



FABIANA DE SOUZA GOMES

**TOPICAL 5-AZACYTIDINE ACCELERATES SKIN
WOUND HEALING IN RATS**

**USO TÓPICO DE 5-AZACYTIDINE MELHORA A
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE
ROEDORES POR MEIO DO SISTEMA
ATIVINA/FOLISTATINA**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENFERMAGEM

FABIANA DE SOUZA GOMES

**TOPICAL 5-AZACYTIDINE ACCELERATES SKIN WOUND HEALING
IN RATS**

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pereira De Araujos

**USO TÓPICO DE 5-AZACYTIDINE MELHORA A CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS DE ROEDORES POR MEIO DO SISTEMA
ATIVINA/FOLISTATINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Enfermagem e Trabalho .

Master's dissertation presented to the Nursing Postgraduation Programme of the School of Nursing of the University of Campinas to obtain the MSc grade in Health Sciences.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA FABIANA DE SOUZA GOMES
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAUJO.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G585u Gomes, Fabiana de Souza, 1982-
 Uso tópico de 5- azacitidina melhora a cicatrização
de feridas cutâneas de roedores por meio do sistema
ativina/folistatina / Fabiana de Souza Gomes. --
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

 Orientador : Eliana Pereira de Araujo.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Enfermagem.

 1. Cicatrização de feridas. 2. 5-azacitidina. 3.
Folistatina. 4. Ativinas. 5. Enfermagem. I. Araujo, Eliana
Pereira de, 1965-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Topical 5-azacytidine accelerates skin wound healing in rats

Palavras-chave em inglês:

Wound healing

5-Azacytidine

Follistatin

Activins

Nursing

Área de concentração: Enfermagem e Trabalho

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Eliana Pereira de Araujo [Orientador]

Vanessa Cristina Arantes

Maria Helena de Melo Lima

Data da defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Enfermagem

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

FABIANA DE SOUZA GOMES

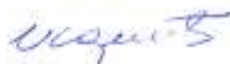
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO



2. PROF(A). DR(A). VANESSA CRISTINA ARANTES



3. PROF(A). DR(A). MARIA HELENA DE MELO LIMA



Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este momento a minha filha Jenifer, que entendeu minha ausência para que eu pudesse estar aqui. Durante este tempo crescemos juntas. É minha razão de querer superar os desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado minha vida, fazendo com que eu me encontrasse com pessoas tão especiais e que concluísse mais uma difícil, porém prazerosa etapa de vida.

A professora e orientadora Eliana, a quem admiro por seu conhecimento, por ter me recebido e confiado em mim. Sobretudo admiro pela humildade, amizade, pela orientação não apenas para o trabalho, mas para minha vida. É minha amiga, irmã e mãe.

Ao Professor Lício, que para mim é o maior exemplo de cientista. Apesar de tantos compromissos está sempre presente no laboratório e com muita paciência orienta e incentiva a todos. Exemplo de disciplina, humildade e dedicação. Se minha orientadora ao meu ver representa ser mãe, o professor Lício representa portanto um pai de todos nós alunos do laboratório.

A professora Maria Helena pela paciência, conversas e orientações. Pelos momentos divertidos que passamos.

Aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos.

Ao meu marido pela companhia, pelos finais de semana no laboratório me ajudando cuidar dos animais. Sobretudo agradeço a compreensão e ao amor.

A minha filha que tanto me ajudou cuidar dos animais, sempre com muito carinho para deixá-los confortáveis.

A Erika Anne, Gerson e Marcio, pela presença constante no laboratório. Sem vocês este trabalho não teria sido possível. Agradeço a competência e dedicação.

Aos amigos Lorena, Gabriela, Daniele, Carla, Ermilo, Rafael, Lucas, Gustavo, Rodrigo, Joseane, Flavia, Vanessa e tantos outros do laboratório que me acompanharam no dia a dia, me ensinaram e ajudaram. Agradeço principalmente a amizade e os momentos de descontração e alegria.

*A grande verdade é que você é a pessoa que escolhe ser.
Todos os dias você decide se continua do jeito que é ou muda.
A grande glória do ser humano é poder participar de sua
autocriação.*

Roberto Shinyashiki

RESUMO

O desenvolvimento de métodos que tem por objetivo acelerar e melhorar a qualidade do processo de cicatrização de feridas tem impacto positivo na condução de distúrbios de cicatrização associados a inúmeras condições médicas. Neste estudo, avaliamos os efeitos moleculares, celulares e clínicos da aplicação tópica de 5-azacitidina na cicatrização de feridas em ratos. De acordo com estudos pregressos, a 5-azacitidina reduz a expressão de folistatina, que é um regulador negativo das ativinas. Estas, por sua vez, promovem o crescimento de células em diferentes tecidos, incluindo a pele. Ratos Wistar machos com oito semanas de vida foram submetidos a um ferimento cutâneo com *punch* de oito milímetros na região dorsal. A seguir os ratos foram aleatoriamente separados em grupo controle (veículo) ou submetidos a aplicação tópica de 5-azacitidina (10 mM), uma vez por dia por até 12 dias, iniciando-se no terceiro dia após a lesão. A documentação fotográfica e coleta de amostras ocorreram nos dias 5, 9 e 15. O emprego desta droga resultou em aceleração da cicatrização da ferida, ($99,7 \pm 7,0\%$ versus $71,2 \pm 2,8\%$ no dia 15, $p < 0,01$). Este resultado clínico foi acompanhado pela redução de aproximadamente três vezes na expressão proteica de folistatina. O exame histológico da pele revelou re-epitelização eficiente com aumento da expressão de queratinócitos e aumento significativo na expressão do gene de TGF- β além da diminuição significativa de citocinas, tais como TNF- α e IL-10. Analisamos também a proliferação celular na lesão de pele através do método de incorporação de BrdU. O número de células positivas para BrdU aumentou significativamente quando comparado ao controle. No entanto, quando folistatina exógena foi aplicada na pele em paralelo ao tratamento tópico de 5-azacitidina a maioria dos benefícios do medicamento foi perdida. Assim, 5-azacitidina atua, pelo menos em parte, através da via folistatina/ativina para melhorar a cicatrização de feridas em ratos. Este trabalho pertence a linha de pesquisa Processo de Cuidar em Saúde e Enfermagem.

Descritores: cicatrização de feridas; folistatina; ativinas; 5-azacitidina; enfermagem.

ABSTRACT

The development of new methods aimed at improving wound healing may have an impact on the outcomes of a number of medical conditions. Here we evaluate the molecular and clinical effects of topical 5-azacytidine, a compound used in myelodysplasia, on the wound healing in rats. According to previous studies, 5-Azacytidine decreases the expression of follistatin 1, which is a negative regulator of activins. Activins, in turn, promote cell growth in different tissues, including the skin. Eight-week old male Wistar rats were submitted to an 8 mm punch-wound in the dorsal region. After three days, rats were randomly assigned to either control or topical application of a solution containing 5-azacytidine (10mM), once a day. Photo documentation and collection of samples occurred at days 5, 9 and 15. Overall, 5-azacytidine resulted on a significant acceleration of complete wound healing ($99.7\% \pm 0.7.0$ vs. $71.2\% \pm 2.8$ on days 15; $n=10$; $p<0,01$). This was accompanied by an up to 3-fold reduction in follistatin expression. Histological examination of the skin revealed efficient reepithelization with increase in gene expression of TGF- β and keratinocytes markers, involucrin and citokeratin, besides the significant decrease of cytokines such as TNF- α and IL-10. In addition, we analyzed cell proliferation in injured skin employing the BrdU incorporation method. The treatment with 5-azacytidine led to a progressive increase of BrdU positive cells. Finally when recombinant follistatin was employed in the skin in parallel to topical 5-azacytidine most of the benefits of the drug were lost. Thus, 5-azacytidine acts, at least in part, through the follistatin/activin pathway to improve wound healing in rats. This study belongs to online research process Caring in Nursing and Health.

Key words: wound healing; follistatin; activins; 5-azacytidine; nursing.

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
Baba	homodímeros ativina A
Babb	heterodímero ativina AB
bbbb	homodímeros ativina B
BrdU	5-Bromo-20-Desoxiuridina
CEMIB	Centro de Bioterismo da UNICAMP
DM	Diabetes Mellitus
ECM	Matriz Extra Celular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	endoplasmatic-reticulum Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio folículo estimulador

IL1	Interleucina 1
JNK	c-jun amino terminal Kinase
MDS	Síndrome Mielodisplásica
PCR	Reação em cadeia de polimerase
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrílamida com dodecil sulfato de sódio
TGF-β	Fator de Crescimento e Diferenciação Transformador β

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 1.....	27
FIGURA 2.....	28
FIGURA 3.....	29
FIGURA 4.....	30

SUMÁRIO

Página

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	32
3. CAPÍTULO 1.....	33
Artigo: Topical 5-azacytidine accelerates skin wound healing in rats.	
4. CONCLUSÃO GERAL.....	52
5. REFERÊNCIAS.....	53
6. ANEXO	59

INTRODUÇÃO

A pele forma a cobertura externa do corpo e com seus anexos constitui o sistema tegumentar. A área total da pele em adultos pode chegar a 1,5 até 2,0 metros² e pesar de oito a dez quilogramas, sendo, portanto, o maior órgão do corpo humano, representando 16% do nosso peso. Em cada centímetro quadrado de pele existem cerca de oito milhões de células, trezentas glândulas sudoríparas e nove mil células nervosas ⁽¹⁾.

Várias funções vitais são exercidas pela pele. Dentre eles destacam-se o controle do fluxo sanguíneo, regulação térmica, percepção sensorial especializada, proteção contra raios ultravioletas (UV), prevenção contra desidratação e absorção de substâncias. Quando danificada, a pele é capaz de cicatrizar-se e regenerar-se, e ainda, faz parte do sistema imunológico atuando como uma linha de defesa primária contra potenciais agressores, infecções e toxinas do meio externo. Por fim, possui também função metabólica participando da síntese de vitamina D ⁽²⁾.

A pele é constituída por duas camadas, epiderme e derme. A epiderme corresponde à porção epitelial da pele e é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com células escamosas organizadas em várias camadas. A principal célula desta camada é o queratinócito, responsável pela produção de queratina, que é uma proteína resistente e impermeável que desempenha papel fundamental na função de proteção exercida pela pele. Também estão presentes os melanócitos, os quais produzem melanina, um pigmento castanho que absorve os raios UV, as células imunitárias, constituídas principalmente pelas células de Langerhans ⁽³⁻⁴⁾.

Vistas da derme para sua superfície, a epiderme é composta pelas seguintes camadas:

- Camada basal: caracterizada por intensa atividade mitótica com constante geração de novas células que, progressivamente, migram para as camadas superficiais repondo aquelas perdidas pelo processo contínuo, dando origem a todas as outras camadas.

- Camada espinhosa: formada por células cúbicas ou achatada com maior quantidade de queratina que as da camada basal, as quais apresentam um processo incipiente de formação de junções celulares umas com as outras, com o intuito de proporcionar maior resistência e elasticidade.

- Camada granulosa, que é caracterizada por células achatadas com grânulos de queratina proeminentes e outras substâncias extracelulares e proteínas, como o colágeno.

- Camada lúcida, constituída de uma delgada lâmina de células eosinofílicas e translúcidas, as quais perdem seus núcleos que são digeridos por enzimas secretadas por essas mesmas células.

- Camada córnea que é a camada mais externa, constituída de células achatadas eosinófilas, anucleares com grande quantidade de filamentos, principalmente queratina ⁽⁵⁾.

A junção entre a epiderme e a derme apresenta forma de papilas, que dão maior superfície de contato com a derme e maior resistência ao atrito da pele, sendo a derme o tecido conjuntivo que sustenta a epiderme. É constituído por elementos fibrilares como o colágeno e a elastina, além de outros elementos da matriz extracelular, como proteínas estruturais. Os fibroblastos são as células envolvidas com a produção dos componentes da matriz extracelular constituindo-se no principal componente celular da derme ⁽³⁻⁴⁾.

A derme é subdividida em duas camadas, onde se localizam os vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, vasos linfáticos e também os nervos e os órgãos sensoriais a eles associados. A primeira é a camada papilar, a qual faz contato com a epiderme sendo

constituída por tecido conjuntivo frouxo e, a segunda é a camada reticular que é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colágenas ⁽⁵⁾.

Adjacente à derme encontra-se o tecido celular subcutâneo ou hipoderme, o qual não faz parte da pele. Este é constituído predominantemente por tecido adiposo que confere proteção contra o frio, e um tecido conjuntivo frouxo responsável pela conexão entre a derme e a fáscia muscular. A espessura da hipoderme varia entre os grupos étnicos, gêneros, em relação à localização no corpo e também de acordo com hábitos e estilo de vida. Possui como funções principais as de reservatório energético, isolante térmico, modelagem da superfície corporal, absorção de choques e fixação dos órgãos, além de ser considerado um órgão endócrino capaz de secretar hormônios e citocinas importantes para o metabolismo ⁽¹⁾. Os anexos da pele são: folículo piloso, pelo músculo liso eretor e terminações nervosas sensitivas ^(1,3-4).

As feridas, que são a ruptura de todas essas camadas importantes da pele, são definidas como a interrupção na continuidade de tecido e a perda da integridade física da pele, podendo ocorrer perda de tegumento cutâneo, além de parte do tecido subcutâneo e nos casos mais graves atingir músculo, tendões. Podem ter diversas causas como trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por afecções clínicas. Contudo, independente da etiologia das feridas, todas podem tornar-se crônicas ⁽¹¹⁾.

As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações graves como amputações de membros e podem até levar a morte ⁽¹¹⁾. Elas representam um grande problema de saúde pública por gerarem elevados custos com a saúde, incapacidades físicas e afastamento do trabalho. Um fato que colabora para a elevada prevalência de feridas crônicas em todo o mundo é o aumento progressivo da expectativa de vida ⁽⁶⁾.

O tratamento de lesões cutâneas não é um desafio restrito às sociedades modernas. Durante séculos o tratamento de feridas tem sido uma preocupação constante das pessoas envolvidas com cuidados à saúde e o objetivo sempre foi de obter melhores resultados cicatricial em menor tempo possível. Na Mesopotâmia, as feridas eram lavadas com água ou leite e cobertas com mel, lã de carneiro, folhas e cascas de árvores. Os egípcios associavam uma variedade de plantas, substâncias animais e minerais na cobertura das feridas e ao longo do tempo perceberam que o bolor de pão era capaz de controlar a infecção, intervenção empírica que mais tarde foi comprovada pela descoberta da penicilina em 1.928 por Alexander Fleming ⁽⁷⁻⁸⁾.

Hipócrates sugeria que as feridas contusas fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração, remover material necrótico e reduzir a inflamação. No início da era cristã, Celsus preconizava o fechamento primário das feridas recentes e desbridamento das contaminadas para posteriormente poderem ser suturadas ⁽⁷⁻⁸⁾. Na idade média o corpo era considerado a morada de divindades ou de demônios e as feridas eram a prova de sua existência. Desta forma o cuidado das feridas era realizado por “bruxas” que acreditavam ter poderes especiais utilizando assim todo o tipo de substância ⁽⁷⁻⁸⁾.

Em 1.683 com a descoberta da existência dos microorganismos por Leeuwenhoek e sua associação a diversas doenças, deu-se início a preocupação com a limpeza e desinfecção. Nesta época acreditava-se que quanto mais seca, mais protegida a ferida estava de microorganismos. Emplastos e pomadas com antibióticos eram muito utilizados, juntamente com gazes secas para manter o ambiente o mais seco possível, facilitando a formação de crostas para a proteção da ferida e para sua completa cicatrização ⁽⁷⁻⁸⁾.

O avanço da química levou a descoberta de compostos de cloro e iodo que foram utilizados para limpeza do material e da pele nos séculos XVII e XIX. Mais recentemente, na

década de 1.950, novos estudos revolucionariam o tratamento de feridas. Assim nasce o conceito de cicatrização em meio úmido, utilizado como base no cuidado de feridas até hoje (1-2).

Atualmente se preconiza a intervenção na expressão gênica e na síntese de proteínas envolvidas em fenômenos de proliferação e migração celular para melhorar o processo cicatricial (7-8).

Encontrar alvos terapêuticos mais eficientes para tratar as feridas tornou-se ainda mais importante pelo fato de que, nas últimas décadas, tem se observado um aumento surpreendente na prevalência de diabetes mellitus do tipo dois (DM2) e obesidade ao redor do planeta e também no Brasil (9-10), doenças que levam ao surgimento de lesões cutâneas aumentando dessa forma a prevalência de feridas na população.

As feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de reparação tissular, em agudas e crônicas. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado sem complicações. A causa mais frequente de feridas crônicas são as complicações do diabetes mellitus levando as úlceras do pé diabético, as úlceras por pressão em pacientes com baixa mobilidade no leito ou na cadeira e as úlceras vasculares, por estase venosa e/ou obstrução arterial (6).

Outra classificação se refere às estruturas comprometidas e consiste na descrição anatômica da profundidade da ferida. Este sistema é adotado para estadiar alguns tipos de feridas crônicas como as úlceras por pressão e as queimaduras. O sistema de classificação por extensão do dano tissular completa a anterior, englobando a ferida superficial (limitada à epiderme), ferida com perda parcial (limitada à epiderme e porção superior da derme) e a perda total (destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos) (11-12).

1 - O Processo Cicatricial

Constitui-se de um fenômeno complexo e altamente especializado, onde é necessária a integração de vários tipos de células, incluindo as inflamatórias, fibroblastos, queratinócitos e endoteliais, além do envolvimento de fatores de crescimento e enzimas. O processo normal ocorre através de várias fases: formação do coágulo, inflamação, reepitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação, contração da ferida, formação da cicatriz e remodelamento do tecido ⁽¹³⁾.

1.1- Fase Inflamatória

Imediatamente após a lesão ocorre o tamponamento dos vasos e logo a seguir vasoconstrição como primeira resposta, seguido por uma sequência de eventos que se inicia com a deposição e ativação de plaquetas e posterior recrutamento de novas células, o qual leva a formação de um trombo que provisoriamente tampona a lesão. O trombo rico em plaquetas (branco) é rapidamente infiltrado por fibrina. Logo após, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se então o trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este trombo fornece uma matriz preliminar que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores de glicoproteína (GPR) e a adenosina difosfato (ADP), liberados pelas hemácias. Outra substância que contribui para a agregação plaquetária é o ácido araquidônico da membrana das plaquetas, convertido em tromboxano A₂ (TxA₂) pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxane sintetase. O Fator Ativador de Plaquetas (PAF), importante derivado do ácido araquidônico liberado pelas próprias plaquetas, macrófagos e mastócitos também atuam na agregação plaquetária ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

As plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea, como o colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o Fator Transformador Beta (TGF- β) e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), além de quimiocinas e outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina, as quais são encontradas em seus próprios grânulos. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com proteínas da matriz extracelular formam uma matriz provisória. O TGF- β , PDGF e o PAF se difundem pela matriz provisória formando assim um gradiente quimiotático que encaminha a migração de outras células importantes no processo inflamatório e de cicatrização ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sangue, onde um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover assim o recrutamento ativo de mais neutrófilos. À medida que ocorrem as primeiras migrações de células inflamatórias para o local, o gradiente quimiotático é retroalimentado positivamente. As células que migram em resposta ao gradiente quimiotático (neutrófilos, monócitos e fibroblastos) também são em sua maioria produtoras de substâncias quimiotáticas, com papel destacado para os eicosanóides e, principalmente, para as quimiocinas ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Isoladamente, a produção e a liberação dos mediadores acima descritos são insuficientes para o recrutamento de neutrófilos a partir da circulação. A força de arraste da corrente circulatória impede seu contato com as paredes dos vasos. Por ação dos eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas), citocinas inflamatórias (como a Interleucina 1 (IL-1) e Tumor de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)) produzidas por macrófagos, mastócitos, células estromais e outros mediadores, e células endoteliais dos vasos não lesados são induzidas a expressarem em sua membrana proteínas de adesão para

leucócitos, levando a sua dilatação. Esse processo lentifica a circulação sanguínea diminuindo dessa forma a sua força de arraste, permitindo, assim, a marginação dos leucócitos e sua ligação às moléculas de adesão expressas nas células endoteliais ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Nas regiões distais onde os vasos se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido em função da formação do trombo. O influxo de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região aumenta a demanda por oxigênio com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH. A combinação de hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico leva a ativação de macrófagos para a produção de fatores de crescimento ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

1.2- Fase Proliferativa

Essa fase é marcada por intensa produção e liberação de mediadores químicos produzidos pelos macrófagos, tão bem quanto migração e ativação de fibroblastos. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após sofrerem influência dos fatores de crescimento e demais mediadores derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o centro. Isto se dá por meio da matriz provisória formada, seguindo a orientação das substâncias quimiotáticas ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Com o aumento no número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e ocorre por volta do quarto dia simultaneamente com formação de novos vasos sanguíneos. Além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura, a indução da angiogênese é, em parte, devida à característica baixa tensão de oxigênio que ocorre no centro da ferida ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A neovascularização é essencial neste estágio, pois permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas. Com o estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais no interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal permitindo a migração das células endoteliais que, ao atravessarem a parede do vaso e utilizarem como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão. Uma vez na região externa do vaso, elas passam pelo processo de diferenciação para aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de origem, para que, em seguida, ocorra o restabelecimento do fluxo sanguíneo ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

O leito da ferida aberta deve ser preenchido e este fenômeno requer duas condições. Na primeira, a própria natureza anatômica da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação das células (fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos) a partir das suas margens. Através de um mecanismo descrito por Montesano e Orci de “efeitos de vizinhança livre”, as células basais próximas à região da ferida ao perderem a interação com as células adjacentes, são ativadas, adquirem propriedades mitóticas e proliferam em direção ao centro da lesão. Na segunda, mesmo quando o espaço da lesão está preenchido com tecido de granulação, as margens se movem uma em direção à outra como se houvesse uma força de tração invisível. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos, portanto, fibroblastos com capacidade contrátil. Com a evolução do processo, a matriz extracelular, que inicialmente era composta principalmente por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, passa por modificações em sua composição ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região, somada à presença de vasos neoformados, permite que os componentes da nova matriz extracelular

passem a ser localmente produzidos principalmente por estas células. Os fibroblastos passam a depositar grande quantidade de fibronectina que, embora seja substrato que desempenha outras funções, basicamente serve para a fixação da própria célula. As células endoteliais dos vasos neoformados se diferenciam em células de revestimento e os vasos neoformados assumem as características funcionais de capilares ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Os fibroblastos são as células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas. Nesta etapa, é necessária alta tensão de oxigênio para a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas do colágeno montadas no citoplasma dos fibroblastos. Isto é proporcionado pela rede capilar neoformada ⁽¹²⁻¹³⁾. Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima, o que decorre como exposto acima, da formação de miofibroblastos ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Apesar de seu mecanismo contrátil ainda não ser totalmente esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão. Elas também auxiliam no processo de contração no ressecamento da crosta superficial da ferida, a qual durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderido ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

À medida que a região da lesão vai sendo coberta pelas células epidermais, um mecanismo de “inibição por contato” é acionado. As células voltam a apresentar o fenótipo original, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos. Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática sofre um processo de regeneração. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, dando à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

1.3- Fase de Remodelamento

Por volta do décimo dia, o leito da ferida encontra-se totalmente preenchido pelo tecido de granulação emaranhado pela nova rede capilar e com a rede linfática em franca regeneração, devido a sua reconstrução ter-se iniciado posteriormente a vasculatura. O tecido de granulação vai sendo enriquecido com fibras de colágeno começando a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem (observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais) formando finalmente a cicatriz. Atualmente sabe-se, que a resolução completa de uma ferida somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. Quanto maior o número de ligações covalentes transversais, maior a resistência da cicatriz. Quando secretado na forma de tropocolágeno, as ligações transversais das fibras se dão por pontes de hidrogênio. No processo de amadurecimento da fibra, as lisinas, hidroxilisinas e lisinas glicosiladas constituintes da molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos pela enzima lisil oxidase. Estes, após sofrerem oxidação, se ligam covalentemente a outros grupos aldeídos ou com lisinas não oxidadas, o que aumenta a resistência da fibra ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A princípio, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da

natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, re-sintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas da lise, re-síntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanharem as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Ao final desta etapa, os anexos da pele como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

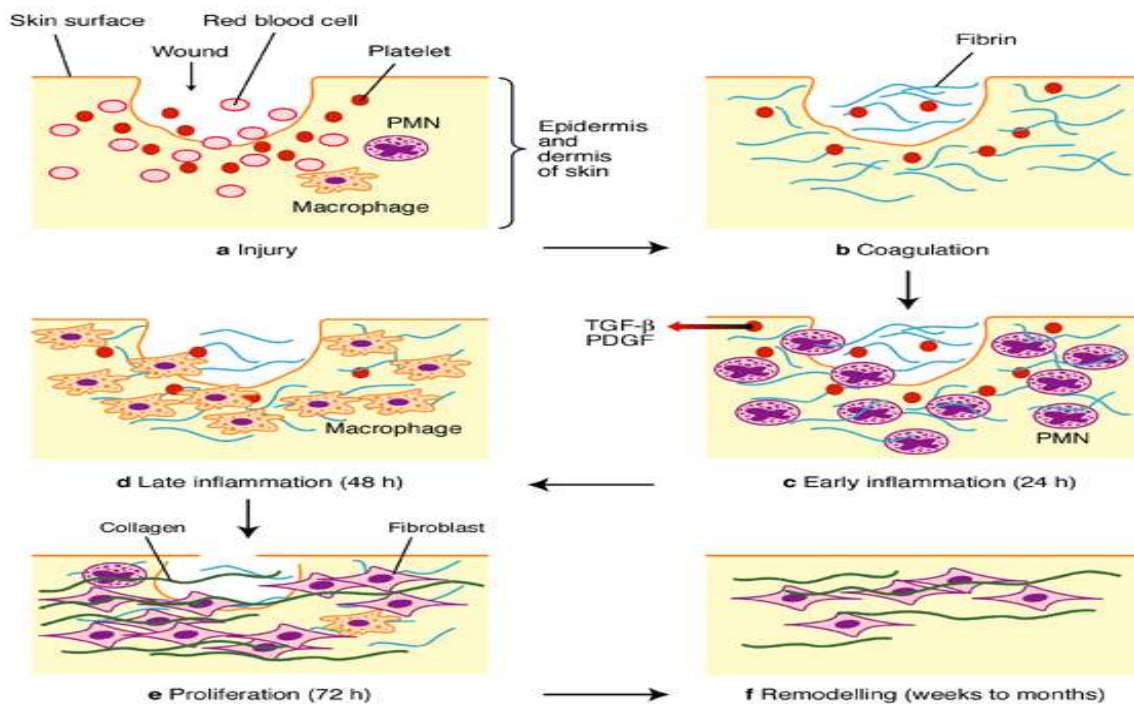


Figura 1- Esquema ilustrativo das fases do processo de cicatrização: A- Lesão, B- Coagulação, C- Inflamação recente, D – Inflamação tardia, E – Proliferação e F- Remodelação. Adaptado de Expert Reviews Molecular Medicine, 2003 Cambridge University Press.

2- Ativinas

São proteínas diméricas que apresentam duas subunidades β cruzadas por uma ponte dissulfeto, membros da família do Fator de Crescimento e Diferenciação Transformador β (TGF- β) ^(15,17).

As variantes das ativinas mais abundantes são os homodímeros ativina A (baba) e ativina B (bbbb), tão bem como o heterodímero ativina AB (babb). Essas proteínas exercem suas funções biológicas através de sua ligação a receptores transmembrana heteroméricos (I e II) com atividade serina/treonina quinase intrínseca, o qual se associa a um conjunto de

proteínas sinalizadoras da família Smad, as quais por sua vez formam um complexo que leva ao controle da transcrição gênica ^(15,17).

As ativinas foram inicialmente descobertas como indutores da liberação do Hormônio Folículo Estimuladoras (FSH) pela hipófise, porém, posteriormente foram descritas uma grande variedade de funções para essas proteínas como reguladoras cruciais do desenvolvimento celular ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Na pele, estudos têm revelado funções importantes, em especial no que diz respeito à ativina A. Estudos em camundongos e humanos detectaram a expressão significativamente aumentada da subunidade bA da ativina durante a cicatrização tecidual após lesão aguda ou crônica ^(19,21).

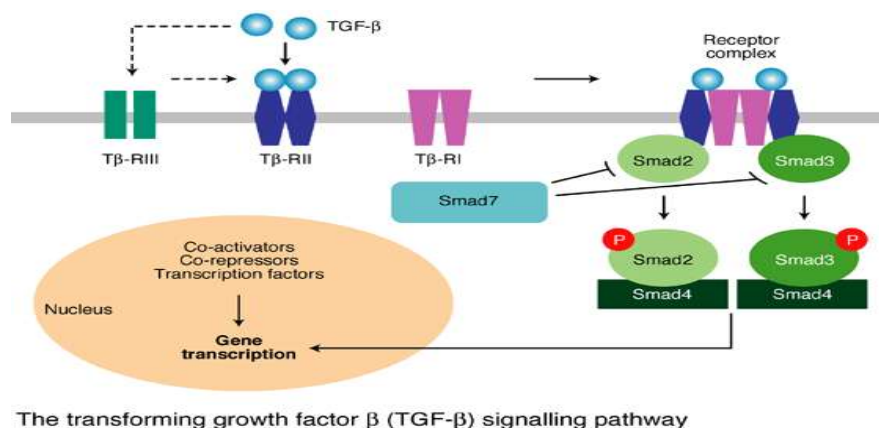


Figura 2- Esquema ilustrativo da sinalização das ativinas ativando as proteínas Smads e sua translocação para o núcleo. Adaptado de Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003 Cambridge University Press.

3- Folistatina

A atividade biológica das ativinas é regulada por uma glicoproteína chamada folistatina secretada (Fst), que sequestra as ativinas e, portanto, inibe a sua ação biológica ⁽²²⁻²³⁾.

A regulação da Fst representa grande importância funcional no processo cicatricial, pois em camundongos transgênicos onde a mesma foi super expressa na epiderme foi observado um atraso considerável na cicatrização de feridas ⁽²²⁻²⁴⁾. Em outro estudo no qual a atividade da Fst em queratinócitos for suprimida pela geração de camundongos transgênicos, foi demonstrado a ativação específica da ativina na epiderme e nos folículos pilosos. Esses animais apresentaram maior proliferação de queratinócitos, com início mais precoce ⁽¹⁹⁾. Há outros fenômenos importantes nos quais a Fst também desempenha importante função regulatória, como por exemplo, em alguns aspectos do desenvolvimento embrionário, revascularização após a lesão isquêmica, sobrevivência de miócitos, imunomodulação, regulação de citocinas e câncer ⁽²²⁾.

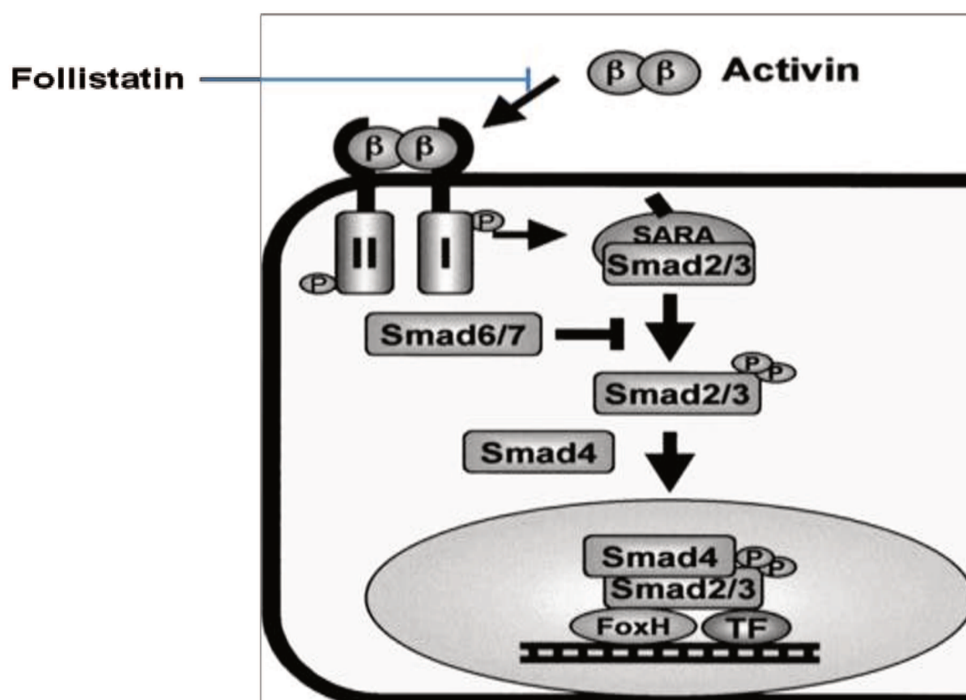


Figura 3 – Esquema da ação inibitória da folistatina sobre a ativina.

4- Azacitidina

O Azacitidina, 5-azacytidine ou 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza) foi sintetizado pela primeira vez por Piskala e Sorm em 1.964 e foi originalmente desenvolvido e testado como um nucleosídeo com especificidade clínica e ação antimetabólito para a leucemia mielóide aguda. Atualmente, é usado no tratamento da síndrome mielodisplásica (MDS) e é liberado pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos.

Por ser ativado pelo trifosfato de adenosina (ATP) e incorporado tanto pelo DNA como pelo RNA, o tratamento com 5-aza leva à inibição da síntese de proteínas. A incorporação de 5-aza no RNA-transportador (RNAt) é capaz de inibir a metilação, resultando em um defeito funcional do RNAt. A metilação também desempenha um papel importante no processamento de RNA, pois os efeitos da incorporação de 5-aza interfere na estabilidade do RNA o que também leva a diminuição da síntese de proteínas ⁽²⁵⁻³¹⁾.

Apesar de poder atuar sobre a expressão de diferentes genes, um estudo recente mostrou que quando adipócitos 3T3L-1 foram tratados com o 5-aza, ocorreu uma redução de cerca de 90% da expressão do gene da Fst, o que sugere ser este um dos genes mais afetados pelo tratamento.

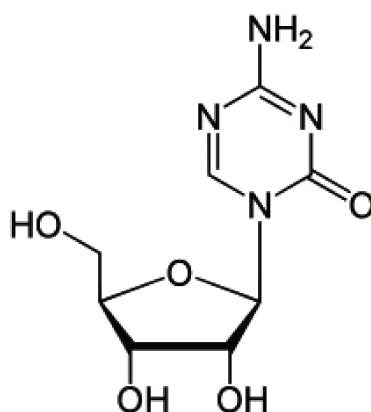


Figura 4 – Estrutura química da 5-azacitidina

Portanto, a hipótese deste trabalho é que o tratamento tópico com 5-aza reduz a atividade da glicoproteína Fst1 em feridas levando a um subsequente aumento da capacidade das células em promover crescimento celular e, dessa forma, melhorar a cicatrização em feridas de ratos Wistar.

A justificativa para o presente estudo decorre da necessidade de se encontrar novas opções para o tratamento de feridas que contribuam para que o processo cicatricial seja mais rápido e eficiente. Tal avanço traria benefícios para pacientes portadores de doenças crônicas onde o processo cicatricial encontra-se comprometido como por exemplo o diabetes mellitus do tipo 2, as quais sobrecarregam o sistema público de saúde.

OBJETIVOS

Gerais:

Avaliar os efeitos da ação tópica de 5-aza nas diferentes fases do processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar.

Específicos:

- Determinar a taxa de retração das feridas por fotografia e planimetria;
- Determinar a expressão das proteínas folistatina, ativina, smad e citoqueratinas 10 e 14;
- Investigar a modulação gênica das Interleucinas 1, 6, 10 (IL-1, IL-6, IL-10) e TNF- α ;
- Investigar a modulação gênica do marcador de queratinócito involucrin;
- Avaliar os aspectos morfológicos da ferida por microscopia de campo claro;
- Determinar a taxa de proliferação celular na ferida por meio da captação nuclear de 5-bromo-20-desoxiuridina.

CAPÍTULO 1

Article

Topical 5-azacytidine accelerates skin wound healing in rats

Fabiana S. Gomes^{1,2}, Gabriela F. de-Souza², Lucas F. Nascimento², Eva L. Arantes^{1,2}, Rafael M.

Pedro^{1,2}, Daniele C. Vitorino², Carla E. Nunez², Maria H. Lima¹, Lício A. Velloso², Eliana P. Araújo^{1,2}

¹Nursing School, ²Laboratory of Cell Signaling – Obesity and Comorbidities Research Center,
University of Campinas, Brazil

Corresponding Author

Eliana P. Araujo

Email pa.eliana@gmail.com

Nursing School, University of Campinas

13084-970 – Campinas SP, Brazil

ABSTRACT

The development of new methods to improve skin wound healing may affect the outcomes of a number of medical conditions. Here, we evaluate the molecular and clinical effects of topical 5-azacytidine on wound healing in rats. 5-Azacytidine decreases the expression of follistatin-1, which negatively regulates activins. Activins, in turn, promote cell growth in different tissues, including the skin. Eight-week-old male Wistar rats were submitted to 8.0 mm punch-wounding in the dorsal region. After three days, rats were randomly assigned to receive either a control treatment or the topical application of a solution containing 5-azacytidine (10 mM) once per day. Photo documentation and sample collection were performed on days 5, 9 and 15. Overall, 5-azacytidine promoted a significant acceleration of complete wound healing ($99.7\% \pm 0.7.0$ vs. $71.2\% \pm 2.8$ on day 15; $n=10$; $p<0.01$), accompanied by an up to 3-fold reduction in follistatin expression. Histological examination of the skin revealed efficient re-epithelization and cell proliferation, as evaluated by the BrdU incorporation method. 5-Azacytidine treatment also resulted in increased gene expression of TGF- β and the keratinocyte markers involucrin and cytokeratin, as well as decreased expression of cytokines such as TNF- α and IL-10. Lastly, when recombinant follistatin was applied to the skin in parallel with topical 5-azacytidine, most of the beneficial effects of the drug were lost. Thus, 5-azacytidine acts, at least in part through the follistatin/activin pathway to improve skin wound healing in rodents.

INTRODUCTION

Skin wound healing is a complex biological process that involves the integrated actions of a number of different cells and tissues (1). In healthy subjects, skin wounds are generally re-epithelized in approximately two weeks (1). During this period, the initial steps of healing, such as clot formation, inflammation and cell proliferation, take place (1). The final phase of wound healing, tissue remodeling, can last for years, and even if it occurs in the most appropriate way, it will never regenerate the same level of skin integrity and resistance that was present prior to the development of the wound (1, 2).

Fortunately, for most subjects with skin wounds, the healing process is sufficiently rapid and efficient to achieve a safe and non-complicated repair (2). However, depending on the magnitude of the wound and the presence of a number of potential accompanying conditions, such as chronic illnesses or infections, healing can be prolonged or even impaired, leading to unwanted, and occasionally even debilitating or lethal, complications (2). In this context, developing new methods to safely accelerate skin wound healing may have a beneficial impact on several medical conditions.

During clot formation, in the initial phase of wound healing, platelets secrete transforming growth factor-beta (TGF- β), which is one of the most important growth factors involved in the promotion of wound healing (1). Recent studies have shown that activins, and particularly the TGF- β family member activin-A, are highly expressed in both acute and chronic wounds (3) and that the hyperexpression of follistatin (Fst), an endogenous inhibitor of activin, impairs wound healing in mice (4). Moreover, the genetic disruption of the Fst gene results in increased activin signaling in the skin and increased keratinocyte proliferation (5). Thus, the pharmacological inhibition of Fst in the skin may increase activin signal transduction and potentially accelerate

wound healing. Here, we tested this hypothesis by using topical 5-azacytidine (5-aza) to treat skin wounds produced in healthy rats. 5-Aza is a pharmacological inhibitor of Fst (6) and is currently approved for clinical use in the treatment of myelodysplasia (6, 7). Our results show that 5-aza accelerates wound healing through a mechanism that depends, at least in part, on the activation of the activin signal transduction system.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

All experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Campinas. Eight-week old male Wistar rats were submitted to an 8.0 mm punch-wound in the dorsal region. Initially, the rats were randomly assigned to two distinct treatment groups. Both of the groups received a topical application of a solution containing 5-azacytidine (10 mM) once per day, and treatment began either on the day of wound generation or on the third day following wound generation. Respective controls were treated once per day with vehicle. Photo documentation and sample collection were performed on days 5, 9 and 15. In the dose response experiments, wounds were treated with different doses of 5-aza (0.1, 1.0 or 10.0 mg/day).

In the final part of the study, the rats were submitted to an alternative protocol and treated daily, beginning on day three after generation of the wound, with either 5-aza, 5-aza plus follistatin (2.5 mg) or vehicle.

Tissue extraction and western blot

Rats were anesthetized with sodium amobarbital (15 mg/kg body weight, i.p.) and used 10–15 min later, i.e., as soon as complete anesthesia was obtained and verified by the loss of pedal and corneal reflexes. For protein expression evaluation, the skin wound was excised and

immediately homogenized in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg/ml aprotinin) at 4°C with a Polytron PTA 20S homogenizer (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 sec. The extracts were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 45 min, and the supernatants of these tissues were used for western blotting with antibodies against follistatin (1:1000), cytokeratin-10 (1:1000), cytokeratin-14 and β -actin (1:1000). Whole tissue extracts from all animals were homogenized in Laemmli buffer, and equal-sized aliquots (20 μ g protein) were subjected to SDS-PAGE. Following transfer to nitrocellulose, the membranes were incubated with a secondary specific IgG antibody (diluted 1:5000 in TTBS containing 1% dry skim milk) for 2 h at room temperature. After incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Pierce) was used to permit protein detection by autoradiography. The band intensities were quantified by optical densitometry (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

Quantification of mRNAs by real-time PCR

Aliquots containing 5.0 ng RNA were subjected to reverse transcription using random hexamer primers and Superscript Moloney-MLV reverse transcriptase. PCR reactions were performed in real time using the TaqManTM system (Applied Biosystems). The GAPDH gene (TaqManTM - Applied Biosystems) was chosen as the endogenous control of the reaction to which the expression levels of the gene of interest in different samples were normalized. After calculation of the efficiencies of amplification of the gene of interest and the endogenous control, a scatter plot was constructed to define the range of concentrations for which the system is efficient. Primers for the target genes were purchased from Applied Biosystems. For the relative quantification of the gene under study, the PCR reactions in real time were carried out in

duplicate in reactions containing 6.25 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 0.625 µl of primers and probe solution, 1.625 µl of water and 4.0 µL of cDNA. The negative control used 4.0 µl of water in place of cDNA. The cycling conditions were as follows: 50 °C for 2 minutes, 95 °C for 10 minutes, and 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute. The relative gene expression values were obtained by analyzing the results in the program 7500 System SDS Software (Applied Biosystems).

Microscopy

After dissection, the skin tissues fixed by immersion in paraformaldehyde were processed in alcohol at increasing concentrations (70%, 80%, 95% and 100%), followed by xylol and paraffin, embedded in paraffin blocks, sectioned at 5.0 µm and placed on microscope slides pretreated with poly-L-lysine. To evaluate cell and extracellular matrix morphology, the wound sections were stained with hematoxylin and eosin. The sections were incubated with hematoxylin for 30 seconds, rinsed in distilled water, incubated for 30 seconds with eosin, rinsed again in distilled water and dehydrated. The slides were mounted in Entellan[®] and then analyzed; digital images were captured under bright field microscopy.

Detection of cellular proliferation assay using 5-bromo-20-deoxyuridine.

5-Bromo-20-deoxyuridine (BrdU, 250 mg/kg BrdU in 0.9% NaCl) was intraperitoneally injected on the ninth day following wound generation; 2 h later, the tissue samples were fixed in 1% acetic acid and ethanol. Then, the fragments were embedded in paraffin and sectioned at 5.0 µm. Indirect immunofluorescence staining was performed using antibodies against BrdU (Roche) and activin (Santa Cruz). The analysis and documentation of results were performed using a Leica FW 4500 B microscope (8).

Photo documentation

The process of wound healing was photo documented using a Nikon digital camera. A tripod was used to ensure a similar distance from camera to wound in all experiments. The area of the wound was measured using Adobe Photoshop 7.0.

Statistical Analysis

The results are always presented as the mean $\pm$ standard error. For the statistical analysis, we first applied the Levene test to check for homogeneity of variance. To compare the means between two groups, we used Student's *t*-test for independent samples. For multi-group analysis, we used analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey HSD test for multiple comparisons of means, when necessary. In all cases, the level of significance considered sufficient to reject the null hypothesis was 5% ($p < 0.05$). Data were analyzed using the "Statistic for Windows" version 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Topical 5-aza accelerates skin wound healing in rats

The proposed wound healing acceleration property of 5-aza was tested using two different protocols. The first protocol was designed to expose the wounds to the drug beginning at the cloth formation phase, while in the second protocol, treatment began during the inflammatory phase. In both protocols, the drug was used daily until the fifteenth day after wound generation. As depicted in **Figure 1**, treatment with 5-aza beginning at day 3, but not at day 0, resulted in a significant acceleration of healing ($99.7\% \pm 0.7.0$ vs. $71.2\% \pm 2.8$ on day 15; $n=10$; $p<0,01$). Thus, in most of the remaining experiments, only the protocol with treatment beginning at day 3 was used.

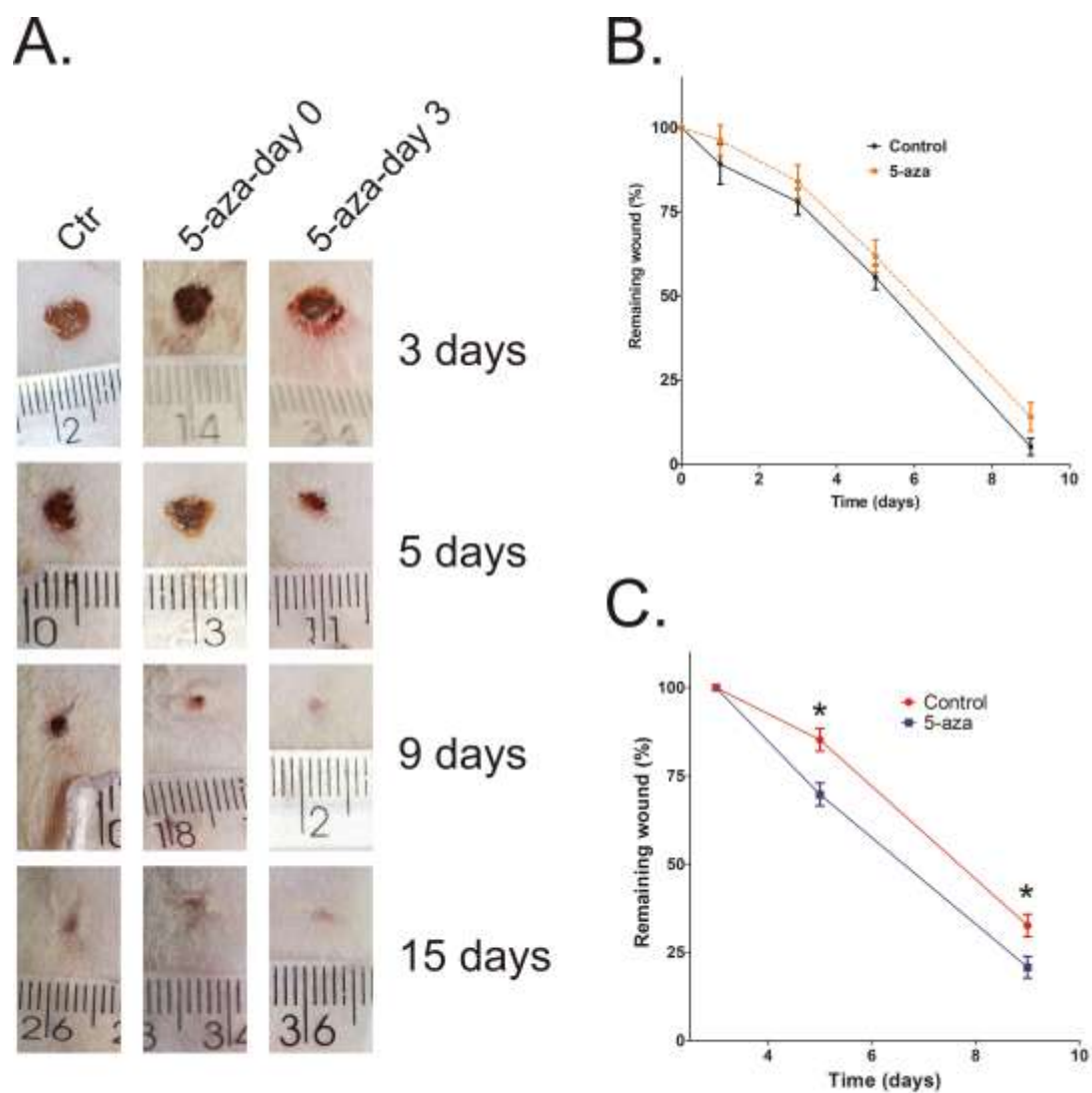


Figure 1. Male Wistar rats were submitted to a wound generation in the dorsal region and randomly selected for daily topical treatment with vehicle (Ctr), 5-azacytidine beginning on the same day of wound generation (5-aza-day 0) or beginning on the third day following wound generation (5-aza-day 3). Photographic record of the wounds is shown in A and variation on the % of remaining wound is graphically depicted in B, for Ctr vs. 5-aza-day 0; and C, for Ctr vs. 5-aza-day 3. In C, * $p < 0.05$ vs. Ctr. In all experiments, $n = 6$.

Topical 5-aza reduces Fst and inflammatory cytokine expression in wounds

Topical 5-aza applied beginning at day 3 after wound generation produced a dose-dependent inhibition of Fst expression in the wounds (Fig. 2A and 2B). This was accompanied by reductions in the expression levels of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 on day 9 after wound generation (Fig. 2C). The expression levels of both TNF- α and IL-6 were restored to control levels at the end of the evaluation, on day 15 after wound generation (Fig. 2C). The expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the wound was not affected by 5-aza treatment beginning at day 3 (Fig. 2C). Interestingly, if 5-aza was employed beginning on day 0, the expression of IL-10 at day 5 was reduced, and the expression of TNF- α at day 9 was increased (Fig. 2D).

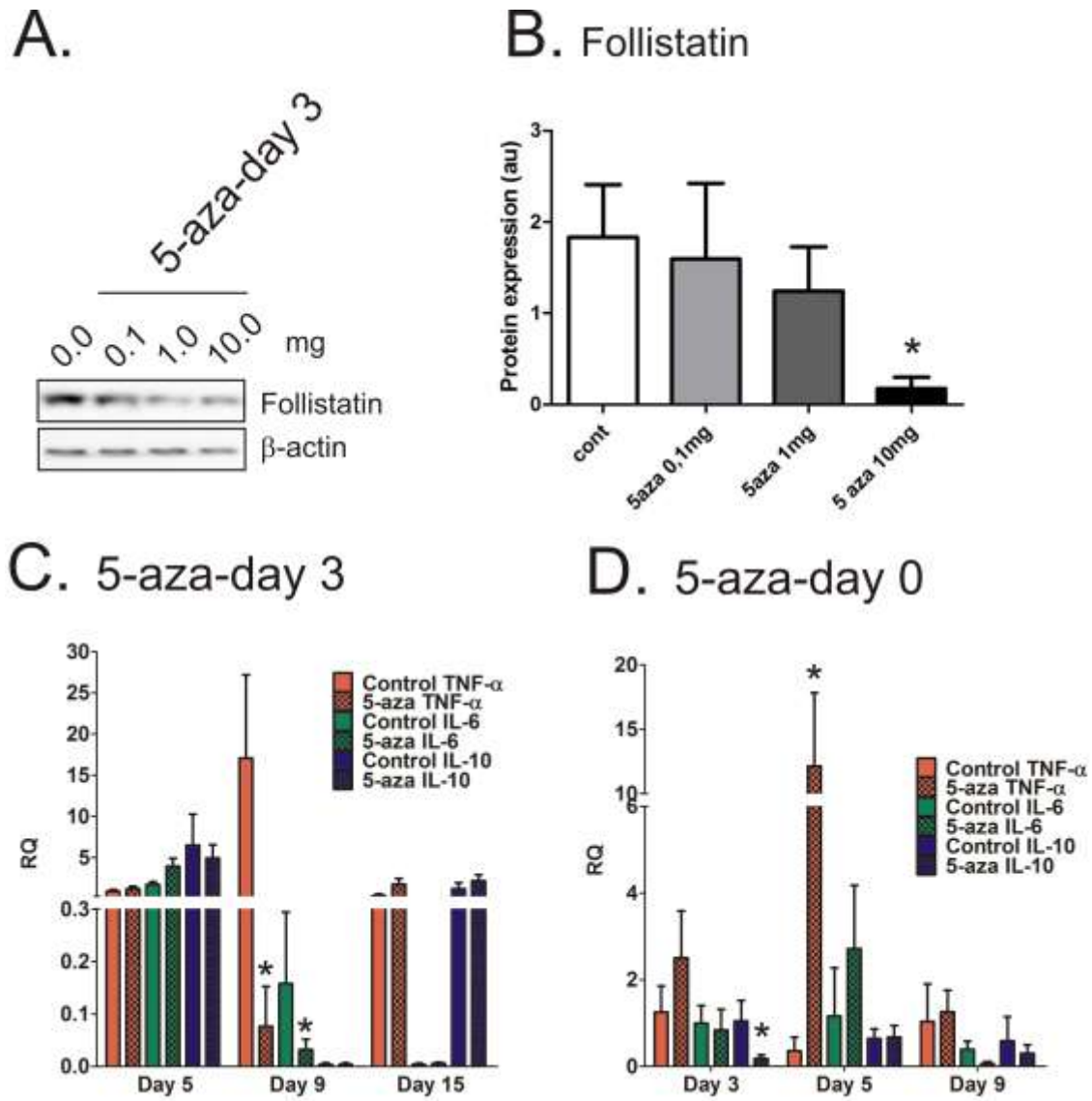


Figure 2. Male Wistar rats were submitted to a wound generation in the dorsal region and randomly selected for daily topical treatment with vehicle (0.0 mg in A and B, Control in C and D), 5-azacytidine beginning on the third day following wound generation (0,1-10 mg in A and B; 5-aza in C) or beginning on the same day of wound generation (5-aza-day 0) (D). Tissue fragments of the wounds were obtained on day 9 after wound generation (A and B) and on the days depicted in the x axis of the bar-graphs in C and D. The expression of follistatin (Fst) was determined by immunoblotting (A) and expressed as arbitrary units obtained from the densitometric measurement of specific bands (B). TNF- α , IL-6 and IL-10 mRNA expression was determined by real-time PCR (C and D). In all experiments n = 6; *p<0.05 vs. respective control.

Topical 5-aza increases the expression of keratinocyte markers and cell proliferation in healing wounds

Topical 5-aza applied beginning on day 3 after wound generation resulted in the increased expression of TGF- β on day 15 (Fig. 3A). In addition, the expression of the keratinocyte marker involucrin was increased at days 5 and 15 (Fig. 3A). This was accompanied by increases in the expressions of cytokeratin-14 and cytokeratin-10 on day 15 (Fig. 3B and 3C) and by increased cell proliferation, as determined by the evaluation of BrdU incorporation, on day 9 (Fig. 3D and 3E). At the end of the evaluation period, on day 15 after wound generation, the thickness of the resulting re-epithelized epidermal layer in the wound was significantly wider in 5-aza treated wounds than in control wounds (Fig. 3F and 3G). Interestingly, for wounds treated with 5-aza beginning at day 0, the expression of involucrin was reduced at days 5 and 9, and no increase in TGF- β expression was detected (Fig. 3H).

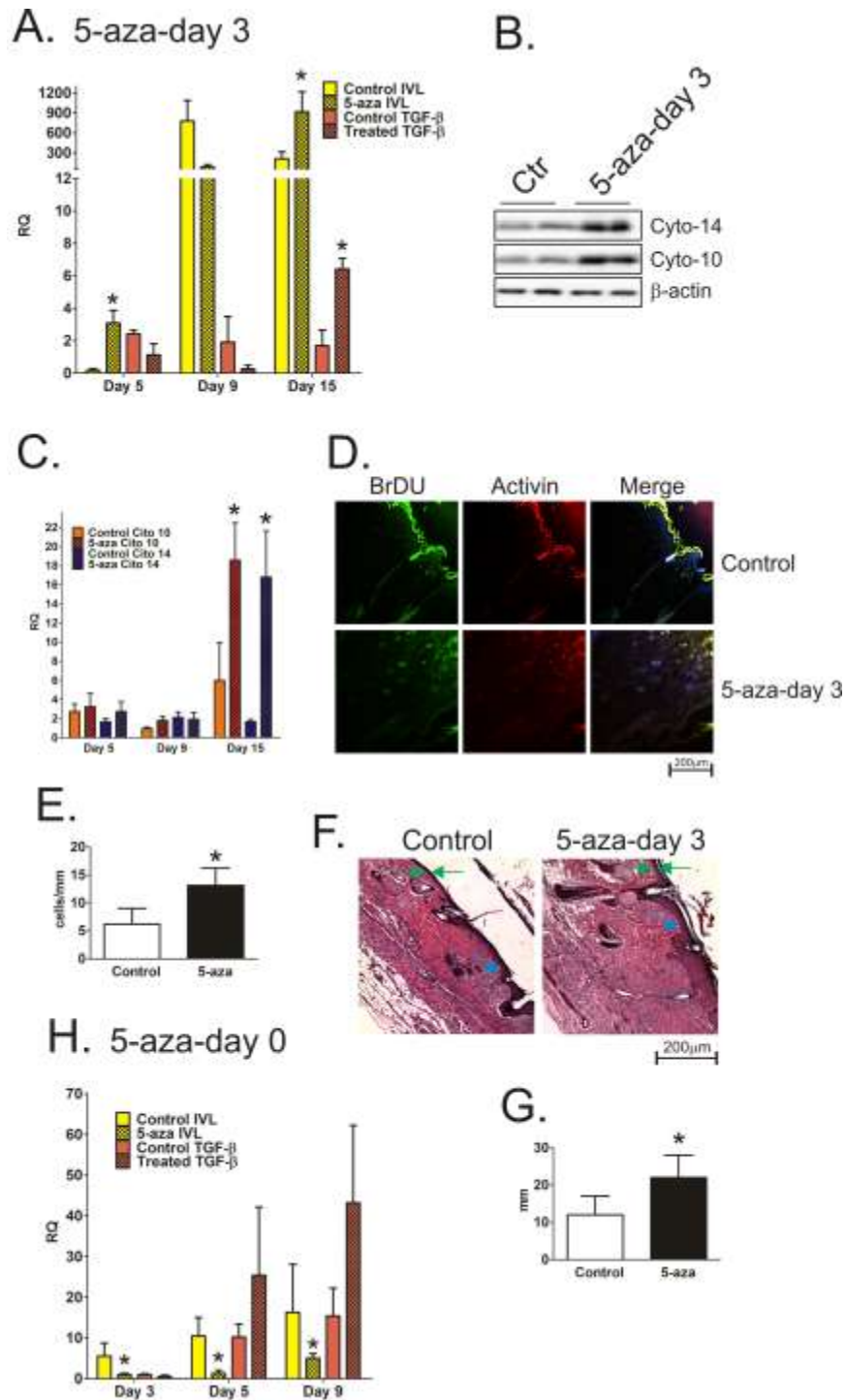


Figure 3. Male Wistar rats were submitted to a wound generation in the dorsal region and randomly selected for daily topical treatment with vehicle (control, Ctr), 5-azacytidine beginning on the third day following wound generation (5-aza-day 3) (A-G), or beginning on the same day of wound generation (5-aza-day 0) (H). Involucrin (IVL) (A and H), TGF- β (A and H), cytokeratin-

14 and cytokeratin-10 (C) mRNA expressions were determined by real-time-PCR in tissue fragments of the wounds collected in the days as depicted in the x axis of the bar-graphs (A, C and H). The expressions of cytokeratin-14 and cytokeratin-10 were determined by immunoblot in wound tissue samples collected on day 9 after wound confection (B). In D, rats were treated with BrdU on day 9 after wound confection and fragments of the wounds were collected for histological evaluation; for that, 5.0 mm sections were employed for the immunodetection of activin (red) and BrdU (green) by indirect immunofluorescence. Cells labeled positive for activin and BrdU were counted (E). Hematoxylin-eosin staining of paraformaldehyde fixed paraffin embedded 5.0 mm section of skin fragments obtained from the wound region, collected on day 15 after wound generation (F); blue arrows depict the margin of the wound and green arrows depict region where the width of epithelium of the repaired region was measured. The means of the measured epithelium widths obtained from control and 5-aza treated wound, as shown in F, is represented in bar-graph (G). In all experiments, n = 6; in A, C, E, G and H, *p<0.05 vs. respective control.

Exogenous Fst impairs the beneficial effect of topical 5-aza on skin wound healing

To test the hypothesis that the beneficial effect of topical 5-aza was dependent on the reduction of Fst, wounds were simultaneously treated with 5-aza and exogenous Fst. As shown in Figure 4A, exogenous Fst completely inhibited the effect of topical 5-aza to accelerate healing. This was accompanied by reduced cytokeratin-14 expression (Fig. 4B and 4C).

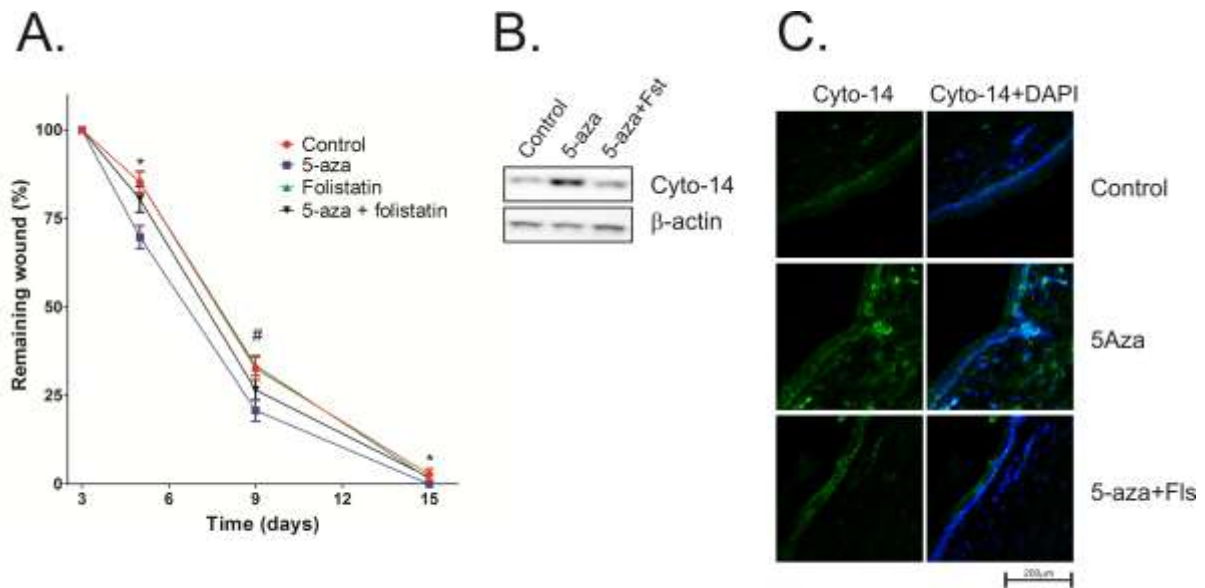


Figure 4. Male Wistar rats were submitted to a wound generation in the dorsal region and randomly selected for daily topical treatment with vehicle (control, Ctr), 5-azacytidine, follistatin (Fst) or 5-azacytidine plus follistatin. The treatments always started on the third day following wound generation. The variation on the % of remaining wound is graphically depicted in A. On day 9 after wound generation, fragments of the wound were collected for evaluation of cytokeratin-14 expression by immunoblot (B) and for indirect immunofluorescence detection of cytokeratin-14 in 5.0 mm paraformaldehyde fixed, paraffin embedded sections. In all experiments, n = 6; in A, *p<0.05 for 5-aza vs. 5-aza+Fst.

DISCUSSION

For most humans, the normal skin wound healing process is sufficient to achieve a non-complicated repair of the damaged tissue (9). However, skin wound healing can be affected by a number of physiological and pathological conditions, leading to prolonged and frequently dysfunctional repair. Because of the broad role of the skin as a physical, chemical and immunological barrier that protects the body against environmental threats, any defect in skin

wound healing may eventually impact quality of life (9). Increases in the numbers of elderly citizens and the prevalence of chronic illnesses that can affect skin integrity and repair, such as diabetes mellitus, hypertension and atherosclerosis, are important epidemiological factors contributing to a continuously increasing number of patients with delayed and complicated skin wound healing (10). Therefore, the development of new methods that can be safely used to accelerate this healing may have a positive impact on the management of such conditions.

Here, we evaluated the effect of 5-aza as a topical pharmacological agent to accelerate the healing of uncomplicated skin wounds in a rodent model. The drug 5-aza is a pyrimidine nucleoside analogue of cytidine (11) that acts as an inhibitor of gene transcription because it interferes with DNA methylation (12). The expression of a number of distinct genes can be affected by 5-aza (7); some of these genes have important roles in cancer. For this reason, 5-aza is currently approved for clinical use in myelodysplasia, a complex hematological condition that can progress to leukemia (13).

Fst, a protein encoded by one of the genes that is inhibited by 5-aza (6), is an endogenous inhibitor of activin (14). It binds activin with high affinity (50-500 pM), leading to the formation of biologically inactive protein complexes, thereby regulating a number of processes that are controlled by activin (15, 16). Previous studies have shown that activins, which belong to the TGF- β family, can promote skin wound repair by activating signal transduction through the RhoA-JNK signaling pathway (3, 17). Thus, we hypothesized that a pharmacological inhibition of Fst in skin wounds would result in increased activin signaling and accelerated wound repair.

Initially, we tested our hypothesis using two distinct therapeutic approaches: topical 5-aza applied beginning on the day of wound generation and on the third day following wound generation. The first day of wound healing is characterized by clot formation, while the third

day is marked by intense inflammatory activity (1). While 5-aza treatment beginning on the day of wound generation did not lead to any change in the process of healing, 5-aza treatment initiated on the third day produced a significant acceleration of the process that could be noted as early as the fifth day after wounding. In addition to its inhibitory effect on Fst expression, 5-aza treatment begun on the third day reduced TNF- α expression and increased TGF- β expression in the wounds, whereas 5-aza started on day 0 led to an increased expression of TNF- α and reduced expression of IL-10.

TGF- β plays an important role in skin development, and its expression is increased during a narrow window of time during the repair of damaged skin (18). Although the mechanisms by which TGF- β controls wound healing are not fully known, the regulation of inflammatory activity seems to be particularly affected by its presence (18). Our results show that starting 5-aza during the third day after wound generation alters the expression of the inflammatory cytokine TNF- α , suggesting that the modulation of the inflammatory activity in the wound could be one mechanism involved in the beneficial effects of the drug.

We next evaluated the impact of 5-aza on the expression of proteins involved in skin repair. Involucrin plays an important role in the organization of the cellular structural changes required for the formation of the cornified envelope during keratinocyte differentiation (19). While 5-aza treatment started on the third day after wound generation resulted in the increased expression of involucrin, 5-aza started on the day of wound generation significantly and long-lastingly reduced the expression of this protein. In parallel with the increased expression of involucrin, 5-aza treatment started on day 3 led to increases in the expression levels of cytokeratin-14 and cytokeratin-10 and to increased cell proliferation, as determined by the BrdU incorporation method. Lastly, 5-aza started on day 3 produced a thicker epidermal layer and more organized collagen fiber disposition. Taken together, these results suggest that 5-aza has a beneficial effect

on wound healing, affecting multiple aspects of the process, including the expression of growth factors, cytokines and cytoskeletal proteins.

In the last part of the study, we tested the hypothesis that the beneficial effects of 5-aza were due to the reduction of Fst expression. Indeed, the application of exogenous Fst was sufficient to reverse the effect of 5-aza, maintaining the same healing process efficiency over 15 days as was observed in the control.

Taken together, the results of this study provide evidence for the beneficial effect of 5-aza as a pharmacological agent to accelerate skin wound healing. It must be emphasized that the drug must be applied during the inflammatory phase of healing; in our hands, the early use of 5-aza during the cloth formation phase was accompanied by increased inflammatory activity and reduction of the expression of a number of important repair markers. At least a portion of the effect of 5-aza is dependent on the reduction of Fst expression.

Acknowledgements. We thank Dr. E. Roman, G. Ferraz and M. Cruz for technical assistance. Sao Paulo Research Foundation provided the grants for this study. The authors belong to the National Institute of Science and Technology – Diabetes and Obesity and to the Obesity and Comorbidities Research Center, Brazil.

REFERENCES

1. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276(5309):75-81.
2. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012;49(1):35-43.
3. Zhang M, Liu NY, Wang XE, Chen YH, Li QL, Lu KR, et al. Activin B promotes epithelial wound healing in vivo through RhoA-JNK signaling pathway. *PLoS One* 2011;6(9):e25143.
4. Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225(1-2):127-32.
5. McDowall M, Edwards NM, Jahoda CA, Hynd PI. The role of activins and follistatins in skin and hair follicle development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(5-6):415-26.
6. Wu Y, Zhou S, Smas CM. Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mech Dev* 2010;127(3-4):183-202.
7. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21(35):5483-95.
8. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* 2012;7(1):e30571.
9. Gunter CI, Machens HG. New strategies in clinical care of skin wound healing. *Eur Surg Res* 2012;49(1):16-23.
10. Jaul E. Non-healing wounds: the geriatric approach. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;49(2):224-6.
11. Keating GM. Azacitidine: a review of its use in the management of myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukaemia. *Drugs* 2012;72(8):1111-36.
12. Lu LJ, Randerath K. Mechanism of 5-azacytidine-induced transfer RNA cytosine-5-methyltransferase deficiency. *Cancer Res* 1980;40(8 Pt 1):2701-5.
13. Lyons RM. Myelodysplastic syndromes: therapy and outlook. *Am J Med* 2012;125(7 Suppl):S18-23.
14. de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116(1):105-14.
15. Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 1994;77(2):283-95.

16. Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, et al. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9337-42.
17. Munz B, Tretter YP, Hertel M, Engelhardt F, Alzheimer C, Werner S. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180(1-2):169-77.
18. Li AG, Koster MI, Wang XJ. Roles of TGFbeta signaling in epidermal/appendage development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(2):99-111.
19. Eckert RL, Crish JF, Efimova T, Dashti SR, Deucher A, Bone F, et al. Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol* 2004;123(1):13-22.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do trabalho demonstraram que:

- O tratamento com 5-aza levou a uma modulação na atividade inflamatória da ferida, evidenciada pela alteração na expressão de TNF- α .
- Além de alteração na expressão de citocinas, o tratamento com 5-aza foi capaz também de afetar múltiplos aspectos do processo de cicatrização como alteração na expressão de fatores de crescimento e proteínas do citoesqueleto, sugerindo então seu efeito benéfico.
- O tratamento tópico com 5-aza levou a uma redução na expressão de folistatina, acarretando por sua vez um aumento na ativação das ativinas, demonstrando assim sua eficácia sobre a cicatrização.
- O 5-aza demonstrou ser um agente farmacológico eficaz em acelerar o processo de cicatrização, fazendo das ativinas um potencial alvo terapêutico para o tratamento de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

1. Goldsmith. My organ is bigger than your organ. Arch.Dermatol 1990;126 (3):301-2.
2. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2):403-434.
3. Nestle FO, Di Meglio P, Qin J, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev.Immunol. 2009; 9(10):679-691.
4. Stoitzner P, Sparber F, Tripp CH. Langerhans cells as targets for imunotherapy against skin cancer. Immunol. Cell Biol.2010; 88(4):431-437.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica.Editora Guanabara Koogan. 1999;18: 303-332.
6. Ferreira MC, Tuma Jr. P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. Clinics. 2006; 61(6):571-8.
7. Andrade MNB, Seward R, Melo JRC. Curativos. Rev Méd Minas Gerais 1992; 2(4):228 36.
7. Abila LEF, Ishizuka MMA. Fisiopatologia das Feridas. In: Ferreira LM. Manual de cirurgia plástica. São Paulo: Atheneu; 1995;5-11.
8. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature 2000;404(6778):635-643.
9. Zimmet P, Albert KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414(6865):782-7.
10. Santos VLCG. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; 2000;265-306.
11. Bryant RA. Acute and chronic wounds: nursing managment. 2ª ed. St Louis: Mosby; 1992;105-63
12. Singer A, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med 1999;341(10):738-4.

13. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras de Ciênc Farmac* 2005;41(1):27-50.
14. Seishima M, Nojiri M, Esaki C, Yoneda K, Eto Y, Kitajima Y. Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):432-6
15. Phillips DJ, Kretser DM, Hedger MP. Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009; 20(2): 153–164.
16. Schramm C, Werner S, Blessing M, Herkel J, Presser K, Carambia A. Induced Regulatory T Cells Conversion of CD4 +CD25 T Cells into Foxp3+Activin A Promotes the TGF- β -Induced. *J Immunol.*2009;182(8):4633-4640.
17. De Kretser DM, O'Hehir RE, Hardy CL, Hedger MP. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Mol Cell Endocrinology* 2011;359(1-2):101-106.
18. Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and Neuroprotection. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004;225(1-2):127–132.
19. Zhang M, Liu NY, Wang XE, Chen YH, Li QL, et al. Activin B Promotes Epithelial Wound Healing In Vivo through RhoA-JNK Signaling Pathway. *PLoS ONE* 2011; 6(9):25-143.
20. Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006;17(3):157–171.
21. Winter JP, Dijkeb P, Vries CJM , Achterberg TAE, Sugino H, Waelee P, Huylebroeckb D,Verschuerenb D, Eijnden-van Raaij AJM. Follistatins neutralize

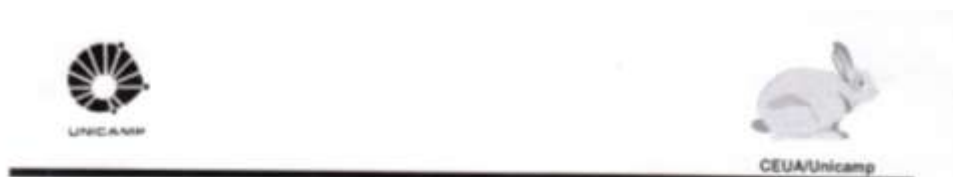
- activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996; 116(1):105-114.
22. Hubner G, Hu Q, Smola H, Werner S. Strong Induction of Activin Expression after Injury Suggests an Important Role of Activin in Wound Repair. *Developmental Biology*. 1996;173(2):490–498.
 23. Sieber Nt, Xu W, Grambow E, Zechner D, Vollmar B. Erythropoietin improves skin wound healing and activates the TGF- β signaling pathway. *Laboratory Investigation*. 2011;91(12):1-13.
 24. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002;21 (35):5483 – 5495.
 25. Wu Y, Zhou S, Smas CM. Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mechanisms of development*. 2010;127(3-4):13–202.
 26. Poirier F, Bourin P, Bladier D, Caron RJ, Caron M. effect of 5-azacytidine and galectin-1 on Growth and differentiation of the human b lymphoma cell line b136. *Cancer Cell International*. 2001;1(1):2.
 27. Yang F, Zhang L, Li J, Huang J, Wen R, Ma L, Zhou D, Li L. Trichostatin A 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize. *BMC Plant Biol*. 2010;10(178):2-11.
 28. Czibere A, Bruns I, Kröger N, Platzbecker U, Lind J, Zohren F, Fenk R, Germing U, Schroder T, Graf T, Haas R, Kobbe G. 5 azacytidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome who relapse after allo-SCT: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantation*. 2010;45(5):872-876.
 29. Kelecsényi Z, spencer DL, Caspary WJ. Molecular analysis of 5 azacytidine-induced variants in mammalian cell. *UK Envirom Mutag Society* 2000; 15: 25-31.

30. Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA Drug approval summary:(azacytidine, Vidaza TM) for injectable suspension. *The Oncologist*. 2005;10(3):176-182.
31. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75–81.
32. Hubner G, Hu Q, Smola H, Werner S Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Biol*.1996; 173(2): 490–498.
33. Munz B, Tretter YP, Hertel M, Engelhardt F, Alzheimer C, et al. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 180(1-2):169–177.
34. Harrison, C. A., Gray, P. C., Vale, W. W. and Robertson, D. M. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol. Metab*. 2005;16(2):73-78.
35. Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, Lein I, Evans LW, Huylebroeck D, Balling R,Werner S. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair.*EMBO J*. 1999; 18(19):5205-15.
36. Sulyoka S, Wankella M, Alzheimer C, Wenwr S. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection .*Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004;225(1-2):127–13.
37. Grose R ,Werner S. Wound healing studies in transgenic and knockout mice. A review.*Methods Mol Med*. 2003;78:191-216. Review.
38. Nüsing R.M. Barsig, J.. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *Brit. J. Pharmacol*. 1999;127(4):919–926.

39. Nüsing, RM, Mohr S, Ullrich V. Activin A and retinoic acid synergize in cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase induction during differentiation of J774.1 macrophages. *Eur J Biochem.* 1995;227(1-2):130-136.
40. Yamashita, N. et al. Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology.* 1993;94(1):214–219.
41. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, Bernabéu C, Vega MA, Corbí AL. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood.* 2011;117(19):5092-5101.
42. Bamberger C, Scharer A, Antsiferova M, et al. Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes. *Am J Pathol.* 2005;167(3):733–747.
43. Antsiferova M, Klatte JE, Bodo E, Paus R. Keratinocyte-derived follistatin regulates epidermal homeostasis and wound repair. *Laboratory Investigation.* 2009;89(2):131–141.
44. De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;116(1):105-14.
45. Seishima M, Nojiri M, Esaki C, et al. Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):432–436.
46. Munz, B., Smola, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., Brauchle, M., Lein, I., Evans, L. W., Huylebroeck, D., Balling, R. and Werner, S. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J.* 1999;18(19): 5205-5215.

47. Zhang M, Liu NY, Wang XE, et al. Activin B promotes epithelial wound healing in vivo through RhoA-JNK signaling pathway. PLoS ONE. 2011;6(9),1-13.

ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

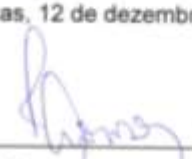
Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DO USO DE 5 AZA CYTIDINE SOBRE OS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS DIABÉTICOS" (protocolo nº 2583-1), sob a responsabilidade de PROFA. DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAUJO / Fabiana de Souza Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de dezembro de 2011.

Campinas, 12 de dezembro de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva