $\beta$ -actina (42 kDa) foi utilizada como proteína constitutiva para normalização. As diferenças de RT-PCR foram normalizados para a proteína ribossômica L10 60S (Rpl10). Os dados (n=5 por grupo) foram expressos como a média  $\pm$  SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001 comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (teste t não pareado ou teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05).

Fonte: O autor, 2016.

### 6.5. Efeitos do calor na deposição de fibras do sistema elástico

A expressão gênica de fibrilina-1 se apresentou 3 vezes maior (QR = 4,5) no grupo de 43°C ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo de 23°C 13 dias após o início da exposição ao calor (Figura 9b). Enquanto a expressão gênica da elastina se mostrou 17 vezes (QR = 18,8) maior no grupo de 43°C ( $p < 0,001$ ) do que no grupo de 23°C (Figura 9a). Como mostrado na figura 9c, a pele dos camundongos do grupo de 43°C apresentou fibras elásticas mais espessas e ocupando maior área ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo de 23°C (Figura 9c), entretanto a arquitetura da pele normal foi mantida.

Figura 9 - Efeitos de calor sobre a deposição de fibras elásticas da pele de camundongos



Legenda: (a) A expressão gênica da elastina e (b) fibrilina-1 na pele são mais elevadas no grupo de 43°C, 13 dias após o início da exposição. (c) Secções coradas com Weigert da pele dos camundongos dos grupos 23 °C e 43°C e quantificação da área das fibras do sistema elástico. Barra = 200 µm. A densitometria foi expressa como unidades arbitrárias (a.u.) As diferenças de RT-PCR foram normalizados para a proteína ribossômica L10 60S (Rpl10). Os dados (n=5) foram expressos como a média ± SEM. \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo de 23 °C (teste de Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ ).

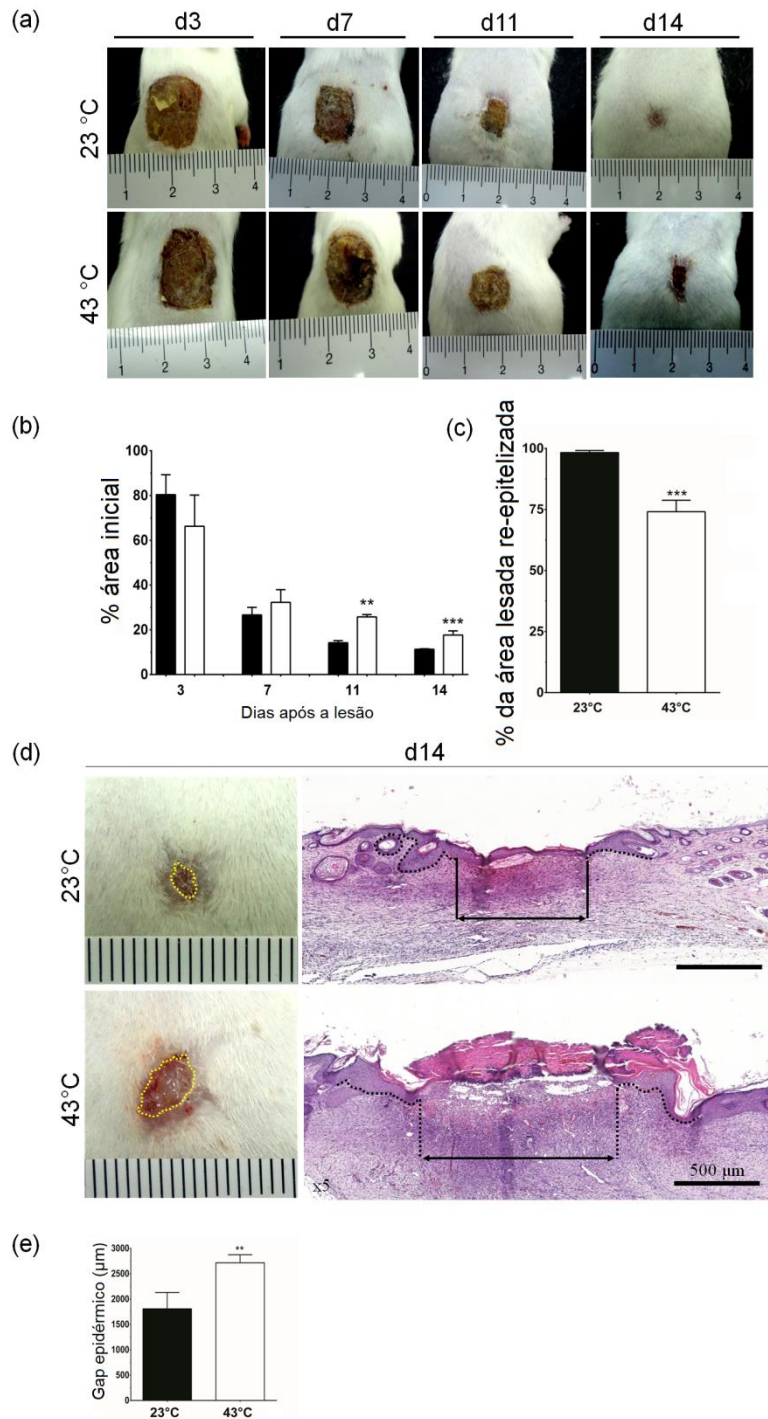
Fonte: O autor, 2016

## 6.6. Análise macroscópica e microscópica da cicatrização cutânea de camundongos expostos ao calor

Para investigar os efeitos do calor sobre a cicatrização das lesões cutâneas, analisamos a área da lesão e a porcentagem de reepitelização pela macroscopia, e o comprimento do gap epidérmico pela microscopia. Observamos que as lesões dos camundongos do grupo 43°C apresentaram áreas 42% e 29% maiores no 11° ( $p<0,01$ ) e 14° ( $p<0,001$ ) dias após a lesão, respectivamente, comparadas as áreas das lesões do grupo 23°C (Figura 10a e 10b).

A porcentagem de reepitelização da lesão foi menor no grupo de 43°C (Figura 10c). Ao medir a reepitelização, verificamos que a porcentagem de lesões reepitelizadas no grupo de 43°C foi 17% menor ( $p<0,001$ ) em comparação com o grupo de 23°C, indicando incompleta reepitelização 14 dias após a lesão (Figura 10d). Além disso, as lesões dos camundongos do grupo de 43°C apresentaram maior gap epidérmico em comparação com o grupo 23°C ( $p<0,01$ ) 14 dias após a lesão (Figura 10e).

Figura 10 - Análise da cicatrização cutânea de camundongos expostos ao calor.



Legenda: (a) As fotografias das lesões dos camundongos expostas a 23°C e 43°C nos 3°, 7°, 11°, e 14° dias após a lesão. (b) Contração da lesão expressa em porcentagem de área original nos 3°, 7°, 11° e 14° dias após a lesão (representação gráfica). (c) Porcentagem de lesões reepitelizadas 14 dias após a lesão (representação gráfica). (d) Imagens representativas do gap epidermal nos grupos 23°C e 43°C 14 dias após a lesão. Esquerda, imagens macroscópicas; A linha amarela representa a área da região não reepitelizada. Direita, imagens histológicas do gap epidermal. A área entre as linhas pretas representa o gap epidérmico. Hematoxilina-eosina, barra=500 µm. (e) Gap epidermal 14 dias após a lesão (representação gráfica). Os dados (n=10 por grupo) foram expressos em média ± SEM. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (ANOVA não-paramétrico de medidas repetidas com pós-teste de Dunn para a área da lesão, e teste t não pareado para porcentagem de reepitelização e gap epidermal).

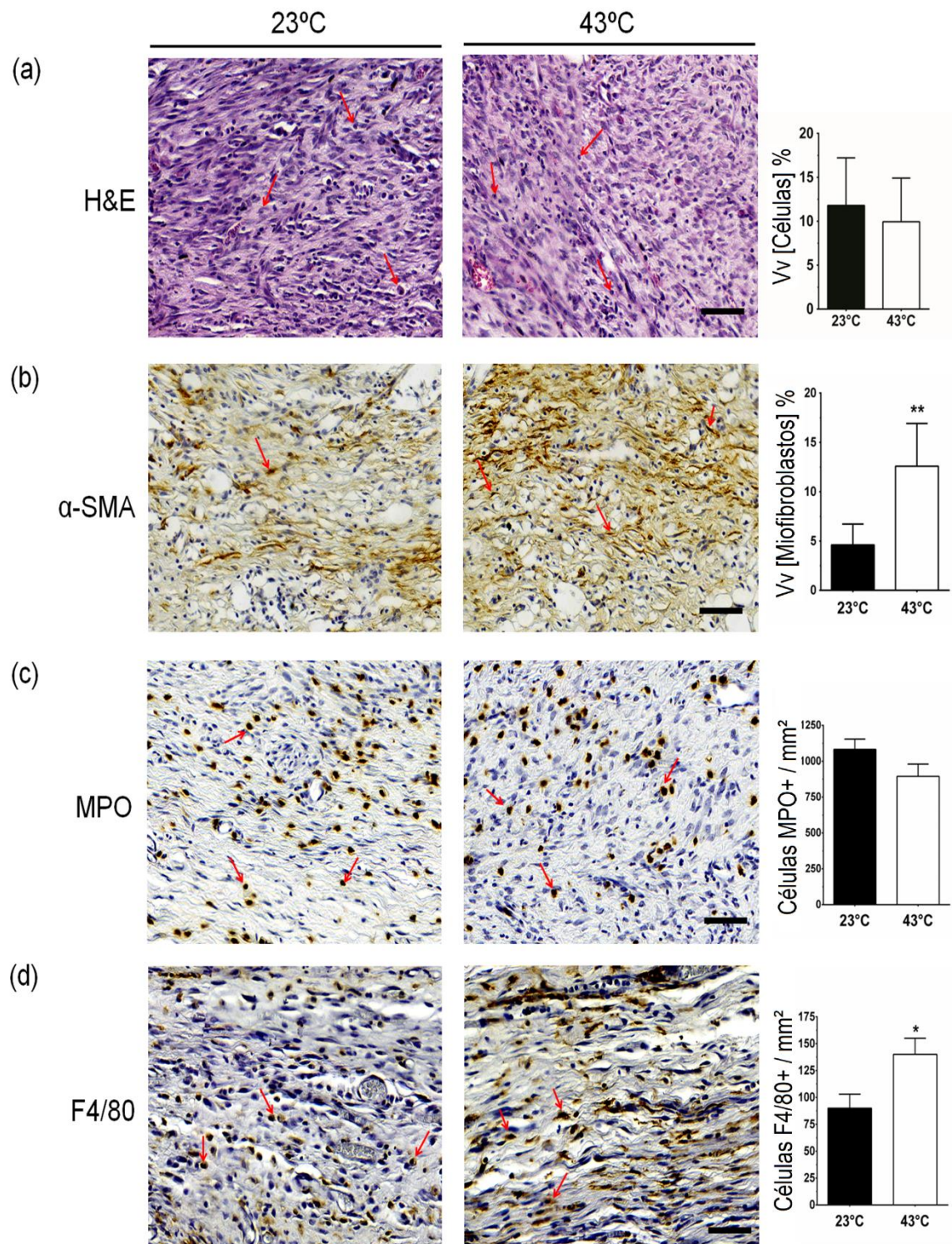
Fonte: O autor, 2016.

### **6.7. Exposição ao calor retarda a formação do tecido de granulação**

A densidade de volume celular e o número de células foram avaliados 14 dias após a lesão para analisar o tecido de granulação. Os dois grupos apresentaram um número semelhante de células na área do tecido de granulação (Figura 11a). O grupo 43°C apresentou maior densidade de volume de miofibroblastos ( $p < 0,01$ ) (Figura 11b), um número similar de células MPO-positivas (Figura 11c) e maior número de células F4/80-positivas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo 23°C (Figura 11d).



Figura 11 - A análise microscópica da cicatrização da lesão cutânea de camundongos expostos ao calor.



Legenda: (a) densidade de volume de células ( $V_v$  %) na área da lesão 14 dias após a lesão. (b) Análise estereológica que mostra a densidade de volume de miofibroblastos [ $V_v$  (miofibroblastos) %] pelas células  $\alpha$ SMA-positivas na área da lesão 14 dias após a lesão. (c) Neutrófilos identificados por células MPO-positivas e (d) macrófagos por células F4/80-positivas na área da lesão 14 dias após a lesão. Os dados ( $n=5$  por grupo) foram expressos como a média  $\pm$  SEM. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (teste t não pareado). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Fonte: O autor, 2016.

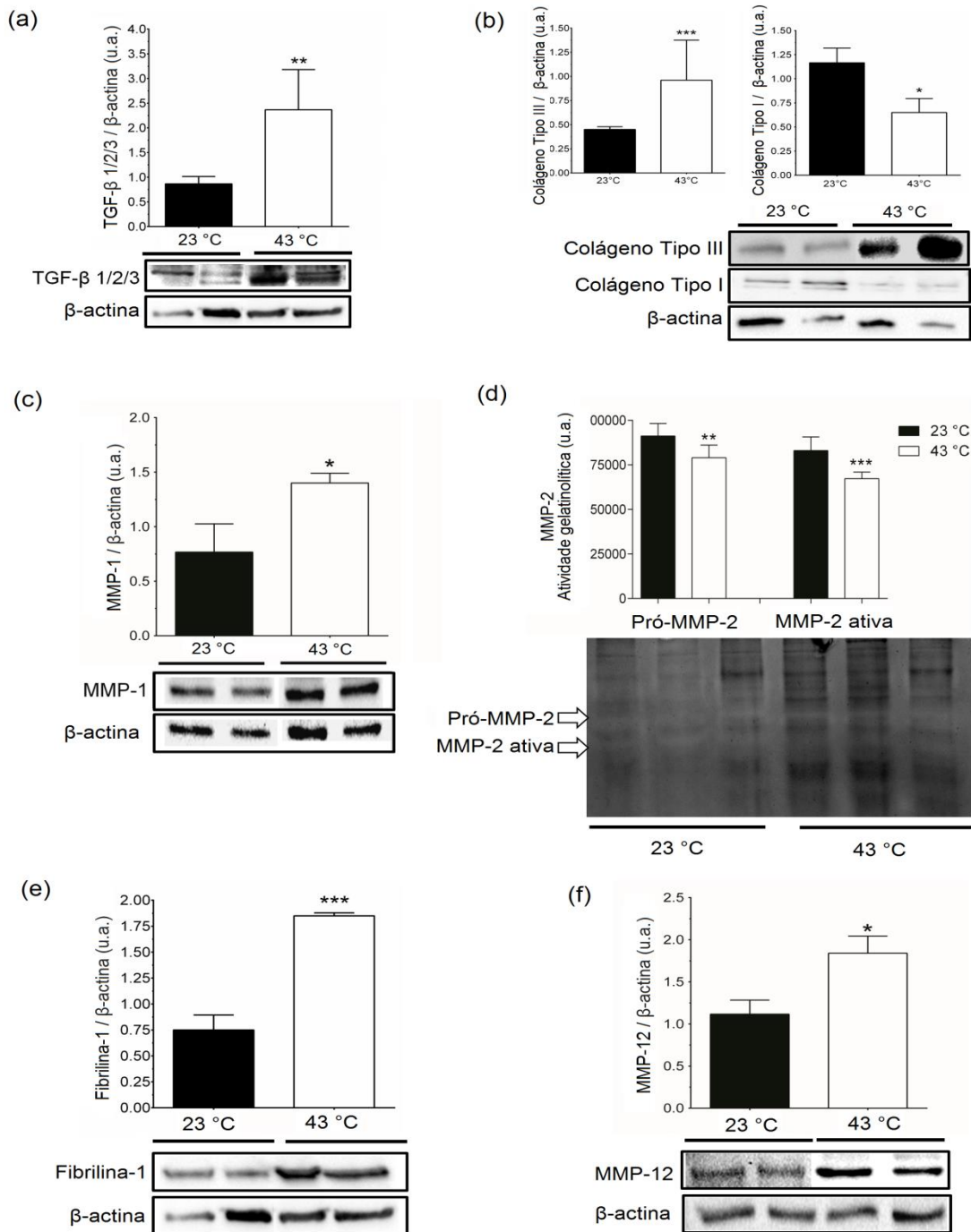
### 6.8. Efeito da exposição ao calor sobre os componentes da matriz extracelular na área de cicatrização da lesão

Para investigar o efeito do calor sobre a expressão de proteínas da matriz extracelular durante a cicatrização de lesão, a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1/2/3, colágeno tipo I e III, MMP-1, MMP-12, fibrilina-1 e a atividade gelatinolítica da MMP-2 foram avaliadas no 14º dia após a lesão. A expressão da proteína de TGF- $\beta$ 1/2/3 foi maior no grupo de 43°C ( $p < 0,01$ ) comparado com o grupo 23°C (Figura 12a). As lesões dos camundongos do grupo 43°C apresentavam aumento da expressão proteica do colágeno tipo III ( $p < 0,001$ ) e a diminuição da expressão proteica do colágeno tipo I ( $p < 0,05$ ) em comparação com as do grupo 23°C (Figura 12b). Este resultado corresponde com o aumento da expressão proteica da MMP-1 expressão ( $p < 0,05$ ) e a com a redução de atividade gelatinolítica da MMP-2 ( $p < 0,001$ ) observada no grupo de 43°C (Figura 12c e 12d), indicando um desequilíbrio entre a degradação e a deposição de colágeno.

Para investigar o efeito de exposição ao calor sobre os componentes elásticos da matriz extracelular, nós analisamos a expressão proteica da fibrilina-1, um componente de fibras elásticas, e da MMP-12, uma elastase. A expressão de fibrilina-1 ( $p < 0,001$ ) e MMP-12 ( $p < 0,05$ ) aumentaram na lesão dos camundongos do grupo 43°C comparado com o grupo 23°C (Figura 12e e 12f). Os nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de fibrilina-1 induzida pelo calor pode ter contribuído para o acúmulo de material elástico na matriz extracelular da área da lesão, mesmo com elevada expressão de MMP-12.



Figura 12 - Expressão de proteínas da matriz extracelular durante a cicatrização de lesões cutâneas de camundongos expostos ao calor.



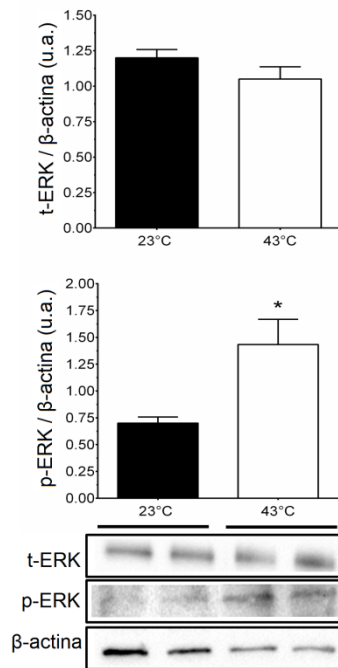
Legenda: (a) Expressão proteica de TGF- $\beta$ 1/2/3. (b) Expressão proteica do colágeno tipo III e do colágeno tipo I. (d) Expressão proteica da metaloproteinase da matriz (MMP-1) pelo ensaio de imunoblotting. (d) Atividade gelatinolítica da MMP-2 pelo ensaio de zimografia. (e) Expressão proteica de fibrilina-1 (f) da MMP-12. A densitometria das bandas foram expressas como unidades arbitrárias (u.a.) no imunoblotting para expressão proteica do TGF- $\beta$ 1/2/3 (47 kDa), colágeno tipo I (70-90 kDa), colágeno tipo III (138 kDa), MMP-1 (52 kDa), fibrilina-1 (330-350 kDa) e MMP-12 (59 kDa) e na zimografia para MMP-2. A densitometria foi expressa como unidades arbitrárias (a.u.) para todos os *immunoblottings*.  $\beta$ -actina (42 kDa) foi utilizada como proteína constitutiva para normalização. Os dados (n=5 por grupo) foram expressos como a média  $\pm$  SEM. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001 comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (teste t não pareado).

Fonte: O autor, 2016.

### 6.9. O calor induz a ativação de ERK

A expressão de MMP está associada com a ativação coordenada de MAPKs (MAP Quinases) - Proteíno-quinases ativadas por mitógenos. Assim, investigamos a ativação da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) pela exposição ao calor. Catorze dias após a lesão, as lesões dos camundongos do grupo 43°C apresentaram aumento da expressão proteica da pERK ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo 23°C (Figura 13).

Figura 13 - Ativação de ERK durante a cicatrização de lesões em camundongos expostos ao calor.



Legenda. Expressão proteica de pERK (42-44 kDa). A densitometria foi expressa como unidades arbitrárias (a.u.) para todos os *immunoblottings*.  $\beta$ -actina (42 kDa) foi utilizada como proteína constitutiva para normalização. Os dados ( $n=5$  por grupo) foram expressos como a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  comparação entre os grupos 23°C vs 43°C (teste t não pareado).

Fonte: O autor, 2016.

## DISCUSSÃO

### *Estudo 1 – Efeito do calor sobre a pele de camundongos*

Os efeitos do estresse térmico têm sido estudado em célula *ex vivo* (64), no entanto pouco se sabe sobre a exposição ao calor na pele *in vivo*. Recentemente, foi sugerido que o calor induzido pela radiação IV pode estar envolvido no processo de fotoenvelhecimento (9). No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que o curto período de exposição ao calor pode proporcionar algum efeito anti-envelhecimento na pele de camundongos.

No envelhecimento cutâneo induzido pelo estresse, a espessura da derme reduziu e a quantidade de colágeno do tipo I e III reduziu (65). No presente estudo a espessura da derme foi aumentada e, embora a síntese de colágeno tipo I tenha reduzido, a síntese de colágeno tipo III aumentou. O aumento na síntese e deposição de colágeno tipo III mostra que o calor induziu um remodelamento positivo na derme com a síntese de um novo colágeno típico de tecido novo, como o tecido embriológico e de granulação. Além do aumento da deposição no colágeno tipo III, a área ocupada pelo colágeno também aumentou e a arquitetura foi preservada, mostrando que o tecido recém-depositado estava perfeitamente integrado à matriz extracelular dérmica.

Com o envelhecimento, a renovação das células epidérmicas é mais lenta (66, 67), mas a epiderme espessa observada mostrou que não havia comprometimento no compartimento epidérmico devido à exposição ao calor, pelo contrário, podemos sugerir uma estimulação para proliferação/diferenciação epidérmica (bioestimulação tipicamente produzida pela luz). O espessamento da epiderme já foi relatado em um estudo que investigou os efeitos do tratamento repetitivo com o calor sobre a formação de rugas, a pele do dorso de camundongos sem pêlos foi exposto ao calor (43°C, 15 min ou 30 min) por um período de 6 semanas (53).

Na pele humana, a exposição aguda ao calor estimula a formação de novos vasos, recruta células inflamatórias e causa dano oxidativo ao DNA (6). Os neutrófilos podem ser recrutados para a pele (68) quando ela é exposta a luz solar natural, os macrófagos por exposição a radiação UV e ao calor induzido tanto pela radiação IV quanto pela luz visível (69). O influxo de neutrófilos para a pele exposta à luz solar contribui para a destruição da MEC, uma vez que estas células são a principal fonte de MMP-1, MMP-8 e MMP-9 (3). Neste estudo, não houve diferença no número de neutrófilos e macrófagos na pele de camundongos expostos ao calor, mas a expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa e a expressão protéica de MMP-8 aumentaram, sugerindo que os neutrófilos foram ativados. O

calor não afetou o número de macrófagos na pele, mas induziu uma redução na expressão protéica da óxido nítrico sintase induzível (NOS2) e aumento da expressão da arginase (Arg1). Os macrófagos M1, expressam principalmente NOS2, e estão relacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias. Já os macrófagos M2, expressam principalmente Arg1, para funções anti-inflamatórias e de reparo (21, 70). Assim, pode-se especular que, embora não haja diferença no número de macrófagos, uma mudança no perfil de direção ao perfil M2 pode estar presente. O que pode contribuir para o processo de reparação da pele de camundongos expostos ao calor.

Já foi sugerido que a luz visível age degradando o colágeno antigo para permitir a deposição de novas moléculas, em um processo semelhante à cicatrização (47). Os estímulos para a degradação do colágeno antigo e, provavelmente, de outros componentes da MEC, podem estar associados a oxidação induzida por ERO (47). Lubart e cols mostraram que a luz visível pode produzir ERO que são capazes de destruir as fibras de colágeno (47). Mostramos uma maior quantidade de proteínas carboniladas no grupo exposto ao calor. A degradação da MEC antiga para permitir a renovação também necessita da ação de MMPs, e no grupo exposto ao calor aumentaram tanto os níveis de MMP-1 como de MMP-8.

Em contraste com a atrofia extracelular generalizada que é evidente na pele intrinsecamente envelhecida, a pele fotoenvelhecida é caracterizada por eventos de remodelação catabólicos e anabólicos bem localizados e dependente da quantidade de componentes específicos da MEC (71). Foi relatado que o estímulo por exposição ao calor pulsado a 45°C ou 60°C causou uma regulação positiva do procolágeno do tipo I e III em fibroblastos dérmicos humanos (72) e uma exposição repetida de calor moderado a 41°C durante 1 hora duas vezes por semana ao longo da vida replicativa dos fibroblastos humanos demonstrou proporcionar benefícios anti-envelhecimento tais como aumento da produção de colágeno (73). No presente estudo observou-se que o calor aumentou a área das fibras colágenas, aumentou a expressão gênica e protéica do colágeno tipo III e diminuiu a expressão gênica e protéica do colágeno tipo I. Esses achados sugerem que o calor causou degradação, resíntese e deposição de fibras colágenas alongadas, espessas e em formato de cesto, semelhante à histoarquitetura de pele jovem.

O TGF- $\beta$  é a principal citocina pró-fibrótica, que regula positivamente a produção de procolágeno do tipo I e tipo III (74). Uma única irradiação com radiação IV na pele humana aumenta a expressão do procolágeno tipo I, enquanto irradiações múltiplas reduzem a expressão do procolágeno tipo I (4). *In vitro*, o tratamento de fibroblastos com calor durante 30 min a 43°C aumenta a expressão de TGF- $\beta$ 1(4). No presente estudo, a expressão gênica e

proteica de TGF- $\beta$  aumentou na pele dos camundongos expostos a 43°C. Novamente, podemos sugerir que os macrófagos foram ativados, pois os macrófagos são as principais células responsáveis pela liberação de TGF- $\beta$  (5).

No fotoenvelhecimento da pele induzido pela radiação UV, a destruição das fibras elásticas leva à redução da espessura dérmica e alterações na junção dermo-epidérmica, resultando na formação de rugas (75). Estes resultados podem estar diretamente associados ao aumento dos níveis proteicos da MMP-8 e da elastase neutrofílica, uma vez que o aumento destas proteases na pele exposta à radiação UV provoca um acúmulo de material elastótico e a fragmentação das fibras colágenas (3). Demonstrou-se que a exposição crônica ao calor é um importante estímulo físico para o desenvolvimento de rugas na pele (53). O calor da luz solar modula a síntese de tropoelastina, elastina e fibrilina-1, resultando no desenvolvimento de elastose solar. Na pele jovem, o sistema de fibras elásticas adota uma arquitetura altamente ordenada característica, na qual as microfibrilas ricas em fibrilina orientadas perpendicularmente (fibras oxitalânicas) na junção dermo-epidérmica se fundem com fibras elásticas de grande diâmetro na derme reticular, que são compostas principalmente de elastina (76). Num sistema *in vivo*, foi demonstrado que a indução da expressão de fibrilina-1 ocorre antes da expressão do colágeno, tornando assim este componente de fibra elástica um biomarcador útil de reparação da pele (77). No presente estudo, observou-se um aumento da área das fibras elásticas no grupo de 43°C em comparação com o grupo de 23°C, com arquitetura preservada. Observamos também um aumento da expressão gênica de elastina e fibrilina-1, indicando que o calor pode ter estimulado a elastogênese.

O calor aumenta a angiogênese na pele humana *in vivo*, induz a expressão do VEGF e diminui a expressão dos fatores anti-angiogênicos na epiderme e na derme (4). No presente estudo, a exposição ao calor também aumentou os níveis de VEGF na pele, indicando que a pele exposta ao calor pode ser beneficiada pelo aumento da oferta de sangue que é visto na pele jovem.

### *Estudo 2 – Efeito do calor sobre o reparo tecidual cutâneo de camundongos*

O papel do calor produzido pelo espectro de luz visível durante a cicatrização das lesões cutâneas não está bem esclarecido. Em 2003, um estudo demonstrou que ratos atrasaram o fechamento da lesão quando foram expostos a 27°C comparados aos ratos expostos a 27°C com adição da radiação IV (49). A pele humana quando exposta à luz visível produz ERO,

citocinas pró-inflamatórias e MMP-1 (28). Nosso estudo mostrou que camundongos expostos à 43°C atrasaram o fechamento das lesões no 11° e no 14° dias após a lesão.

É possível que o calor influencie diretamente na fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo. Após lesão da pele, os neutrófilos são atraídos para o local da lesão, seguido pelos macrófagos (78). Os neutrófilos são mais ativos nas fases iniciais de inflamação, e na ausência de infecção, a infiltração de neutrófilos cessa dentro de poucos dias (19). Um estudo demonstrou que o número de neutrófilos no tecido de granulação foi semelhante nos ratos expostos a 27°C e os ratos expostos a 27°C associado com a radiação IV (49). Em nosso estudo observou-se um número semelhante de neutrófilos (células MPO-positivas), independentemente da temperatura, indicando que o calor não influencia no número de neutrófilos durante a cicatrização de lesões cutâneas.

Além disso, durante a fase inflamatória, macrófagos liberam TGF- $\beta$  que atraem fibroblastos para a área da lesão, iniciando a formação de tecido de granulação, desempenhando assim um papel essencial na transição entre a inflamação e a fibroplasia (24) acelerando a cicatrização de lesões (79). No entanto, a permanência de macrófagos em fases posteriores do reparo tecidual indica atraso na cicatrização. No nosso estudo, observou-se um aumento no número de macrófagos (células F4/80-positivas) e na expressão proteica de TGF- $\beta$  1/2/3 no grupo 43°C, em comparação com o grupo de 23°C no 14° dia após a lesão.

A fase proliferativa é caracterizada pela migração de fibroblastos para o local da lesão, para sintetizar e depositar colágeno com o objetivo de formar um tecido de granulação ou tecido de cicatriz (23, 26). Toyokawa e cols., mostraram um aumento na infiltração de fibroblastos em ratos expostos à radiação IV associada com a exposição de 27°C até o 7° dia após a lesão (49). O TGF- $\beta$  também importante durante o reparo tecidual cutâneo, pois estimula a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. Um estudo onde a pele das nádegas foi exposta por 90 minutos à 43°C um aumento na expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 24 horas após a exposição (4).

Durante a fase de remodelamento, a síntese da MEC é reduzida, e a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos entram em apoptose para reduzir a celularidade do tecido de granulação (5, 26). No presente estudo, 14 dias após a lesão, o grupo 43°C mostrou maior densidade de volume de miofibroblastos e de macrófagos. Possivelmente estes macrófagos ainda estavam participando da inflamação e estimulando a diferenciação miofibroblástica proporcionando uma característica típica de um processo de cicatrização de lesão atrasado.

Ainda na fase de remodelamento, o colágeno tipo III, um componente importante do tecido de granulação, é gradualmente substituído por colágeno tipo I, a principal proteína da derme (23). A exposição da pele saudável a temperatura de 41°C durante 1 hora, duas vezes por semana aumenta a produção de colágeno (73), enquanto que a exposição pulsátil de 45°C e 60°C regulam a síntese, deposição e degradação de tipo pró-colágeno tipo I e tipo III em fibroblastos dérmicos humanos (80). Este processo regulatório é dependente das MMPs secretadas pelos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, cuja atividade é controlada por TIMPs (5, 20). O reparo tecidual normal requer um equilíbrio entre a atividade de MMPs e TIMPs (19). O nosso estudo mostrou que 14 dias após a lesão, a exposição a 43°C aumentou a expressão de colágeno do tipo III e diminuiu a expressão de colágeno do tipo I.

Não há consenso sobre se é o efeito luminoso da radiação IV ou o calor gerado por ela é a responsável por induzir a ativação das MMPs. Shin e cols., demonstraram que ratos sem pêlos saudáveis expostos a 43°C durante 15 ou 30 minutos, por 6 semanas apresentaram aumento da expressão de MMP-13, mas não alteraram a expressão de MMP-2 e MMP-9 (53). Nosso estudo demonstrou que o calor aumentou a expressão proteica de MMP-1 e reduziu a atividade gelatinolítica da MMP-2. Estes achados sugerem que o calor ativou a MMP-1, causando a degradação do colágeno tipo I. e os produtos da degradação do colágeno tipo I não foram devidamente consumidos pela atividade gelatinolítica da MMP-2, sendo então acumulado na matriz extracelular da área da lesão dificultado seu fechamento.

A elastina contribui para a elasticidade da pele, reaparece no final da fase de remodelamento. No entanto, o tecido cicatricial não têm as mesmas propriedades elásticas como o tecido saudável (5, 26). Em 2005, Chen e cols, demonstraram que o calor da luz solar modula a síntese de tropoelastina, elastina, e fibrilina-1, resultando no desenvolvimento de elastose solar. Eles observaram que a expressão gênica da fibrilina-1 diminui com a exposição ao aguda e aumenta com a exposição crônica ao calor em cultura de fibroblastos da pele humana. A fibrilina-1 aumenta a expressão na derme da pele envelhecida. Observaram ainda neste estudo que o calor induz aumento da expressão genica fibrilina-1 na epiderme, enquanto reduz a sua expressão na derme, o que leva a um conjunto de fibras elásticas anormais (8). No nosso estudo foi observado um aumento da expressão da proteína de fibrilina-1 e MMP-12 nos camundongos expostos ao calor 14° dia após a lesão.

Estudos anteriores demonstraram a relação entre a expressão de MMP-1 e a ativação de proteino-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Park e cols., observaram que o calor aumenta a expressão gênica e proteica de MMP-1 e MMP-3, mas não de MMP-2, por ativação da via das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) através de um mecanismo au-

tócrino dependente de IL-6 (9). Em nosso estudo observou-se que os camundongos expostos ao calor aumentaram a expressão proteica da ERK fosforilada 14 dias após a lesão.

## **CONCLUSÃO**

Em conclusão, nossos resultados indicam que a exposição ao calor atua sobre a pele de camundongos. Ao agir sobre a pele, promoveu efeitos compatíveis com os desejáveis para terapias anti-envelhecimento. Entretanto, ao agir sobre lesões cutâneas retardou a cicatrização.



**REFERÊNCIAS**

1. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):75-81. PubMed PMID: 9082989. Epub 1997/04/04. Eng.
2. Oh JH, Kim YK, Jung JY, Shin JE, Kim KH, Cho KH, et al. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *Journal of dermatological science*. 2011 Jun;62(3):192-201. PubMed PMID: 21477996. Epub 2011/04/12. Eng.
3. Rijken F, Kiekens RC, Bruijnzeel PL. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. *The British journal of dermatology*. 2005 Feb;152(2):321-8. PubMed PMID: 15727646.
4. Seo HR, Chung DY, Lee YJ, Lee DH, Kim JI, Bae S, et al. Heat shock protein 25 or inducible heat shock protein 70 activates heat shock factor 1: dephosphorylation on serine 307 through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jun 23;281(25):17220-7. PubMed PMID: 16624816.
5. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21. PubMed PMID: 18480812. Epub 2008/05/16. eng.
6. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, et al. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings*. 2009 Aug;14(1):15-9. PubMed PMID: 19675547.
7. Kim MS, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev*. 2006 Dec;127(12):875-82. PubMed PMID: 17067654. Epub 2006/10/28. eng.
8. Chen Z, Seo JY, Kim YK, Lee SR, Kim KH, Cho KH, et al. Heat modulation of tropoelastin, fibrillin-1, and matrix metalloproteinase-12 in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):70-8. PubMed PMID: 15654955. Epub 2005/01/19. eng.
9. Park CH, Lee MJ, Ahn J, Kim S, Kim HH, Kim KH, et al. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *The Journal of investigative dermatology*. 2004 Dec;123(6):1012-9. PubMed PMID: 15610507. Epub 2004/12/22. eng.
10. Vandersee S, Beyer M, Lademann J, Darvin ME. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:579675. PubMed PMID: 25741404. Pubmed Central PMCID: 4337113.
11. Kierszenbaum A. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2012.

12. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan; 2008.
13. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol*. 2007;26(4):343-57. PubMed PMID: 18058308.
14. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD*. 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1. PubMed PMID: 12095893. Epub 2002/07/04. Eng.
15. James WD, Berger, T.G., & Elston, D.M. *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology 10th ed*: Elsevier Saunders; 2006.
16. Ludriksone L, Garcia Bartels N, Kanti V, Blume-Peytavi U, Kottner J. Skin barrier function in infancy: a systematic review. *Archives of dermatological research*. 2014 Sep;306(7):591-9. PubMed PMID: 24595645.
17. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology*. 2002 Nov;138(11):1462-70, PubMed PMID: 12437452. Epub 2002/11/20, Eng.
18. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007 Jan-Feb;25(1):9-18. PubMed PMID: 17276196. Epub 2007/02/06. eng.
19. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006 Jun;117(7 Suppl):1e-S-32e-S. PubMed PMID: 16801750, Epub 2006/06/28. Eng.
20. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999 Sep 2;341(10):738-46. PubMed PMID: 10471461. Epub 1999/09/02. eng.
21. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593-604. PubMed PMID: 20510870, Epub 2010/06/01. eng.
22. Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):353-62. PubMed PMID: 19880493. Pubmed Central PMCID: 2808158. Epub 2009/11/03. eng.
23. Darby IA, Laverdet B, Bonte F, Desmouliere A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014;7:301-11. PubMed PMID: 25395868. Pubmed Central PMCID: 4226391. Epub 2014/11/15. eng.
24. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):753-62. PubMed PMID: 21281986. Epub 2011/02/02. eng.
25. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *The Surgical clinics of North America*. 1997 Jun;77(3):509-28. PubMed PMID: 9194878. Epub 1997/06/01. Eng.

26. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):56-66. PubMed PMID: 7856739. Pubmed Central PMCID: 1870783. Epub 1995/01/01. eng.
27. Yamamoto T, Akiyoshi, H., Yoshikiyo, K., Takahashi, T., Tanabe, Kudoh, Y., Kudoh, S., Imura, S., Yamamoto, N. A spectroscopic study on the effect of ultraviolet solar radiation in Antarctica on the human skin fibroblast cells. *Geoscience Frontiers* 2013;4:647-53.
28. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *The Journal of investigative dermatology.* 2012 Jul;132(7):1901-7. PubMed PMID: 22318388.
29. Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine.* 2003 Oct;19(5):228-34. PubMed PMID: 14535893. Epub 2003/10/11. eng.
30. MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):92-6. PubMed PMID: 16616325. Epub 2006/04/18. eng.
31. Norval M, Halliday GM. The consequences of UV-induced immunosuppression for human health. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):965-77. PubMed PMID: 21749399. Epub 2011/07/14. eng.
32. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci.* 2013 Jan;12(1):54-64. PubMed PMID: 23111621. Epub 2012/11/01. eng.
33. Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J. Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2002 Dec;119(6):1323-9. PubMed PMID: 12485435. Epub 2002/12/18. eng.
34. Kleesz P, Darlenski R, Fluhr JW. Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects. *Skin Pharmacol Physiol.* 2012;25(1):25-33. PubMed PMID: 21912200, Epub 2011/09/14. eng.
35. Shin MH, Moon YJ, Seo JE, Lee Y, Kim KH, Chung JH. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free radical biology & medicine.* 2008 Feb 15;44(4):635-45. PubMed PMID: 18036352. Epub 2007/11/27. eng.
36. Darvin ME, Haag SF, Meinke MC, Sterry W, Lademann J. Determination of the influence of IR radiation on the antioxidative network of the human skin. *J Biophotonics.* 2011 Jan;4(1-2):21-9. PubMed PMID: 20151398. Epub 2010/02/13. eng.
37. Krutmann J, Morita A, Chung JH. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *The Journal of investigative dermatology.* 2012 Mar;132(3 Pt 2):976-84. PubMed PMID: 22170486. Epub 2011/12/16. eng.

38. Schroeder P, Calles C, Benesova T, Macaluso F, Krutmann J. Photoprotection beyond ultraviolet radiation--effective sun protection has to include protection against infrared A radiation-induced skin damage. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23(1):15-7. PubMed PMID: 20090404. Epub 2010/01/22. eng.
39. Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, et al. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(1):31-44. PubMed PMID: 19122479. Epub 2009/01/06. eng.
40. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochemistry and photobiology.* 2008 Mar-Apr;84(2):450-62. PubMed PMID: 18248499.
41. Haywood R. Relevance of sunscreen application method, visible light and sunlight intensity to free-radical protection: A study of ex vivo human skin. *Photochemistry and photobiology.* 2006 Jul-Aug;82(4):1123-31. PubMed PMID: 17205635.
42. Bitter PH. Noninvasive rejuvenation of photodamaged skin using serial, full-face intense pulsed light treatments. *Dermatol Surg.* 2000 Sep;26(9):835-42; discussion 43. PubMed PMID: 10971556.
43. Goldberg DJ. New collagen formation after dermal remodeling with an intense pulsed light source. *J Cutan Laser Ther.* 2000 Jun;2(2):59-61. PubMed PMID: 11360318.
44. Goldberg DJ, Silapunt S. Q-switched Nd:YAG laser: rhytid improvement by non-ablative dermal remodeling. *J Cutan Laser Ther.* 2000 Sep;2(3):157-60. PubMed PMID: 11360334.
45. Hernandez-Perez E, Ibiertt EV. Gross and microscopic findings in patients submitted to nonablative full-face resurfacing using intense pulsed light: a preliminary study. *Dermatol Surg.* 2002 Aug;28(8):651-5. PubMed PMID: 12174053.
46. Negishi K, Wakamatsu S, Kushikata N, Tezuka Y, Kotani Y, Shiba K. Full-face photorejuvenation of photodamaged skin by intense pulsed light with integrated contact cooling: initial experiences in Asian patients. *Lasers in surgery and medicine.* 2002;30(4):298-305. PubMed PMID: 11948600.
47. Lubart R, Friedmann H, Lavie R, Longo L, Jacobi J, Baruchin O, et al. A reasonable mechanism for visible light-induced skin rejuvenation. *Lasers in medical science.* 2007 Mar;22(1):1-3. PubMed PMID: 17333456.
48. Samoilova KA, Zhevago NA, Menshutina MA, Grigorieva NB. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic level: I. diabetic patients. *Photomed Laser Surg.* 2008 Oct;26(5):433-42. PubMed PMID: 18922086.
49. Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya H, Teshima S, Nakanishi H, et al. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003 Jun;228(6):724-9. PubMed PMID: 12773705. Epub 2003/05/30, eng.
50. Lawson D, Petrofsky JS. A randomized control study on the effect of biphasic electrical stimulation in a warm room on skin blood flow and healing rates in chronic wounds of patients with and without diabetes. *Med Sci Monit.* 2007 Jun;13(6):CR258-63. PubMed PMID: 17534231.

51. Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose Response*. 2009;7(1):90-103. PubMed PMID: 19343114. Pubmed Central PMCID: 2664638.
52. Alvarenga ES, Saliba, W.A., Milagres, B.G. Montagem de câmara com lâmpada de ultravioleta de baixo custo. *Quim Nova*. 2005;28(5):927-8.
53. Shin MH, Seo JE, Kim YK, Kim KH, Chung JH. Chronic heat treatment causes skin wrinkle formation and oxidative damage in hairless mice. *Mechanisms of ageing and development*. 2012 Feb-Mar;133(2-3):92-8. PubMed PMID: 22306609. Epub 2012/02/07. eng.
54. Cardoso JF, Souza BR, Amadeu TP, Valenca SS, Porto LC, Costa AM. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol*. 2007 Dec;35(7):890-6. PubMed PMID: 18098035. Epub 2007/12/22. eng.
55. Mufti A, Coutts P, Sibbald RG. Validation of commercially available infrared thermometers for measuring skin surface temperature associated with deep and surrounding wound infection. *Adv Skin Wound Care*. 2015 Jan;28(1):11-6. PubMed PMID: 25502971.
56. Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, Porto LC, Desmouliere A, Costa A. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract*. 2003;199(7):469-73. PubMed PMID: 14521263. Epub 2003/10/03. eng.
57. Assis de Brito TL, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice. *Life Sci*. 2014 Apr 1;100(2):138-46. PubMed PMID: 24560961. Epub 2014/02/25. eng.
58. Costa RA, Ruiz-de-Souza V, Azevedo GM, Jr., Gava E, Kitten GT, Vaz NM, et al. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2011 Jul-Aug;19(4):487-97. PubMed PMID: 21649782. Epub 2011/06/09. eng.
59. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc*. 1986 Jun;142(Pt 3):259-76. PubMed PMID: 3735415. Epub 1986/06/01. eng.
60. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 Oct;96(10):857-81. PubMed PMID: 3056461. Epub 1988/10/01. eng.
61. Conrad CC, Talent JM, Malakowsky CA, Gracy RW. Post-Electrophoretic Identification of Oxidized Proteins. *Biological procedures online*. 2000 Mar 23;2:39-45. PubMed PMID: 12734585. Pubmed Central PMCID: 140127. Epub 2003/05/08. Eng.

62. Varelias A, Cowin AJ, Adams D, Harries RH, Cooter RD, Belford DA, et al. Mitogenic bovine whey extract modulates matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 levels in chronic leg ulcers. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2006 Jan-Feb;14(1):28-37. PubMed PMID: 16476069. Epub 2006/02/16. eng.
63. Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci*. 2000 Feb 11;66(12):1127-37. PubMed PMID: 10737363. Epub 2000/03/29. eng.
64. Dams SD, de Liefde-van Beest M, Nuijs AM, Oomens CW, Baaijens FP. Heat shocks enhance procollagen type I and III expression in fibroblasts in ex vivo human skin. *Skin Res Technol*. 2011 May;17(2):167-80, PubMed PMID: 21251083. Epub 2011/01/22. Eng.
65. Romana-Souza B, Santos Lima-Cezar G, Monte-Alto-Costa A. Psychological stress-induced catecholamines accelerates cutaneous aging in mice. *Mechanisms of ageing and development*. 2015 Dec;152:63-73. PubMed PMID: 26541702. Epub 2015/11/07. Eng.
66. Gilchrist BA. Skin aging and photoaging: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1989 Sep;21(3 Pt 2):610-3. PubMed PMID: 2476468. Epub 1989/09/01. Eng.
67. Yaar M, Gilchrist BA. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clinics in geriatric medicine*. 2001 Nov;17(4):617-30, v. PubMed PMID: 11535419. Epub 2001/09/06. Eng.
68. Rijken F, Bruijnzeel PL. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings*. 2009 Aug;14(1):67-72. PubMed PMID: 19675558. Epub 2009/08/14. Eng.
69. Cho S, Lee MJ, Kim MS, Lee S, Kim YK, Lee DH, et al. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *Journal of dermatological science*. 2008 May;50(2):123-33. PubMed PMID: 18194849. Epub 2008/01/16. Eng.
70. Campbell L, Saville CR, Murray PJ, Cruickshank SM, Hardman MJ. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *The Journal of investigative dermatology*. 2013 Oct;133(10):2461-70, PubMed PMID: 23552798. Pubmed Central PMCID: 3778883. Epub 2013/04/05. Eng.
71. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental dermatology*. 2002 Oct;11(5):398-405. PubMed PMID: 12366692. Epub 2002/10/09. Eng.
72. Dams SD, de Liefde-van Beest M, Nuijs AM, Oomens CW, Baaijens FP. Pulsed heat shocks enhance procollagen type I and procollagen type III expression in human dermal fibroblasts. *Skin Res Technol*. 2010 Aug;16(3):354-64. PubMed PMID: 20637005. Epub 2010/07/20, Eng.

73. Mayes AE, Holyoak CD. Repeat mild heat shock increases dermal fibroblast activity and collagen production. *Rejuvenation research*. 2008 Apr;11(2):461-5. PubMed PMID: 18341425. Epub 2008/03/18. Eng.
74. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*. 1990;6:597-641. PubMed PMID: 2177343. Epub 1990/01/01. Eng.
75. Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-associated alterations in collagen and elastin. *Clinics in geriatric medicine*. 1989 Feb;5(1):127-47. PubMed PMID: 2645992. Epub 1989/02/01. Eng.
76. Dahlback K, Ljungquist A, Lofberg H, Dahlback B, Engvall E, Sakai LY. Fibrillin immunoreactive fibers constitute a unique network in the human dermis: immunohistochemical comparison of the distributions of fibrillin, vitronectin, amyloid P component, and orcein stainable structures in normal skin and elastosis. *The Journal of investigative dermatology*. 1990 Mar;94(3):284-91. PubMed PMID: 1689758. Epub 1990/03/01. Eng.
77. Watson RE, Craven NM, Kang S, Jones CJ, Kielty CM, Griffiths CE. A short-term screening protocol, using fibrillin-1 as a reporter molecule, for photoaging repair agents. *The Journal of investigative dermatology*. 2001 May;116(5):672-8. PubMed PMID: 11348454. Epub 2001/05/12. Eng.
78. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *The Journal of investigative dermatology*. 2007 May;127(5):1009-17. PubMed PMID: 17435786. Epub 2007/04/17. eng.
79. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. *Lasers in surgery and medicine*. 1994;15(3):281-9. PubMed PMID: 7830474. Epub 1994/01/01. eng.
80. Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2001 Dec;17(6):261-5. PubMed PMID: 11722751. Epub 2001/11/28. eng.

**Original Research****Heat delays skin wound healing in mice****Marco Aurélio dos Santos-Silva<sup>1</sup>, Eduardo Tavares Lima Trajano<sup>2</sup>,  
Fernanda Seabra Schanuel<sup>1</sup> and Andréa Monte-Alto-Costa<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Tissue Repair Laboratory, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro 20950-003, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory Biomorphology and Experimental Pathology, Severino Sombra University (USS), Vassouras, Rio de Janeiro 27700-000, Brazil  
Corresponding author: Andréa Monte-Alto-Costa. Email: amacosta@uerj.br**Abstract**

*In vivo* studies have shown that the combination of infrared radiation (IR) and visible light (VIS) is responsible for the activation of metalloproteinases, causing matrix degradation and damage to healthy skin. However, the role of heat originating from the VIS spectrum on wound healing remains poorly understood. Our objective was to investigate the macroscopic, microscopic and biochemical effects of heat induced by visible light on cutaneous wound healing in mice. Male mice were anesthetized, subjected to a cutaneous excisional wound and divided into two groups ( $n = 10/\text{group}$ ) exposed to 23°C or 43°C in a thermal chamber for 30 min every other day, for 13 days. On day 14, the animals were sacrificed, and their lesions were processed for histochemistry, immunohistochemistry and protein expression analysis. The wound area was 42% greater 11 days ( $p < 0.01$ ) and 29% greater 14 days ( $p < 0.001$ ) after wounding in the 43°C group than in the 23°C group. The 43°C group presented a lower (17%) percentage of reepithelialized wounds ( $p < 0.001$ ) 14 days after wounding. The length of the epidermal gap was greater in the 43°C group ( $p < 0.01$ ). The volume density of myofibroblasts and the number of F4/80-positive macrophages was greater in the 43°C group ( $p < 0.05$ ). The 43°C group showed increased protein expression of type III collagen ( $p < 0.001$ ), decreased protein expression of type I collagen ( $p < 0.05$ ), increased MMP-1 expression ( $p < 0.05$ ), and decreased MMP-2 activity ( $p < 0.001$ ). The protein expression of fibrillin-1 ( $p < 0.001$ ), MMP-12 ( $p < 0.05$ ), TGF- $\beta$  1/2/3 ( $p < 0.01$ ) and ERK activation ( $p < 0.05$ ) was increased in the 43°C group. Our results suggest that heat delays the stages of wound healing in mice.

**Keywords:** Heat, skin, wound healing, mice, extracellular matrix**Experimental Biology and Medicine 2016; 0: 1–9. DOI: 10.1177/1535370216675066****Introduction**

The skin acts primarily as a protective barrier against the environment. The loss of the integrity of large skin portions as a result of a lesion can lead to severe disability or even death.<sup>1</sup> Cutaneous wound healing is a dynamic process that includes inflammation, granulation, tissue formation, and tissue remodelling.<sup>2,3</sup> After injury, fibroblasts proliferate and migrate to deposit a rich matrix in the lesion area. A proportion of these fibroblasts differentiate into myofibroblasts, which are responsible for wound contraction.<sup>4</sup> Thus, the process of wound healing can be affected when the activities of dermal fibroblasts and myofibroblasts are compromised by systemic and environmental factors. Although studies indicate that local and systemic factors may impair wound healing,<sup>5</sup> the effects of heat on cutaneous wound healing are not well understood.

Solar radiation (SR) is essential for life on Earth; however, it is a major environmental risk factor for living organisms. The involvement of the ozone layer exposes South Australia, New Zealand and South America to high concentrations of

SR.<sup>6</sup> The sunlight spectrum on the Earth's surface is 290–3000 nm and is 6.8% ultraviolet radiation (UV) (UVB: 290–320 nm and UVA: 320–400 nm), 38.9% visible light (VIS: 400–760 nm) and 54.3% near-infrared radiation (IRA: 760–1440 nm, IRB: 1440–3000 nm and IRC: 3000 nm to 1 mm).<sup>7</sup> UV radiation-induced effects on the skin include solar elastosis, keratosis, skin cancer, and photo ageing.<sup>8</sup>

Although most studies about the adverse effects on the skin involve SR and UV radiation,<sup>9,10</sup> the skin can be exposed to a dose of 75 J/cm<sup>2</sup>/h of IR in the summer in Munich, Germany.<sup>11</sup> Skin temperature varies between 27.6°C and 33.1°C; while IRA penetrates into the subcutaneous tissue without raising the temperature of the skin, IRB and IRC are absorbed into the epidermal layers and increase the temperature up to 45°C.<sup>12–14</sup> Studies have shown that high doses of IR can damage human skin,<sup>15–18</sup> whereas lower doses are widely used for the treatment of inflammatory processes.

Recent studies indicate that exposure of human skin to IR stimulates the expression of matrix metalloproteinase



(MMP-1), decreases type I procollagen, increases neoangiogenesis, and induces the infiltration of inflammatory cells and DNA oxidative stress.<sup>12,19</sup> A study comparing the effect of heat with and without IRA on the healing of skin wounds in rats showed that isolated heat delayed the closure of skin wounds.<sup>20</sup> Heat increases the expression of MMP-1, MMP-3, MMP-12 and modulates the synthesis of elastin and fibrillin.<sup>21,22</sup>

In contrast to UV radiation and IR, which are known to facilitate the cutaneous photo ageing and formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS), the possible similar effects of VIS on human skin are poorly characterized. Vandersee and colleagues showed that VIS can produce free radicals and ROS in human skin through radiation with blue-violet light.<sup>23</sup> *In vivo* studies have shown that the combination of IR and VIS is responsible for the activation of MMPs, causing matrix degradation and damage to healthy skin.<sup>23</sup> However, the role of heat from the VIS spectrum remains poorly understood in wound healing. However, some studies have shown that a slight increase in the room temperature may improve wound healing in diabetic patients (associated with electrical stimulation)<sup>24</sup> and *in vitro* studies suggest that an increase in temperature may accelerate the wound healing process, by accelerating fibroblast migration.<sup>25</sup> Therefore, due to this controversy in the literature and to the lack of clear evidence from animal models, the aim of this study was to investigate the macroscopic, microscopic, and biochemical effects of heat induced by visible light on the healing of excisional skin lesions in mice.

## Materials and methods

### Animals

Male Swiss mice aged 8–10 weeks (25–35 g) had free access to food and water and were maintained in a room at 23°C and with a 12-h light/dark cycle. All procedures were performed in accordance with the Brazilian legislation regarding animal experimentation (no. 11.794, from October 8, 2008). This study was approved by the Ethical Committee for Animal Use of the State University of Rio de Janeiro (CEA/022/2014).

### Heat exposure chamber

Heat exposure was conducted in a wooden box that was 15 mm thick<sup>26</sup> with the indicated external (52 cm long, 24 cm wide and 21 cm high) and internal (42.5 cm long, 21.5 cm wide and 18.8 cm high) dimensions. The temperature was controlled by a rotary dimmer (Pratis-Pial Legrand, São Paulo, Brazil) coupled to two incandescent bulbs (100 W) (Philips Standard, 100 W, 127 v, Barueri, Brazil). The temperature of 43°C and the time of exposure were chosen based on the study of Shin et al.<sup>27</sup> In a pilot study (data not shown), we performed daily exposure to heat during the first three days only. In the pilot study as well as in the present study, heat exposure delayed closure of skin wounds.

### The measurement of the intensity of visible light

The intensity of visible light was measured with a spectrometer (Ocean Optics Red Tide 650, average of 50 scans, USA). This lamp has a colour temperature of 2700 K. The luminous flux of 1350 lm and average lux were assessed every 5 min for 30 min and were  $35.5 \pm 0.4$  lux (Digital light meter – Minipa MLM-1332). To measure the temperature and humidity inside and outside of the box, a digital thermo-hygrometer was employed (INCOTERM, Porto Alegre, Brazil).

### Temperature measurement

The skin surface temperature was measured using a non-contact thermometer<sup>28</sup> (OEM, Mainland, China) before the heating process and at 5-min intervals thereafter.

### Experimental design

Mice ( $n = 20$ ) were intraperitoneally anesthetized with ketamine (150 mg/kg b. wt.) and xylazine (15 mg/kg b. wt.). The hair on the back of the mice was shaved. Using a template, a square (1 cm<sup>2</sup>) was drawn on the animal's back and a full-thickness excisional wound was created, using scissors, with the excision of the epidermis, dermis and hypodermis, exposing the panniculus carnosus.<sup>29</sup> The wound was not sutured or covered and healed by second intention (does not have its margins approximated by sutures). After the injury, the animals were divided as follows: the 23°C group ( $n = 10$ ) – the mice were placed in the exposure chamber with the lamps turned off for 30 min; and the 43°C group ( $n = 10$ ) – the mice were exposed to 43°C in the heat exposure chamber for 30 min. For exposure to heat, the two lamps were lit to full power until an internal temperature of 43°C was reached, and then the power was reduced to stabilize the temperature. When the temperature was stable, the animals were placed in the heat exposure chamber for 30 min. Exposure to heat started on the first day after the injury and lasted for 13 days, with exposure occurring every other day.<sup>27</sup>

### Macroscopic analyses

To evaluate wound contraction and reepithelialization (macroscopically), immediately after wounding and 3, 7, 11 and 14 days later, a transparent plastic sheet was placed over the wound, and the lesion's margins were traced.<sup>30</sup> The wound area was measured using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The results were expressed as a percentage of the original wound area (mean  $\pm$  standard mean error). The percentage of reepithelialized wounds was estimated by the number of closed wounds per group 14 days after wounding.

### Tissue harvesting and microscopic analyses

Fourteen days after wounding, the mice were killed by CO<sub>2</sub> exposure. Five lesions and adjacent normal skin per group were collected, fixed in formalin (pH 7.2) and embedded in paraffin. The paraffin-embedded sections were stained with haematoxylin-eosin to analyze the wound area and the

length of the epidermal gap. Lesions from five animals per group were collected and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  for each group. The frozen lesions were macerated in lysis buffer, and the total protein concentration was determined using a bicinchoninic acid protein assay (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, USA). The lysate was used to perform immunoblotting.

Sections ( $5\mu\text{m}$  thick) were stained with haematoxylin-eosin to measure the epidermal gap, which is defined as the distance in micrometres ( $\mu\text{m}$ ) between the edges of the lesion. For this, the slides were digitized using a Panoramic Digital Slide Scanner (3DHitech Ltd., Budapest, Hungary). The length of the epidermal gap was measured using Panoramic Viewer software (3DHitech Ltd., Budapest, Hungary).

To analyze cell density, scanned images were used. A stereological tool (point counting) was employed as previously described by our group.<sup>31</sup>

#### Immunohistochemistry and quantification

Immunohistochemistry was used to investigate the numbers of neutrophils (myeloperoxidase) and macrophages (F4/80). The following antibodies were used: rat monoclonal to myeloperoxidase (#71674; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:500) and rat monoclonal to F4/80 (#497; Serotec Inc., Raleigh, NC, USA; 1:500), as previously described.<sup>32,33</sup> To quantify the number of immunostained cells, five random fields per animal ( $14,978\mu\text{m}^2$ ) were analyzed as previously described.<sup>32,33</sup> The results were presented as cells per  $\text{mm}^2$ .

Quantification of myofibroblasts was performed using sections immunolabelled with mouse monoclonal antibody to  $\alpha$ -smooth muscle actin (#0851; DAKO, Carpinteria, CA, USA; 1:100) and the anti-mouse EnVision System (#4001; DAKO; 1:20), as previously described.<sup>34</sup> The volume density of myofibroblasts was evaluated using point counting and a video microscopic system, as previously described.<sup>32,35,36</sup> The results were presented as the volume density of myofibroblasts ( $V_{V(31)}$ ).

#### Immunoblotting

Five lesions per group were collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen lesions were macerated in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 138 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 0.025% phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After centrifugation, the total protein concentration was determined using a bicinchoninic acid protein assay (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, USA). Proteins (30 or 50  $\mu\text{g}$ ) were resolved by 8 or 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels (SDS) and were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Protein molecular weight standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were included. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in powder form (Nestlé, São Paulo, Brazil) dissolved in phosphate buffer containing 0.05% Tween-20 and were probed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with rabbit anti-type I collagen precursor (Col-1 p) (Millipore, Temecula, CA, USA,

1:1000), mouse anti-type III collagen (Col-3) (Millipore, 1:600), mouse anti-MMP-1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), goat anti-fibrillin-1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), rabbit anti-MMP-12 (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), rabbit anti-precursor transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1/2/3 antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), rabbit anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), and mouse anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). The membranes were then washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse (1:100) (DAKO), anti-goat (1:200) or anti-rabbit (1:500) secondary antibodies, all from Santa Cruz Biotechnology. Bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (Santa Cruz Biotechnology). For chemiluminescence detection, the ChemiDoc MP system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) was used. Subsequently, the membranes were stripped and reprobed with a mouse anti- $\beta$ -actin antibody (42 kDa, Sigma-Aldrich). The bands were quantified by densitometry analysis, which was performed using Adobe Photoshop version 7.01 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA), and the results were expressed as arbitrary units.

#### Zymography

The gelatinase activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was analyzed by zymography in five samples of frozen scar tissue per group, as described previously.<sup>37</sup> Frozen fragments of each wound were placed in 1 mL of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 138 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mg/mL leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), macerated and centrifuged at 3.864 g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The lysates were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Twenty micrograms of protein from each lysate was resolved on an 8% SDS-polyacrylamide resolving gel containing 1 mg/mL gelatin (Sigma-Aldrich) layered with a 4% SDS-polyacrylamide stacking gel. Lysate from a human placenta was used as a positive control for gelatinolytic activity.<sup>38</sup> Protein molecular weight standards (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) were included for molecular weight estimation. Following protein separation, the gels were washed in 2.5% Triton X-100 and incubated in development buffer, pH 8.4 (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and 2 mM  $\text{ZnCl}_2$ ), for 12 h at  $37^{\circ}\text{C}$  without agitation. The gels were then stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R solution for 30 min and then destained (50% methanol, 10% glacial acetic acid, and 40% distilled water) to obtain a contrast between the gelatinolytic bands and the gel background. Images captured with the ChemiDoc MP system (Bio-Rad Laboratories) were used for detection. Densitometry was performed on the scanned images using Adobe Photoshop software version 7.01 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA), and the results were expressed as arbitrary units.

#### Statistical analysis

The values for all measurements are expressed as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). Analysis of the data was performed using repeated measures ANOVA (Geisser-Greenhouse) with Dunn's post test for wound

closure and unpaired *t*-test for the other parameters, with  $p < 0.05$  as the least significant level. InStat GraphPad software was used to perform the statistical analysis (GraphPad InStat version 6.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### Heat exposure delays wound healing and reepithelialization

During the exposure period, the temperature and humidity of the chamber were constant (online Supplementary Figure 1). The light used to heat the chamber was visible light with a maximum spectral emission between 614–628 and 661–677 nm. The emission spectrum can be seen in online Supplementary Figure 2.

The average mouse body temperature before exposure was  $31.8 \pm 0.31^\circ\text{C}$  and during the exposure to  $43^\circ\text{C}$  peaked at  $33.5 \pm 0.19^\circ\text{C}$  in 30 min. Five minutes after exposure to  $43^\circ\text{C}$  for 30 min, the mouse body temperature was  $32.3 \pm 0.09^\circ\text{C}$  (online Supplementary Figure 3).

To investigate the effects of heat on wound healing, we analyzed the area of the wound, reepithelialization and epidermal gap length. The  $43^\circ\text{C}$  group lesions showed 42% and 29% increases in area 11 ( $p < 0.01$ ) and 14 ( $p < 0.001$ ) days after wounding, respectively, compared with the  $23^\circ\text{C}$  group (Figure 1(a) and (b)).

The percentage of reepithelialized wounds was reduced in the  $43^\circ\text{C}$  group (Figure 1(c)). When reepithelialization was measured, we verified that the percentage of reepithelialized wounds in the  $43^\circ\text{C}$  group was decreased by 17% ( $p < 0.001$ ) compared with the  $23^\circ\text{C}$  group, indicating incomplete reepithelialization 14 days after wounding (Figure 1(d)). Furthermore, the  $43^\circ\text{C}$  group showed an increased epidermal gap length compared with the  $23^\circ\text{C}$  group ( $p < 0.01$ ) 14 days after wounding (Figure 1(e)).

### Heat exposure increases the number of myofibroblasts and macrophages

The number of cells was evaluated 14 days after the injury to analyze the granulation of tissue; both groups showed similar numbers of inflammatory cells (Figure 2(a)). The  $43^\circ\text{C}$  group had a higher volume density of myofibroblasts ( $p < 0.01$ ) (Figure 2(b)), a similar number of MPO-positive neutrophils (Figure 2(c)), and a greater number of F4/80-positive macrophages ( $p < 0.05$ ) compared with the  $23^\circ\text{C}$  group (Figure 2(d)).

### Effect of heat exposure on the components of the extracellular matrix in the wound healing area

To investigate the influence of heat on the expression of extracellular matrix proteins during wound healing, the protein expression of TGF- $\beta$  1/2/3, type I and III collagen, and MMP-1, and MMP-2 gelatinolytic activity was investigated. The protein expression of TGF- $\beta$  1/2/3 was greater in the  $43^\circ\text{C}$  group ( $p < 0.01$ ) than in the  $23^\circ\text{C}$  group 14 days after injury (Figure 3(a)). Fourteen days after wounding, the  $43^\circ\text{C}$  group presented increased expression of type III collagen ( $p < 0.001$ ) and decreased expression of type I

collagen ( $p < 0.05$ ) compared with the  $23^\circ\text{C}$  group (Figure 3(b)). This result corresponds with the increase in MMP-1 expression ( $p < 0.05$ ) and the reduction of MMP-2 activity ( $p < 0.001$ ) observed in the  $43^\circ\text{C}$  group compared with the  $23^\circ\text{C}$  group (Figure 3(c) and (d)), indicating an imbalance between degradation and collagen deposition 14 days after wounding.

To investigate the effect of heat exposure on the elastic components of the extracellular matrix, we analyzed the expression of fibrillin-1, a component of elastic fibres, and MMP-12, an elastase. The expression of fibrillin-1 ( $p < 0.001$ ) and MMP-12 ( $p < 0.05$ ) increased in the  $43^\circ\text{C}$  group compared with the  $23^\circ\text{C}$  group (Figure 3(e) and (f)). Our results suggest that the increased production of fibrillin-1 induced by heat may have contributed to the accumulation of elastic material in the extracellular matrix of the wound area.

### Heat induces the activation of ERK mitogen-activated protein kinase pathways

The expression of MMPs is associated with the coordinated activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Thus, we investigated ERK activation by exposure to heat. Fourteen days after wounding, the  $43^\circ\text{C}$  group showed increased activation of pERK compared with the  $23^\circ\text{C}$  group ( $p < 0.05$ ) (Figure 4).

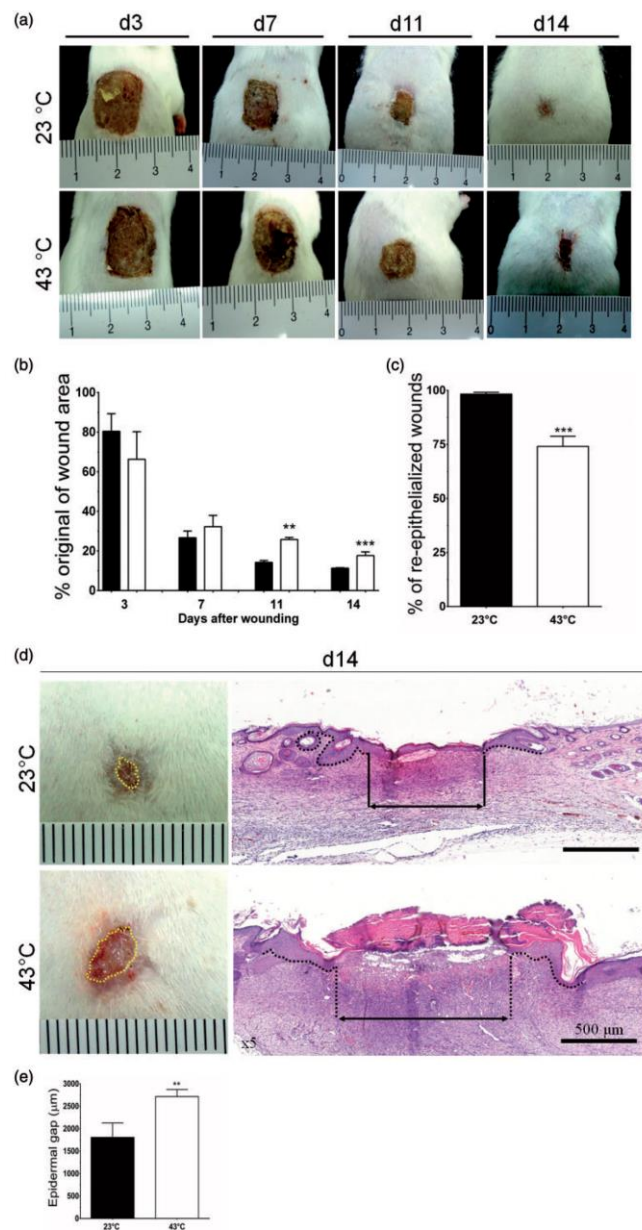
## Discussion

The role of heat produced by the visible light spectra during wound healing is not clear. In 2012, the production of ROS, pro-inflammatory cytokines, and MMP-1 expression in human skin after visible light exposure was reported.<sup>39</sup> Another study showed that exposure to approximately  $27^\circ\text{C}$  delayed the healing of cutaneous wounds in rats compared with the rats exposed to  $27^\circ\text{C}$  added to the infrared radiation.<sup>20</sup> Our study showed that exposure to  $43^\circ\text{C}$ , achieved by exposure to visible light, delayed the closure of wounds 11 and 14 days after injury.

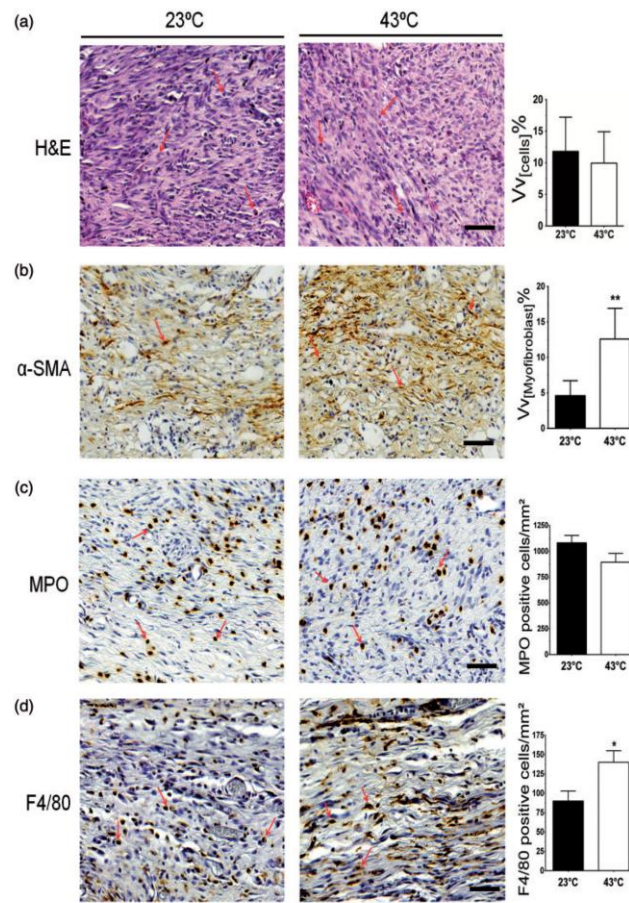
It is possible that heat plays a role during the inflammatory stage of cutaneous tissue repair. After skin injury, neutrophils are attracted to the wound site, followed by macrophages.<sup>40</sup> Neutrophils are more active in the early stages of inflammation, and in the absence of infection, the infiltration of neutrophils ceases within a few days.<sup>2</sup> The number of neutrophils in granulation tissue was similar in the mice exposed to  $27^\circ\text{C}$  and the mice exposed to  $27^\circ\text{C}$  associated with infrared radiation.<sup>20</sup> In our research, we observed a similar number of MPO-positive neutrophils, regardless of the temperature, indicating that the heat did not influence the action of neutrophils during wound healing.

Additionally, macrophages release TGF- $\beta$  during the inflammatory phase, which attracts fibroblasts to the area of injury, initiating the formation of granulation tissue, thus playing an essential role in the transition between inflammation and fibroplasia<sup>41</sup> and accelerating wound healing.<sup>42</sup> However, the permanence of macrophages in the later stages of tissue repair indicates delayed healing. In our study, we observed an increase in the number of F4/80-positive macrophages and the extent of TGF- $\beta$  1/2/3





**Figure 1** Macroscopic analysis of wound healing in heat-exposed mice. (a) Photographs of the wounded mice exposed to 23°C and 43°C at 3, 7, 11, and 14 days after wounding. (b) Percentage of original wound area at 3, 7, 11, and 14 days after wounding (graphical representation). (c) Percentage of reepithelialized wounds 14 days after wounding (graphical representation). (d) Representative images of the epidermal gap in the 23°C and 43°C groups 14 days after wounding. Left, macroscopic images; the dotted line represents the border of the non-reepithelialized region. Right, histological images of the epidermal gap. The area between the lines represents the epidermal gap. Hematoxylin-eosin, bar = 500 µm. (e) Epidermal gap 14 days after wounding (graphical representation). Data ( $n = 10$  per group) are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared between the 23°C vs 43°C groups (non-parametric repeated measures ANOVA with Dunn's post test for wound area, and unpaired  $t$ -test for percentage of reepithelialized wounds and epidermal gap). (A color version of this figure is available in the online journal.)



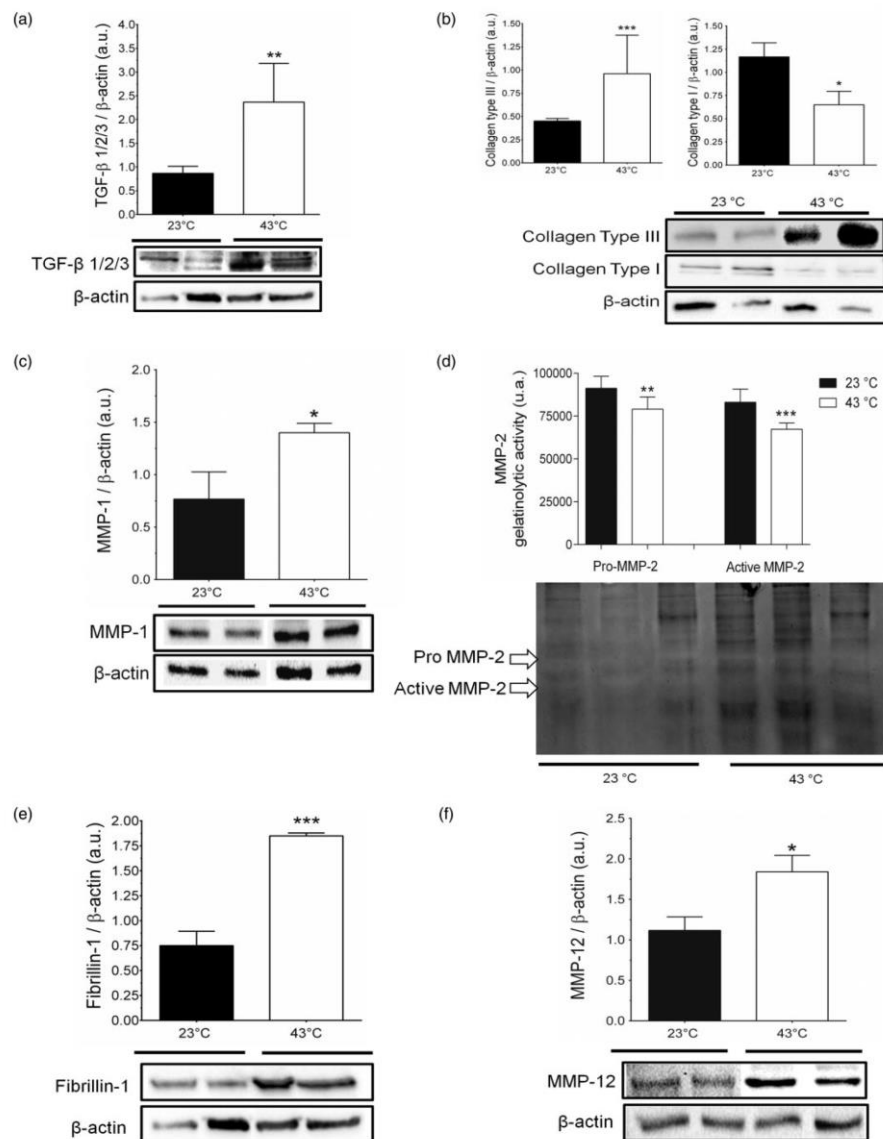
**Figure 2** Microscopic analysis of wound healing on heat-exposed mice. (a) Volume density of inflammatory cells ( $V_v$  %) in the wound area 14 days after wounding. (b) Stereological analysis showing the volume density of myofibroblasts ( $V_v$  %) in the  $\alpha$ -SMA-positive myofibroblasts in the wound area 14 days after wounding. (c) MPO-positive neutrophils and (d) F4/80-positive macrophages in the wound area 14 days after wounding. Data ( $n = 6$  per group) were expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared between the 23°C vs 43°C groups (Unpaired  $t$  test). Bar = 50  $\mu$ m. (A color version of this figure is available in the online journal.)

protein expression in the 43°C group compared with the 23°C group 14 days after injury.

The proliferative phase is characterized by the migration of fibroblasts to the site of injury, to synthesize and deposit collagen to form new tissue or scar tissue.<sup>43,44</sup> Toyokawa et al. showed an increase in fibroblast infiltration in mice exposed to IR associated with 27°C exposure up to seven days post wounding.<sup>20</sup> An increase in the expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 24 hours after heating the skin of the buttocks to 43°C for 90 min was observed in another study.<sup>45</sup> During the remodelling phase, extracellular matrix synthesis is reduced, and the majority of endothelial cells, myofibroblasts and macrophages die by apoptosis to reduce the cellularity of the granulation tissue.<sup>4,44</sup> Fourteen days after injury, myofibroblasts of the 43°C

group showed a higher bulk density and a higher number of F4/80-positive macrophages than the 23°C group; this is a feature typical of a delayed wound healing process.

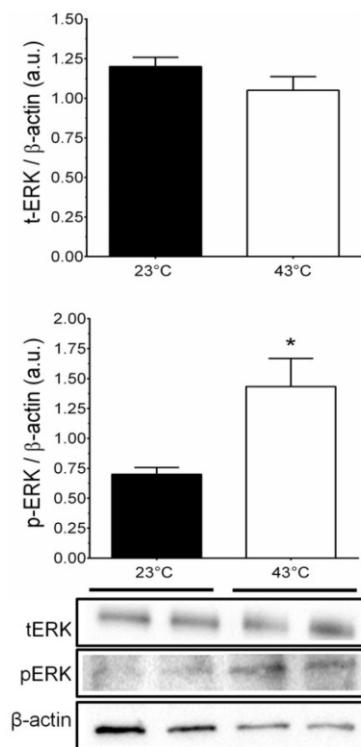
Throughout the remodelling phase, type III collagen, a major component of granulation tissue, is gradually replaced by type I collagen, the main dermal protein.<sup>43</sup> Exposure to temperatures of 41°C for 1 h twice a week increases collagen production in healthy skin,<sup>46</sup> whereas pulse exposure to 45°C and 60°C increases the regulation of procollagen type I and III in human dermal fibroblasts.<sup>47</sup> This process is dependent on MMPs secreted by macrophages, endothelial cells and fibroblasts, whose activity is controlled by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).<sup>1,4</sup> Normal tissue repair requires a balance between



**Figure 3** Collagen and MMP expression and activity during wound healing in heat-exposed mice. (a) Protein expression of TGF- $\beta$ 1/2/3. (b) Protein expression of type III collagen and type I collagen. (c) Protein expression of MMP-1. (d) Activity of MMP-2 by a zymographical assay of matrix metalloproteinase (MMP-2). (e) Protein expression of fibrillin-1 and (f) MMP-12. Densitometry expressed as arbitrary units (a.u.) for immunoblotting of TGF- $\beta$ 1/2/3 (47 kDa), type I collagen (70–90 kDa), type III collagen (138 kDa), MMP-1 (52 kDa), fibrillin-1 (330–350 kDa) and (f) MMP-12 (59 kDa) and the zymographical assay of MMP-2.  $\beta$ -Actin (42 kDa) was used as a constitutive protein for normalization. Data ( $n = 5$  per group) were expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared between the 23°C vs 43°C groups (unpaired t-test)

the activity of MMPs and TIMPs.2-Our study showed that 14 days after injury, exposure to 43°C increased the expression of type III collagen and decreased the expression of type I collagen.

There is no consensus on whether IR or the heat generated by IR can induce the activation of MMPs. Shin et al. demonstrated that healthy hairless mice exposed to 43°C for 15 or 30 min for 6 weeks showed increased



**Figure 4** ERK during wound healing in heat-exposed mice. Protein expression of pERK (42–44 kDa).  $\beta$ -Actin (42 kDa) was used as a constitutive protein for normalization. Data ( $n = 5$  per group) were expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared between the 23°C vs 43°C groups (unpaired  $t$ -test)

MMP-13 expression but unchanged MMP-2 and MMP-9 expression.<sup>27</sup> We observed that heat increased MMP-1 expression and reduced MMP-2 activity. These findings suggest that the heat activated MMP-1, causing degradation products of type I collagen. Type I collagen degradation products were consumed by the gelatinase activity of MMP-2.

Elastin, which contributes to the elasticity of the skin, reappears at the end of the remodelling phase; however, scar tissue does not have the same elastic properties as healthy tissue.<sup>4,43</sup> Heat from sunlight modulates the synthesis of tropoelastin, elastin, and fibrillin-1, resulting in the development of solar elastosis. Fibrillin-1 expression increases in the dermis of aged skin. While the gene expression of fibrillin-1 decreases with acute heat exposure, it increases with chronic exposure in cultured fibroblasts of human skin. Heat increases the expression of the fibrillin-1 gene in the epidermis while reducing its expression in the dermis, which leads to a set of abnormal elastic fibres.<sup>21</sup> In our study, we observed increased protein expression of fibrillin-1 and MMP-12 in the mice exposed to 43°C 14 days after wounding.

Previous studies have shown the relationship between the expression of MMP-1 and MAPK activation. Park et al. observed that heat increases the gene and protein expression of MMP-1 and MMP-3, but not MMP-2, by ERK pathway activation via an IL-6 dependent autocrine mechanism.<sup>22</sup> We observed that the mice exposed to 43°C heat showed increased protein expression of phosphorylated ERK 14 days after wounding.

In conclusion, we have shown that heat delayed the healing of skin wounds in mice. This delay was characterized by an increase in the wound area and the gap associated with a reduction of the reepithelialized area. Our findings suggest a possible role of heat in the imbalance between the deposition and the degradation of collagen and elastic fibres in the extracellular matrix.

**Authors' contribution:** MASS designed the experiments, conducted the research, analyzed the data and wrote the manuscript; ETLT and FSS conducted the research and analyzed the data; AMAC designed the experiments, analyzed the data, critically revised and reviewed the manuscript for important intellectual content.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr CE Fellows from Federal Fluminense University for the excellent technical assistance in determining the irradiation spectral range.

#### DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### FUNDING

This work was supported by grants from the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) and Foundation Carlos Chagas Filho Research of the Rio de Janeiro State (FAPERJ). Santos-Silva, MA holds a fellowship from CAPES.

#### REFERENCES

- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999;**341**:738–46
- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;**25**:9–18
- Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012;**49**:35–43
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;**453**:314–21
- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;**89**:219–29
- Yamamoto T, Akiyoshi H, Yoshikiyo K, Takahashi T, Tanabe, Kudoh Y, Kudoh S, Imura S, Yamamoto N. A spectroscopic study on the effect of ultra-violet solar radiation in Antarctica on the human skin fibroblast cells. *Geosci Frontier* 2013;**4**:647–53
- Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;**19**:228–34
- MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:92–6



9. Norval M, Halliday GM. The consequences of UV-induced immunosuppression for human health. *Photochem Photobiol* 2011;**87**:965–77
10. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci* 2013;**12**:54–64
11. Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J. Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002;**119**:1323–9
12. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, Chung JH. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J Investigat Dermatol Symp Proc/the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 2009;**14**:15–9
13. Kleesz P, Darlenski R, Fluhr JW. Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects. *Skin Pharmacol Physiol* 2012;**25**:25–33
14. Shin MH, Moon YJ, Seo JE, Lee Y, Kim KH, Chung JH. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med* 2008;**44**:635–45
15. Darwin ME, Haag SE, Meinke MC, Sterry W, Lademann J. Determination of the influence of IR radiation on the antioxidative network of the human skin. *J Biophotonics* 2011;**4**:21–9
16. Krutmann J, Morita A, Chung JH. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J Invest Dermatol* 2012;**132**:976–84
17. Schroeder P, Calles C, Benesova T, Macaluso E, Krutmann J. Photoprotection beyond ultraviolet radiation—effective sun protection has to include protection against infrared A radiation-induced skin damage. *Skin Pharmacol Physiol* 2010;**23**:15–7
18. Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L. The missing link—light-induced (280–1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2009;**22**:31–44
19. Kim MS, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Age Dev* 2006;**127**:875–82
20. Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya H, Teshima S, Nakanishi H, Kwon AH, Azuma Y, Nagaoka T, Ogawa T, Kamiyama Y. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;**228**:724–9
21. Chen Z, Seo JY, Kim YK, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Heat modulation of tropoelastin, fibrillin-1, and matrix metalloproteinase-12 in human skin in vivo. *J Investigat Dermatol* 2005;**124**:70–8
22. Park CH, Lee MJ, Ahn J, Kim S, Kim HH, Kim KH, Eun HC, Chung JH. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *J Invest Dermatol* 2004;**123**:1012–9
23. Vandersee S, Beyer M, Lademann J, Darwin ME. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. *Oxidat Med Cell Longevity* 2015;**2015**:579675
24. Lawson D, Petrofsky JS. A randomized control study on the effect of biphasic electrical stimulation in a warm room on skin blood flow and healing rates in chronic wounds of patients with and without diabetes. *Med Sci Monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2007;**13**:CR258–63
25. Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society* 2009;**7**:90–103
26. Alvarenga ES, Saliba WA, Milagres BG. Montagem de câmara com lâmpada de ultravioleta de baixo custo. *Quim Nova* 2005;**28**:927–8
27. Shin MH, Seo JE, Kim YK, Kim KH, Chung JH. Chronic heat treatment causes skin wrinkle formation and oxidative damage in hairless mice. *Mech Age Develop* 2012;**133**:92–8
28. Mufti A, Coutts P, Sibbald RG. Validation of commercially available infrared thermometers for measuring skin surface temperature associated with deep and surrounding wound infection. *Adv Skin Wound Care* 2015;**28**:11–6
29. Cardoso JE, Souza BR, Amadeu TP, Valenca SS, Porto LC, Costa AM. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol* 2007;**35**:890–6
30. Romana-Souza B, Porto LC, Monte-Alto-Costa A. Cutaneous wound healing of chronically stressed mice is improved through catecholamines blockade. *Exp Dermatol* 2010;**19**:821–9
31. Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, Porto LC, Desmouliere A, Costa A. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract* 2003;**199**:469–73
32. Assis de Brito TL, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice. *Life Sci* 2014;**100**:138–46
33. Costa RA, Ruiz-de-Souza V, Azevedo GM Jr, Gava E, Kitten GT, Vaz NM, Carvalho CR. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound Repair Regen* 2011;**19**:487–97
34. Cardoso JE, Souza BR, Amadeu TP, Valenca SS, Porto LC, Costa AM. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol* 2007;**35**:890–6
35. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 1986;**142**:259–76
36. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TE, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;**96**:857–81
37. Varelias A, Cowin AJ, Adams D, Harries RH, Cooter RD, Belford DA, Fitrige RA, Rayner TE. Mitogenic bovine hyaluronate modulates matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 levels in chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2006;**14**:28–37
38. Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000;**66**:1127–37
39. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *J Invest Dermatol* 2012;**132**:1901–7
40. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 2007;**127**:1009–17
41. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 2011;**216**:753–62
42. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. *Lasers Surg Med* 1994;**15**:281–9
43. Darby IA, Laverdet B, Bonte F, Desmouliere A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 2014;**7**:301–11
44. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;**146**:56–66
45. Seo HR, Chung DY, Lee YJ, Lee DH, Kim JI, Bae S, Chung HY, Lee SJ, Jeoung D, Lee YS. Heat shock protein 25 or inducible heat shock protein 70 activates heat shock factor 1: dephosphorylation on serine 307 through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;**281**:17220–7
46. Mayes AE, Holyoak CD. Repeat mild heat shock increases dermal fibroblast activity and collagen production. *Rejuvenation Res* 2008;**11**:461–5
47. Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001;**17**:261–5

(Received April 28, 2016, Accepted September 15, 2016)



**ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ)**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/022/2014 sobre " **Papel da exposição térmica crônica durante reparo tecidual cutâneo: estudo do dano oxidativo e da matriz extracelular** ", sob a responsabilidade de **Andréa Monte Alto Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **28/01/2014**. Este certificado expira em **28/01/2018**.

Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 2014.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Patricia C. Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex C. Manhães  
CEUA/IBRAG/UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br

**ANEXO B** – Carta de submissão do artigo intitulado “*Heat induced by visible light promotes anti-aging effects in mice skin*” a revista Mechanism of Ageing and Development.

The screenshot displays the EVISE journal submission portal. The browser address bar shows the URL: [https://www.evise.com/evise/faces/pages/homepage/homepage.jspx?\\_adf.ctrl-state=mr93k6e3y\\_165](https://www.evise.com/evise/faces/pages/homepage/homepage.jspx?_adf.ctrl-state=mr93k6e3y_165). The page header includes the journal title "MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT" and the user name "Andrea Monte-Alto-Costa". A navigation menu shows "Home" and "Reports". A yellow notification banner states: "EVISE is experiencing intermittent issues and we are working on resolving these. Thank you for your patience." Under the "My Author Tasks" section, there is a "Start New Submission" button with the text "Click here to view your submissions with a final decision". The "My Submissions with Journal (1)" section lists one submission:

<a href="#">Heat induced by visible light promotes anti-aging effects in mice skin</a>	MAD_2016_129
Current status: With Journal (28/Nov/2016)	Article Type: Research Paper
	Initial submission : 28/Nov/2016

The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date and time: 06:27, 28/11/2016.


Esta tese contou com o suporte do projeto “Ensino integrado: assistência, docência e inovação em medicina laboratorial e saúde” do Edital Pró-Ensino em Saúde (024/2010) da CAPES, na forma de bolsa para o doutorando Marco Aurélio dos Santos Silva.

Esta linha de pesquisa no Ensino em Saúde visa permitir a integração maior entre a pós-graduação e o ensino em seus diversos níveis. Na Pós-graduação em Biologia Experimental alunos de mestrado e doutorado e recém doutores tem atuado em sinergia para produção de material didático, revisão e validação de metodologias de ensino, avaliação de aprendizado e de melhoria de desempenho no ambiente de ensino através de preceptoria, ensino a distância, teleconferências, telessaúde, chats e fóruns de discussão e de consulta ao especialista.

No ensino tradicional de Histologia a parte prática é realizada em microscópios de luz, entretanto esta metodologia oferece algumas desvantagens como, por exemplo, a necessidade de uma grande quantidade de lâminas iguais para atender a todos os alunos e os altos custos de manutenção dos microscópios e das coleções de lâminas. O objetivo do estudo no qual o autor desta tese participou foi comparar a microscopia tradicional com a microscopia digital, e utilizando a plataforma Moodle em um Ambiente Virtual de Aprendizagem criar uma nova forma de avaliação. Acreditamos que implementação da microscopia digital além de reduzir os custos de manutenção vai permitir o acesso dos alunos a um número maior de imagens e com maior qualidade.

Os resultados desta parte do projeto são apresentados no artigo submetido.

**ANEXO C** – Carta de submissão do artigo intitulado “*Digital microscopy implementation in histology course and comparison with conventional microscopy*” à revista Life Science Education.



The banner features a circular image of a biological network on the left. Text on the left side reads: 'PUBLISHED BY THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY' and 'EDITORIAL PARTNER THE GENETICS SOCIETY OF AMERICA'. On the right, 'LSE' is written in large white letters, with 'CBE—LIFE SCIENCES EDUCATION' below it in blue.

---

[HOME](#)      [AUTHOR INSTRUCTIONS](#)      [REVIEWER INSTRUCTIONS](#)      [HELP](#)

---

Submission Approved and Ready for Review (CBE-16-12-0338).

**Home Page for Dr. Andréa Monte-Alto-Costa**


**Author Tasks**

- [Author Instructions](#)
- [Submit Manuscript](#)
- [Live Manuscripts \(1\)](#)

**General Tasks**

- [Modify Unavailability Dates](#)
- [Modify Profile/Password](#)
- [Knowledge Base/Help](#)
- [Logout](#)

---

 eJournalPress

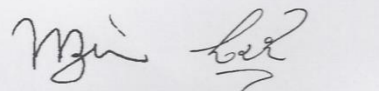
## ANEXO D – Mensão Honrosa



Certificamos que

o trabalho 22.004 - EXPOSIÇÃO TÉRMICA CRÔNICA ATRASADA REPARO TECIDUAL CUTÂNEO DE CAMUNDONGOS. Silva MAS, Costa AMA, - Depto de Histologia e Embriologia (DHE) - UERJ, foi contemplado com Menção Honrosa pela brilhante apresentação na

XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Hotel Gloria em Caxambu - MG, de 27 a 30 de agosto de 2014.

  
Comissão Organizadora

