



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BIANCA MOREIRA KURITA

**EFEITO CICATRIZANTE E MECANISMOS SUBJACENTES DE UMA
PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE NONI *Morinda citrifolia* L.
(Rubiaceae) EM QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA- CE
2023

BIANCA MOREITA KURITA

EFEITO CICATRIZANTE E MECANISMOS SUBJACENTES DE UMA
PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE NONI *Morinda citrifolia* L.
(Rubiaceae) EM QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do
título de doutor em Farmacologia.
Orientadora: Profa. Dra. Nylane
Maria Nunes de Alencar.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- K1e Kurita, Bianca Moreira.
Efeito cicatrizante e mecanismos subjacentes de uma proteína isolada das sementes de Noni *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) em queimaduras superficiais em camundongos / Bianca Moreira Kurita. – 2023.
89 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. cicatrização. 2. *Morinda citrifolia*. 3. queimaduras. I. Título.

CDD 615.1

BIANCA MOREIRA KURITA

EFEITO CICATRIZANTE E MECANISMOS SUBJACENTES DE UMA
PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE NONI *Morinda citrifolia* L.
(Rubiaceae) EM QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do
título de doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane
Maria Nunes de Alencar.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

Profa. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAR

Profa. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará - UFC
(Orientadora)

A Deus que em sua infinita bondade permaneceu ao meu lado em todos os momentos, ao meu esposo e ao meu filho, que compreenderam minhas ausências durante esses anos e me recebiam em casa cheios de amor e à minha mãe, por todo o apoio e suporte.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Deus pelas minhas vitórias e derrotas, pelo amor inabalável, e pela força em persistir durante todos esses anos de dedicação e estudo.

A minha querida orientadora, Prof.^a Nylane Alencar, por ter estendido sua mão quando mais precisei e ter aceitado me orientar. Por me mostrar o lado humano, respeitoso, bondoso e agradável da pós-graduação. Por ser amiga e confidente, por me ensinar tudo o que sabe, por ser exemplo de docência. Por não medir esforços para conseguir verba para nossas pesquisas, por querer nos ver crescer e ter orgulho dos nossos feitos. Muito obrigada, Professora Nylane!

Ao prof.^o Hermógenes de Oliveira por ter me concedido a oportunidade e confiado a mim trabalhar com a McLTP1 e estudar mais sobre as propriedades desta proteína. Agradeço por toda a cordialidade e amizade, pela disponibilidade em se reunir comigo para me ajudar a corrigir protocolos e atingir os resultados, bem como participar da banca avaliadora de defesa desta tese. Obrigada, professor Hermógenes!

A prof.^a Renata Leitão, por ter estabelecido, de maneira assertiva, os escores da avaliação histológica e ter contribuído para este trabalho. Não somente por isso, mas também por todo o carinho com que me tratou durante o tempo em que realizou a avaliação e me trata até hoje, por toda a disponibilidade e compreensão, por ter dedicado seu tempo a engrandecer este trabalho e por ter aceitado nosso convite para avaliar meu trabalho. Obrigada, professora Renata!

Aos professores Felipe Sousa e Jefferson Oliveira, por aceitarem contribuir com este trabalho, participando da banca de defesa da tese. É um prazer poder ouvir contribuições de docentes competentes como vocês.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC, que compartilham conosco seus conhecimentos e tornam suas disciplinas engrandecedoras.

As professoras Deysi Viviana Tenazoa Wong e Mirna Marques Bezerra Brayne que participaram da banca de qualificação deste trabalho e teceram contribuições pertinentes.

A Dr.^a Tamiris Goebel, pelas observações feitas no momento da qualificação, bem como a amizade e disponibilidade em me ensinar os protocolos de cicatrização *in vitro* e *in vivo*.

As amigas Gisele Pinheiro, Fernanda Macedo e Liviane Rabelo, pelos momentos de descontração em meio ao trabalho. Por toda a ajuda durante os experimentos, pelo incentivo e pela amizade sincera. Vocês foram essenciais neste percurso e, com toda certeza, o tornaram mais fácil e prazeroso.

Ao grupo de pós-graduação do Laboratório de Farmacologia Bioquímica, em especial a Raquel Roriz, Kayanne Queiroz e Marília Nunes, pela parceria nos experimentos, limpezas e seminários.

Ao técnico de laboratório Dr. Manuel Monteiro, pela disposição em ajudar no que fosse preciso e por manter o laboratório de modo a facilitar nosso trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica que passaram e que estão no laboratório: Anderson Dantas, Carol Oliveira, Rebeca Duarte, Ianah Marcilon e Marcelo Fernandes pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitei e, principalmente, pela vontade de sempre aprender mais. Podem ter certeza de que aprendi muito mais compartilhando conhecimento com vocês.

Aos meus pais Evandro Moreira e Maria Cecy Moreira por todo o suporte que me deram, pelo esforço que fizeram pela minha educação, para que eu tivesse

estrutura e tranquilidade para estudar. Quero sempre ser motivo de orgulho para vocês!

Ao meu esposo Lucio Kurita, pelo incentivo de todas as horas. Pelo amor, carinho e respeito que me dedicou, nos quais pautamos nosso casamento. Obrigada por não deixar eu desistir e me fazer acreditar no meu potencial. Eu te amo.

Ao meu filho Lucas Kurita, por ser meu motivo de viver, por me fazer querer ser melhor a cada dia. Pelo seu sorriso que me alegra e seu abraço que me acalma. Por entender quando não pude estar presente em alguns momentos e por me fazer sentir a mulher mais amada do mundo. Eu te amo, meu cabritinho.

Aos meus amigos de faculdade Edyr Freitas, Flávia Jucá, Juliana Buosi, Felipe Ramirez e Thales Feijó, que mesmo após 8 anos de formados, continuam sendo amigos com quem posso dividir minhas alegrias e meus anseios. Obrigada por todos os conselhos, eles valeram à pena.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), em especial a Dona Marta e Seu Sevilho, pelas conversas boas e cordiais.

As secretárias da Pós-graduação em Farmacologia, Milena e Laura por todo auxílio e disponibilidade quando precisei da licença maternidade, bem como na parte de autorizar a qualificação e defesa da tese.

RESUMO

As queimaduras são problemas de saúde que sobrecarregam o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil apresentando alto custo para tratamento. Atualmente, os tratamentos disponíveis focam em reduzir a contaminação bacteriana das lesões, mas apresentam poucos efeitos indutores da cicatrização. Assim, empregar plantas com potencial terapêutico, pode ser uma alternativa. A *McLTP1*, uma proteína transferidora de lipídios isolada das sementes da *Morinda citrifolia* (noni) tem mostrado efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, antibacterianos e antioxidantes, mas seu efeito cicatrizante ainda não foi estudado. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito da *McLTP1* na cicatrização de queimaduras superficiais em camundongos. O estudo obteve aprovação da CEUA NPDM – UFC (protocolo: 02170619-0). A avaliação da proliferação celular foi realizada com linhagens de fibroblastos murinos (L929), pelo método da sulforodamina B (SRB) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A queimadura foi induzida pelo contato direto de uma placa de aço quadrada inox (1,5 cm²). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n= 6/grupo) e tratados diariamente com solução salina de NaCl a 0,9% (Sham), Sulfadiazina de prata 1% (Sulfa 1%), creme lanette (Veículo), a *McLTP1* a 0,25% e 0,5% em creme lanette. Os animais foram eutanasiados após 3, 7 e 14 dias. O ensaio de SRB mostrou que a *McLTP1* promoveu aumento da proliferação celular na concentração de 0,05 µg/ml em relação aos controles DMEM e Salina. Nos animais, a *McLTP1* promoveu fechamento total das feridas após 2 semanas de tratamento, reduziu os escores histopatológicos após 7 dias, bem como induziu a formação de um epitélio de maior espessura ao 14^o dia, modulou a inflamação reduzindo a atividade da MPO, os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e aumentando IL-10 em 3 dias, modulou a produção de VEGF nos três tempos de análise do estudo, favorecendo a cicatrização, aumentou os níveis de TGF- β e as imunomarcações para FGF após 7 dias, reduziu a expressão para TNF- α no 3^o dia e exerceu função antioxidante ao reduzir MDA e nitrito e aumentar o GSH após 3 dias da queimadura. Em suma, a *McLTP1* mostrou uma importante ação cicatrizante neste modelo de queimadura, apresentando efeitos adicionais anti-inflamatórios e antioxidantes.

Palavras-chave: cicatrização; *Morinda citrifolia*; queimaduras.

ABSTRACT

HEALING EFFECT AND UNDERLYING MECHANISMS OF A PROTEIN ISOLATED FROM NONI SEEDS *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) ON SUPERFICIAL BURNS IN MICE

Burns are health problems that burden the Unified Health System (SUS) in Brazil, with a high cost for treatment. Currently, available treatments focus on reducing bacterial contamination of lesions, but have few healing-inducing effects. Thus, using plants with therapeutic potential can be an alternative. McLTP1, a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* (noni) seeds, has shown antinociceptive effects, anti-inflammatories, antibacterials and antioxidants, but its healing effect has not yet been studied. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of McLTP1 on the healing of superficial burns in mice. The study was approved by CEUA NPDM – UFC (protocol: 02170619-0). Cell proliferation was evaluated using murine fibroblasts (L929) using the sulforodamine B (SRB) method at 24, 48 and 72 hours. The burn was induced by direct contact with a square stainless-steel plate (1.5 cm²). The animals were divided into five experimental groups (n=6/group) and treated daily with 0.9% NaCl saline solution (Sham), 1% silver sulfadiazine (1% sulfa), lanette cream (Vehicle), the 0.25% and 0.5% McLTP1 in cream lanette. The animals were euthanized after 14 days. The SRB assay showed that McLTP1 promoted an increase in cell proliferation at a concentration of 0.05 µg/ml compared to DMEM and saline controls. In vivo, McLTP1 promoted total wound closure after 2 weeks of treatment, reduced histopathological scores at 3rd day, as well as induced the formation of a thicker epithelium and collagens synthesis on 14th day, modulated inflammation by reducing MPO activity, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels and increasing IL-10 after 3 days of burn, modulated VEGF production at three times analyzed in this study, increased TGF- β and immunostaining for FGF after 7 days, reduced immunostaining for TNF- α on the 3rd day and exerted an antioxidant function by reducing MDA and nitrite and increasing GSH at day 3. In short, McLTP1 showed an important healing action in this burn model, showing additional anti-inflammatory and antioxidant effects.

Keywords: burns; *Morinda citrifolia*; wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae) “Noni”	16
Figura 2 – Camadas que constituem a pele.....	23
Figura 3 - Estágios e zonas das queimaduras.....	26
Figura 4 - Análise eletroforética do isolamento da proteína da semente de <i>Morinda citrifolia</i> L. (McLTP1).....	32
Figura 5 – Representação dos protocolos experimentais empregados no estudo.....	36
Figura 6 - Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com a <i>McLTP1</i> pelo método da SRB.....	45
Figura 7A - Evolução temporal da contração das feridas induzidas por queimaduras e tratadas com <i>McLTP1</i>	47
Figura 7B - Representação fotográfica do seguimento clínico das úlceras por queimadura tratadas com <i>McLTP1</i>	49
Figura 8 - Fotomicrografia da área ulcerada na pele após 3 dias nos grupos experimentais (HE).....	51
Figura 9 - Fotomicrografia da área ulcerada na pele após 7 dias nos grupos experimentais (HE).....	52
Figura 10 - Efeito do tratamento com <i>McLTP1</i> na espessura do epitélio neoformado após 14 dias.....	53
Figura 11 - Fotomicrografia da área ulcerada na pele após 14 dias nos grupos experimentais (HE).....	54
Figura 12 - Efeito do tratamento com <i>McLTP1</i> na atividade da MPO.....	55
Figura 13 - Efeito do tratamento com <i>McLTP1</i> nos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.....	56
Figura 14 - Representação fotográfica da angiogênese na pele submetida à queimadura.....	58
Figura 15 - Efeito do tratamento com <i>McLTP1</i> nos níveis de TGF- β	59
Figura 16 - Quantificação das imunomarcações para TNF- α na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 3 dias	60
Figura 17 - Fotomicrografias das imunomarcações para TNF- α na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 3 dias.....	61

Figura 18 - Quantificação das imunomarcações para FGF na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 7 e 14 dias.....	62
Figura 19 - Fotomicrografias das imunomarcações para FGF na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 7 dias.....	63
Figura 20 - Fotomicrografias das imunomarcações para FGF na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 14 dias.....	64
Figura 21 - Efeito do tratamento com <i>McLTP1</i> nos níveis de MDA, GSH e NO ₂ /NO ₃	65
Figura 22 – Resumo dos efeitos produzidos pela <i>McLTP1</i> em modelo de queimadura superficial.....	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Composição dos cremes dermatológicos.....	34
Tabela 2 – Escores utilizados na avaliação histológica.....	38
Quadro 1 – Representação por escores da avaliação histológica das queimaduras	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CXCL	Quimiocina ligante CXC
DAB	Diaminobenzidina
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GSH	Glutaciona reduzida
HTAB	Hexadeciltrimetilamonio
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L-NAME	N ω -nitro-arginina-metil-ester
LTP	Proteína transferidora de lipídio
McLTP1	Proteína transferidora de lipídios isolada da <i>Morinda citrifolia</i>
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NaDPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaEDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético sódico
NaPO ₄	Fosfato de sódio
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
NP-SH	Grupos sulfidrílicos não-proteicos
PGE	Prostaglandinas

PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	Tetrametilbenzidina
TGF	Fator transformador do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae) “Noni”	18
1.2	Proteína transferidora de lipídios, <i>McLTP1</i> , isolada das sementes de Noni <i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae)	20
1.3	Constituição da pele e o processo de cicatrização	22
1.4	Cicatrização de queimaduras	25
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Isolamento e purificação da proteína isolada da semente de <i>Morinda citrifolia</i> L. (<i>McLTP1</i>)	32
4.2	Cultivo das linhagens de fibroblastos murinos	32
4.2.1	Avaliação do efeito de <i>McLTP1</i> na viabilidade de fibroblastos murinos método da Sulforodamina B (SRB)	33
4.3	Protocolo de indução de queimadura superficial e tratamento dos animais	33
4.3.1	Animais	33
4.3.2	Preparo dos cremes dermatológicos	34
4.3.3	Indução das queimaduras superficiais	34
4.3.4	Definição dos grupos experimentais	35
4.4	Avaliação da contração das lesões	34
4.5	Obtenção das amostras teciduais	37
4.6	Processamento das amostras para coloração por HE	37
4.7	Dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	38
4.8	Análise dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e VEGF	37
4.9	Análise imunohistoquímica da expressão de TNF- α e FGF	39
4.10	Avaliação do estresse oxidativo	40
4.10.1	Quantificação dos níveis de MDA (malondialdeído)	40
4.10.2	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)	41
4.10.3	Determinação dos níveis de nitrito (NO ²⁻)	42
4.11	Análise Estatística	43
5	RESULTADOS	
5.1	A <i>McLTP1</i> apresentou baixa toxicidade e efeito proliferativo pelo método SRB	44
5.2	Avaliação Macroscópica	46
5.2.1	O tratamento tópico com <i>McLTP1</i> aumenta a contração de feridas induzidas por queimadura	46
5.3	Avaliação histológica	49
5.3.1	O tratamento com <i>McLTP1</i> promoveu redução do infiltrado inflamatório, e remodelação tecidual nas lesões induzidas por queimadura.	49
5.4	Análises bioquímicas	55
5.4.1	A <i>McLTP1</i> reduziu a atividade de mieloperoxidase (MPO) nas feridas induzidas por queimadura	55
5.4.2	A <i>McLTP1</i> modulou a inflamação diminuindo a liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6 e aumentando a liberação de IL-10 nas lesões após 3 dias da indução por queimadura	55
5.4.3	A <i>McLTP1</i> modulou os níveis de VEGF nos três períodos experimentais	57
5.4.4	A <i>McLTP1</i> modulou os níveis de TGF- β nos 7º e 14º dias	58

5.4.5	O tratamento com <i>McLTP1</i> reduziu as imunomarcações para TNF- α no 3º dia	59
5.4.6	O tratamento com <i>McLTP1</i> aumentou a expressão de FGF após 7 e 14 dias	61
5.4.7	O tratamento com <i>McLTP1</i> reduziu o estresse oxidativo	64
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS	77
9	ANEXO I	88
10	ANEXO II	89

INTRODUÇÃO

1.1 *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) “Noni”

A *Morinda citrifolia* L. (Noni) é uma planta medicinal bastante popular, descoberta pelos ancestrais polinésios a mais de 2000 anos, que apresenta uma ampla variedade de propriedades nutricionais (Singh, Ikahihifo, Panuve, 1984; Whistler, 1985). A árvore pode chegar até 6 metros de altura, cujas folhas verdes e ovais podem medir entre 10 e 30 cm. O fruto tem forma ovoide, e quando maduro apresenta odor forte e sabor adstringente. As sementes são de cor marrom e apresentam compartimento aerado que lhes permite fluturar (Potterat; Hamburger, 2007).

Figura 1 - *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) “Noni”



<https://jornalagricola.wordpress.com>

Esta planta apresenta uma distribuição cosmopolita, se desenvolvendo muito bem em ambientes tropicais, entretanto, metade das suas espécies é encontrada na América do Sul. No Brasil existem, aproximadamente, 130 gêneros e um total de 1500 espécies de *Morinda citrifolia* L. (Joly, 2002). É considerada uma planta de boa resistência ao estresse e longevidade. Se desenvolve bem quando exposta ao sol e ventos frios, e dificilmente é acometida por pragas (Germosén-Robineau, 1995). Leva em torno de 1 ano de cultivo para o noni produzir seus frutos, que após isso, passa a ter produção constante durante o ano inteiro (Torres et al., 2017). No Brasil, o cultivo já é relatado nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe e Ceará, entre outros (Correia et al., 2011)

Estudos relatam que o noni apresenta benefícios terapêuticos contra o câncer, diabetes, respostas alérgicas e úlceras gástricas (Whistler, 1992). Para alcançar esses benefícios, são utilizados as raízes, caule, casca, frutos e folhas (Bao-

Ning et al., 2005). Em modelo tumoral em animais, foi observado que o extrato aquoso de folhas do noni inibiu o crescimento de células tumorais pela supressão da resposta imunológica via ciclooxygenase-2 (Lim et al., 2016). Wang e Su (2001) também observaram, em modelo animal semelhante, que a administração de suco do noni resultou na inibição de genes mutantes, mais especificamente por inibir a formação de compostos carcinogênicos que se ligam ao DNA celular.

O efeito antidiabético foi investigado em camundongos C57BL/6, após indução de diabetes tipo II e tratamento com suco do noni. Observou-se que os animais tratados demonstraram maior taxa de metabolismo da glicose, via fosforilação do fator de transcrição FOXO1 (Nerurkar et al., 2012). Em outro estudo com ratos diabéticos, o suco do noni reduziu os níveis séricos de glicose e apresentou ação sinérgica à terapia com insulina (Horsfall et al., 2008). As raízes do noni também demonstraram efeito hipoglicêmico em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. O extrato metanólico da raiz reduziu os níveis plasmáticos de glicose (Kamiya et al., 2008). Efeito semelhante foi observado em ratos diabéticos tratados com suco do noni fermentado, onde observou-se, além do efeito hipoglicêmico, propriedades hepatoprotetoras (Nayak et al., 2011).

As propriedades antialérgicas foram investigadas em ratos que tiveram as orelhas inoculadas com alérgenos, que foram tratados com extrato etanólico das folhas e frutos, administrado por via oral. A avaliação foi realizada na fase imediata e tardia da hipersensibilidade. Foi observada redução do edema nas duas fases avaliadas, sugerindo que os extratos reduzem a degranulação de mastócitos e a liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios, o que permite levantar a hipótese de que o noni pode ser efetivo em tratar reações de hipersensibilidade e dermatite atópica (Murata et al., 2014).

A capacidade gastroprotetora da *Morinda citrifolia* L. foi avaliada por Mahattanadul et al. (2011), que utilizaram o extrato aquoso da fruta em modelo de inflamação gastro-esofágica, que agrega efeitos como esofagite de refluxo, gastrite aguda induzida por etanol e úlcera gástrica induzida por ácido acético. O noni preveniu a esofagite, reduziu a formação de lesões gástricas e acelerou a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético, com efeito similar à ranitidina e lansoprazol.

O potencial cicatrizante do Noni já foi estudado anteriormente em modelo de ferida excisional em ratos. Um extrato aquoso foi obtido através das folhas do Noni, e utilizado diariamente na dose de 150 mg/kg por via oral, diluído na mamadeira de

água. Após 5 e 11 dias, observou-se que o tratamento promoveu maior contração das feridas. Histologicamente, observou-se maior quantidade de colágeno e fibroblastos, e redução de infiltrado inflamatório dos animais tratados com o extrato (Nayak, Sandiford, Maxwell; 2009).

1.2 Proteína transferidora de lipídios, *McLTP1*, isolada das sementes de Noni *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)

As proteínas transferidoras de lipídios (LTPs) são abundantes no reino vegetal e estão envolvidas na sinalização contra a invasão de microorganismos (Azofra et al., 2016). As LTPs são divididas em duas famílias de acordo com seu peso molecular, sendo a primeira família denominada LTPs tipo 1 com massa molecular de aproximadamente 9 kDa e cerca de 90 aminoácidos, incluindo a grande maioria dessas proteínas. A segunda família é denominada LTPs tipo 2 formada por proteínas com massa molecular de aproximadamente 7 kDa e cerca de 70 aminoácidos. Essas proteínas contêm oito resíduos de cisteína formadoras de pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura, composta de um feixe de quatro a cinco α -hélices, que formam uma cavidade hidrofóbica com capacidade de facilitar a troca de lipídeos entre membranas, por exemplo ácidos graxos e fosfolipídeos (Asero et al., 2017; Deeken et al., 2016; Salmien, Blomqvist, Esqvist, 2016).

Em 2016, Campos et al. utilizaram as sementes da *Morinda citrifolia* L. e isolaram, pela primeira vez, uma proteína transferidora de lipídeos chamada *McLTP1*. O isolamento foi feito em quatro etapas onde se obteve o rendimento de 72 mg de *McLTP1* para 100 g de sementes de Noni. Após a purificação, a *McLTP1* apresentou uma massa molecular em torno de 9.4 kDa e sua sequência N-terminal (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) demonstrou um alto grau de identidade com outras proteínas transferidoras de lipídios vegetais já relatadas, bem como boa estabilidade térmica e resistência à ação enzimática da pepsina, tripsina e quimotripsina.

Campos et al., (2016), além de isolarem a *McLTP1* das sementes de noni, realizaram ainda a administração intraperitoneal de *McLTP1* nas doses de 1, 2, 4 e 8 mg/kg via oral de 8 mg/kg e camundongos, e observaram que essa proteína inibiu a contorção animal em resposta ao ácido acético. O pré-tratamento de camundongos com a *McLTP1* (8 mg/kg, i.p. e v.o.) também diminuiu as fases neurogênica e inflamatória da nocicepção no teste da formalina. A naloxona (2 mg/kg, i.p.),

antagonista de receptores opioides, interferiu no efeito analgésico da *McLTP1*, o que possibilita sugerir que a ação antinociceptiva desta proteína ocorra pela via opioide.

A dose de 8 mg/kg (v.o e i.p.) de *McLTP1* inibiu a quimiotaxia de neutrófilos em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina e reduziu o aparecimento de edema de pata induzido por carragenina e dextrana em camundongos. Também foi observada a redução da presença de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e aumento de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, nas amostras de pata, sugerindo-se que os efeitos anti-inflamatórios podem estar associados à modulação de citocinas inflamatórias. A *McLTP1* também foi capaz de reduzir marcadores de lesão pancreática como a amilase e a lipase séricas (Campos et al., 2017).

Em um estudo *in vitro* e *in vivo*, a *McLTP1* nas concentrações de 12,5 a 800 μ g/mL demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, reduzindo o crescimento de colônias e a formação de biofilme. Ademais, essa proteína induziu maior sobrevivência de camundongos em modelo de sepse com ligadura do ceco, uma vez que nenhum animal tratado com a dose de 8 mg/kg por vias oral ou intraperitoneal morreu. Esses animais ainda apresentaram melhora nos sinais de infecção como perda de massa corporal, febre, leucocitose e dano aos órgãos, além de modular a resposta inflamatória induzida pela sepse (Souza et al., 2018).

Nogueira et al. (2022) demonstraram efeitos gastro e hepatoprotetor da *McLTP1*, ao reduzir, nas doses de 4, 8 e 16 mg/kg, lesões gástricas induzidas por etanol, tanto de maneira profilática como terapêutica. Esse estudo também demonstrou que o pré-tratamento de um inibidor da síntese de óxido nítrico, o N-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) (20 mg/kg, i.p.), reverteu parcialmente o efeito protetor da *McLTP1*, o que possibilita sugerir que a proteção observada com esta proteína pode estar relacionada à via do óxido nítrico. Além disso, a *McLTP1* demonstrou reduzir a secreção gástrica em modelo de ligadura do piloro, bem como os níveis de malondialdeído (MDA), e aumentar os níveis de glutathiona reduzida (GSH), desempenhando em conjunto um efeito antioxidante. No modelo de lesão hepática induzida por paracetamol, a dose oral de 8 mg/kg de *McLTP1* reduziu os níveis séricos de AST e ALT e hepáticos de MDA, aumentando os níveis de GSH, de maneira semelhante ao modelo de lesão gástrica.

Do Carmo et al. (2022) investigaram os efeitos da *McLTP1* em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano. As doses de 2 e 8 mg/kg via

intraperitoneal reduziam a diarreia e a mortalidade dos animais. A maior dose preveniu o dano intestinal causado pelo irinotecano e a contração causados pela mucosite, diminuindo a contratilidade excessiva do músculo intestinal. Também reduziu a atividade da mieloperoxidase, os níveis de IL-1 β , IL-6 e KC e a expressão de COX-2, NF- κ B e iNOS.

Diante desses resultados que mostram o potencial terapêutico da *McLTP1* e a necessidade de opções farmacológicas mais eficazes na cicatrização de feridas, se faz interessante investigar o efeito dessa proteína na cicatrização de queimaduras.

1.3 Constituição da pele e o processo de cicatrização

A pele exerce um importante papel na homeostasia e proteção do organismo contra agentes agressores do ambiente. Esse órgão está envolvido no transporte de fluidos, na regulação da temperatura, na percepção de sinais do ambiente, bem como na produção de hormônios e moléculas de sinalização (Nejati; Kovacic; Slominski, 2013). É constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, que contém uma enorme variedade celular como células estromais, epidermais, endoteliais e neuronais, bem como é composta, também de matriz extracelular (MEC) (Mathes et al., 2013; Spichka et al., 2019).

A epiderme, primeira camada da pele, é a barreira principal que separa os órgãos internos do meio ambiente. Ela é dividida em subcamadas como camada córnea, camada clara, camada granular, camada espinhosa e camada basal (Fuchs, 2008; Arda et al., 2014). Sua espessura é fina, composta por queratinócitos, células de merkel e langerhans e melanócitos. Os queratinócitos são a população de células mais abundantes na epiderme, e são responsáveis pela sua constituição estratificada e pela produção de queratina (Strong; Neumaister; Levi, 2017). Os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme e sintetizam melanina, um pigmento que absorve os raios ultravioletas, protegendo a pele de seus efeitos negativos (Arda et al., 2014). As células de meckel são os receptores mecânicos, também localizados na camada basal. As células de Langerhans e os monócitos estão distribuídas na camada espinhosa e desempenham função imunológica, apresentando antígenos, fagocitando patógenos e outros componentes estranhos (Mathes et al., 2014).

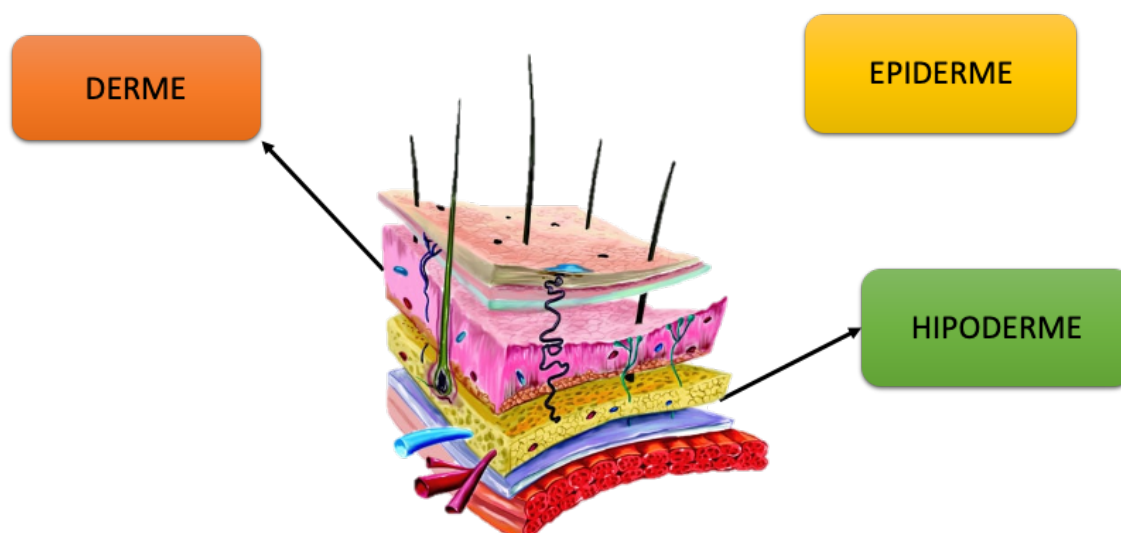
Abaixo da epiderme, situa-se a derme, agregando vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas sebáceas e folículos pilosos e constituída por duas camadas de tecido conectivo e MEC: camada papilar e reticular (Arda et al., 2014; Strong;

Neumaister; Levi, 2017). A camada papilar é superficial e constituída por tecido conectivo como colágeno tipo III. A camada reticular, mais fina e profunda, é composta por fibras mais organizadas de colágeno tipo I e III e vasos sanguíneos mais largos (Arda et al., 2014).

O tecido conectivo da derme é formado, em sua maioria por fibras colágenas que conferem resistência, mas também por elastinas e proteoglicanas, responsáveis por trazer elasticidade e flexibilidade, viscosidade e hidratação (Pozzi, Iuchenko, Yozzo et al, 2017). As células mais importantes da derme são os fibroblastos, que são os responsáveis pela manutenção da MEC ao produzir colágeno, elastina e proteoglicanas e secretar fatores de crescimento como TGF- β , citocinas como TNF- α e metaloproteinases de matriz (MMPs). Além disso, também são importantes para a diferenciação e proliferação de queratinócitos (Wang; Thampathy, 2007). Diante disso, os fibroblastos são as células centrais da remodelação e cicatrização da pele (Cerqueira; Pirraco; Marques, 2016).

Entre a derme e a camada muscular, localiza-se a hipoderme, cuja função é proteger os órgãos internos de traumas térmicos e mecânicos, participa da síntese hormonal e constitui uma reserva energética (Nejati; Kovacic; Slominski, 2013). É formada por uma rede de lóbulos de adipócitos, perfundida por tecido nervoso e por uma microvasculatura sanguínea e linfática, que melhora a nutrição e a oxigenação (Arda et al., 2014).

Figura 2 – Camadas que constituem a pele



<https://escolaeducacao.com.br/a-pele-e-um-tecido-ou-um-orgao/>

A pele é dividida em três camadas: epiderme, que serve de barreira protetiva e regula o transporte de fluidos; derme: que agrega os vasos sanguíneos e linfáticos e as fibras colágenas; hipoderme: contém a camada de gordura e participa na síntese hormonal

O restabelecimento da pele após uma lesão é um processo dinâmico que conta com quatro fases clássicas: homeostasia, inflamação, proliferação e maturação. Na fase de homeostasia, ocorre constrição dos vasos sanguíneos afetados e ativação plaquetária para promover a coagulação sanguínea (Clark, 2003). O coágulo promove proteção à ferida e serve de arcabouço para células inflamatórias. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas, e constituem a primeira linha de defesa contra a colonização de bactérias oportunistas (Wilgus; Roy; Daniel, 2013).

A fase inflamatória se inicia com a infiltração de células mononucleares no tecido afetado (Herman, 2005; Lorenti, 2012). Monócitos são recrutados dentro de 48 a 96 horas após a lesão, e se diferenciam em macrófagos no local (Park; Barbul, 2004). A ativação dos macrófagos torna por induzir o sistema imune adaptativo a enviar células fagocitárias como as células de Langerhans e outras células dendríticas e os linfócitos T para combater microorganismos (Davies et al., 2013a, 2013b).

A fase de proliferação conta com a multiplicação celular buscando a epitelização, fibroplasia, angiogênese e formação de tecido de granulação (Herman, 2005; Lorenti, 2012). Ao passo que a fase inflamatória se finaliza, a angiogênese começa a ser estimulada. Ela envolve a proliferação de células endoteliais, migração e ramificação para formar uma nova rede de vasos sanguíneos (Rodrigues et al., 2019). Pericitos da camada basal promovem um arcabouço para as células endoteliais, e ajudam neste processo (Ansel et al. 2015).

Enquanto novos vasos surgem, fibroblastos residentes se proliferam e invadem o coágulo para formar tecido de granulação, dando início à última etapa da cicatrização caracterizada pela deposição de colágeno ou formação da cicatriz (Herman, 2005; Lorenti, 2012). Os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, delimitando as margens da lesão (Martin, 1997) e depositam MEC alterando o microambiente inflamatório para proliferativo (Werner, Krieg, Smola, 2007). A partir disso, inicia-se a reepitelização da área afetada (Rodrigues et al., 2019). O processo de reparo também agrega a reconstrução dos anexos da pele. Glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos são restituídos pela multiplicação de células pluripotentes residentes. Essas células são unipotentes na homeostasia, mas após a lesão se tornam-se altamente diferenciáveis, originando variados tipos celulares que rapidamente reestruturam a epiderme durante a cicatrização (Achauer et al., 1998; Blanpain; Horsley, Fuchs, 2007; Fuchs, 2009; Rodrigues et al., 2019).

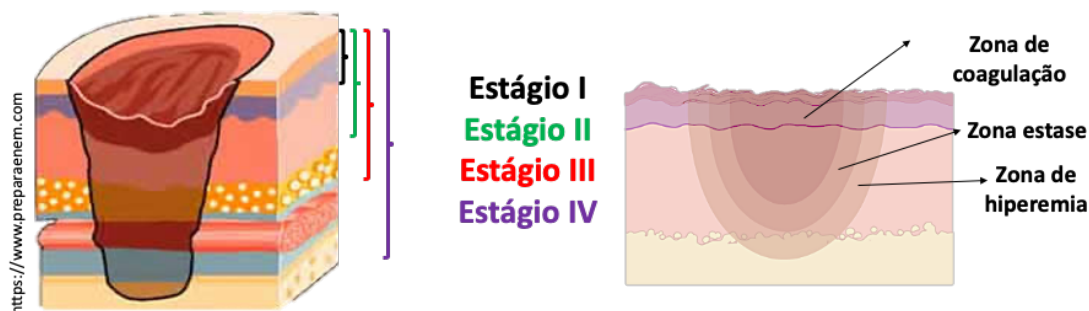
1.4 Cicatrização de queimaduras

De acordo com o ministério da saúde, as queimaduras são problemas de saúde pública que acometem pelo menos 1 milhão de brasileiros a cada ano (www.saude.gov.br – acesso em 13 de janeiro de 2022). Desses, cerca de 2.500 poderão ir à óbito em função direta ou indiretamente da queimadura (Rosa; Lima, 2021). Em 2012, o ministério da saúde demonstrou que as queimaduras pelo mal uso de álcool líquido e outras substâncias inflamáveis como gasolina e querosene, são as formas mais comuns de incidentes, seguidos pelo mal uso agente químicos e exposição à corrente elétrica. Os locais de ocorrência, na maioria dos casos, são as residências das próprias vítimas. Estima-se que o gasto médio anual de dinheiro público com o tratamento de queimaduras seja de 55 milhões de reais (Greco-Júnior et al., 2007; BRASIL, 2012).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, as queimaduras são consideradas um agravo de saúde, uma vez que podem ser altamente agressivas a depender da sua extensão, podem causar não somente alterações físicas, mas também metabólicas, perda de líquido, infecções oportunistas e falência de órgãos (Nielson et al., 2017). Porém, ainda são bastante negligenciadas, por isso a alta taxa de mortalidade. Esse cenário não é observado em países desenvolvidos, que apresentam, por sua vez, taxas menores uma vez que empregam ações mais eficientes de prevenção e tratamento (Lafaiete, 2019).

Sabe-se que as queimaduras se estabelecem em estágios diferentes, de acordo com a sua severidade, variando entre os tipos I a IV ou de primeiro a quarto grau (Hermans, 2006; Tiwari, 2012). A lesão por queimadura inclui as zonas de coagulação, estase e hiperemia (Hussain et al., 2013). A área de coagulação corresponde ao tecido destruído pelo trauma. Ela é circundada pela área de estase, com aumento da resposta inflamatória e baixa perfusão tecidual. A última camada, ao contrário da camada de estase, apresenta alta microvascularização. Não é incomum que a zona de estase evolua para a necrose tecidual com o decorrer do tempo (Bohr et al., 2013; Nielson et al., 2017).

Figura 3 – Estágios e zonas das queimaduras



Os eventos de cicatrização das queimaduras dependem da sua extensão. Queimaduras de estágio I, atingem a hipoderme, estágio II, a epiderme e derme, estágio III, alcançam também a hipoderme e estágio IV atingem, além das três camadas, músculos, tendões e ossos. Essas lesões apresentam zonas de coagulação, correspondente à área do trauma, zona de estase, com baixa perfusão tecidual e zona de hiperemia, com aumento da microvascularização.

Queimaduras de primeiro grau atingem apenas a epiderme. As de segundo acometem a epiderme e a derme, enquanto as de terceiro grau danificam a epiderme, a derme e a hipoderme (Hermans, 2005; Rnjak et al., 2011). Queimaduras de quarto grau são aquelas que se estendem além da hipoderme, atingindo músculos, tendões e ossos, não causam dor pois os nervos estão completamente destruídos. São de baixa incidência, e geralmente são letais e muitas vezes, é necessária a amputação da área acometida devido à extensão do trauma (Nuchtern et al., 1995; Parrett et al., 2006).

Os mecanismos celulares que envolvem a primeira fase das lesões por queimaduras podem incluir a trombose capilar, produção de mediadores inflamatórios e fatores pró-apoptóticos (Nielson et al., 2017). A lesão de queimadura leva à ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), responsável por induzir a produção de muitos mediadores pró-inflamatórios a partir da ativação de macrófagos, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Schwacha, 2003; Vaughn; Beckel, 2012). Além da produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, a queimadura também resulta no aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio, além do óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (Sehirli et al., 2008).

A produção de TNF- α também está envolvida na resposta antibacteriana, pela liberação de células de defesa, como neutrófilos, e por induzir a liberação de outras citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e IL-6 (Ravat et al., 2011). É nesta fase da

lesão por queimadura que, a depender da extensão da lesão, pode ocorrer falência de órgãos, devido à resposta inflamatória exacerbada (Nielson et al., 2017).

Após a queimadura, o nível de adenosina trifosfato (ATP) do tecido diminui enquanto o de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) aumenta. Este último é convertido na hipoxantina, um substrato da xantina oxidase. A ação desta enzima sobre a hipoxantina libera a xantina e oxigênio. A ativação desta via leva à produção de radicais livres como superóxido e peróxido de hidrogênio (Parihar et al., 2008). Além disso, neutrófilos recrutados e ativados no local no trauma, contribuem para o aumento de ROS (Parihar et al., 2008; Nielson et al., 2017). A produção intensa desses radicais, além de participar na resposta inflamatória local, também contribui para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, imunossupressão, infecção secundária e septicemia, que podem culminar em dano tecidual e falência múltipla de órgãos (Horton et al., 2003). Diante disso, a resposta clínica do indivíduo ao trauma por queimadura depende, principalmente, do estresse oxidativo tecidual ocasionado e à capacidade de resposta anti-oxidante (Horton et al., 2003; Nielson et al., 2017).

A segunda fase da fisiopatologia das queimaduras se caracteriza pelo aumento da atividade anti-inflamatória, principalmente pela intensa diferenciação de linfócitos Th0 em linfócitos Th-2 (Nielson et al., 2017). Células Th-2 são responsáveis pela produção de três mediadores considerados os principais atuantes na resposta anti-inflamatória: interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) (Ravat et al., 2011).

A cicatrização das lesões por queimadura depende da extensão do dano tecidual que causaram (Oryan et al., 2017). Queimaduras de primeiro grau superficiais, tendem a cicatrizar sem deixar cicatrizes, enquanto as queimaduras mais profundas requerem tratamento prolongado, que incluem cirurgias reconstrutivas para liberar as contraturas ocasionadas pelas cicatrizes extensas (Wang et al., 2010). Embora queimaduras superficiais possam desaparecer dentro de duas semanas se mantidas limpas, são processos dolorosos que podem sofrer o processo de conversão de queimaduras em estágios mais avançados, como II e III, por isso o manejo destas lesões não deve ser negligenciado (Palackic et al., 2022).

Por isso, independentemente do estágio em que se encontra a queimadura, o processo de cicatrização é imprescindível para o retorno da função e da estética da pele. Quanto mais breve o fechamento da lesão, menor a probabilidade de infecção e perda de fluido, conseqüentemente, reduz-se o tempo de tratamento e a incidência de

cicatrices hipertróficas (Kim et al., 1998; Xiao et al., 2002; Ong et al., 2006; Siaz et al., 2012). Por isso determinar a profundidade da queimadura se faz necessário para estabelecer o melhor tratamento (Singer; Boyce, 2017). A literatura traz uma variedade de métodos para estabelecer a profundidade de uma queimadura. Destes, o escaneamento por Doppler é o mais comumente utilizado (Jaskille et al., 2010).

A indução da proliferação celular necessária para a cicatrização das queimaduras ocorre pela ação das células de langerhans (Vinish et al., 2016). A angiogênese é induzida por mediadores como VEGF e CXCL-12 e a contração da lesão é mediada pela ação do TGF- β (Sakalioglu et al., 2006; Fox et al., 2008). Diferentemente de outros tipos de feridas, as queimaduras também exercem efeitos sistêmicos renais, pulmonares, cardíacos, gastrintestinais, entre outros (Sarrazy et al., 2011). Na área queimada, a presença de TNF- α e IL-6, IL-8 e IL-1 β em níveis elevados está relacionada a esses efeitos, e demonstra-se ainda que as suas concentrações plasmáticas estão diretamente relacionadas ao tamanho da superfície de pele queimada. O pico destas citocinas está relacionado à um maior risco de infecção, disfunção múltipla de órgãos e morte (Van der Water et al., 2013; Ghieh et al., 2015; Rowan et al., 2015). Além disso, a queimadura promove um desequilíbrio na resposta imunológica, uma vez que nos estágios iniciais, ocorre a supressão da medula óssea seguida de disfunção das células imunes, podendo contribuir para o surgimento de infecções resistentes às terapias comuns, resultando em sepse e retardo na cicatrização das queimaduras (Church et al., 2006; Hampson et al., 2016).

Além dos aspectos imunológicos, o controle de possíveis contaminações também se faz importante para a cicatrização da queimadura, uma vez que a perda da camada estratificada constitui uma porta de entrada para microorganismos colonizadores da própria pele (Singer; Boyce, 2018). Para evitar complicações posteriores, a remoção de escaras da queimadura e a limpeza frequente da área podem retardar a formação do biofilme bacteriano na lesão. A aplicação tópica de agentes antimicrobianos como a bacitracina, nistatina e sulfadiazina de prata facilitaram a restauração da camada córnea e o fechamento da ferida, bem como controlaram a fase inflamatória da cicatrização (Neely et al., 2009; Rashaan et al., 2014).

Queimaduras severas necessitam de rápido tratamento para que o processo de cicatrização não seja prejudicado e nem resulte em infecção. Embora muitas preparações tópicas para o tratamento das queimaduras estejam disponíveis

no mercado, ainda se considera a ausência de abordagens adequadas, uma vez que a grande maioria dos produtos exerce ação antimicrobiana, e não cicatrizante (Bahramsoltani; Farzaei; Rahimi, 2014). Estudos demonstram que a sulfadiazina de prata exerce efeito tóxico sobre fibroblastos, tendo uso limitado como tratamento cicatrizante de queimaduras (Hassanzadeh et al., 2013). Apenas 1 a 3% dos medicamentos utilizados para tratamento de queimaduras tem se mostrado eficazes na cicatrização da pele lesionada (Kumar et al., 2007).

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos para estudo da fisiopatologia das queimaduras como uma tentativa de otimizar possíveis tratamentos, entretanto pouco tem se descoberto acerca desse tema (Nielson et al., 2017). Nesse cenário, vem crescendo os estudos que tentam investigar o potencial de plantas medicinais como agentes cicatrizantes, uma vez que estas apresentam uma ampla variedade de constituintes como alcaloides, óleos essenciais, flavonoides, ácidos graxos e compostos fenólicos os quais podem ser capazes de potencializar a cicatrização não só de queimaduras, mas também de feridas em geral (Bahramsoltani; Farzaei; Rahimi, 2014). Além disso, compostos naturais apresentam, em sua grande maioria, baixo custo, disponibilidade e poucos efeitos colaterais, o que faz com que sejam objetos de estudo promissores no ramo da cicatrização da pele (Thakur et al., 2011; Rahimi et al., 2012; Farzaei et al., 2013). Nesse contexto, se faz necessário avaliar abordagens terapêuticas naturais que possam otimizar o processo de cicatrização de queimaduras.

2 JUSTIFICATIVA

A *McLTP1* tem mostrado efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos importantes em modelos experimentais. Entretanto, não há relatos na literatura que mostrem se essa proteína possui um efeito estimulador da cicatrização, como já mencionado com outras partes do Noni. Dito isso, é importante avaliar se esta fração pode constituir uma alternativa de tratamento para feridas como as queimaduras.

Pode-se considerar que o tratamento de queimaduras é um desafio na prática clínica, pois estas são bastante frequentes e apresentam riscos de complicações tardias que aumentam a morbidade e mortalidade, matando cerca de 180.000 pessoa por ano, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (World Health Organization. Burns. Fact Sheets. Published 2018. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>).

Portanto, muitos esforços têm sido aplicados para o melhor entendimento do mecanismo fisiológico da cicatrização de queimaduras, bem como das interferências que ocorrem durante este processo, e, também, na descoberta e elaboração de novas ferramentas biotecnológicas, que são importantes para aprimorar o tratamento de pacientes com lesões de pele. A literatura demonstrou que a *McLTP1* inibiu, de forma eficaz, o crescimento de bactérias que colonizam a pele como *Staphylococcus aureus* e *epidermidis* (Souza et al., 2018), as quais podem causar infecção secundária nessas lesões. Este achado eleva, ainda mais, a importância desse investigar se esta proteína pode ser uma alternativa de tratamento e diminuição das complicações das queimaduras.

Ademais, o modelo de queimadura em camundongos irá fornecer informações cruciais para a melhor compreensão sobre o efeito da *McLTP1* em queimaduras superficiais. Além disso, é importante validar o uso medicinal dessa proteína para o tratamento de processos inflamatórios e possibilitar o desenvolvimento de um biofármaco como nova alternativa terapêutica, menos oneroso e mais eficiente que as disponíveis no mercado, visto que os curativos e estratégias utilizados são de difícil acesso à população brasileira.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito cicatrizante da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* (McLTP1) em modelo de queimadura superficial em camundongos

3.2 Específicos

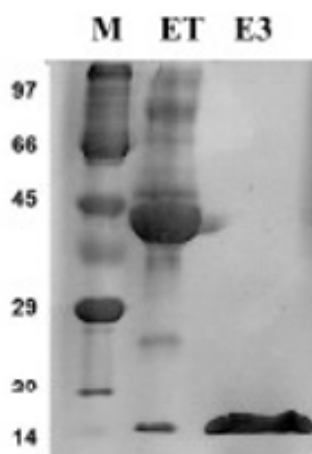
- Avaliar o efeito proliferativo da *McLTP1* em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929)
- Avaliar macroscopicamente o efeito da *McLTP1* sobre a contração da queimadura;
- Avaliar o efeito da *McLTP1* sobre o reparo tecidual na queimadura pela análise histológica do infiltrado inflamatório, arquitetura tecidual e neoformação epitelial;
- Investigar efeito da *McLTP1* na modulação da inflamação induzida pela queimadura através da determinação tecidual de mediadores inflamatórios (MPO, NO, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e anti-inflamatório (IL-10);
- Analisar o efeito da *McLTP1* sobre a liberação e/ou expressão tecidual de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (VEGF) e na neoformação tecidual (TGF- β e FGF) na queimadura;
- Avaliar o efeito da *McLTP1* sobre o estresse oxidativo induzido pela queimadura, através da determinação tecidual de MDA, GSH e nitrito;

4 METODOLOGIA

4.1 Isolamento e purificação da proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* L. (McLTP1)

A McLTP1 foi isolada e purificada de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (2016) com as modificações introduzidas por Souza *et al.* (2018) no Laboratório de Química Medicinal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, coordenado pelo Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira. O rendimento da proteína foi de aproximadamente 72 mg para 100g de semente e sua pureza foi confirmada por SDS-PAGE.

Figura 4 - Análise eletroforética do isolamento da proteína da semente de *Morinda citrifolia* L. (McLTP1)



Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%; 20 µg). Raia 1: marcadores de massa molecular (kDa); Raia 2: Extrato total das sementes de *Morinda citrifolia*; Raia 3: McLTP1. Bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250. Fonte: CAMPOS, 2016.

4.2 Cultivo das linhagens de fibroblastos murinos

As células L929 (linhagem de fibroblastos murinos) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico (100 UI/ml de penicilina/estreptomicina 100 µg/mL) (Gibco) em estufa de a 37°C em incubadora (Panasonic modelo MCO 19AICUU-PA) com 95% de umidade e 5% de CO₂. (YOUSEFI *et al.*, 2017; KEYOU *et al.*, 2016).

4.2.1 Avaliação do efeito de *McLTP1* na viabilidade de fibroblastos murinos pelo método da Sulforodamina B (SRB)

A determinação da proliferação celular induzida pela *McLTP1* foi avaliada pelo ensaio da sulforodamina B (SRB). Após 24 h de crescimento celular, as células foram incubadas com diferentes concentrações de *McLTP1* (0,05 – 25 µg/mL) por 24, 48 e 72 h. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo da placa foi removido e as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v), por no mínimo 1h a 4°C, em seguida coradas com 100 µL de SRB 0,4% ((p/v) em ácido acético 1%) e mantida em incubadora com 5% CO₂ a 37°C por 30 min. As placas forão lavadas com ácido acético 1% para a remoção do excesso de corante, e então adicionados 200 µL de solução de leitura tampão Tris-base (10 mM) e homogeneizado por 10 minutos (HOUGHTON *et al.*, 2007). A absorbâncias (Abs) da placa forão lidas em leitora de microplacas (Multiskan FC – Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados do SRB foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Abs da amostra} / \text{Abs média do grupo controle DMEM}) \times 100$$

4.3 Protocolo de indução de queimadura superficial e tratamento dos animais

4.3.1 Animais

Foram utilizados 180 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem swiss (8 semanas de idade – 20 a 25 g) cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN-UFC) e mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, local onde foram realizados todos os protocolos experimentais *in vivo*. Os animais foram mantidos em ciclo de 12h claro/escuro, temperatura (23 ± 2°C) e umidade (55 ± 10%) controlados, com fornecimento de ração e água à vontade.

Todos os protocolos realizados neste estudo seguiram as diretrizes éticas estabelecidas pelos Princípios Éticos na Experimentação em Animais adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), analisados e aprovados (sob o nº 02170619-0) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC – ANEXO I).

4.3.2 Preparo dos cremes dermatológicos

Os cremes dermatológicos foram preparados pela Farmácia de manipulação veterinária, DrogaVet, localizada na avenida Senador Virgílio Távora, 485, Meireles, Fortaleza-CE. As quatro formulações foram confeccionadas a partir da base Lanette sendo que a um deles não foi incorporado nenhum princípio ativo. Este foi definido como veículo (controle negativo). Aos demais foram incorporados a Sulfadiazina de prata 1% (controle positivo) e a *McLTP1* nas concentrações de 0,25% e 0,5%.

Tabela 1 – Composição dos cremes dermatológicos

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Butil-hidroxi toluol	0,05%
Solução germall 115 50%	0,06%
EDTA	0,1%
Nipazol	0,1%
Nipagim	0,2%
Propilenoglinol	5%
Vaselina líquida	5%
Lanette N	10%
Água purificada	76,95 %

Foram adicionados à base lanette sulfadiazina de prata a 1% e a *McLTP1* nas concentrações de 0,25 e 0,5%.

4.3.3 Indução das queimaduras superficiais

Os animais permaneceram na sala de experimentação animal do biotério do NDPM pelo período mínimo de 7 dias, para aclimatação e redução de estresse prévio ao início dos protocolos.

No dia inicial, as bancadas da cirurgia foram, previamente, higienizadas com álcool etílico 70% para prevenção de contaminação cruzada. Após isso, os

animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p.). Após a anestesia, a região do dorso dos animais foi desinfetada com gel de clorexidina a 2%, tricotomizada (8 cm²) e assepsiada com idodopovidona a 1% e álcool etílico a 70%. A queimadura superficial foi induzida pelo contato direto de uma placa de aço quadrada inox (1,5 cm²) aquecida e regulada para 100°C por 6 segundos (Lima-Júnior *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021). Após a indução da lesão, os animais receberam 1 ml de soro fisiológico 0,9% (i.p.) para reposição de fluidos e foram mantidos em ambiente aquecido e sob observação até a completa recuperação da anestesia (Figura 4).

A fim de se evitar infecções secundárias das feridas, previamente à indução das queimaduras, as bancadas foram higienizadas com álcool 70°. Os animais foram organizados em caixas limpas (N=1/caixa), com maravalha estéril, durante toda a duração do protocolo experimental, de modo a não haver contaminação da área da queimadura por contato com saliva de outros animais. Os instrumentais utilizados também foram esterilizados.

4.3.4 Definição dos grupos experimentais

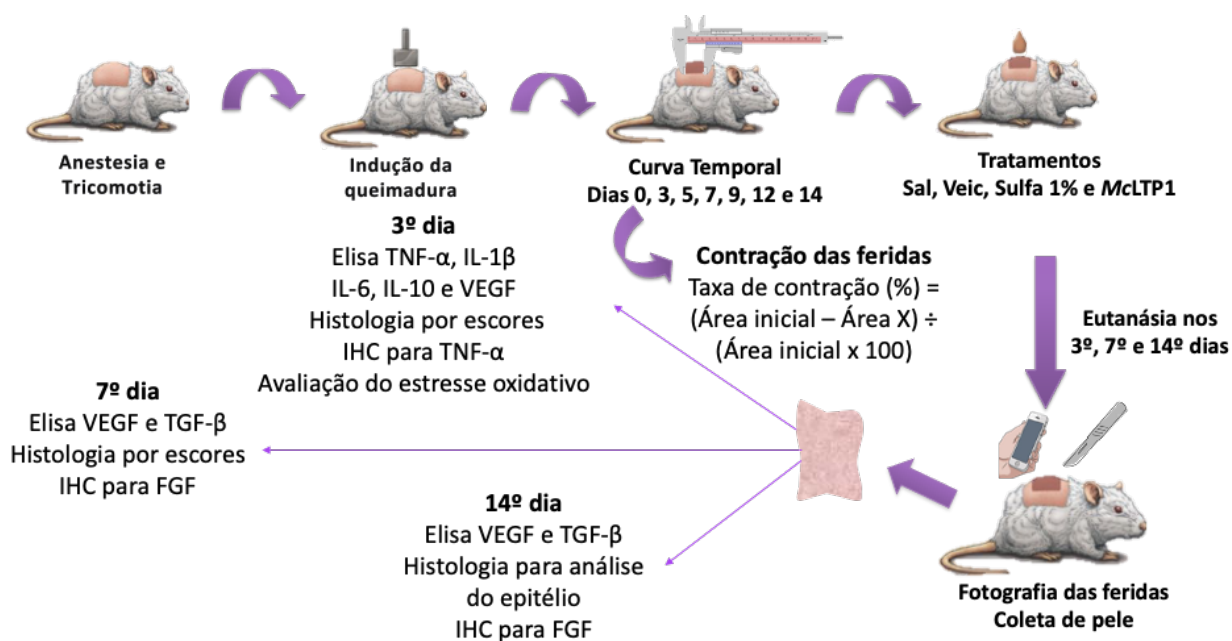
Após a indução da queimadura, os animais foram distribuídos aleatoriamente nas caixas individuais, de modo a obter-se um N de 6 a 7 animais por grupo. O tratamento com os cremes foi iniciado logo após a organização dos grupos.

Abaixo seguem as características dos grupos experimentais.

- SHAM: queimadura superficial + solução salina de NaCl 0,9% 1 vez ao dia, até o dia da eutanásia;
- SULFA 1%: queimadura superficial + creme base Lanette com sulfadiazina de prata 1%, 1 vez ao dia, até o dia da eutanásia.
- VEIC: queimadura superficial + creme base Lanette, 1 vez ao dia, até o dia da eutanásia.
- McLTP1 0,25%: queimadura superficial + creme base Lanette contendo McLTP1 0,25% (p/p), 1 vez ao dia, até o dia da eutanásia.
- McLTP1 0,5%: queimadura superficial + creme base Lanette contendo McLTP1 0,5% (p/p), 1 vez ao dia, até o dia da eutanásia.

Os animais foram tratados diariamente, uma vez ao dia, até o final do protocolo experimental, que, a depender da fase em que as peles seriam avaliadas. Antes da aplicação dos cremes, as queimaduras eram limpas e hidratadas com solução salina de NaCl a 0,9%, a fim de remover o creme residual do dia anterior. Novas quantidades de cremes foram colocadas com a ajuda de cotonete descartável, de modo que o creme cobrisse toda a extensão da queimadura.

Figura 5 – Representação dos protocolos experimentais empregados no estudo



Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e tricotomizados. A queimadura foi induzida pelo contato com uma placa de aço-inox aquecida a 100 °C durante 6 segundos. A curva temporal foi realizada no período de 14 dias e a medida da contração das feridas foi feita pela aplicação da fórmula ilustrada. Seguiram-se os tratamentos tópicos com NaCl 0,9%, Lannete, Sulfadiaizina de prata a 1% e McLTP1 0,25 e 0,5%. A eutanásia ocorreu nos 3º, 7º e 14º dias. Em cada período, foram realizadas avaliações específicas explicitadas na figura.

4.4 Avaliação da contração das lesões

Inicialmente, realizou-se o curso temporal da avaliação macroscópica a fim de avaliar os períodos mais relevantes do ponto de vista da cicatrização de animais tratados ou não com a *McLTP1*. Para isso, logo após a indução da queimadura, a área lesionada foi mensurada com um paquímetro digital, sendo então considerada a *área inicial*. A mensuração foi feita para medir a base (*b*) e a altura (*h*) da região. A partir destas medidas, obteve-se a área total (*A*) pela fórmula matemática $A = b \times h$ (mm²).

Estas medidas se repetiram após 3, 5, 7, 9, 12 e 14 dias após a indução da queimadura, e a taxa de contração da lesão foi calculada em cada período mencionado, aplicando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Taxa de contração (\%)} = (\text{área inicial} - \text{área dia X}) \div (\text{área inicial}) \times 100$$

4.5 Obtenção das amostras teciduais

Após a realização da do curso temporal da avaliação macroscópica, o 3º, 7º e 14º dia foram escolhidos para avaliação histológica e imuno-histoquímica, bem como dos mediadores envolvidos na inflamação e cicatrização. A eutanásia foi realizada por sobredosagem anestésica equivalente ao triplo da dose recomendada para anestesia para camundongos, com cloridrato de xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg, i.p.). A pele do dorso dos animais foi removida de forma a abranger toda a extensão das lesões bem como parte da pele saudável circundante, até que a camada muscular fosse exposta.

Nesses três períodos, 3º, 7º e 14º dia, também foram obtidas fotos da região do dorso desses animais e da parte interna da pele removida utilizando-se uma câmera dupla de 12 MP do Iphone X. A câmera foi posicionada a uma distância de 15 cm da superfície onde o animal ou a pele foram posicionados, de modo a padronizar a obtenção das imagens.

4.6 Processamento das amostras para coloração por HE

As amostras de tecido coletadas no 3º, 7º e 14º dia foram fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4), substituída por álcool etílico 70% após 24h e seguidas para o processamento histológico de inclusão em parafina a 58°C no processador automático de tecidos (Lupe®). Segmentos de 4 µm de espessura dos fragmentos foram elaborados em micrótomo semi-automático (Leica®) e organizados em lâminas microscópicas.

A avaliação histológica por escores foi realizada nos tempos experimentais de 3 e 7 dias, tendo como base a presença ou não de úlcera, avaliação da espessura da epiderme e derme e presença de infiltrado inflamatório na derme e hipoderme como observado na tabela 2 (Avsar et al., 2016).

As lâminas foram confeccionadas no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem do Departamento de Anatomia e Morfologia da UFC, em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Renata Carvalho Leitão.

A avaliação histológica foi realizada por dois avaliadores cegos quanto aos grupos utilizados neste trabalho.

Tabela 2 – Escores utilizados na avaliação histológica

Escores	Parâmetros
0	Sem úlceras + epitélio e derme em espessuras normais ou restauradas + Ausência de infiltrado inflamatório + queratinização
1	Áreas pontuais de úlcera + leve adelgaçamento do epitélio e da derme + discreto infiltrado inflamatório na derme e hipoderme
2	Áreas moderadas de úlcera + moderado adelgaçamento do epitélio e da derme + infiltrado inflamatório moderado na derme e hipoderme
3	Extensa área ulcerada + perda de epitélio e de parte da derme + intenso infiltrado inflamatório na derme e hipoderme

Adaptado de Avsar et al., 2016.

A espessura do epitélio recuperado foi mensurada após 14 dias da indução da lesão, baseado no protocolo realizado por Oriá et al. (2003). Utilizando-se uma lente ocular milimetrada, a medida da espessura do epitélio foi realizada em cinco campos de uma mesma lâmina (mesmo animal) no aumento de 100x. Após isso, a medida final da espessura foi a média aritmética das cinco medidas.

4.7 Dosagem da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, foi realizada nas amostras coletadas no 3º dia.

A pele de cada animal foi coletada e incubada em 200 µL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron) e o material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Realizou-se um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de solução de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm/15 min/4°C, o “*pellet*” foi ressuspenso em tampão

NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizou-se novamente em triturador Pollytron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante obtido foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min a 37 °C. A seguir, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1x10⁵ neutrófilos/50 µL no primeiro poço). Realizou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (Alves-Filho et al, 2006).

4.8 Análise dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e VEGF

Amostras coletadas no 3^o dia foram destinadas às dosagens de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF. No 7^o e 14^o dias, as amostras foram dosadas para TGF- β e VEGF (FUJIMI *et al.*, 2009; INFANGER *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2001). Os tecidos (n=6/grupo) foram macerados e homogeneizados 10% (mg tecido/µL) em temperatura de 4°C (POLYTRON®) em solução de PBS (pH 7,4), centrifugados a 5000 rpm por 5 min para remoção de resíduos que não foram triturados completamente (LIN *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018). Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de homogenato, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações diferentes, partindo de uma diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 1000 pg/mL para IL-1 β e VEGF, e 2000 pg/mL para TNF- α , IL-10, TGF- β (R&D Systems). Em decorrência da etapa extra de ativação de TGF- β , as absorbâncias foram multiplicadas pelo fator de correção 1,4 após a interpolação de dados.

4.9 Análise Imunohistoquímica da expressão de TNF- α e FGF

Amostras de pele coletadas aos 3^o, 7^o e 14^o dias foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24h e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão, os tecidos foram cortados em micrótomo, obtendo-se cortes de espessuras de 4 µm, que, posteriormente, foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas. Na etapa

seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C por 1 hora, seguido de dois banhos em xilol por 5 min cada. Em seguida, foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, e um banho em etanol a 70%, por 3 minutos cada. Ao final desta etapa, os cortes foram submersos a um banho de água destilada por 10 min e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 6,0) por 25 min em banho maria na temperatura de 95°C. Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 min. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (DAKO) por 30 min. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários anti-TNF- α (AB6671) (diluição 1:300) e anti-FGF (SAB2108135) (diluição 1:300) overnight. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero HRP (DAKO) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante 3 min cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e Harrys e processadas para inserir a lamínula. Imagens dos tecidos foram capturadas por meio de câmera digitalizada acoplada ao microscópio (Nikon Elipse E200), sendo capturados 5 campos por corte histológico no aumento de 400x. A quantidade de marcações foi contada em cada campo, e feita a média aritmética por campo para cada animal.

4.10 Avaliação do estresse oxidativo

4.10.1. Quantificação dos níveis de MDA (malondialdeído)

Amostras de pele foram coletadas no 3º dia e destinadas à quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA). O MDA é um produto da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo (DRAPER; HADLEY, 1990). A reação envolve o ácido 2- tiobarbitúrico com o MDA, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente

a 532 nm de comprimento de onda. As amostras de pele foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). Em seguida, 250 µL do homogenato foram levados ao banho de água a 37°C por 1 hora. Decorrido esse tempo, no intuito de interromper a peroxidação, adicionaram-se 400 µL de ácido perclórico 35% às amostras, que foram então centrifugadas (14000 rpm, 15 minutos, 4°C). Do sobrenadante obtido, 600 µL foram transferidos para um microtubo, ao qual se adicionaram 200 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Esta mistura foi levada ao banho de água a 95°C por 30 minutos. Após o resfriamento as amostras foram plaqueadas e a leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 532 nm. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de tetrametoxipropano (TMP) foi utilizada para calibração do método e a concentração de MDA nas amostras foi calculada através da equação da reta para a curva-padrão. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

4.10.2. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Amostras de pele foram coletadas no 3º dia e destinadas à quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A GSH é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno do *pool* dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NPSH) do nosso organismo. Para a determinação da concentração de GSH, o teor de NP-SH foi analisado pela técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1968), que se baseia na reação de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) com compostos de sulfidril, e consequente desenvolvimento de coloração amarela. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e glutathiona oxidada (GSSG). As amostras de pele foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com solução de EDTA 0,02 M. Logo após, adicionaram-se 60 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% a 40 µL de cada amostra a fim de precipitar as proteínas presentes no material biológico. O material foi então centrifugado (5000 rpm, 15min, 4°C) e 60 µL do sobrenadante obtido foi plaqueado. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de GSH foi utilizada para calibração do método. Adicionaram-se 102 µL da solução de leitura (Tris-EDTA, DTNB 0,01 M) e a absorbância foi medida imediatamente em leitora de microplacas no comprimento de onda de 412 nm. A concentração de GSH nas amostras foi calculada através da

equação da reta para a curva-padrão e os resultados foram expressos em μg de GSH/g de tecido.

4.10.3. Determinação dos níveis de nitrito (NO^{2-})

Amostras de pele foram coletadas no 3º dia e destinadas à determinação dos níveis de nitrito (NO^{2-}). A determinação de NO^{2-} e nitrato (NO^{3-}) foi obtida como indicador indireto da produção de óxido nítrico. O método baseia-se na reação do NO^{2-} com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess) (GREEN et al., 1982), o qual absorve na região visível do espectro eletromagnético. O íon NO^{3-} é determinado como íon NO^{2-} após redução pela enzima nitrato redutase.

As amostras de pele foram pesadas e trituradas (POLITRON®) com auxílio de uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCl a 1,15%), após a obtenção dos homogenatos de cada amostra (10% de tecido) a centrifugação foi realizada para a obtenção do sobrenadante (1500g; 15 minutos). Para que todo o nitrato (NO^{3-}) presente no sobrenadante se convertesse em nitrito (NO^{2-}), as amostras obtidas foram plaqueadas (placa de 96 poços) em duplicata (80 μL de cada sobrenadante) e incubadas por 12 horas com uma solução reagente (40 μL da enzima nitrato redutase, substrato NADPH, KH_2PO_4 em água destilada). Uma curva padrão de referência de nitrito também foi plaqueada, a partir de uma diluição contínua (1:2) de uma solução de nitrato de sódio (NaNO_2) de 200 μM . Após a conversão de nitrato em nitrito, 80 μL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de NEED/água destilada/1:1:1:1) foram adicionadas em cada poço. A leitura da coloração púrpura final obtida pela reação foi feita na absorbância de 540 nm e os resultados foram expressos em μM de NO^{2-} , usando como referência a curva padrão de nitrito para a obtenção dos valores (CHEN et al., 2000).

4.11 Análise Estatística

Para realização das análises estatísticas, foi empregado o software GraphPad Prism® (v 8.0). A distribuição normal foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilke. Os dados que seguiram a normalidade (paramétricos) foram avaliados pelo

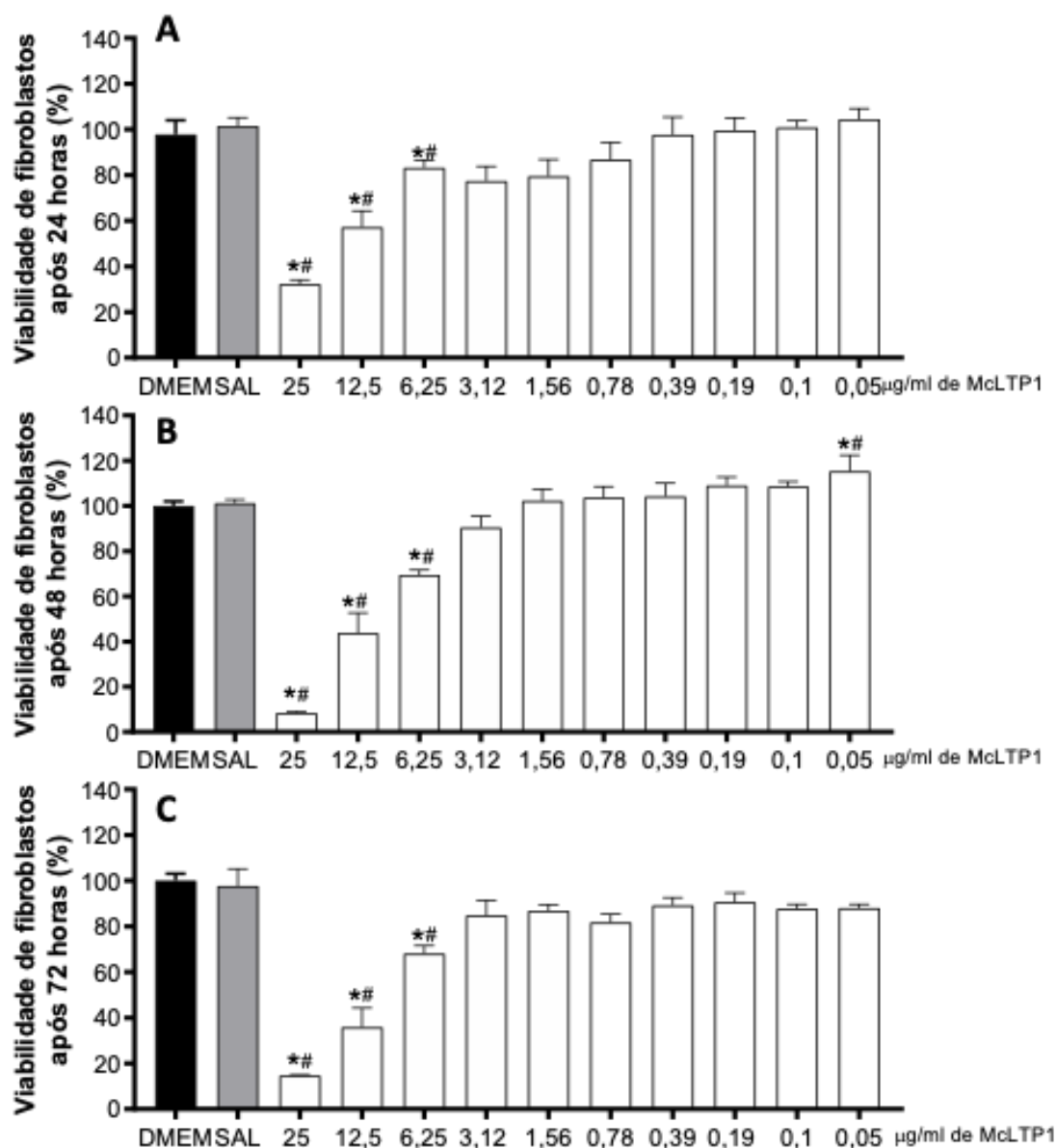
teste t, quando da comparação entre dois grupos, ou ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, para a comparação de três ou mais grupos. Os dados que não seguiram a normalidade (não-paramétricos) foram avaliados com teste de Mann-Whitney, quando da comparação entre dois grupos, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, para a comparação de três ou mais grupos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana seguida de seus valores mínimo e máximo. Em todas as situações, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A McLTP1 apresentou baixa toxicidade e efeito proliferativo pelo método SRB

Nas primeiras 24 horas, a McLTP1 reduziu a proliferação celular nas concentrações mais altas de 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $32,3 \pm 1,85\%$; 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $57,28 \pm 7\%$; DMEM: $97,8 \pm 6,17\%$; SAL: $101,5 \pm 3,69\%$ - Figura 6; painel A). Após 48 e 72 horas, estas três concentrações mantiveram seus efeitos citotóxicos em relação aos grupos controles DMEM 2,5% e Salina (48 horas - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $8,4 \pm 0,65\%$; 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $43,8 \pm 8,9\%$; 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $69,42 \pm 2,24\%$; DMEM: $100 \pm 1,98\%$; SAL: $101,2 \pm 1,65\%$; 72 horas - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $14,65 \pm 0,35\%$; 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $35,91 \pm 8,36\%$; 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $68,13 \pm 3,45\%$; DMEM: $100 \pm 3,08\%$; SAL: $97,68\%$ Figura 6; painel B e C. Apenas a concentração de 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da McLTP1 foi capaz de aumentar a proliferação celular após 48 horas, quando comparada aos grupos DMEM 2,5% e Salina (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $115,4 \pm 7\%$; DMEM: $100 \pm 1,98\%$; SAL: $101,2 \pm 1,65\%$ Figura 6; painel B).

Figura 6 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) tratados com a *McLTP1* pelo método da SRB



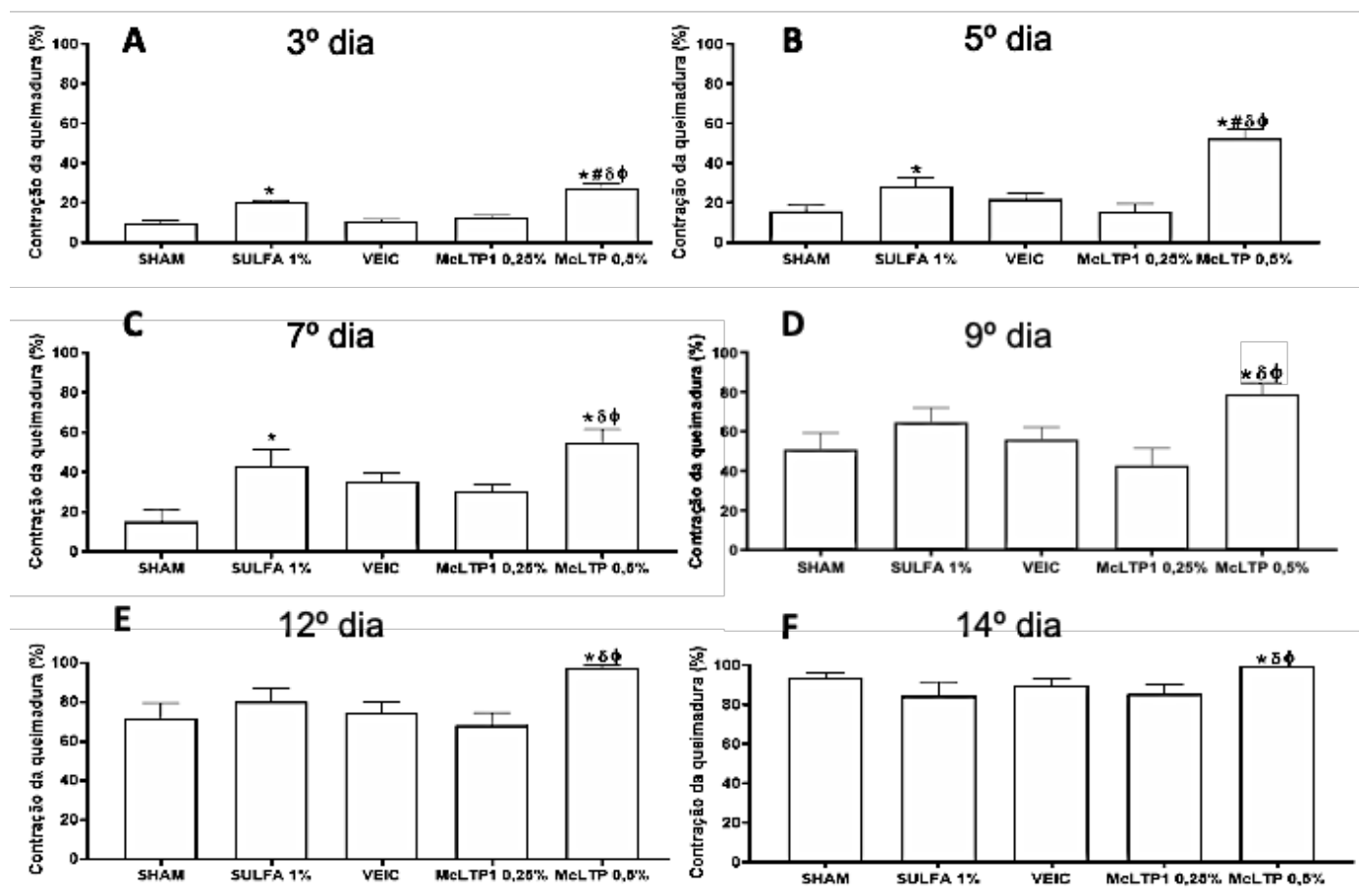
A viabilidade celular de fibroblastos pelo SRB foi expressa após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação com *McLTP1* (0,05 – 25 µg/mL). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como porcentagem média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey foi utilizado para a análise estatística dos dados. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em comparação ao grupo DMEM e # $p < 0,05$ ao grupo salina (0 µg/mL).

5.2 Avaliação Macroscópica

5.2.1 O tratamento tópico com *McLTP1* aumenta a contração de feridas induzidas por queimadura

Como demonstrado na figura 7A, dos cremes dermatológicos utilizados para o tratamento das feridas induzidas por queimadura, somente aquele que tinha como princípio ativo a *McLTP1* na maior concentração (0,5%) foi eficiente em aumentar a contração da ferida em todo o curso temporal da cicatrização no modelo aqui utilizado. A *McLTP1* na menor dose testada (0,25%), não aumentou a contração da ferida em nenhum dos tempos avaliados. Por outro lado, o creme contendo a sulfadiazina de prata a 1%, tratamento tópico mais utilizado na prática clínica em queimaduras, foi efetivo em aumentar a taxa de contração da ferida somente nos dias 3, 5 e 7 após e com percentual de contração inferior nos dias 3 e 5, ao demonstrado pelo creme com *McLTP1* (0,5%). Em todo o curso temporal de avaliação, não foi observado aumento na contração das lesões no grupo de animais tratados com o creme lanette sem nenhum princípio ativo (veículo), o que descarta efeito *per si* do veículo utilizado na confecção dos cremes. Para complementar a avaliação temporal das lesões, estas foram fotografadas, sendo uma ferida por grupo experimental ilustrada de forma representativa da sua evolução durante o processo cicatricial (Figura 7B).

Figura 7A – Evolução temporal da contração das feridas induzidas por queimaduras e tratadas com *McLTP1*



As medidas das áreas das feridas foram realizadas nos dias 0, 3, 5, 7, 9, 12 e 14 e expressas em percentual de contração. Os animais foram tratados com aplicação única diária de cremes dermatológicos por 14 dias. *McLTP1* (proteína nas concentrações de 0,25% e 0,5%), Sulfa 1% (sulfadiazina de prata 1%), Veic (lanette sem adição de substância ativa) e o SHAM (sem tratamento). ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação a Sulfa 1%, $\delta p < 0,05$ em relação ao Veículo e $\phi p < 0,05$ em relação ao *McLTP1* 0,25% (N=6 animais/grupo).

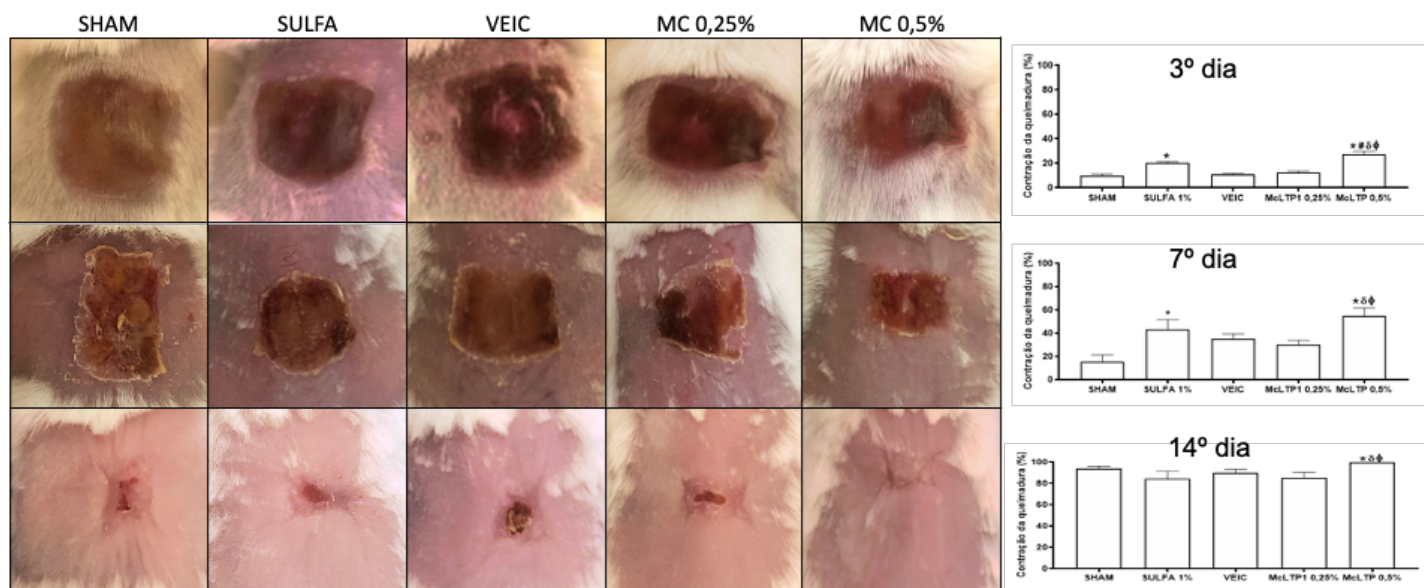
No 3º dia após a indução da queimadura, o percentual de contração das feridas foi 63% maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com *McLTP1* 0,5% ($27,66 \pm 1,9$ %) em relação ao grupo Sham ($10,13 \pm 1,1$ %), sendo também superior aos demais grupos todos os grupos experimentais, Sulfa 1% ($20,29 \pm 1,08$ %), Veículo ($10,79 \pm 1,10$ %) e *McLTP1* 0,25% ($12,4 \pm 1,5$ %). O tratamento com Sulfa 1% também aumentou de forma significativa a contração da ferida quando comparado ao grupo Sham (Figura 7A; painel A).

No painel B da figura 7A estão demonstrados os percentuais de contração das feridas quantificados nos grupos experimentais no 5º dia. O tratamento com a *McLTP1* 0,5% ($52,5 \pm 5,06$ %) promoveu aumento significativo na taxa de contração das feridas em 69% quando comparado ao Sham ($16,03 \pm 2,9$ %) sendo também superior aos demais grupos experimentais: Sulfa 1% ($28,6 \pm 4,5$ %), Veículo ($22,13 \pm 3,1$ %) e *McLTP1* 0,25% ($15,41 \pm 4,3$ %). O tratamento com Sulfa 1%, quando comparado ao Sham, também aumentou de forma significativa a contração da lesão.

Também no 7º dia (Figura 7A, painel C), o tratamento com *McLTP1* 0,5% aumentou significativamente a contração da lesão ($54,7 \pm 6,9$ %) em relação aos grupo Sham ($15,2 \pm 6,2$ %) em 73%, sendo também efetiva quando da comparação com os grupos Veículo ($35,01 \pm 4,5$ %) e *McLTP1* 0,25% ($30,1 \pm 3,7$ %). O tratamento com sulfadiazina promoveu aumento na taxa de contração ($43,23 \pm 8,5$ %) em relação ao sham ($15,2 \pm 6,2$ %).

Nos 9º, 12º e 14º dias (Figura 7A, painéis D, E e F) apenas o tratamento com *McLTP1* 0,5% foi capaz de aumentar de forma significativa (9º dia: $78,8 \pm 7,1$ %; 12º dia: $97,77 \pm 1,2$ %; 14º dia: 100 ± 0 %) a contração das lesões em relação ao Sham (9º dia: $50,9 \pm 8,3$ %; 12º dia: $97,77 \pm 1,2$ %; 14º dia: $93,93 \pm 2,3$ %).

Figura 7B – Representação fotográfica do seguimento clínico das úlceras por queimadura, tratadas com *McLTP1*



As lesões foram fotografadas nos dias 3, 7 e 14 após a indução da queimadura. Um animal por grupo foi escolhido para representar o grupo de acordo com os resultados obtidos pela análise da contração da lesão. Os animais foram tratados com aplicação única diária de cremes dermatológicos à base de *McLTP1* (MC) 0,25% e 0,5%, Sulfadiazina de prata 1% e Veículo (sem princípio ativo) por 14 dias. (N=6 animais/grupo).

5.3 Avaliação histológica

5.3.1 O tratamento com *McLTP1* promoveu redução do infiltrado inflamatório e remodelação tecidual nas lesões induzidas por queimadura.

A análise qualitativa da celularidade e da arquitetura tecidual foi realizada em amostras de tecidos das lesões coletadas no 3º e 7º dias após a queimadura, fixadas em lâminas e coradas por hematoxilina-eosina. A avaliação foi feita mediante aplicação de escores considerando os parâmetros de presença de úlcera, alterações na espessura da epiderme e derme, presença de infiltrado inflamatório e queratinização, adaptados do estudo de Avsar et al., (2016). No 14º dia, as lâminas foram avaliadas quanto à espessura do epitélio neoformado através da mensuração da camada epitelial com uma lente ocular milimetrada e expressos em como média em mm (Oriá et al., 2003).

No 3º dia, a avaliação histológica por escores demonstrou que o modelo foi eficiente em induzir formação de úlcera, redução na espessura do epitélio e derme, bem como induzir a presença de células inflamatórias como polimorfonucleares e mononucleares na derme e hipoderme. Esses achados não foram constatados ao

avaliarem-se as lâminas de animais não submetidos à queimadura (dados não mostrados). Os escores deste dia não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Quadro 1, Figura 8).

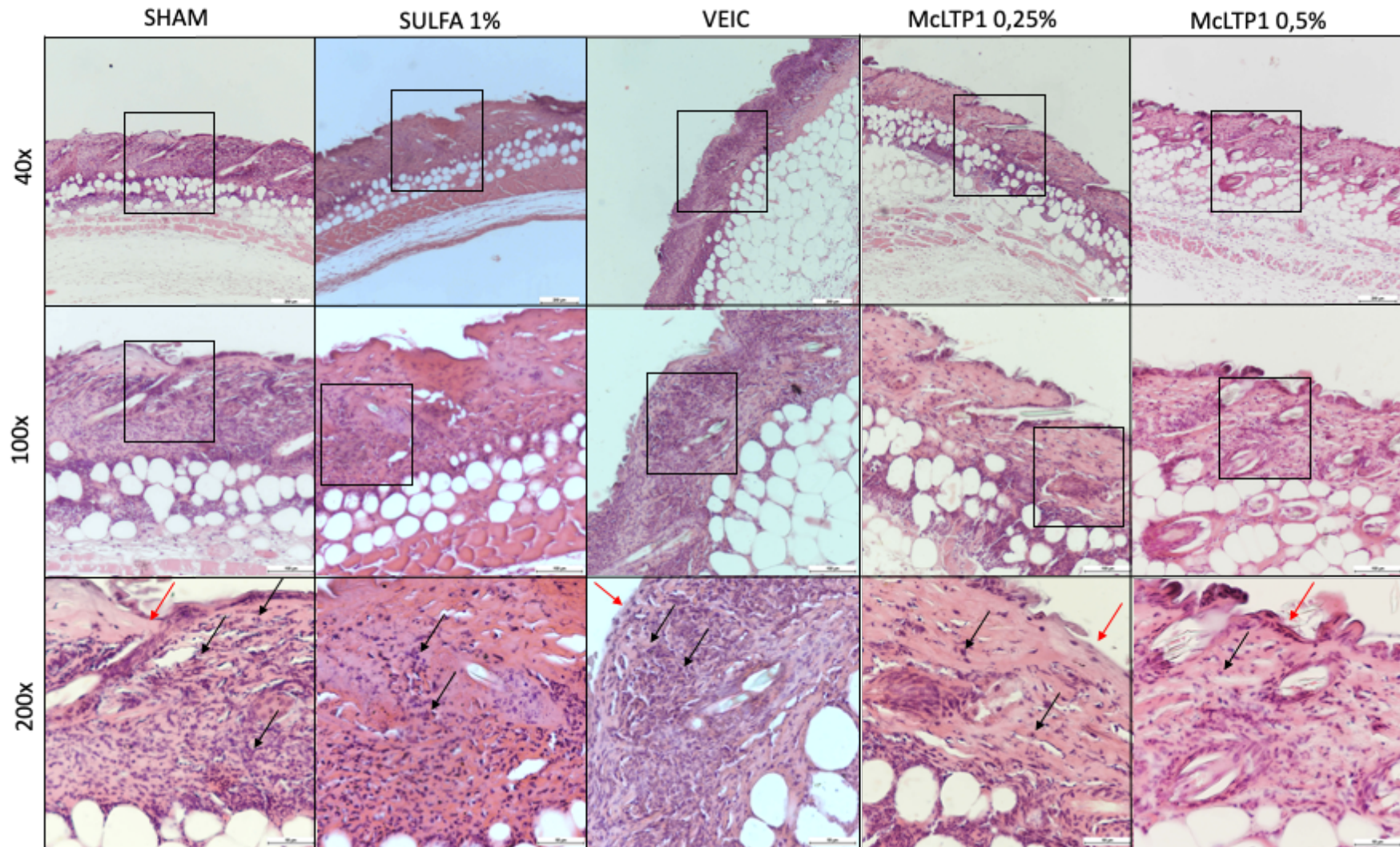
Já no 7º dia, observou-se uma redução significativa dos escores avaliados nos grupos Sulfa 1% e *McLTP1* 0,5%, em relação ao Sham e ao Veículo (Quadro 1; Figura 9). Observou-se persistência do infiltrado inflamatório após a queimadura, entretanto a presença de fibroblastos e fibrócitos foi constatada (Quadro 1; Figura 9). A *McLTP1* 0,5% foi capaz de promover proliferação fibroblástica e formação de epitélio logo abaixo à crosta da ferida, o que não foi observado nos animais tratados com sulfadiazina de prata a 1%. Entretanto, os dois tratamentos foram efetivos em controlar a presença de infiltrado inflamatório. Ademais, observou-se no grupo tratado com *McLTP1* a 0,5% um aumento da presença de fibroblastos na derme.

Quadro 1 – Representação por escores da avaliação histológica das queimaduras

Grupos Tempo	SHAM	SULFA 1%	VEIC	McLTP1 0,25%	McLTP1 0,5%
3º dia	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (1-3)
7º dia	3 (2-3)	2(1-2) * δ	2,5 (2-3)	2 (1-2)	1 (1-2) * δ

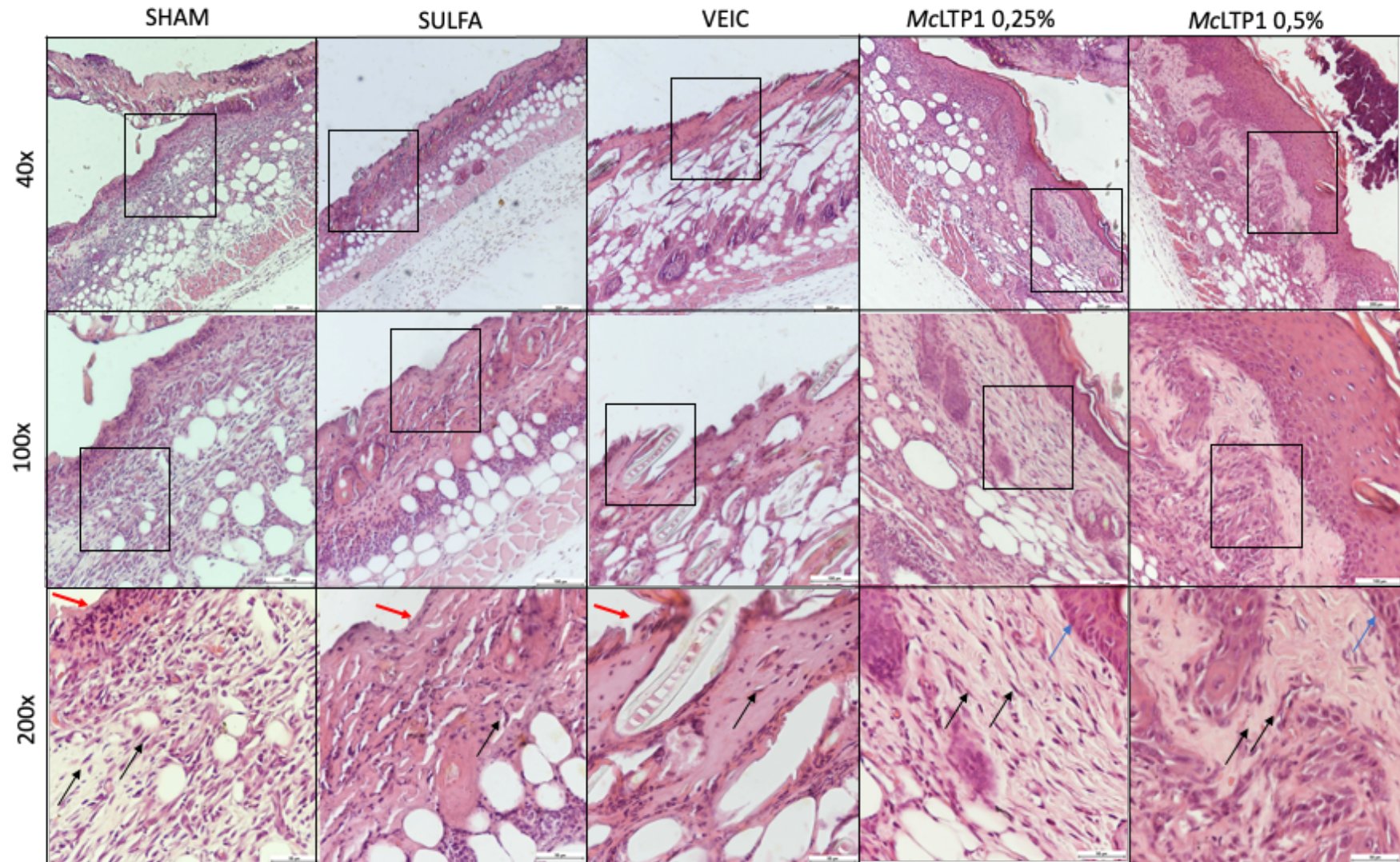
Os resultados foram expressos em mediana seguida de seus valores mínimo e máximo. A análise estatística dos dados não-paramétricos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo Sham e $\delta p < 0,05$ em relação ao Veículo (N=6 animais/grupo).

Figura 8 – Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 3 dias nos grupos experimentais (HE)



As peles de dorso foram removidas dos animais no 3º dia experimental, processadas e coradas por método HE. As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 40, 100 e 200 vezes. (N=6 animais/grupo). Setas vermelhas indicam a presença de úlcera, as pretas mostram os fibroblastos e as azuis, o epitélio neoformado.

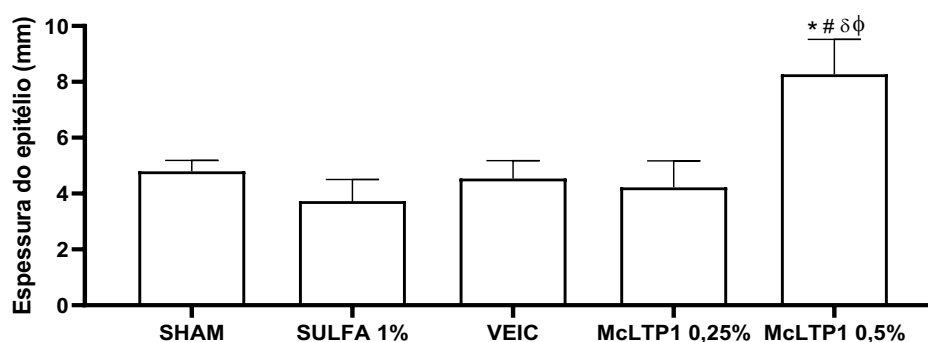
Figura 9 – Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 7 dias nos grupos experimentais (HE)



As peles de dorso foram removidas dos animais no 7º dia experimental, processadas e coradas por método HE. As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 40, 100 e 200 vezes. (N=6 animais/grupo). Setas vermelhas indicam a presença de úlcera, as pretas mostram os fibroblastos e as azuis, o epitélio neoformado.

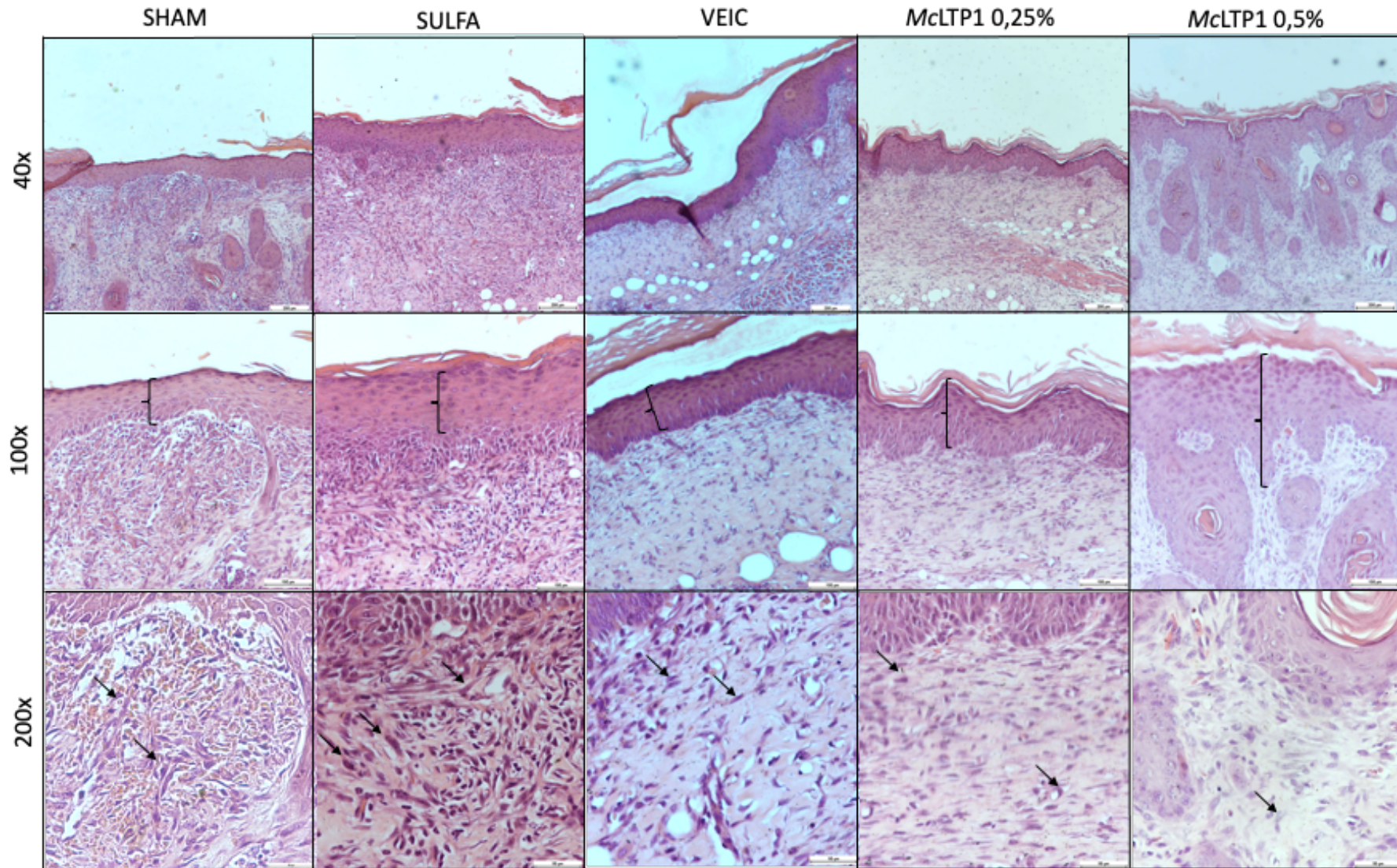
No 14º dia, as lâminas foram avaliadas quanto à espessura do epitélio neoformado através da mensuração da camada epitelial com uma lente ocular milimetrada (Oriá et al., 2003). Observou-se que os animais tratados com *McLTP1* 0,5% apresentaram um epitélio mais espesso em comparação aos demais grupos (Sham: $4,8 \pm 0,4$; Sulfa 1%: $3,73 \pm 0,78$; Veículo: $4,5 \pm 0,64$; *McLTP1* 0,25%: $8,2 \pm 1,25$ – Figura 10; 11).

Figura 10 – Efeito do tratamento com *McLTP1* na espessura do epitélio neoformado após 14 dias



A mensuração da espessura do epitélio foi realizada em cinco campos (100x) de uma mesma lâmina, e feita a média aritmética entre eles. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. O epitélio dos animais tratados com *McLTP1* 0,5% se mostrou mais espesso que os demais. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1%, $\delta p < 0,05$ em relação ao Veículo e $\phi p < 0,05$ em relação ao *McLTP1* 0,25% (N=6 animais/grupo).

Figura 11 – Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 14 dias nos grupos experimentais (HE)



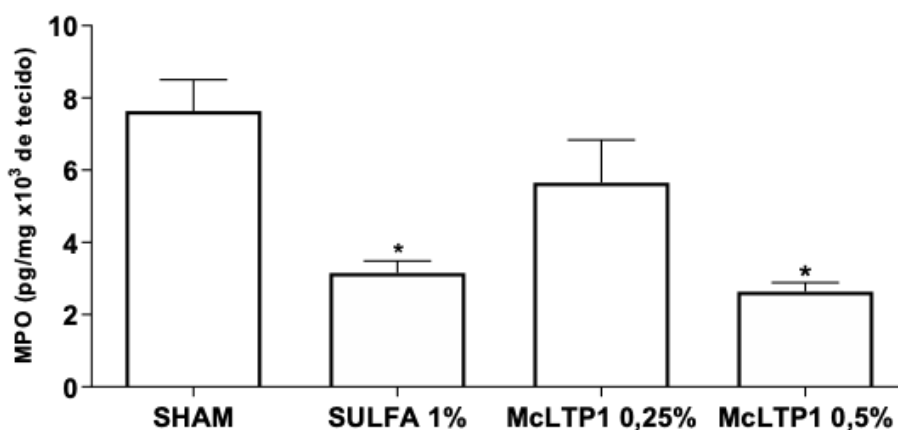
As peles de dorso foram removidas dos animais no 14º dia experimental, processadas e coradas por método HE. As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 40, 100 e 200 vezes. (N=5-6 animais/grupo). As chaves mostram o epitélio neoformado e as setas pretas indicam os fibroblastos.

5.4 Análises bioquímicas

5.4.1 A *McLTP1* reduziu a atividade de mieloperoxidase (MPO) nas feridas induzidas por queimadura

Amostras de pele das feridas dos grupos experimentais foram coletadas no 3º dia foram maceradas e preparadas para avaliar onde foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador indireto da presença de neutrófilos. O tratamento das lesões com Sulfa 1% e *McLTP1* 0,5% reduziram significativamente a atividade tecidual da MPO (Sulfa 1%: $3,15 \pm 0,3$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $2,63 \pm 0,25$ pg/mg) quando comparado ao grupo sem nenhum tratamento, Sham ($7,64 \pm 0,87$ pg/mg). A *McLTP1* 0,25% não reduziu a atividade da MPO ($5,65 \pm 1,2$ pg/mg) (Figura 12).

Figura 12 – Efeito do tratamento com *McLTP1* na atividade da MPO



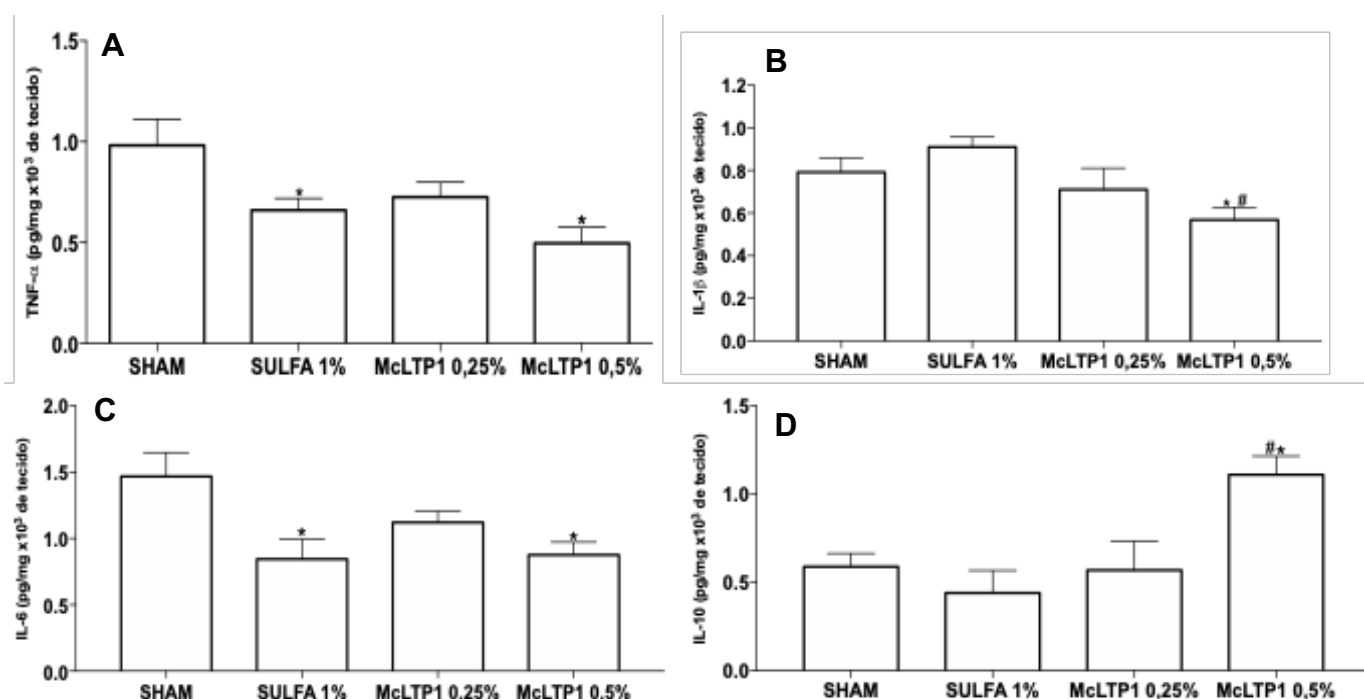
A atividade da MPO foi avaliada na pele do dorso submetida à queimadura superficial após 3 dias de tratamento. Os resultados (picograma/mg 10³ de tecido) foram expressos pela média ± erro padrão da média. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. *p<0,05 representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham (N=6 animais/grupo).

5.4.2 A *McLTP1* modulou a inflamação diminuindo a liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e aumentando a liberação de IL-10 nas lesões após 3 dias da indução por queimadura

Amostras de pele das lesões foram coletadas no 3º dia após a indução da queimadura e foram quantificados os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA. Os resultados da Figura 13 mostram que somente o tratamento das lesões

com o creme contendo a *McLTP1* 0,5% foi eficiente em interferir da liberação de todas as citocinas avaliadas, reduzindo os níveis das citocinas inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) e aumentando os níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória).

Figura 13 – Efeito do tratamento com *McLTP1* nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10



Os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ (A), $\text{IL-1}\beta$ (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram dosados na pele do dorso submetida à queimadura superficial após 3 dias de tratamento. Os resultados (picograma/mg 10^3 de tecido) foram expressos pela média \pm erro padrão da média. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% (N=6 animais/grupo).

O tratamento com *McLTP1* 0,5%, quando comparado ao grupo Sham, promoveu de forma significativa a redução dos níveis teciduais de $\text{TNF-}\alpha$ (Sham: $0,98 \pm 0,13$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $0,5 \pm 0,07$ pg/mg – Figura 13; Painel A), de $\text{IL-1}\beta$, (Sham: $0,79 \pm 0,07$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $0,57 \pm 0,05$ pg/mg – Figura 13; Painel B) e de IL-6 (Sham: $1,47 \pm 0,18$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $0,87 \pm 0,98$ pg/mg – Figura 13; Painel C) e aumentou os níveis de IL-10 (Sham: $0,58 \pm 0,07$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $1,11 \pm 0,1$ pg/mg – Figura 13; Painel D). Por outro lado, o tratamento com a *McLTP1* na concentração de 0,25 % não promoveu alteração tecidual nos níveis de nenhum dos mediadores inflamatórios avaliados nesta abordagem.

O tratamento das lesões com a sulfadiazina, quando comparado ao grupo

Sham, promoveu significativa redução somente de TNF- α (Sham: $0,98 \pm 0,13$ pg/mg; Sulfa 1%: $0,66 \pm 0,05$ pg/mg – Figura 13; Painel A) e IL-6 (Sham: $1,47 \pm 0,18$ pg/mg; Sulfa 1%: $0,85 \pm 0,15$ pg/mg – Figura 13; Painel C), não interferindo na liberação tecidual dos níveis de IL-1 β e IL-10.

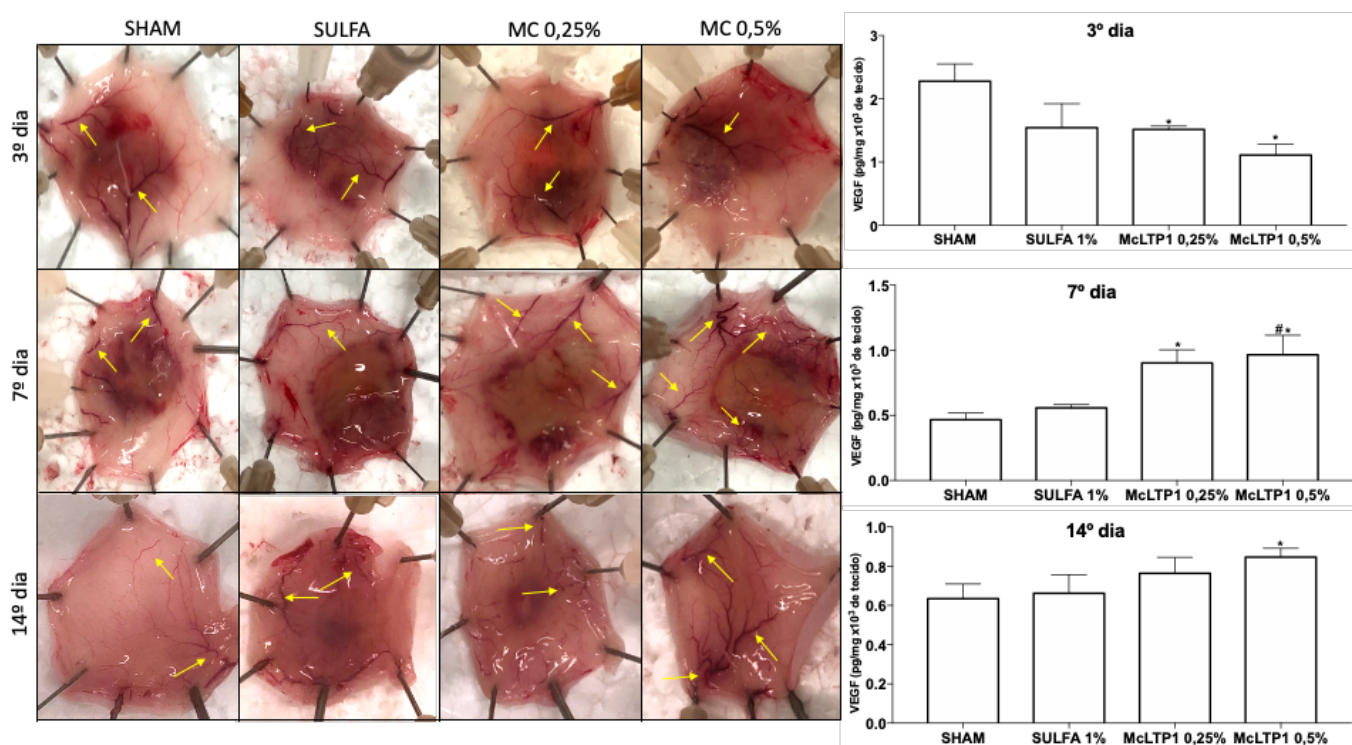
5.4.3 A *McLTP1* modulou os níveis de VEGF nos três períodos experimentais

Amostras de pele coletadas nos dias 3, 7 e 14 foram utilizadas para dosagem dos níveis de VEGF por ELISA. No 3º dia, a *McLTP1* nas concentrações de 0,25% e 0,5% diminuíram os níveis de VEGF (*McLTP1* 0,25%: $1,52 \pm 0,05$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $1,11 \pm 0,17$ pg/mg – Figura 14) em relação ao Sham ($2,3 \pm 0,28$ pg/mg – Figura 14; Painel A), não diferindo do Sulfa 1% ($1,54 \pm 0,4$ pg/mg – Figura 14).

Ao 7º dia experimental, ambas as concentrações da *McLTP1* aumentaram os níveis de VEGF em relação ao Sham (Sham: $0,46 \pm 0,05$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $0,90 \pm 0,1$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $0,96 \pm 0,15$ pg/mg – Figura 14), sendo que o aumento da concentração de 0,5% foi significativamente maior também em relação ao Sulfa 1% ($0,56 \pm 0,02$ pg/mg – Figura 14). No 14º dia, apenas a maior concentração de *McLTP1* (*McLTP1* 0,5%: $0,84 \pm 0,04$ pg/mg – Figura 14) manteve um aumento significativo dos níveis deste mediador em relação ao Sham (Sham: $0,63 \pm 0,07$ pg/mg; Sulfa 1%: $0,66 \pm 0,09$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $0,76 \pm 0,08$ pg/mg – Figura 14).

Considerando o envolvimento do VEGF na angiogênese, foi avaliado macroscopicamente a presença de novos vasos nas fotografias da parte interna da pele do dorso submetidas à queimadura. As ilustrações demonstram a redução de vasos nos animais dos grupos tratados com *McLTP1* ao 3º dia experimental, seguida de aumento da angiogênese nesses grupos após 7 dias. Ao 14º a diferença na presença de novos vasos entre o grupo Sham e *McLTP1* 0,5% é bem evidente, sendo visto, no grupo experimental, aumento do número bem como do calibre dos novos vasos em relação ao controle.

Figura 14 – Representação fotográfica da angiogênese na pele submetida à queimadura

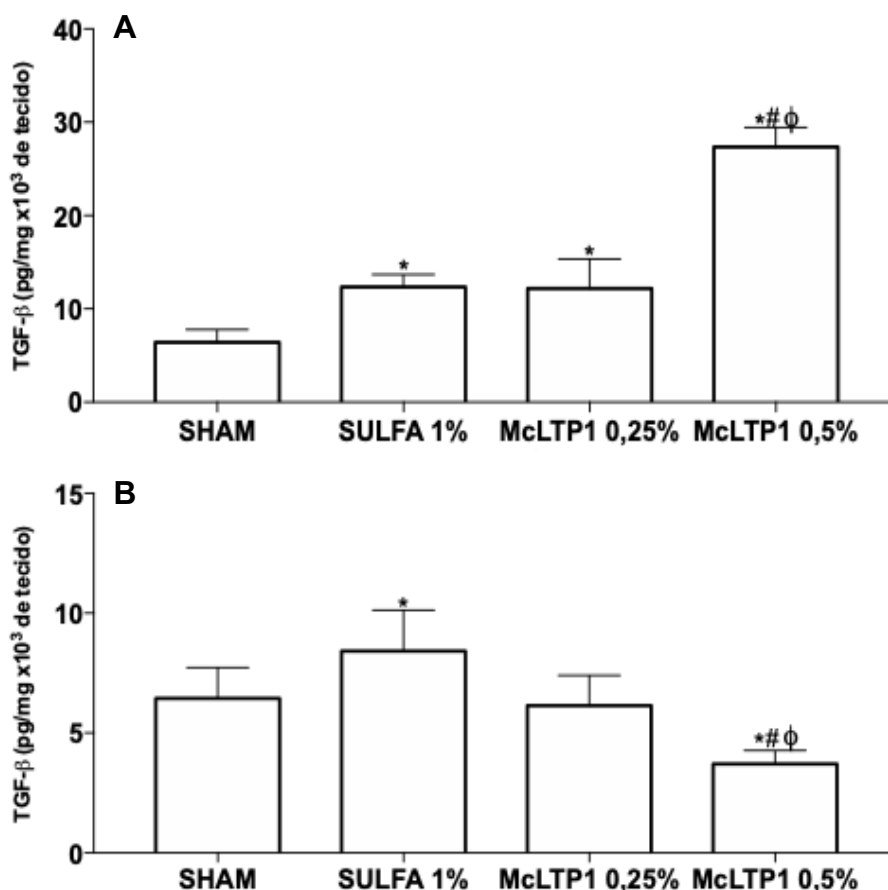


Os níveis de VEGF foram dosados na pele do dorso submetida à queimadura superficial após 3, 7 e 14 dias de tratamento. Os resultados (picograma/mg 10^3 de tecido) foram expressos pela média \pm erro padrão da média. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% (N=6 animais/grupo). Setas amarelas indicam os novos vasos sanguíneos.

5.4.4 A *McLTP1* modulou os níveis de TGF- β nos 7º e 14º dias

Amostras de pele coletadas nos dias 7 e 14 foram coletadas e utilizadas para dosagem da presença de TGF- β por ELISA. No 7º dia, a Sulfa 1% e a *McLTP1* nas concentrações de 0,25% e 0,5% aumentaram os níveis de TGF- β (Sulfa 1%: $12,35 \pm 1,33$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $12,17 \pm 3,2$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $27,34 \pm 2,1$ pg/mg - Figura 15; Painel A) em relação ao Sham ($6,5 \pm 1,35$ pg/mg - Figura 15; Painel A). A *McLTP1* em sua maior concentração foi mais efetiva em aumentar TGF- β em relação a todos os grupos (Figura 15; Painel A).

No 14º dia, apenas o grupo Sulfa 1% ($8,41 \pm 1,7$ pg/mg - Figura 15; Painel B) demonstrou níveis aumentados de TGF- β em relação ao Sham ($6,45 \pm 1,3$ pg/mg - Figura 15; Painel B) tendo a diminuído os níveis deste fator de crescimento em relação aos demais grupos (*McLTP1* 0,25%: $6,15 \pm 1,3$ pg/mg; *McLTP1* 0,5% $3,7 \pm 0,56$ pg/mg - Figura 15; Painel B).

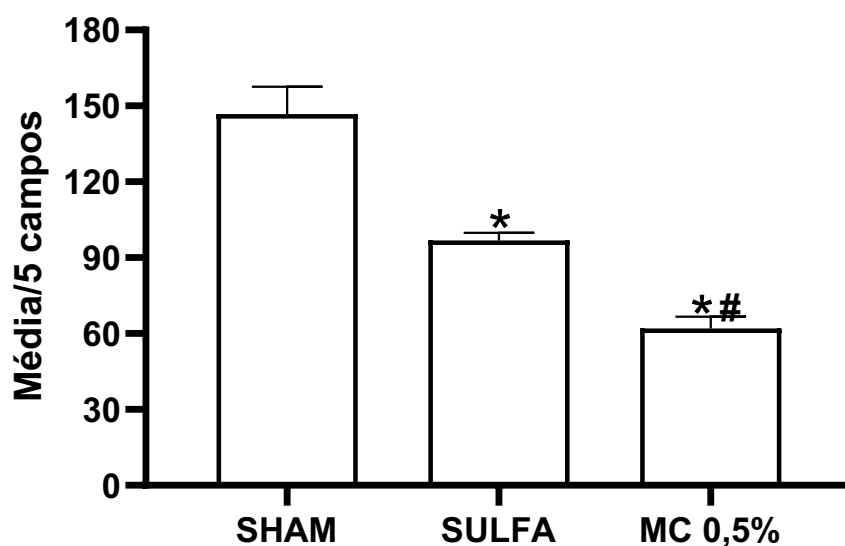
Figura 15 – Efeito do tratamento com *McLTP1* nos níveis de TGF- β 

Os níveis de TGF- β (A e B) foram dosados na pele do dorso submetida à queimadura superficial após 7 e 14 dias de tratamento. Os resultados (picograma/mg 10³ de tecido) foram expressos pela média \pm erro padrão da média. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% e $\phi p < 0,05$ em relação ao *McLTP1* 0,25% (N=6 animais/grupo).

5.4.5 O tratamento com *McLTP1* reduziu as imunomarcações para TNF- α no 3º dia

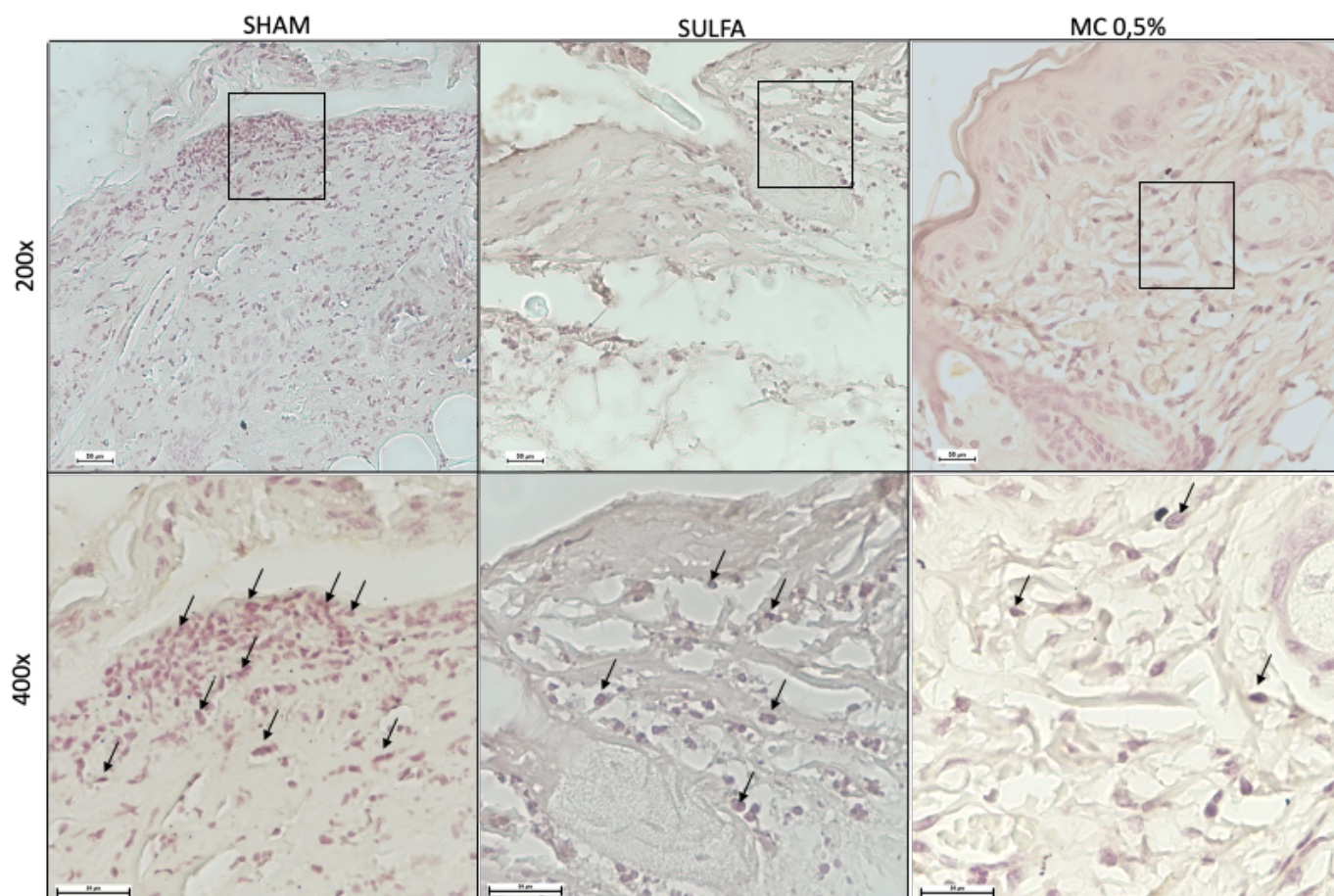
Amostras de pele coletadas no 3º dia foram processadas para a avaliação da expressão de TNF- α por imunohistoquímica. O grupo Sham apresentou um aumento das imunomarcações para TNF- α ($146,8 \pm 10,85$; Figuras 16 e 17), enquanto os tratamentos com Sulfadiazina de prata 1% e *McLTP1* 0,5% diminuíram as marcações desta citocina nas amostras teciduais (Sulfa 1%: $96,75 \pm 3,2$; *McLTP1* 0,5%: $62 \pm 4,6$; Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Quantificação das imunomarcações para TNF- α na pele do dorso de animais submetidos à queimadura após 3 dias



A quantificação das imunomarcações foi realizada em realizada em cinco campos (400x) de uma mesma lâmina, e feita a média aritmética entre eles. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. A *McLTP1* reduziu as imunomarcações para TNF- α após 3 dias. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% (N=6 animais/grupo).

Figura 17 – Fotomicrografias das imunomarcações para TNF- α na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 3 dias

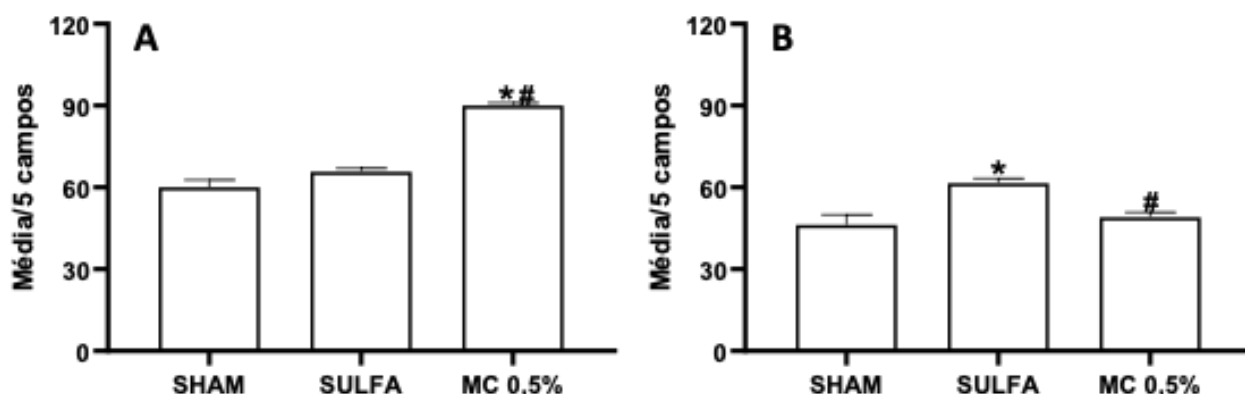


As peles de dorso foram removidas dos animais no 3º dia experimental, processadas e submetidas à imunomarcação para TNF- α . As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 200 e 400 vezes. (N=6 animais/grupo).

5.4.6 O tratamento com *McLTP1* aumentou a expressão de FGF após 7 e 14 dias

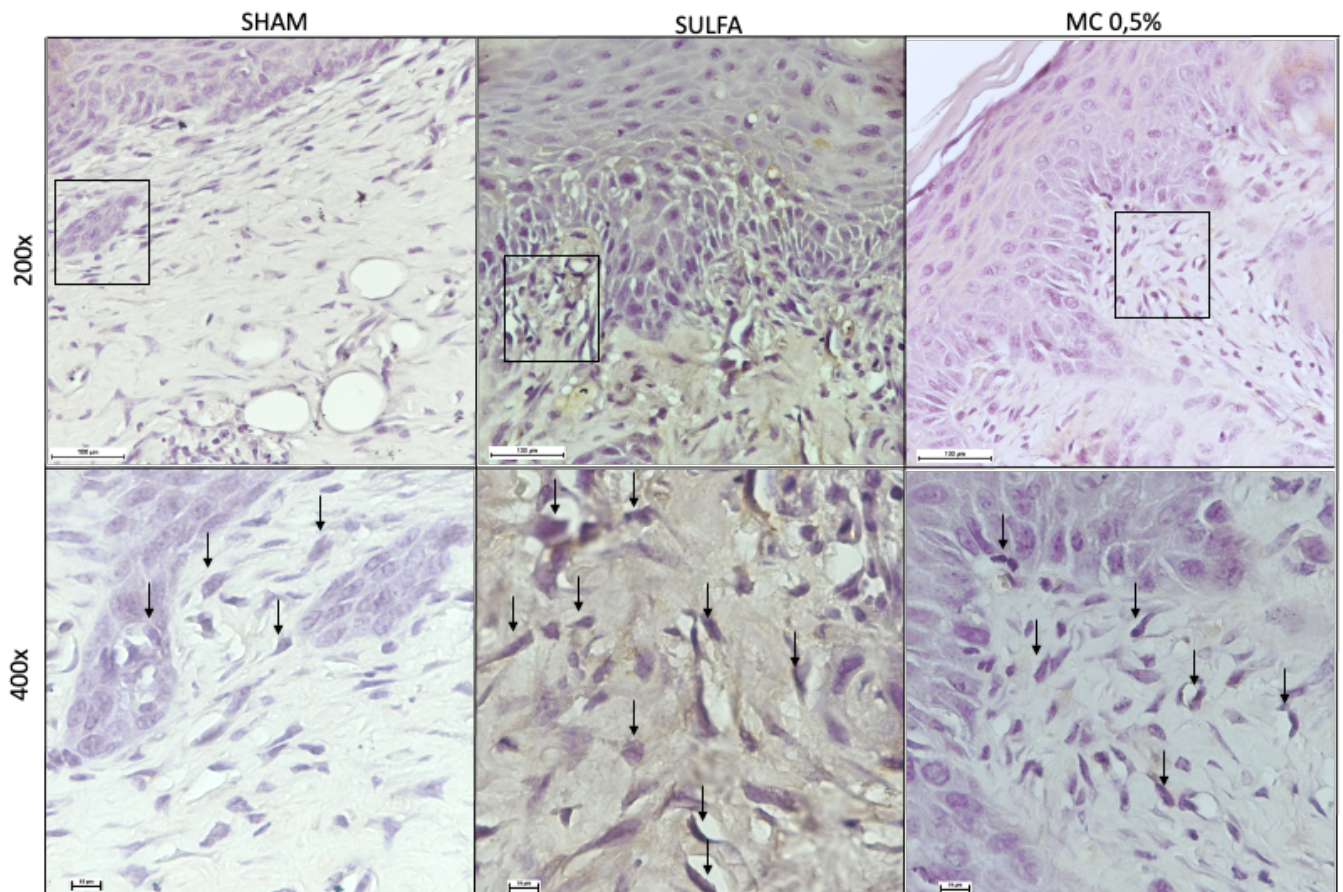
Amostras de pele coletadas nos dias 7 e 14 também foram destinadas à imuno-histoquímica para FGF, um marcador de fibroblastos. No 7º dia, observou-se um aumento significativo da imunomarcações para FGF nas amostras de pele tratadas com a *McLTP1* 0,5% ($90 \pm 1,08$; Figura 18A e 19) em comparação aos grupos Sham ($60 \pm 2,74$; Figura 18A e 19) e Sulfa 1% ($65,75 \pm 1,31$ - Figura 18A e 19). No 14º dia, o grupo Sulfa 1% ($61,5 \pm 1,7$; Figura 19B e 21) demonstrou um aumento de marcações em relação ao Sham ($46,25 \pm 3,7$; Figura 18B e 20), enquanto a *McLTP1* 0,5% ($49 \pm 1,82$; Figura 18B e 20) não alterou a expressão de FGF neste período.

Figura 18 – Quantificação das imunomarcações para FGF na pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 7 e 14 dias



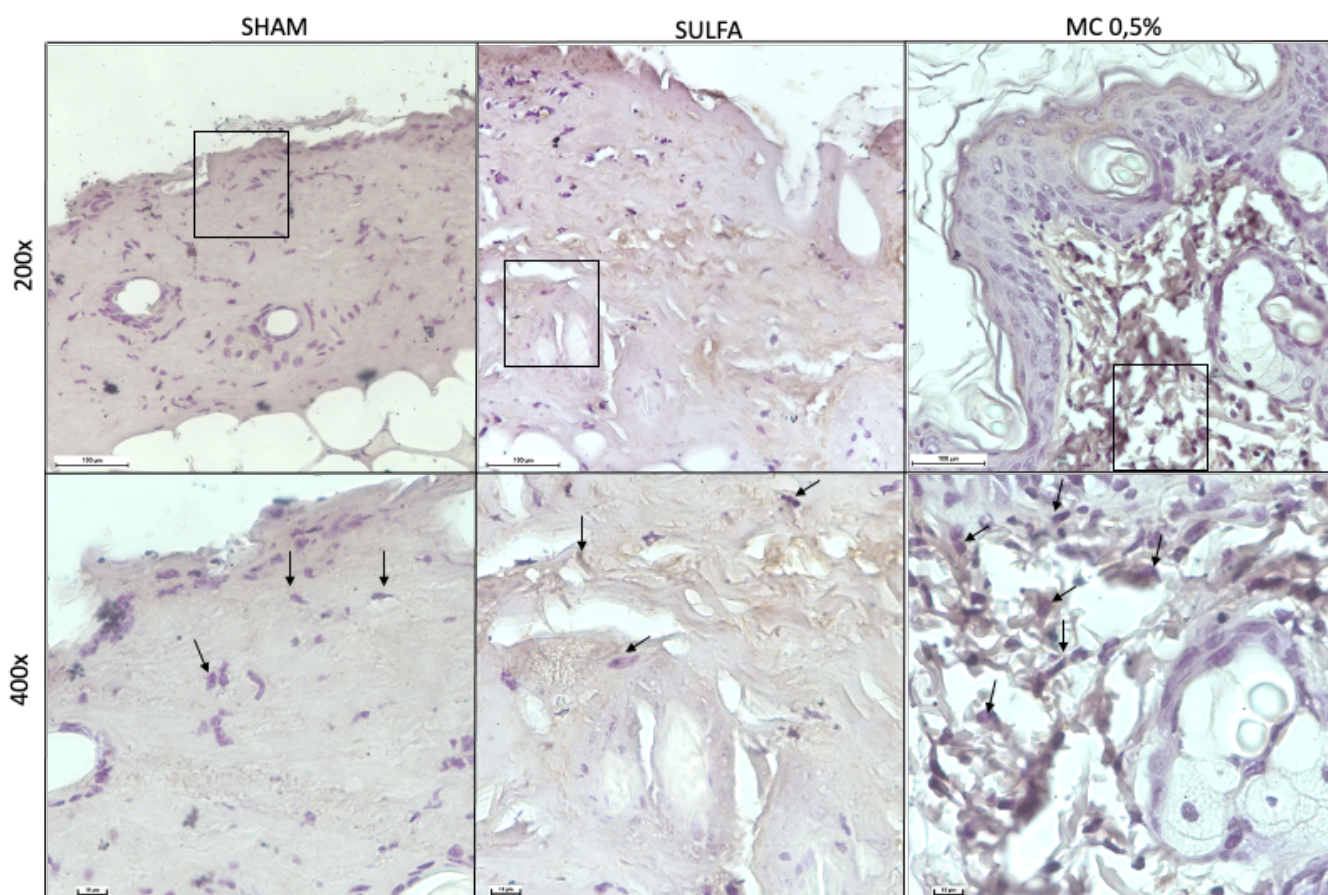
A quantificação das imunomarcações foi realizada em realizada em cinco campos (400x) de uma mesma lâmina, e feita a média aritmética entre eles. Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média. A *MclTP1* aumentou as imunomarcações para FGF após 7 dias (A) e não alterou a presença deste fator de crescimento após 14 dias (B). ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% (N=6 animais/grupo).

Figura 19 – Fotomicrografias das imunomarcações para FGF pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 7 dias



As peles de dorso foram removidas dos animais no 7º dia experimental, processadas e submetidas à imunomarcção para FGF. As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 200 e 400 vezes. (N=6 animais/grupo). As setas pretas indicam células marcadas.

Figura 20 – Fotomicrografias das imunomarcações para FGF pele do dorso de animais submetidos à queimadura experimental após 14 dias



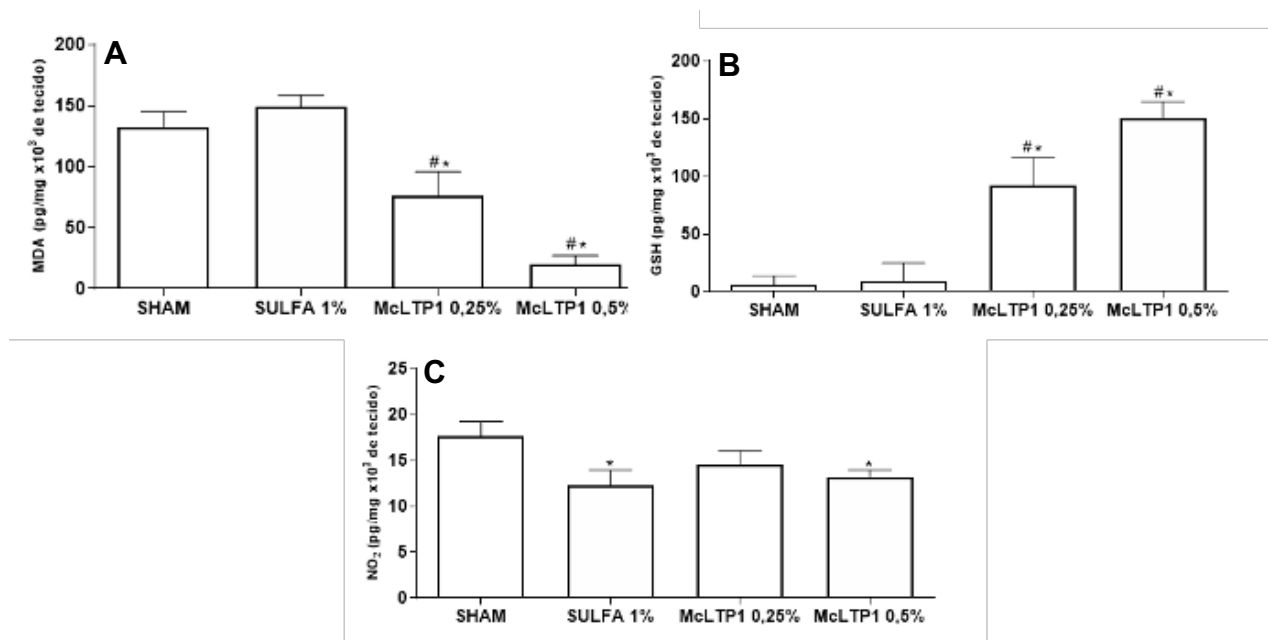
As peles de dorso foram removidas dos animais no 14º dia experimental, processadas e submetidas à imunomarcação para FGF. As fotomicrografias foram realizadas nos aumentos de 200 e 400 vezes. (N=6 animais/grupo).

5.4.7 O tratamento com *McLTP1* reduziu o estresse oxidativo

Amostras de pele coletadas no 3º dia foram processadas para avaliação dos níveis de marcadores de estresse oxidativo [malondialdeído (MDA) e a conversão de NO_2 em NO_3 (NO_2/NO_3)], e do efeito antioxidante como a glutatona reduzida (GSH). O tratamento com *McLTP1* em ambas as concentrações reduziu significativamente os níveis de MDA em relação ao Sham e ao Sulfa 1% (Sham: $132,6 \pm 12,36$ pg/mg; Sulfa 1% 1%: $149,4 \pm 9,2$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $76,39 \pm 19,6$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $19,84 \pm 7,3$ pg/mg- Figura 21; Painel A). A conversão de NO_2 em NO_3 foi diminuída nos grupos tratados com sulfadiazina de prata a 1% e *McLTP1* 0,5% (Sham: $17,6 \pm 1,62$ pg/mg; Sulfa 1%: $12,3 \pm 1,65$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $14,5 \pm 1,6$ pg/mg; *McLTP1* 0,5%: $13,2 \pm 0,75$ pg/mg – Figura 21; Painel C). A proteína *McLTP1*, nas duas

concentrações, promoveu efeito antioxidante ao elevar os níveis de GSH em relação aos grupos Sham e Sulfa 1% em suas duas concentrações (Sham: $6 \pm 7,5$ pg/mg; Sulfa 1%: $10,9 \pm 0,48$ pg/mg; *McLTP1* 0,25%: $91,72 \pm 24,5$ pgm/g; *McLTP1* 0,5%: $150,2 \pm 14,5$ pg/mg – Figura 21; Painel B).

Figura 21 – Efeito do tratamento com *McLTP1* nos níveis de MDA, GSH e NO_2/NO_3

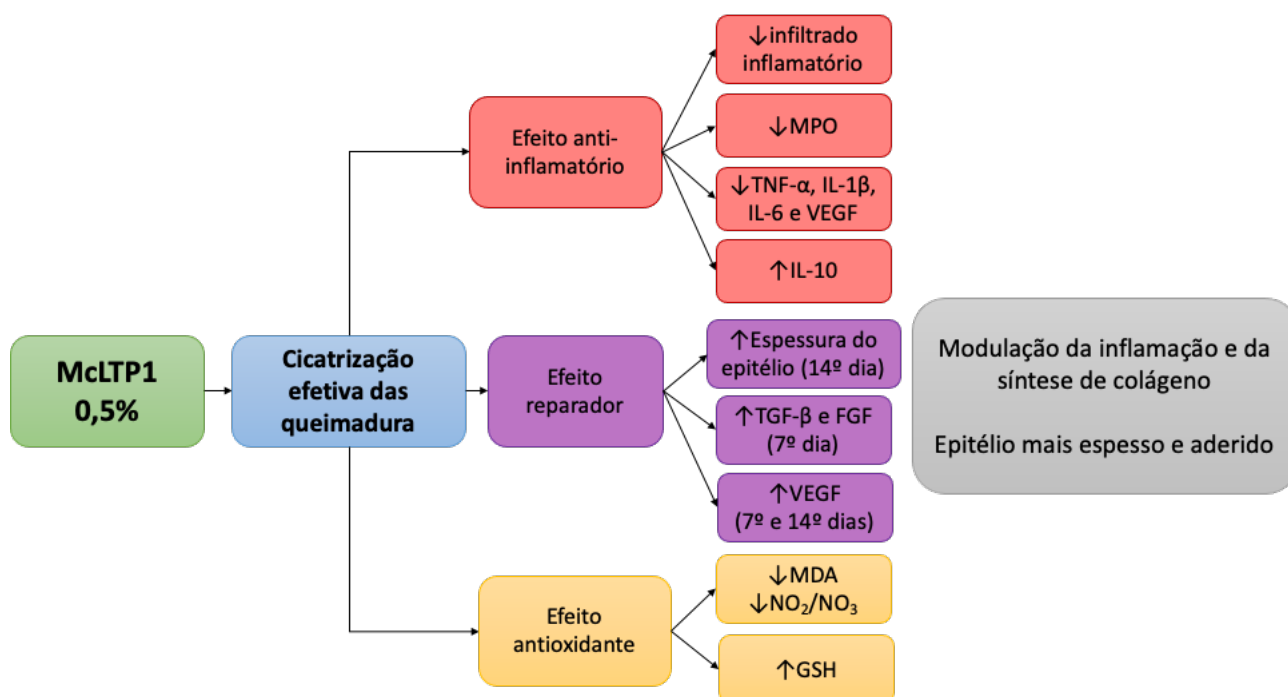


O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem de MDA (A), GSH (B) e NO_2/NO_3 (C) na pele do dorso submetida à queimadura superficial após 3 dias de tratamento. Os resultados (picograma/mg 10^3 de tecido) foram expressos pela média \pm erro padrão da média. ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para comparações entre médias. * $p < 0,05$ representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao Sulfa 1% (N=6 animais/grupo).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o tratamento com a *McLTP1* demonstrou potente efeito anti-inflamatório por reduzir o infiltrado inflamatório, a atividade da enzima mieloperoxidase, os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e VEGF e aumentar IL-10 , bem como efeito antioxidante por diminuir os níveis de malondialdeído e a conversão de NO, bem como aumentar os níveis de glutathiona reduzida no 3º dia experimental. Ademais, promoveu reparação epitelial por aumentar a espessura do epitélio, pela indução de VEGF, $\text{TGF-}\beta$ e FGF após 7 dias, e manutenção da angiogênese elevada após 14 dia. Deste modo, esta proteína induziu ótima resposta cicatricial comprovada pelo fechamento total das feridas no grupo tratado com a concentração de 0,5%.

Figura 22 – Resumo dos efeitos produzidos pela McLTP1 em modelo de queimadura superficial



Efeitos demonstrados por McLTP1 em modelo de queimadura induzida

As queimaduras são consideradas um problema de saúde pública, visto que, a depender da sua extensão, demandam maior tempo de tratamento. Portanto, muitos esforços têm sido aplicados para o melhor entendimento do mecanismo fisiológico da cicatrização de queimaduras, bem como das interferências que ocorrem durante este processo, e, também, na descoberta e elaboração de novas ferramentas biotecnológicas, que são importantes para aprimorar o tratamento de pacientes com lesões de pele. Estudos buscam alternativas terapêuticas para as queimaduras, utilizando produtos naturais que demonstraram efetividade em recuperar essas lesões (Avsar et al., 2016; Souza et al., 2021).

A McLTP1, uma proteína transferidora de lipídios isolada das sementes de noni, tem sido estudada acerca de seus efeitos terapêuticos, e tem demonstrado potenciais antinociceptivo, anti-inflamatório, antibacteriano e anti-oxidante (Campos et al., 2016; Souza et al., 2018; Nogueira et al., 2022). A literatura demonstrou que a McLTP1 inibiu, de forma eficaz, o crescimento de bactérias que colonizam a pele como *Staphylococcus aureus* e *epidermidis* (Souza et al., 2018), as quais podem causar infecção secundária nessas lesões. Este achado eleva, ainda mais, a importância

desse investigar se esta proteína pode ser uma alternativa de tratamento e diminuição das complicações das queimaduras.

A sulfadiazina de prata a 1% é um antibacteriano que tem como mecanismo de ação a liberação do íon prata que causa precipitação proteica e lise da membrana celular bacteriana (Devi; Poornima, 2022). Seu uso como controle positivo neste estudo se deu pelo fato dela ser o tratamento preconizado pelo ministério da saúde no âmbito do SUS, por ser efetiva em controlar infecções secundárias e possíveis complicações (BRASIL, 2012). Entretanto, estudos já compararam o efeito da sulfadiazina de prata a 1% a produtos naturais como o gel de *Aloe vera* e mel de abelhas e observaram que estes últimos foram mais eficazes como agentes cicatrizantes do que a sulfadiazina (Shahzad; Ahmed, 2013; Aziz et al., 2017). De forma semelhante, este estudo também observou que a McLTP1 foi superior em induzir a cicatrização das queimaduras do que a sulfadiazina de prata a 1%.

Para avaliar inicialmente o efeito da McLTP1 em células que participam ativamente da cicatrização, foi realizado a avaliação da viabilidade celular em fibroblastos pelo método SRB, que fornece maior sensibilidade, linearidade e reprodutibilidade que outros métodos como o MTT, por exemplo (TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Concentrações mais elevadas da McLTP1, como 25, 12,5 e 6,25 µg/mL reduziram a viabilidade celular de fibroblastos, o que pode ser explicado pelo fato dela ser um composto isolado. Park et al. (2017), ao utilizaram a deoxishikonina, uma proteína isolada do composto *Lithospermi Radix*, uma mistura herbal utilizada na Coreia do Sul para tratamentos de feridas e infecções de pele, observaram que concentrações de 30, 15 e 7,5 µg/mL também promoveram efeito citotóxico em queratinócitos humanos. As concentrações de 3,12 a 0,1 µg/mL não alteraram a viabilidade celular. Apenas a menor concentração foi capaz de aumentar a proliferação de fibroblastos murinos.

A partir deste resultado *in vitro*, onde se observou potencial proliferativo da McLTP1 na concentração de 0,05 µg/mL, objetivou-se investigar o potencial cicatrizante desta proteína *in vivo*. O percentual de 0,5% McLTP1 foi escolhido de acordo com a extrapolação da concentração de 0,05 µg/mL e a de percentual 0,25% foi empregada no intuito de avaliar se concentrações menores poderiam ser mais efetivas.

A literatura mostra diversos modelos animais utilizados para o estudo da cicatrização de feridas, sendo um passo inicial importante para posteriores estudos

da cicatrização em humanos. Protocolos de ferida excisional (De Figueiredo et al., 2014), úlcera por pressão (Kottner et al., 2020) e queimadura superficial (Souza et al., 2021) tem-se mostrado como importantes ferramentas para estudo de novas formulações terapêuticas para acelerar a cicatrização bem como impedir a contaminação secundária das lesões.

Neste trabalho, queimadura induziu forte resposta inflamatória tecidual no 3º dia, comprovada pela alteração na espessura da epiderme e derme, presença de úlcera e intenso infiltrado inflamatório presente na derme e hipoderme. Ademais, a dosagem de citocinas mostrou a presença de TNF- α , IL-1 β e IL-6, mediadores importantes na fase inflamatória da queimadura (Ravat et al., 2011). Achados da literatura corroboram o aumento desses mediadores inflamatórios, que se inicia nas primeiras horas após a queimadura, se estendendo até o 3º dia (Kubo et al., 2014).

O modelo de queimadura induzida em camundongos foi escolhido como método de avaliação do efeito da proteína *McLTP1* nas concentrações de 0,25% e 0,5%, as quais foram estabelecidas de acordo com ensaios de viabilidade celular de e fibroblastos murinos *in vitro* (dados não mostrados). A *McLTP1* demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes satisfatórios (Campos et al., 2016; 2017; Nogueira et al., 2022), apresentando também ação antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, bactérias predominantes em infecções secundárias da pele (Souza et al., 2018; Olszewski et al., 1999; Kobayashi et al., 2015). Diante disso, avaliar o efeito desta proteína na cicatrização foi importante, uma vez que este efeito pode vir associado à diminuição da incidência de infecções secundárias em queimaduras.

A *McLTP1*, proteína transferidora de lipídios que vem sendo utilizada em diversos modelos animais, como sepse, dor e mucosite intestinal, tem demonstrado o controle da resposta inflamatória, oxidante e álgica. Destaca-se ainda que este foi o primeiro estudo que buscou avaliar os efeitos cicatrizantes desta proteína, dada a importância e consistência de seus resultados demonstrados previamente.

No 3º dia após a indução da queimadura, a avaliação macroscópica das lesões constatou a presença de úlcera em todos os grupos, estando de acordo com outros achados da literatura (Souza et al., 2021). Entretanto, os tratamentos com a Sulfadiazina de prata 1% e com a *McLTP1* 0,5% foram eficazes em aumentar a contração da área da ferida em relação ao grupo não-tratado (Sham), sendo a

McLTP1 0,5% mais efetiva quando comparada a todos os grupos experimentais. No 5º dia, o efeito de reparação da McLTP1 0,5% se torna mais evidente em relação aos demais grupos, mantendo-se mais eficiente também no 7º dia. No 9º dia apenas a McLTP1 0,5% se mostrou eficaz em continuar o processo de reparação da ferida. A partir desse período, nota-se uma tendência das contrações avaliadas de se igualarem nos grupos Sham, Sulfa 1%, Veículo e McLTP1 0,25% nos demais períodos de avaliação, assemelhando-se aos resultados encontrados por Souza et al., (2021), que investigou o efeito de uma fração metanólica de *Sideroxylon obtusifolium* no modelo de queimadura superficial. Entretanto, a McLTP1 0,5% manteve-se mais efetiva em cicatrizar as queimaduras nos 9º, 12º e 14º dias, resultando em fechamento total de todas as feridas avaliadas nesse grupo.

Diante desses achados, o 3º dia foi escolhido para avaliar a resposta inflamatória, visto que a partir dele já houve diferença entre os grupos McLTP1 e os controles negativo e positivo. O 7º dia foi determinado para avaliar a resposta de transição da fase inflamatória para a fase de cicatrização, uma vez que a partir deste tempo já se observa uma tendência dos grupos de igualarem, com exceção do grupo McLTP1. O 14º dia, último período de análise, foi determinado a fim de se avaliar a regeneração completa do epitélio dos animais, uma vez que neste período o grupo McLTP1 foi capaz de fechar todas as feridas. A partir da definição desses períodos, seguiram-se as demais avaliações.

A avaliação histológica das feridas foi realizada no 3º dia e mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos. Por mais que a McLTP1 tenha reduzido a presença de infiltrado inflamatório, todas as lâminas apresentavam áreas de úlceras, demonstradas nas fotomicrografias, o que, possivelmente, elevou os escores atribuídos. Resultados semelhantes foram observados nesse mesmo período em outro estudo que utilizou o óleo de Argan para tratar queimaduras (Avsar et al., 2016).

Nesse estudo também foram constatadas alterações morfológicas induzidas pela queimadura na epiderme e na derme, com adelgaçamento destas estruturas associado à presença de edema e hiperemia no 3º dia, em acordo com outros achados da literatura (Avsar et al., 2016).

Ao 7º dia, o infiltrado inflamatório no grupo Sham permaneceu intenso, entretanto foi possível observar a presença de fibroblastos e fibrócitos, o que poderia indicar o início do processo de transição para o reparo da ferida. O tratamento com

Sulfadiazina de prata 1% e *McLTP1* 0,5% proporcionou a diminuição dos escores, devido à redução da presença de infiltrado inflamatório e início de fechamento da úlcera, provavelmente relacionado ao aumento do número de fibroblastos e fibrócitos. Entretanto, de maneira a avaliar as fotomicrografias qualitativamente, observou-se que as alterações de adelgaçamento da epiderme e derme induzidas pela queimadura foram parcialmente revertidas pela *McLTP1* 0,5% enquanto o grupo Sulfa 1% manteve o padrão de afinamento da pele.

No último período de avaliação, a mensuração da espessura do epitélio mostrou que a *McLTP1* 0,5% promoveu o fechamento da ferida com um epitélio de maior espessura, onde foi possível observar em algumas áreas a formação das papilas epidérmicas e queratinização. De fato, como demonstrado na macroscopia, essa mesma concentração promoveu o fechamento de todas as lesões. Ademais, também promoveu cicatrização com a formação de um epitélio mais robusto.

A fim de corroborar os achados macroscópicos e histológicos, foram realizadas dosagens de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento como a dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), ELISA para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, VEGF e TGF- β , e imuno-histoquímica para TNF- α e FGF.

A MPO é um marcador indireto da presença de neutrófilos e dos níveis de citocinas inflamatórias. No 3º dia após a queimadura observou-se um aumento significativo da atividade da MPO, estando de acordo com achados de Toklu et al., (2007) que dosaram a atividade desta enzima em modelo de queimadura induzida em ratos. Apenas os tratamentos com Sulfadiazina de prata a 1% e *McLTP1* 0,5% preveniram o aumento da atividade desta enzima. Do Carmo et al. (2022) observaram que a *McLTP1* também reduziu a atividade de MPO em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Da mesma forma, a queimadura foi responsável por aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Somente a *McLTP1* foi capaz de prevenir o aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-6. A sulfadiazina de prata 1% reduziu os níveis de TNF- α e IL-6. Quanto aos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, estes se mostraram reduzidos no modelo de queimadura, e a *McLTP1* foi o único tratamento capaz de aumentar a presença de IL-10.

De fato, neutrófilos são as células inflamatórias mais abundantes nas primeiras 48 horas após o trauma térmico (Olson; Ley, 2002). Além dessas células,

monócitos e macrófagos também migram para o local da lesão, e assim passam a produzir citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que estimulam a proliferação de mais células inflamatórias e a angiogênese mediada por VEGF (Qing et al., 2017). Baixos níveis de IL-10 observados no grupo Sham podem estar relacionados à presença importante de macrófagos M1 que induzem a diferenciação linfocitária para a linhagem Th1, a qual é caracterizada por amplificar a resposta inflamatória aguda, favorecendo o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Rodriguez-Prados et al., 2010). O aumento de IL-10 induzido pela *McLTP1* 0,5% no período de 3 dias corrobora seu efeito anti-inflamatório, uma vez que esta citocina é responsável por prevenir a resposta inflamatória excessiva que antecede a reparação de uma lesão (Kubo et al., 2014). Estudos com a *McLTP1* em outros modelos inflamatórios, como de úlcera péptica também demonstraram diminuição de IL-10 após uso desta proteína (Nogueira et al., 2022).

A fim de complementar os resultados encontrados nas dosagens por ELISA, realizou-se a marcação imuno-histoquímica para TNF- α no 3º. Estudos demonstram a participação de TNF- α na fase inicial da queimadura, desenvolvendo um papel importante na estimulação de células inflamatórias e promovendo vasodilatação por estimulação endotelial via VEGF (Ravat et al., 2011; Kubo et al., 2014; Nielson et al., 2017; Qing et al., 2017). Neste estudo, foi observado um aumento das imunomarcações no grupo Sham, condizente com o aumento desta citocina no ELISA e da presença de infiltrado inflamatório na região. A sulfadiazina de prata 1% e a *McLTP1* reduziram essas marcações, tendo a *McLTP1* promovido uma redução mais significativa, o que demonstra o importante potencial anti-inflamatório desta proteína.

Fatores de crescimento como o VEGF e o TGF- β são importantes, uma vez que a revascularização e o recrutamento de fibroblastos são etapas chave para o processo de reparação (Fadini et al., 2008; Yoshida et al., 2012). No que concerne à angiogênese, esta foi inicialmente avaliada macroscopicamente pela observação da parte interna da pele do dorso, onde reparou-se um padrão diferente de angiogênese entre os grupos nos três períodos de avaliação do estudo. Diante disso, a presença de VEGF foi avaliada por ELISA nos 3º, 7º e 14º dias. Interessantemente, a proteína *McLTP1* modulou a presença deste fator de crescimento a partir do 3º dia. Ambas as concentrações diminuíram os níveis de VEGF no 3º dia. Estudos mostram o aumento

de VEGF em modelos de queimadura a partir do 3º dia, contribuindo para as mudanças no endotélio que culminam em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Kubo et al., 2014). Então, a diminuição dos níveis de VEGF após tratamento com a *McLTP1* no 3º dia corrobora o efeito anti-inflamatório observado previamente. Ademais, a inibição dos sinais vasculares da inflamação pode contribuir para a redução da quimiotaxia de células inflamatórias, bem como do edema e da vermelhidão (Yucel-Lindberg; Bage 2013).

Em conjunto, a dosagem de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF por ELISA e a imuno-histoquímica para TNF- α no 3º dia demonstraram que, por mais que haja a presença da úlcera aberta em todos os grupos avaliados neste período, o tratamento com a *McLTP1* já está sendo capaz de modular a atividade celular desde esse período, resultando em diminuição dos parâmetros iniciais da inflamação. Entretanto, sabe-se que a resposta inflamatória antecede a etapa de reparação, sendo importante para a ocorrência da cicatrização (Schwacha, 2003; Vaughn; Beckel, 2012). Portanto, avaliar o perfil de cicatrização de queimaduras promovido pela *McLTP1* nos 7º e 14º dias responderia se esse efeito anti-inflamatório interferiria de maneira importante no processo de fechamento das lesões. Por isso, avaliou-se a presença de VEGF, bem como de fatores de crescimento para fibroblastos, como TGF- β por ELISA e imuno-histoquímica para FGF nesses dois períodos.

Ao 7º e 14º dias, a *McLTP1*, em ambas as concentrações, aumentou os níveis de VEGF, demonstrando sua ajuda no processo de reparação ao induzir angiogênese. De fato, as fotografias da parte interna da pele do dorso demonstram maior formação de vasos sanguíneos nos animais tratados com a proteína. Kubo et al., (2014), observaram que a presença de VEGF de fato aumentava no decorrer da cicatrização da queimadura sem interferência de nenhum tratamento. Potencializar a atividade desse fator de crescimento, como observado após tratamento com a *McLTP1*, pode sugerir que esta proteína tem um efeito cicatrizante importante. A literatura demonstra que outras abordagens terapêuticas utilizadas em modelo de queimadura superficial também foram efetivas em suprarregular VEGF e promover uma reparação mais efetiva, como os hidrogéis a base de polissacarídeos (Wang et

al., 2021), um polissacarídeo isolado das raízes de *Sanguisorba officinalis* (Zhang et al., 2018) e extrato da casca de romã (Zhang et al., 2022). Este último foi avaliado em queimaduras de segundo grau em porcos e demonstrou um aumento de VEGF após 7, 14 e 28 dias.

O TGF- β é responsável pela maturação de fibroblastos, células importantes no processo de síntese de colágeno, e, portanto, cicatrização de feridas (Mokoena et al., 2018). No 7º dia, a *McLTP*₁ 0,5% foi mais efetiva em aumentar a presença de TGF- β quando comparada a todos os grupos. Já após 14 dias, observou-se a redução significativa deste fator de crescimento no grupo tratado com a maior concentração da proteína. Kubo et al., (2014) demonstraram que os níveis de TGF- β aumentam no 7º dia e diminuem ao 14º dia após a indução da queimadura em animais. Entretanto, o tratamento com a *McLTP*₁ promoveu um pico seguido da infra-regulação de TGF- β em relação ao controle ao final do protocolo experimental. O aumento após sete dias pode estar relacionado à aceleração da cicatrização, em relação aos demais grupos. Ademais, a produção demasiada de TGF- β pode causar hipertrofia cicatricial e queloides, resultando em cicatrizes malformadas. Portanto, o controle dos níveis deste mediador se faz importante para o processo de reparação (Mokoena et al., 2018). Observou-se que ao final do protocolo, a *McLTP*₁ promoveu boa cicatrização e neoformação epitelial, sem presença de cicatrizes hipertróficas. Esse resultado pode ter sido conseguido pelo potencial em controlar o aumento exacerbado de TGF- β após 14 dias.

O FGF é um mediador quimiotático e mitogênico não apenas para fibroblastos, mas também para células endoteliais e mesenquimais, que propiciam angiogênese. Além disso, estimula a contração da ferida, reepitelização e produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanas (Qing et al., 2017). Estudos mostram a participação de FGF na reparação de queimaduras, onde o uso de compostos como o ginsenosídeo Rb1 (*Panax ginseng*) e do fator recombinante para FGF-2 promoveram rápida cicatrização de queimaduras de segundo e terceiro grau, respectivamente, por atuarem estimulando a produção de FGF (Tran-Nguyen et al., 2020; Zhang et al., 2021). Este estudo demonstrou que a *McLTP*₁ aumentou a expressão de FGF no 7º dia, fase inicial da cicatrização, condizente com o aumento de TGF- β nesse mesmo período. Ao 14º dia, as marcações não apresentaram diferenças entre os grupos, mas, como já mencionado anteriormente, todas as feridas do grupo *McLTP*₁ estavam fechadas e a mensuração histológica do epitélio foi

significativamente maior neste grupo. Sugere-se que a modulação celular mais intensa tenha ocorrido por volta do 7º dia. Vale ressaltar também que o tratamento com a *McLTP*₁ resultou em uma reepitelização de maior qualidade, confirmada pela mensuração do epitélio mais espesso no 14º dia.

Adicionalmente, este estudo analisou o perfil de estresse oxidativo, uma vez que a relação bidirecional entre a resposta inflamatória aguda mediada pela presença de neutrófilos e o aumento do dano oxidativo celular e tecidual (Ward; Till, 1990; Schwacha, 2003). Estudos já relataram que a trauma da queimadura é consequência tanto da ativação de citocinas pró-inflamatórias bem como pela alta liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mileski et al., 1992; Hansbrough et al., 1996; Toklu et al., 2007). Além disso, também foi relatado um aumento da peroxidação lipídica, um mecanismo autocatalítico que leva a destruição das membranas celulares, após a queimadura (Demling; Lalonde, 1990; Sandre et al., 2006). Por isso, avaliar a resposta do tratamento de queimaduras com a *McLTP*₁ é de suma importância, uma vez que as EROs estão envolvidas na patogênese da lesão.

Como o aumento do estresse oxidativo é um processo dependente da inflamação, este parâmetro também foi avaliado no 3º dia. Para se obter uma quantificação do grau de peroxidação lipídica, a dosagem do malondialdeído, um importante marcador deste parâmetro, foi realizada (Sener et al., 2005; Toklu et al., 2006; 2007). A queimadura aumentou, como esperado, os níveis de MDA, enquanto a *McLTP*₁ os reduziu, demonstrando um controle do estresse oxidativo. De fato, um estudo prévio demonstrou que a *McLTP*₁ reduziu a peroxidação lipídica ao diminuir os níveis de MDA em modelo de ligadura do piloro (Nogueira et al., 2022).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), sob influência de mediadores inflamatórios e desempenha um papel na vasodilatação. Seus metabólitos diretos são o nitrito (NO₂) e o nitrato (NO₃), os quais são quantificados pela reação de Griess. Um aumento da conversão em NO₂ e NO₃ indica a suprarregulação de NO (Hibbs et al., 1987; Good et al., 1996; Preiser et al., 1996). Estudos mostram que o NO também desempenha um papel importante no aumento do estresse oxidativo, uma vez que, ao reagir com radicais superóxidos, libera peroxinitritos que intensificam a lesão (Parihar et al., 2008). De fato, a queimadura aumentou a quantidade de NO₂/NO₃ no grupo Sham, tendo a *McLTP*₁ em sua maior concentração, prevenido esse aumento. Esses achados corroboram os

resultados prévios demonstrados neste trabalho acerca da avaliação da presença de MDA.

Ademais, a fim de se avaliar a resposta anti-oxidante da *McLTP₁*, mensurou-se a quantidade de glutathiona reduzida (GSH). A GSH é um tripeptídeo responsável pela proteção celular e tecidual à ação dos EROs. Concentrações intracelulares de GSH é que definem a extensão do dano após a queimadura (Sener et al., 2005; Tunali et al., 2005; Toklu et al., 2007). Diante disso, sugere-se que o aumento dos níveis desse aminoácido pode ser importante para diminuir os efeitos deletérios da queimadura. Este estudo demonstrou que os grupos Sham e Sulfa 1% apresentaram níveis extremamente baixos de GSH, o que seria esperado uma vez que o aumento da peroxidação lipídica (altos níveis de MDA) não favorece a resposta anti-oxidante (Toklu et al., 2007). Entretanto a *McLTP₁* promoveu um aumento da atividade da GSH, o que pode demonstrar sua capacidade em reverter os danos causados pela queimadura. Nogueira et al., (2022) também observaram que esta proteína modulou o estresse oxidativo.

Destaca-se ainda o efeito antinociceptivo previamente demonstrado pela *McLTP₁* (Campos et al., 2016). Adicionalmente, o tratamento com esta proteína poderia, além de acelerar a cicatrização, promover maior conforto frente à resposta dolorosa induzida pela queimadura. Levanta-se a necessidade de realizar estudo que avaliem a resposta antinociceptiva dos animais em modelo de queimadura superficial.

Em suma, a *McLTP₁* demonstrou ótima resposta cicatricial em estimular a contração das feridas e promover fechamento total das feridas no grupo tratado com a concentração de 0,5%. Esses achados se confirmaram pela avaliação histológica por escores e pela mensuração do epitélio, onde a *McLTP₁* 0,5% diminuiu o infiltrado inflamatório e promoveu maior reepitelização. Sugere-se que esses efeitos tenham sido mediados pelo controle da resposta inflamatória, bem como pela supra-regulação de fatores de crescimento, avaliados pela dosagem de MPO, ELISA e marcação imuno-histoquímica. Adicionalmente, esses efeitos parecem ter sido otimizados pela sua ação anti-oxidante.

7 CONCLUSÃO

A proteína transferidora de lipídios isolada das sementes de Noni (*McLTP₁*) demonstrou potencial cicatrizante em modelo experimental de queimadura superficial em camundongos pela modulação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo, e aceleração do reparo tecidual. Sugere-se que a *McLTP₁* pode representar uma abordagem farmacêutica interessante para o tratamento de queimaduras

8 REFERÊNCIAS

- ACHAUER, B. M.; VANDERKAM, V. M.; CELIKOZ, B.; JACOBSON, D. G. Augmentation of facial soft-tissue defects with Alloderm dermal graft. **Ann Plast Surg**. v. 41, n. 5, p. 503-507, 1998.
- ALVES-FILHO J. C.; FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F. Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**. v. 34, n. 2, p. 461-470, 2006.
- ANSELL, D. M.; IZETA, A. Pericytes in wound healing: friend or foe? **Exp Dermatol**. v. 24, n. 11, p. 833-844, 2015.
- ARDA, O.; KSÜGÜR G. N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin Dermatol**. v. 32, n. 1, p. 3-13, 2014.
- ASERO, R. *et al.* Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion. **International Archives Of Allergy And Immunology**, Milan, v. 122, n. 1, p.20-32, 2000.
- AVSAR, U.; HALICI, Z.; AKPINAR, E.; YAYLA, M.; AVSAR, U.; HARUN, U.; TARIK, A. H.; BAYRASTUTAN, Z. The effects of Argan Oil in second-degree burn wound healing in rats. **Ostomy Wound Manage**. v. 62, n. 3, p. 26-34, 2016.
- AZIZ, Z.; ABDUL, B.; HASSAN, R. The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials. **Burns**. v. 43, n. 1, p. 50-57, 2017.
- AZOFRA, J.; BERROA, F.; GASTAMINZA, G.; SAIZ, N.; GAMBOA, P. M.; VELA, C.; GARCÍA, B. E.; LIZARZA, S.; ECHENAGUSIA, M. A.; JORAL, A.; AZANZABAL, M. A.; QUIÑONES, M. D.; JAUREGUI, I.; MADERA, J. F.; NAVARRO, J. A. LIZASO, M. T.; BERNARD, A.; GOIKOETXEA, M. J. Lipid Transfer Protein Syndrome in a Non-Mediterranean Area. **International Archives Of Allergy And Immunology**, Navarra, v. 169, n. 3, p.181-188, 2016.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plant and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Arch Dermatol Res**. v. 306, n. 7, p. 601-617, 2014.
- BAO-NING, S. U.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H.; KELLER, W. J.; MCLAUGHLIN J.; KINGHORN D. A. Chemical constituents of the fruits of morinda citrifolia (noni) and their antioxidant activity. **J Nat Prod**. v. 68, n. 4, p. 592-595, 2005.
- BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. **Cell**. v. 128, n. 3, p. 445-458, 2007.
- BOHR, S.; PATEL, S. J.; SHEN, K.; VITALO, A. G.; BRINES, M.; CERAMI, A.; BERTHIAUME, F.; YAMUSH, M. Alternative erythropoietin-mediated signaling prevents secondary microvascular thrombosis and inflammation within cutaneous burns. **Prof Natl Acad Sci**. v. 110, n. 9, p. 3513-3518, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Cartilha para tratamento de emergências das queimaduras**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: pesquisa.bvsalud.org/bvsms/resource/pt/mis-3572. Acesso em: 13 jan. 2022.

CAMPOS, D. C.O.; COSTA, A. S. ; LIMA, A. D.R. ; SILVA, F. D.A. ; LOBO, M. D.P. ; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. ; MOREIRA, R. A. ; LEAL, L. K.A.M. ; MIRON, D.; VASCONCELOS, I. M. ; OLIVEIRA, H. D. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 71-79, 2016.

CAMPOS, D. C.O.; COSTA, A. S.; LUZ, P. B.; SOARES, P. M.G. ; ALENCAR, N. M.N.; OLIVEIRA, H. D. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1121-1129, 2017.

CERQUEIRA, M. T.; PIRRACO, R. P.; MARQUES, A. P. Stem cells in skin wound healing: are we there yet? **Adv Wound Care**. v. 5, n. 4, p. 164-175, 2016.

CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O. WINSTON, B.; LINDSAY, R. Burn wound infections. **Clin Microbiol Rev**. v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006.

CLARK, R. F. A. Fibrin is a many splendored thing. **J Invest Dermatol**. v. 121, n. 5, p. 21-22, 2003.

COLOHAN, S. M. Predicting prognosis in thermal burns with associated inhalational injury: a systematic review of prognostic factors in adult burn victims. **J Burn Care Res**. v. 31, n. 4, p. 529-39, 2010.

CORREIA, A.A.S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.4, p.609-615, 2011.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P, R. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**. v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.

DAVIES, L. C.; ROSAS, M.; JENKINS, S. J.; LIAL, C. T.; SCURR, M. J.; BROMBACHER, F.; FRASER, D.; ALLEN, J. E.; JONES, S. A.; TAYLOR, P. R. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nat Commun**. v. 4, n. 1886, p. 1251-1256, 2013.

DE FIGUEIRERO, I. S. T.; RAMOS, M. V.; SILVA, N. M. P.; GONZAGA, M. L. C.; PINHEIRO, R. S. P.; ALENCAR, N. M. N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 512-519, 2014.

DEEKEN, R. et al. The Nonspecific Lipid Transfer Protein AtLtp1-4 Is Involved in Suberin Formation of *Arabidopsis thaliana* Crown Galls. **Plant Physiology**, Halle, v. 172, n. 3, p.1911-1927, 2016.

DEMLING, R. H.; LALONDE, C. Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period. **J Trauma**. v. 30, n.1, p. 69-74, 1990.

DEVI, M.; POORNIMA, V. Wound healing in second-degree burns in rats treated with silver sulfadiazine: a systematic review and meta-analysis. **J Wound Care**. v. 31, n. 4, 2022.

DO CARMO, L. D.; RANGEL, G. F. P.; RABELO, L. M. A.; SOUZA, T. G. G.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; WONG, D. V. T. ; LEITÃO, R. C.; DA SILVA, A. A. V.; MAGALHÃES, P. J. C.; COSTA, A. S. ; CAMPOS, D. C. O ; DE ALENCAR, N. M. N; DE OLIVEIRA, H. D. Therapeutic effects of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. (noni) seeds on irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 00, p. 0001, 2022.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In: [s.l: s.n.]. p. 421–431, 1990.

FADINI, G. P.; BAESSO, I.; ALBIERO, M.; SARTORE, S.; AGOSTINI, C.; AVOGARO, A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. **Atherosclerosis**. v. 197, n. 2, p. 496-503, 2008.

FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R.; ABBASABADI, Z.; ABDOLLAHI, M. An evidence based review on medicinal plants used for treatment of peptic ulcer in traditional Iranian medicine. **In J Pharmacol**. v. 9, n. 2, p. 108-124, 2013.

FOX, A.; SMYTHE, J.; FISHER, N.; TYLER, M. P. H.; MCGROUTHER, D. A.; WATT, S. M.; HARRIS, A. L. Mobilization of endothelial progenitor cells into the circulation on burned patients. **Bra J Surg**. v. 95, n. 2, p. 244-51, 2008.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **J Cell Biol**. v. 180, n. 2, p. 273-284, 2008.

FUCHS, E. **Finding one's niche in the skin**. **Cell Stem Cell**. v. 5, n. 4, p. 499-502, 2009.

FUJIMI, S. *et al.* Murine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. **J Leuk Biol**, v. 85, 2009.

GERMOSÉN-ROBINEAU, L. **Hacia una farmacopea caribeña**. Santo Domingo: Tramil 7. 1995. 696 p.

GHIEH, F.; JURJUS, R.; IBRAHIM, A.; GEAGEA, A. G.; HISHAM, D.; BABA, B. E.; CHAMS, S.; MATAR, M.; ZEIN, W.; JURJUS, A. The use of stem cells in

burn wound healing: a review. **Biomed Mater.** v. 2015, n. 684084, 2015.

GRECO JÚNIOR, J. B.; MOSCOZO, M. V. A.; LOPES FILHO, A. L.; MENEZES, C. M. G.; TAVARES, F. M.O.; OLIVEIRA, G. M.; GAMA JÚNIOR, W. N. Tratamento de pacientes queimados internados em hospital geral. **Rev Soc Bras Cirur Plast.** v. 22, n.4, p.228-232, 2007.

GREEN L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131–138, 1982.

GOOD, P. F.; WERNER, P.; HSU, A.; OLANOW, C. W.; PERL, D. P. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. **Am J Pathol.** v. 149, n. 1, p. 21-28, 1996.

HAMPSON, P.; DINSDALE, R. J.; WEARN, C. M.; BAMFORD, A. L.; BISHOP, J. R. B.; HAZELDINE, J.; MOIEMEN, N. S.; HARRISON, P.; LORD, J. M. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes and cell-free: a prospective observational cohort study. **Ann Surg.** v. 265, n. 6, p. 1241-1249, 2017.

HANSBROUGH, J. F.; WIKSTROM, T.; BRAIDE, M.; TENENHAUS, M.; RENNEKAMPFF, O. H.; KIESSIG, V.; BJURSTEN, L. M. Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. **J Surg Res.** v. 61, n. 1, p. 17-22, 1996.

HASSANZADEH, G.; HAJMANOUCHEHRI, F.; BEHESHTI, A.; HASSANZADEH, N.; SHAFIGH, N.; BARZROUDIPOUR, M. B.; CHOOBINEH, H. Comparing effects of silver sulfadiazine, sulcrafate and brassica oleracea extract on burn wound healing. **Life Sci J.** v. 10, n. 6s, p. 852-861, 2013.

HERMANS, M. H. E. A general overview of burn care. **Int Wound.** v. 2, n. 3, p. 206-220, 2005.

HIBBS, J. B. J.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science.** v. 234, n. 4787, p. 473-476, 1987.

HORSFALL, A. U.; OLABIYI, O.; AIYEGBUSI, A.; NORONHA, C. C.; OKANLANWAON, A. O. Morinda citrifolia fruit juice augments insulin action in Sprague-Dawley rats with experimentally induced diabetes. **Nig Q J Hosp Med.** v. 18, n. 3, p. 162-165, 2008.

HORTON, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. **Toxicology.** v. 189, n. 1-2, p. 75-88, 2003.

HUSSAIN, A.; DUNN, K. W. Predicting length of stay in thermal burns: a systematic review of prognostic factors. **Burns.** v. 39, n. 7, p. 1331-1340, 2013.

INFANGER, M.; SHMIDT, O.; KOSSMEHL, P.; GRAD, S.; ERTEL, W.; GRIMM, D. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. **Burns,** v. 30, n. 4, p. 305–311, 2004.

JASKILLE, A. D.; RAMELLA-ROMAN, J. C.; SHUPP, J. W.; JORDAN, M. H.; JENG, J. C. Critical review of burn depth assessment techniques: part II. Review of laser doppler technology. **J Burn Care Res.** v. 31, n. 1, p. 151-157, 2010.

JANG, J. K.; LEE, O. S.; KANG, T. J.; LIM, S. C. Wound healing effect of cuttlebone extract in burn injury of rat. **Food Sci Biotechnol**, v. 22, n. S, p. 99–105, 2013.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777p.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; HARADA, S.; MURAKAMI, R.; TOKUYAMA, S.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biol Pharm Bull.** v. 31, n. 5, p. 935-938, 2008.

KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. **Am J Pathol.** v. 185, n. 6, p. 1518-1527, 2015.

KOTTNER, J.; CUDDIGAN, J.; CARVILLE, K.; BALZER, K.; BERLOWITZ, D.; LAW, S.; LITCHFORD, M.; MTCELL, P.; MOORE, Z.; PITTMAN, J.; SIGAUDO-ROUSSEL, D.; YEE, C. Y.; HAESLER, E. Pressure ulcer/injury classification today: an international perspective. **J Tissue Viability.** v. 29, n.3, p. 197-203, 2020.

KIRN, D. S.; LUCE, E. A. Early excision and grafting versus conservative management of burns in the elderly. **Plast Reconstr.** v. 102, n. 4, p. 1013-1017, 1998.

KUBO, H.; HAYASHI, T.; KAZUTOSHI, A.; MIHOKO, A.; KANEKURA, T.; MAMORU OGATA. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. **Legal Medicine.** v. 16, n.1, p. 8-13, 2014.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing – exploring medicinal plants of India. **J Ethnopharmacol.** v. 114, n. 2, p. 103-113, 2007.

LIMA-JÚNIOR, E. M.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B.; RIBEIRO, W., L.L C.; NUNES, A. P. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES-FILHO, M. O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras.** v.16, n.1, p.10-17.

LIM, S. L.; GOH, Y. M.; NOORDIN, M. M.; RAHMAN, H. S.; OTHMAN, H. H.; BAKAR, N. A. A.; MOHAMED, S. *Morinda citrifolia* edible leaf extract enhanced immune response against lung cancer. **Food Funct.** v. 7, n. 2, p. 741-751, 2016.

LIU, C.; YUHUI, H.; HUANG, J.; LI, H.; ZHANGYOU, Y.; YIPING, Z.; LIU, J.; LI, R. Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice. **Exp Dermatol.** v. 26, n. 2, p. 186-193, 2017.

LORENTI, A. Wound healing: from epidermis culture to tissue engineering. **Cell Bio.** v. 1, n. 2, p. 17-29, 2012.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science.** v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 69, n. 70, p. 81-102, 2014.

MILESKI, W.; BORGSTROM, D.; LIGHTFOOT, E.; ROTHLEIN, R.; FAANES, R.; BAXTER, C. Inhibition of leukocyte-endothelial adherence following thermal injury. **J Surg Res.** v. 52, n. 2, p. 334-339, 1992.

MOKOENA, D.; KUMAR, S. S. D.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. **J Photochem Photobiol, B: Biology,** v. 189, p. 138-144, 2018.

MURATA, K.; ABE, Y.; FUTAMURA-MASUDAA, M.; UWAYA, A.; ISAMI, F.; MATSUDA, H. Activation of cell-mediated immunity by *Morinda citrifolia* fruit extract and its constituents. **Nat Prod Commun.** v. 9, n. 4, p. 445-450, 2014.

NAYAK, B.S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. **Evid based complement alternat med.** v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G.; ADOGWA, A. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2011, n. 875293, p. 611-616, 2011.

NEELY, A. N.; GARDNER, J.; DURKEE, P.; WARDEN, G. D.; GREENHALGH, D. G.; GALLAGHER, J. J.; HERNDON, D. N.; TOMPKINS, R. G.; KAGAN, R. J. Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics? **J Burn Care Res.** v. 30, n. 1, p. 19-29, 2009.

NEJATI, R.; KOVACIC, D.; SLOMINSKI, A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: An overview. **Expert Rev Dermatol.** v. 8, n. 6, p. 581-583, 2013.

NERURKAR, P.; NISHIOKA, A.; ECK, P. O.; JOHNS, L. S.; ESTHER, V.; NERURKAR, V. R. Regulation of glucose metabolism via hepatic forkhead transcription factor 1 (FoxO1) by *Morinda citrifolia* (noni) in high-fat diet-induced obese mice. **Br J Nutr.** v. 108, n. 2, p. 218-228, 2012.

NIELSON, C. B.; DUETHMAN, N. C.; HOWARD, J. M.; MONCURE, M.; WOOD, J. G. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. **J Burn Care Res.** v. 38, n. 1, p. 469-481, 2017.

NOGUEIRA, F. C.; COSTA, A. S.; CAMPOS, D. O. C.; SILVA, R. G. G.; FRANCO, A. X.; SOARES, P. M. G.; ROCHA, R. O. R.; DAMASCENO, R. O. S.; DE ALENCAR, N. M. N.; DE SOUZA, M. H. L. P.; DE OLIVEIRA, H. D. Peptide

Isolated from Noni Seeds Confers Gastroprotective Effect by Improving Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **International Journal Of Peptide Research And Therapeutics**, v. 28, p. 131-9, 2022.

NUCHTERN, J. G.; ENGRAV, L. H.; NAKAMURA, D. Y.; DUTCHER, K. A.; HEIMBACH, N. B.; VEDDER, N. B. Treatment of fourth-degree hand burns. **J Burn Care Rehabil.** v. 16, n. 1, p. 36-42, 1995.

OLSON, T.; LEY, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 283, n. 1, p. 7-28, 2002.

OLSZEWSKI, W. L.; JAMAL, S.; MANOKARAN, G.; PANI, S.; KUMARASWAMI, V.; KUBICKA, U.; LUKOMSKA, B.; TRIPATHI, F. M.; SWOBODA, E.; MEISEL-MIKOLAJCZYK, F.; STELMACH, S.; ZALESKA, M. Bacteriological studies of blood, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with acute dermatolymphangioadenitis (DLA) in course of 'filarial' lymphedema. **Acta Trop.** v. 73, n.3, p. 217-224, 1999.

ONG, Y. S.; SAMUEL, M.; SONG, C. Meta-analysis of early excision of burns. **Burns.** v. 32, n. 2, p. 145-150, 2006.

ORYAN, D. V. M.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **J Wound Care.** V. 26, n. 1, p. 5-19, 2017.

PALACKIC, A.; JAY, J. W.; DUGGAN, R. P.; BRANSKI, L. K.; WOLF, S. E.; ANSARI, E. I.; AYADI, A. Therapeutic Strategies to Reduce Burn Wound Conversion. **Medicina (Kaunas).** v. 58, n. 7, p. 922-930, 2022.

PARIHAR, A.; PARIHAR, M. S.; MILNER, S.; BHAT, S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns.** v. 34, n. 1, p. 6-17, 2008.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg.** v. 187, n. 5A, p. 11-16, 2004.

PARK, J. Y.; KWAK, J. H.; KANG, K. S.; JUNG, E. B.; LEE, D. S.; LEE, S.; JUNG, Y.; KIM, K. H.; HWANG, G. S.; LEE, H. L.; YAMABE, N.; KIM, S. N. Wound healing effects of deoxyshikonin isolated from Jawoongo: In vitro band in vivo studies. **J Ethnopharmacol,** v. 199, p. 128–137, 2017.

PARRETT, B. M.; POMAHAC, B.; DEMLING, R. H.; ORGILL, D. P. Fourth-degree burns to the lower extremity exposed tendon and bone: a ten-year experience. **J Burn Care Res.** v. 27, n. 1, p. 34-39, 2006.

POTERATT, O.; HAMBURGER, M. Morinda citrifolia (Noni) fruit-phytochemistry, pharmacology, safety. **Planta Med.** v. 73, n. 3, p. 191-199, 2007.

POZZI, A.; YURCHENCO, P. D.; IOZZO, R. V. The nature and biology of basement membranes. **Matrix Biol.** v. 58, p. 1-11, 2017.

PREISER, J. C.; REPER, R.; VLASSELAER, D.; VRAY, B.; ZHANG, H.; VANDERKELEN, A.; VINCENT, J. L. Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. **J Trauma**. v. 40, n. 3, p. 368-371, 1996.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **J Traumatol**. v. 20, n. 4, p. 189-193, 2017.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. Herbal medicines for the management of irritable bowel syndrome: a comprehensive review. **World J Gastroenterol**. v. 18, n. 7, p. 580-600, 2012.

RASHAAN, Z. M.; KRIJNEN, P.; KLAMER, R. R. M.; SCHIPPER, I. B.; DEKKERS, O. M.; BREEDERVELD, R. S. Nonsilver treatment vs silver sulfadiazine in treatment of partial-thickness burn wounds in children: a systematic review and meta-analysis. **Wound Repair Regen**. v. 22, n. 4, p. 473-482, 2014.

RAVAT F.; PAYRE, J.; PESLAGES, P.; FONTAINE, M.; SENS, N. Burn: an inflammatory process. **Pathol Biol (Paris)**. v. 59, n. 3, p. 63-72, 2011.

RNJAK, J.; WISE, S. G.; MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Severe burns injuries and the role of elastin in the design of dental substitutes. **Tissue Eng Part B Rev**. v. 17, n. 2, p. 81-91, 2011.

ROWAN, M. P.; CANCIO, L. C.; BURMEISTER, D. M.; ROSE, L. F.; NATESAN, S.; CHAN, R. K.; CHRISTY, R. J.; CHUNG, K. K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Crit Care**. v. 12, p. 1-12, 2015.

RODRIGUEZ-PRADOS, J. C.; TRAVÉS, P. G.; CUENCA, J.; RICO, D.; ARAGONÉS, J.; MARTÍN-SANZ, P.; CASCANTE, M.; BOSCA, L. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. **J Immunol**. v. 185, n.1, p. 605-614, 2010.

ROSA, Z.; LIMA, T. H. Epidemiological profile of patients victims of burns. **Braz J of Health Rev**, v.4, n.5, p.19832-19853, 2021.

SAAIQ, M.; ZAIB, S.; AHMAD, S. Early excision and grafting versus delayed excision and grafting of deep thermal burns up to 40% total body surface area: a comparison of outcome. **Ann Burn Fire Disasters**. v. 30, n. 25, p. 143-147, 2012.

SAKALLIOGLU, E. A.; BASARAN, O.; OZDEMIR, B. H.; ARAT, Z.; YUCEL, M.; HABERAL, M. Local and systemic related to serum transforming growth factor- β levels in burn wound various depths. **Burns**. v. 32, n. 8, p. 980-985, 2006.

SALMINEN, T. A.; BLOMQVIST, K.; EDQVIST, J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. **Planta**, Turku, v. 244, n. 5, p.971-997, 2016.

SANDRE, C.; AGAY, D.; VÉRONIQUE, D.; FAURE, H.; CRUZ, C.; ALONSO, A.; CHANCERELLE, Y.; RUSSEL, A. M. Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. **J Trauma**. v. 60, n. 3, p. 627-634, 2006.

SARRAZY, V.; MICALLEF, L.; COULOMB, B.; DESMOULIE, A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. **Wound Repair Regen.** v. 10, Suppl. 1, p. 10-15, 2011.

SCHWACHA, M. G. Macrophages and post-burn immune dysfunction. **Burns.** v. 29, n. 1, p. 1-14, 2003.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; CETINEL, S.; CONTUK, G.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. **Burns.** v. 31, n. 5, p. 587-596, 2005.

SEHIRLI, O.; SENER, E.; SENER, G.; CETINEL, S.; ERZIK, C.; YEGEN, B. C. Ghrelin improves burn-induced multiple organ injury by depressing neutrophil infiltration and the release of pro-inflammatory cytokines. **Peptides.** v. 29, n. 7, p. 1231-1240, 2008.

SHAHZAD, M. N.; AHMED, N. Effectiveness of Aloe Vera gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. **Burns.** v. 63, n. 2, p. 225-230, 2013.

SHPICHKA, A. BUTNARU, D.; BEZRUKOVA E. A.; SUKHANOV, R. B.; ANTHONY, A.; BURDUKOVSKII, V.; ZHANG, Y.; TIMASHEV, P. Skin tissue regeneration for burn injury. **Stem Cell Research and Therapy.** v. 10, n. 94, p. 1-16, 2019.

SINGER, A. J.; BOYSE, S. Burn wound healing and tissue engineering. **J Burn Care Res.** v. 38, n. 3, p. 605-613, 2017.

SINGH, Y.; IKAHIHIFO, T.; PANUVE, M.; SLATTER, C. Folk Medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicine for obstetric and gynecological conditions and disorders. **J Ethnopharm.** v. 12, n. 3, p. 305-325, 1984.

SOUZA, A. A.; COSTA, A. S.; CAMPOS, D. C.O.; BATISTA, A. H.M.; SALES, G. W.P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALVES, K. M. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; OLIVEIRA, H. D. Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie,** v. 149, p. 9-17, 2018.

SOUZA, T. F. G.; PIERDONÁ, T. M.; MACEDO, F. S.; AQUINO, P. E. A.; RANGEL, G. F. P.; DUARTE, R. S.; SILVA, L. M. A; VIANA, G. S. B.; ALVES, A. P. N. N.; MONTENEGRO, R. C.; WILKE, D. V.; SILVEIRA, E. R.; ALENCAR, N. M. N. A proline derivative-enriched methanol fraction from *Sideroxylon obtusifolium* leaves (MFSOL) stimulates human keratinocyte cells and exerts a healing effect in a burn wound model. **Braz J Med Biol Res.** v. 54, n. 9, 2021.

STRONG A. L.; NEUMEISTER, M. W.; LEVI, B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. **Clin Plast Surg.** v. 44, n. 3, p. 635-650. 2017.

TONDER, A. VAN; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC**

Research Notes, v. 8, p. 1-10, 2015.

TOKLU, H. Z.; SENER, G.; JAHOVIC, N.; USLU, B.; ARBAK, S.; YEGEN, B. C. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **Int Immunopharmacol.** v. 6, n. 2, p. 156-169, 2006.

TOKLU, H. Z.; TUNALI-AKBAY, T.; ERKANLI, G.; YUKSEL, M.; ERCAN, F.; SENER, G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. **Burns.** v. 33, n. 7, p. 908-916, 2007.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in wound healing studies of plants. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2011, n. 438056, 2011.

TIWARI, V. K. Burns wound: how it differs from other wounds? **Indian J Plast Surg.** v. 45, n. 2, p. 364-373, 2012.

TRAN-NGUYEN, T.; LE, K. NGUYEN, L. T.; TRAN, T. T.; HOANG-THAI, P.; TRAN, T. L.; TAN, S.; TRAN-VAN, H. Third-degree burn mouse treatment using recombinant human fibroblast growth factor 2. **Growth Factors.** v. 38, n. 5-6, p. 282-290, 2020.

TUNALI, T.; SENER, G.; YARAT, A.; EMEKLI, N. Melatonin reduces oxidative damage to skin and normalizes blood coagulation in a rat model of thermal injury. **Life Sci.** v. 76, n. 11, p. 1259-1265, 2005.

VAN DE WATER, L.; VARNEY, S. Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring and fibrosis: opportunities for new therapeutic intervention. **Adv Wound Care.** v. 2, n. 4, p. 122-141, 2013.

VAUGHN, L.; BECKEL, N. Severe burn injury, burn shock, and smoke inhalation injury in small animals. Part 1: burn classification and pathophysiology. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).** v. 22, n. 2, p. 179-186, 2012.

VINISH, M.; CUI, W.; STAFFORD, E.; BAE, L.; HAWKINS, H.; COX, R.; TOLIVER-KINSKY, T. Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing proliferation. **Wound Repair Regen.** v. 24, n. 1, p. 6-13, 2016.

WANG, J. H. C., THAMPATHY, B. P.; LIN, J. S.; IM, H. J. Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. **Gene.** v. 391, n. 1-2, p. 1-15, 2007.

WANG, X.; KIMBLE, R. M. A review on porcine burn and scar models and their relevance to humans. **Wound Practice and Research.** v. 18, n. 1, p. 41-49, 2010.

WANG, H.; LIU, Y.; CAI, K.; ZHANG, B.; TANG, S.; ZHANG, W.; LIU, W. Antibacterial polysaccharide-based hydrogel dressing containing plant essential oil for burn wound healing. **Burns Trauma.** v. 22, n. 9, 2021.

WARD, P. A.; TILL, G. O. Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. **J Trauma.** v. 30, s. 12, p. 75-79, 1990.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **J Invest Dermatol.** v. 127, n. 5, p. 998-1008, 2007.

WILGUS, T. A.; SASHEATI, R.; MCDANIEL, J. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Adv Wound Care (New Rochelle)**. v. 2, n. 7, p. 379-388, 2013.

WHISTLER, W. A. Tradicional and herbal medicine in the cook islands. **J Ethnopharm.** v. 13, n. 3, p. 239-280, 1985.

WOLFRAM, D.; TZANKOY, A.; PULZI, P. PIZA-KATZER, H. Hypertrophic scars and keloids – a review of their pathophysiology, risk factors and therapeutic management. **Dermatol Surg.** v. 35, n. 2, p. 171-181, 2009.

XIAO-WU, W.; HERDON, D. N.; SPIES, M.; SANFORD, A. P.; WOLF, S. E. Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children. **Arch Surg.** v. 137, n. 9, p. 1049-1054, 2002.

YANG, L.; CHAN, T.; DEMAREM J.; IWASHINA, T.; GHAHARY, A.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Healing of Burn Wounds in Transgenic Mice Overexpressing Transforming Growth Factor- β 1 in the Epidermis. **Amer J of Pathol**, v. 159, n. 6, 2001.

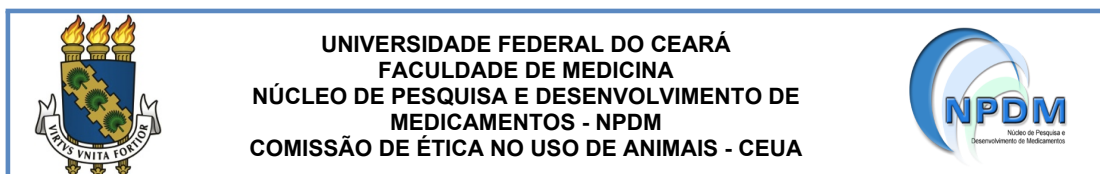
YOSHIDA, M.; OKUBO, N.; CHOSA, N.; HASEGAWA, T.; IBI, M.; KAMO, M.; KYAKUMOTO, S.; ISHISAKI, A. TGF- β -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. **Int J Biol Sci.** v. 8, n. 7, p. 1062-74, 2012.

ZHANG, H.; JUNJIE, C.; CEN. Y. Burn wound healing potential of a polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* L. in mice. **Int J Biol Macromol.** v. 112, p. 862-867, 2018.

ZHANG, L.; HU, Q.; JIN, H.; YANG, Y.; YANG. Y.; YANG, R.; SHEN, Z.; CHEN, P. Effects of ginsenoside Rb1 on second-degree burn wound healing and FGF-2/PDGF-BB/PDGFR- β pathway modulation. **Chin Med.** v. 16, n. 1, p. 1-14, 2021.

ZHANG, L.; YANG, R.; YANGYANG, H.; YANG, Y.; ZHANG, X.; HE, B.; SHEN. Z.; YANG, J.; CHEN, P. Promoting effect of pomegranate peel extract on second-degree burn wound-healing through VEGF-A and TGF- β 1 regulation. **Burns.** v. 43, n. 3, p. 639-648, 2022.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " EFEITO DA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE LIPÍDIOS, MCLTP1, ISOLADA DAS SEMENTES DE NONI *Morinda citrifolia* L. (RUBIACEAE) NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM CAMUNDONGOS", registrada com o protocolo **02170619-0**, sob a responsabilidade de **Nylane Maria Nunes de Alencar** e **Bianca Moreira Kurita** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 19 / 09 / 2019.

We hereby certify that the project entitled "EFFECT OF LIPID TRANSFER PROTEIN, MCLTP1, ISOLATED FROM NONI SEED *Morinda Citrifolia* L. (RUBIACEAE) ON HEALING OF BURNS IN MICE", identified by the protocol number **02170619-0**, and conducted by **Nylane Maria Nunes de Alencar** and **Bianca Moreira Kurita** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 09 / 19 / 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: SETEMBRO/2019 Fim: FEVEREIRO/2022
Espécie	Camundongo
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	180
Peso	20-25 g
Idade	8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 19 de setembro de 2019

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

ANEXO II

RESUMO PARA NÃO CIENTISTAS

As queimaduras são lesões bastante comuns na população brasileira e muitas pessoas não fazem o tratamento correto para elas, o que causa uma variedade de complicações como infecção da ferida, levando o indivíduo à morte. Com isso, o valor financeiro que o Governo emprega no SUS para o tratamento só tende a crescer a cada ano. Como tratamentos disponíveis, as pomadas tópicas com sulfadiazina de prata a 1%, que são utilizadas para manejo das queimaduras no Brasil, impedem apenas que bactérias e outros microorganismos infectem as feridas, mas não promovem a recuperação da pele afetada. Os cientistas que trabalham no ramo da cicatrização, vem tentando desenvolver um tratamento que seja eficaz em promover o fechamento das lesões, e muito tem se investigado acerca do uso de produtos naturais. Recentemente, um grupo de pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) isolou das sementes do Noni, uma proteína chamada *McLTP1*. Esta proteína apresentou bons efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antioxidantes quando avaliados em modelos animais. Recentemente, observou-se que a *McLTP1* inibiu o crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*, bactérias envolvidas em infecções dérmicas. Por isso, diante da ausência de alternativas cicatrizantes por natureza para o tratamento da queimadura, e aliado aos efeitos previamente observados da *McLTP1*, esse estudo decidiu investigar se essa proteína poderia também exercer um efeito cicatrizante em modelo animal de queimadura. Os animais foram tratados com cremes a base de *McLTP1* nas concentrações de 0,25% e 0,5%, bem como com a sulfadiazina de prata a 1%, utilizada como grupo controle positivo, uma vez que esse é o tratamento preconizado pelo ministério da saúde. O grupo controle negativo não recebeu nenhum tratamento, por isso ele serviu de comparação para os demais grupos. Foi observado que o tratamento tópico com a *McLTP1* cicatrizou as queimaduras mais rapidamente que os demais grupos, sendo mais efetiva que a Sulfadiazina de prata a 1% em fechar as lesões. Quando da avaliação dos tecidos em microscópio, foi observado que esta proteína diminuiu a presença de células inflamatórias após 3 dias de queimadura, promoveu maior presença de células que produzem colágeno, chamadas fibroblastos, após 7 dias e a camada da pele formada após 14 dias de tratamento com a proteína se mostrou mais grossa e aderida quando comparada com o grupo que não foi tratado e com o tratamento padrão, que é a sulfadiazina de prata 1%. Esta proteína também diminuiu a presença de moléculas que inflamam e aumentou a presença de fatores de crescimento que estimulam fibroblastos. Ou seja, ela controlou a inflamação da queimadura e aumentou a síntese de colágeno na área. Isso explica a o fechamento mais rápido promovido pela *McLTP1*. Além disso, esta proteína também controlou a formação de radicais livres que potencializam a inflamação e contribuem para a destruição da pele, bem como promoveu uma ação anti-oxidante, diminuindo a extensão do dano e favorecendo a rápida recuperação da pele. Esses achados mostram que a *McLTP1* pode ser uma alternativa efetiva para o tratamento de queimaduras, sendo mais eficaz que a sulfadiazina de prata a 1%, uma vez que ela exerce efeito proliferativo na pele, favorecendo a recuperação tecidual. Aliado ao seu efeito antibacteriano, esta proteína pode controlar a proliferação de microorganismos na pele, evitando infecção das feridas, ao mesmo tempo que promove a cicatrização das lesões.