



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

EVELLY LISBOA SOUZA SANTOS

**Análise morfológica da ação regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas
em camundongos**

Barra do Garças- MT

Outubro de 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

EVELLY LISBOA SOUZA SANTOS

Análise morfológica da ação regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas em camundongos

Monografia apresentada à banca examinadora do Curso de Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, como requisito básico para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marcelino de Oliveira

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kallyne Kioko Oliveira Mimura

Barra do Garças- MT

Outubro de 2024

EVELLY LISBOA SOUZA SANTOS

Análise morfológica da ação regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas em camundongos

Monografia apresentada à banca examinadora do Curso de Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, como requisito básico para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marcelino de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Kallyne Kioko Oliveira Mimura

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Prof. Dr. Sergio Marcelino de Oliveira

Avaliadora:

Prof^a. Dr^a. Ludier Kesser Santos Silva

Avaliadora:

Prof^a. Dr^a. Madileine Francely Américo

Barra do Garças- MT

Outubro de 2024

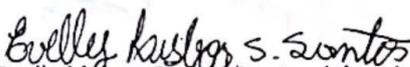


UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DO
TRABALHO DO CURSO DE BIOMEDICINA**

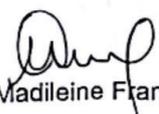
Aos 25 dias do mês de outubro do ano de 2024, às 09:30 horas, na sala 132, do Campus Universitário do Araguaia - UFMT na cidade de Barra do Garças, foi realizada a sessão pública de apresentação e defesa do Trabalho de Curso da acadêmica **Evelly Lisboa Souza Santos**. A banca foi composta pelos seguintes membros: Prof. Sérgio Marcelino de Oliveira, Prof^a. Dr^a. Ludier Kesser Santos Silva e Prof^a. Dr^a. Madileine Franciely Américo, sob a presidência do primeiro. O trabalho de curso tem como título "**Análise morfológica da ação regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas em camundongos**". Após explanação no prazo regulamentar a aluna foi interrogada pelos componentes da banca. Terminada essa etapa, os membros, de forma confidencial avaliaram a aluna e conferiram à mesma o resultado APROVADA com nota 10 (DEZ), proclamado pelo presidente da sessão. Dados por encerrados os trabalhos, lavrou-se a presente Ata, que será assinada pela banca e pela aluna. Havendo requisitos a serem observados, os mesmos seguem registrados em folha anexa.

Barra do Garças, 25 de outubro de 2024.


Evelly Lisboa Souza Santos (aluna)


Prof. Dr. Sérgio Marcelino de Oliveira (orientador)


Profa. Dra. Ludier Kesser Santos Silva (membro titular)


Profa. Dra. Madileine Franciely Américo (membro titular)

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S237a Santos, Evely Lisboa Souza.

Análise morfológica da ação regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas em camundongos [recurso eletrônico] / Evely Lisboa Souza Santos. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 49 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientador: Dr. Sérgio Marcelino de Oliveira.

Coorientadora: Dr^a. Kallyne Kioko Oliveira Mimura.

TCC (graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Barra do Garças, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://bdm.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre ter me dado forças em todas as etapas da minha vida. Gratidão por cada livramento e, principalmente, por ter me permitido chegar até aqui. O versículo “*Não te mandei? Seja forte e corajoso; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares (Josué1:9)*” me acompanhou por toda minha vida. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que Ele me proporcionou e por sua constante presença em minha vida, pois apesar das minhas falhas, tudo o que tenho e tudo o que sou é graças a Ele.

A mim, que fui a minha maior aliada e transformei minhas dores em força, toda gratidão e carinho. Durante toda minha vida, ouvi comentários negativos, mas fico feliz por ter utilizado essas críticas como combustível para ser uma pessoa melhor a cada dia. Olhando para trás, vejo que cada lágrima, cada noite sem dormir estudando para provas e cada sacrifício nessa jornada, me mostraram uma força que eu nem imaginava ter. Estar concluindo a graduação foi apenas uma das muitas vitórias que celebrarei, por isso, sou grata por nunca ter desistido, tudo é aprendizado, e isso me tornou um pouco mais resiliente e determinada. Apesar de precisar evoluir constantemente como pessoa, porque o ser humano é falho, até aqui Deus me sustentou e agradeço a cada pessoa que me apoiou nessa jornada, me ensinando a valorizar cada conquista, por menor que seja.

Ao meu pai, Edmilson Souza Santos, minha sincera e imensa gratidão, por ter sempre feito de tudo para proporcionar as melhores coisas para mim e minha irmã. Sua presença constante em minha vida foi fundamental para todas as minhas conquistas, obrigada por cada sacrifício, pelo apoio moral, emocional, financeiro, e ser meu maior incentivador. Meu pai sempre foi meu alicerce, minha base e porto seguro, tudo o que sou é pela influência dele, tudo o que faço é para dar orgulho a ele, que sempre foi meu espelho e exemplo de força e superação. Ele sempre me ensinou que o estudo nos leva para onde quisermos, desde então, “vencer na vida a partir dos estudos” sempre foi minha prioridade desde o fundamental até a graduação. Ele sempre foi a minha maior rede de apoio, e continuou exercendo essa função com êxito durante toda a graduação. Força, coragem, honestidade, fé e humildade sempre foi o seu lema para minha formação como pessoa, e que levarei comigo para o resto da vida. Mesmo quando a vida nos levou para cidades diferentes, ele continuou presente e demonstrando em atitudes o melhor pai do mundo que é. Portanto, o meu diploma e aprovação eu dedico a ele, que mesmo não sendo perfeito cuida dessa filha com todo amor e dedicação. Te amo daqui até o universo pai, espero te proporcionar só coisas boas e honrar tudo o que o senhor fez e faz por mim.

A minha mãe, Geórgia Lisboa Santos, gratidão por ter me dado a vida, te amo mãe espero te proporcionar um futuro estável. Aos meus avós maternos e paternos recebam toda minha gratidão, carinho e cuidado por cada apoio e orgulho depositado em mim, amo cada um infinitamente, em especial a minha avó materna, Marilene Lisboa Santos, que desde que vim ao mundo me fez sentir amada e acolhida. Minha avó é minha vida, gratidão por todo mimo e carinho de sempre, sei que sente minha falta constante, mas tudo o que faço é para um dia proporcionar uma vida confortável, sempre cuidarei da senhora. A Reginaldo Rocha de Sousa, meu avô emprestado, minha eterna gratidão por cuidar de mim e da minha avó, sua presença é fundamental em nossas vidas, te amo e espero retribuir coisas boas para o senhor.

A minha madrinha, Fernanda Lisboa Ramos Costa, obrigada por tanto! Desde que nasci sempre estive ao meu lado, me apoiando, me orientando, me incentivando e cuidando com muito zelo. A melhor madrinha que poderia ter, que é meu espelho de força, superação e sucesso. Obrigada pelo apoio e conselhos, especialmente nesses 4 anos de graduação, juntamente com Gildevaldo Costa (Dindo), deixaram meus dias mais felizes. Futuramente, espero proporcionar só coisas boas, vocês merecem, estou aqui para te orgulhar e retribuir todo cuidado de sempre. Amo vocês. A família Maia, minha família do coração, que me adotou desde que era uma bebê, que cuidou de mim com muito amor, carinho e atenção, gratidão por tudo, não sei o que seria de mim sem vocês. Nana, tia Sônia, Iane, Aurinha e Lú, vocês são incríveis, amo vocês demais e sinto orgulho de ter sido adotada e consagrada como uma Maia, espero proporcionar tudo de mais lindo para todas vocês. Aqueles da minha família que me apoiaram, me incentivaram, oraram ou desejaram meu bem e meu sucesso, em especial Nete Lisboa de Jesus, minha eterna GRATIDÃO! Não vou citar nomes, mas meus tios e primos que contribuíram até com palavras de conforto, eu amo vocês demais, se eu tiver oportunidade proporcionarei coisas incríveis para vocês.

Ao meu namorado, Bruno Nascimento de Sousa, minha eterna gratidão e amor. Ele foi meu braço direito durante todo esse processo, sempre me ouviu com paciência, me animou nos momentos difíceis e celebrou minhas conquistas comigo. Ele me deu um suporte emocional, financeiro e moral, ele foi fundamental, e palavras não seriam suficientes para agradecê-lo. Meu bunzunzo, eu te amo, obrigada por ser meu parceiro de vida, por cuidar e amar até quando eu não mereço. Gratidão a sua família que sempre me acolheu tão bem, amo demais. Agradeço imensamente a todos os meus amigos pelo apoio incondicional durante esta jornada. Em especial à Jhenyfer Ribeiro dos Santos, minha melhor amiga desde a infância, e à Andreina Lima dos Santos, por sempre estarem ao meu lado, celebrando minhas conquistas e me confortando nos momentos difíceis. Lembro-me com carinho de quando vocês foram incríveis

comigo neste processo, me apoiando, ouvindo meus ensaios para defesa de TCC, rindo, chorando, brigando, mostrando que nem a distância vai nos separar. Eu não poderia ter escolhido pessoas melhores, amo vocês demais, gratidão por tudo. Agradeço também ao grupo “Winx” (Ana Beatriz, Andreina Letícia, Luana Cutrim e Luana Vieira), que contribuíram para esse processo na faculdade ser mais leve. Meninas, vocês são incríveis cada uma do seu jeito e particularidade, provavelmente a vida vai nos afastar, mas levarei vocês comigo, amo vocês. Especialmente, Luana Vieira dos Santos, que foi minha dupla durante todo o processo da faculdade, me motivando e me auxiliando para tornar esse processo leve. Te amo Lú, essa aprovação foi com sua ajuda, devido a tantas noites me escutando repetir exaustivamente toda minha apresentação, você foi essencial nessa graduação e nesse período em Barra do Garças.

Agradeço profundamente a família do Laboratório de Histofisiologia e Reprodução Animal (LaHRA) por todo o cuidado comigo durante todos esses anos, tenho certeza de que estou saindo uma pessoa totalmente diferente de quando entrei, inclusive gratidão a todos os atuais integrantes do LaHRA, que ajudaram a contribuir para minha formação, não esquecerei nenhum de vocês. Agradeço especialmente à Maria Eduarda Urzeda, que me ajudou durante a ausência dos orientadores, me auxiliou com toda paciência e dedicação, nunca esquecerei, obrigada por tudo e muito sucesso. Aos professores e orientadores, Kallyne Kioko Oliveira Mimura e Sérgio Marcelino de Oliveira, obrigada pela orientação paciente e dedicada durante a realização deste trabalho. A experiência de vocês na área da morfologia foi fundamental para a construção do meu conhecimento e para a condução da pesquisa. Agradeço especialmente por suas sugestões precisas durante a análise dos dados e como me incentivou a pensar de forma crítica sobre os resultados. Sua paixão pela pesquisa foi contagiante e me motivou a buscar sempre a excelência. Nunca esquecerei de nenhum dos dois, saibam que marcaram minha vida e levarei vocês como espelho por onde quer que eu vá. Desejo muito sucesso para vocês e espero manter contato, levarei para sempre a experiência adquirida no LaHRA e a admiração e amor que sinto por vocês. Obrigada por toda confiança e carinho.

RESUMO

A pele, o maior órgão do corpo humano, é composta pela epiderme e pela derme, que protegem o organismo contra injúrias. Lesões cutâneas, como queimaduras de primeiro, segundo e terceiro graus, comprometem essas funções e iniciam a reparação tecidual, que envolve hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Dada a importância de desenvolver estratégias que melhorem esse processo, o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) destaca-se por seus compostos bioativos com propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias. A ação terapêutica deste óleo pode estar relacionada à anexina-A1 (AnxA1), uma proteína que medeia a inflamação e participa de processos como proliferação e diferenciação celular. Sendo assim, este estudo visa avaliar a atividade regenerativa do óleo de pequi em queimaduras cutâneas de segundo grau em camundongos. Para isso, realizou-se uma queimadura no dorso de camundongos, que foram tratados (Tratado n=18) ou não (Controle n=18) topicamente com óleo de pequi, e sacrificados em 7, 14 e 21 dias. Foi feita a coleta do fragmento da região do ferimento e da região adjacente, que foi fixado e processado histologicamente para a realização de diversas análises histopatológicas. Tanto no grupo Tratado, quanto no grupo Controle, aos 7 dias, não houve evidências de reepitelização. Contudo, a análise morfológica do epitélio neoformado revelou, aos 14 dias, uma maior altura epitelial no grupo Tratado em comparação ao Controle ($p \leq 0,05$). Após 21 dias, a altura epitelial se tornou semelhante nos dois grupos, sugerindo que o óleo de pequi acelerou a fase proliferativa, promovendo um fechamento mais rápido das feridas. Foi visto, um aumento gradual de colágeno tipo I na derme dos animais do grupo Controle (não significativo), enquanto no grupo Tratado, a quantidade desse colágeno se manteve estável, sugerindo que o óleo de pequi inibiu sua deposição. Por outro lado, a quantidade de fibras reticulares (colágeno tipo III) aumentou significativamente no grupo Tratado em 7, 14 e 21 dias em relação aos seus respectivos Controles ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,001$; respectivamente), indicando que o óleo de pequi modulou a deposição deste colágeno durante todo o processo de regeneração. Além disso, a intensidade da expressão da proteína AnxA1, tanto no epitélio queimado, quanto no epitélio conservado, foi semelhante entre os diferentes grupos experimentais analisados. Entretanto, ao quantificar as células epiteliais imunomarcadas para AnxA1 no epitélio recém-formado, foi observado que nos animais Tratados havia uma quantidade menor aos 14 dias ($p \leq 0,05$) e maior aos 21 dias, em comparação ao Controle. Além disso, no epitélio conservado (região adjacente ao local da queimadura), a quantidade de células positivas para AnxA1 foi semelhante entre todos os grupos experimentais. Os resultados sugerem que o óleo de pequi diminui a atividade inflamatória local, regulando assim a expressão de AnxA1, que por sua vez retarda a maturação de colágeno tipo III para colágeno tipo I favorecendo a reparação tecidual, em detrimento da cicatrização. Dessa forma, conclui-se que o óleo de pequi pode modular as fases da reparação tecidual, aumentando a espessura do epitélio e a deposição de fibras reticulares, mostrando-se promissor para o tratamento de queimaduras cutâneas.

Palavras Chaves: Queimadura de pele; Óleo de pequi; Pele; Colágeno; Anexina-A1.

ABSTRACT

Skin present two layers, the epidermis and dermis, which protect the organism against injuries. First, second, and third-degree burns, can compromise skin functions and initiate tissue repair, which involves hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. To develop strategies that enhance this process, study of pequi oil (*Caryocar brasiliense*) medicinal proprieties stands out for its bioactive compounds with healing and anti-inflammatory properties. The therapeutic action of this oil may be related to annexin-A1 (AnxA1), a protein that mediates inflammation and participates in processes such as cell proliferation and differentiation. Therefore, this study aims to evaluate the regenerative activity of pequi oil in second-degree skin burns in mice. A burn was made on the back of mice, which were treated (Treated n=18) or not (Control n=18) topically with pequi oil, and sacrificed on days 7, 14 and 21. A fragment of the wound region and the adjacent region was collected, which was established and processed histologically for the performance of several histopathological analyses. In both Treated and Control groups, there was no evidence of re-epithelialization at 7 days. However, morphometric analysis of the newly formed epithelium revealed, at 14 days, a greater epithelial height in the Treated group compared to the Control group ($p \leq 0.05$). After 21 days, the epithelial height became similar in both groups, indicating that pequi oil accelerated the proliferative phase, promoting faster wound closure. A gradual increase in type I collagen was observed in the dermis of the animals in the Control group (not significant), while in the Treated group, the amount of this collagen remained stable, indicating that pequi oil inhibited its deposition. On the other hand, the amount of reticular fibers (type III collagen) increased significantly in Treated group at 7, 14, and 21 days compared to their respective Controls ($p \leq 0.05$; $p \leq 0.0001$; $p \leq 0.001$, respectively), indicating that pequi oil modulated the deposition of this collagen throughout the regeneration process. Furthermore, the intensity of AnxA1 protein expression, both in the burned epithelium and in the preserved epithelium, was similar among the different experimental groups analyzed. However, quantifying the epithelial cells immunostained for AnxA1 in the newly formed epithelium, showed that in Treated animals there was a smaller amount at 14 days ($p \leq 0.05$) and a greater amount at 21 days, compared to the Control. Furthermore, in preserved epithelium (adjacent to the burn site), the number of AnxA1-positive cells was similar among in the two groups. The results suggest that pequi oil decreases local inflammatory activity, thus regulating the expression of AnxA1, which in turn delays the maturation of type III collagen to type I collagen, favoring tissue repair, to the detriment of healing. Thus, it is concluded that pequi oil can modulate the phases of tissue repair, increasing epithelial thickness and the deposition of reticular fibers, showing promise for the treatment of cutaneous burns.

Key Words: Skin burn; Pequi oil; Skin; Collagen; Annexin-A1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa da pele.....	Pág. 1
Figura 2 – Os estágios do reparo de feridas.....	Pág. 6
Figura 3 – Estrutura da proteína Anexina-A1.....	Pág. 10
Figura 4 – Imagens representativas da reepitelização.....	Pág. 17
Figura 5 - Avaliação do colágeno do tipo I.....	Pág. 19
Figura 6 – Avaliação das fibras reticulares.....	Pág. 22
Figura 7 – Análise da expressão da Anexina-A1 no epitélio conservado.....	Pág. 27
Figura 8 – Análise da expressão da Anexina-A1 no epitélio queimado.....	Pág. 28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AnxA1- anexina-A1 dos componentes da pele.

De - Derme.

Epi - Epitélio.

Fig. -Figura.

H.E - Hematoxilina & Eosina

ICBS -Instituto de Ciências Biológicas e Saúde.

KDa- Quilodaltos.

KGF- Fator de crescimento de queratinócitos.

LaHRA - Laboratório de Histofisiologia e Reprodução Animal.

MMPs- Metaloproteinases.

NK- Células natural killer.

PLA2- Fosfolipase A2.

PDGF 12- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas.

S.E.M – média \pm erro padrão.

UFMT-CUA – Universidade Federal de Mato Grosso – Centro Universitário do Araguaia.

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa.

TGF β - Fator de Crescimento Transformador beta β .

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1. PELE.....	1
1.2. LESÕES NA PELE	5
1.3. REPARO TECIDUAL	6
1.4. COMPOSTOS NATURAIS NA MEDICINA	8
1.5. ANEXINA-A1	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. METODOLOGIA	12
3.1. ANIMAL: MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA	12
3.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	14
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA EPITELIAL	15
4.2. AVALIAÇÃO DE COLÁGENO.....	18
4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ANEXINA-A1	23
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7. ANEXO.....	355

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. PELE

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, é composta pela epiderme e pela derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A epiderme, camada superficial da pele, é formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Já na camada mais interna encontra-se a derme, subdividida em derme superficial, constituída por tecido conjuntivo propriamente dito frouxo, e derme profunda, formada por um tecido conjuntivo propriamente dito denso não modelado. Embora apresentem diferentes constituintes, a epiderme e a derme, que são separadas por uma membrana basal, conectam-se pelas papilas dérmicas da derme (GARTNER; HIATT, 2003). Além disso, existe o tecido subcutâneo à derme (conhecido como hipoderme) rico em tecido adiposo que, apesar de não ser uma porção da pele, une o tegumento aos outros órgãos do corpo (Fig. 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017)

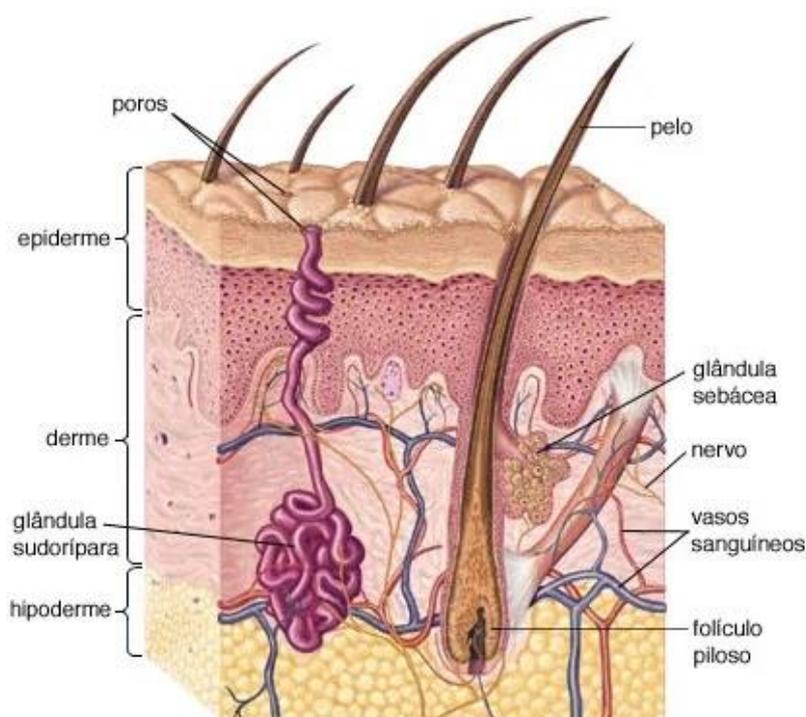


Figura 1. Imagem ilustrativa dos componentes da pele. Imagem adaptada de BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019.

A espessura da pele é determinada de acordo com as regiões mais sensíveis ou de maior atrito, podendo ser espessa e fina, sendo que a pele fina é localizada na maior parte do corpo, enquanto a pele espessa é encontrada apenas nas articulações, palma das mãos e planta dos pés. Na pele espessa, não são encontrados folículos pilosos e glândulas sebáceas, que estão presentes na pele fina, enquanto as glândulas sudoríparas estão presentes em ambos os tipos de pele. A epiderme possui cinco importantes subcamadas, que são essenciais para o processo de queratinização, sendo elas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, sendo que na pele fina não há presença da camada lúcida, e a camada córnea é menos espessa em relação a pele grossa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A camada basal apresenta, principalmente, células basais, que são cúbicas com núcleos maiores e com alta atividade mitótica, que auxilia no processo de reestruturação celular. Além disso, nessa camada também estão presentes as células de Merkel (mecanorreceptoras que contribuem para função de percepção) e os melanócitos (célula produtora do pigmento melanina). O queratinócito, responsável pela produção de queratina (proteína fibrosa com pouca quantidade na camada basal), é a principal célula da epiderme, que também faz o armazenamento da melanina que é uma proteína sintetizada pelos melanócitos na camada basal, que contribui para proteção contra radiação ultravioleta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Em conjunto com a camada basal, a camada espinhosa, onde se inicia o processo de queratinização, participa do processo de renovação celular, e apresenta em sua composição células cuboides com núcleos centralizados. É importante ressaltar a presença das células de Langerhans (células dendríticas) na camada espinhosa, que são importantes para o sistema imune devido à sua função de apresentadoras de antígenos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A camada granulosa é mais reduzida, podendo chegar até cinco camadas de células pavimentosas com núcleos centralizados e contendo grânulos de querato-hialina em seu citoplasma, os quais interagem com a membrana plasmática, contribuindo para formação da barreira da pele e impedindo a desidratação do organismo. Ao decorrer da diferenciação dos queratinócitos da camada basal até a superfície, essas células vão morrendo e perdendo suas organelas (GARTNER; HIATT, 2003). A camada lúcida apresenta células pavimentosas, porque seus núcleos e organelas citoplasmáticas foram eliminados por enzimas lisossomais. Essa é uma camada transparente de queratinócitos mortos, que contém a proteína eleidina de coloração clara, além desta camada ser caracterizada pela numerosa quantidade de queratina (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; NGUYEN;

SOULIKA, 2019). Por fim, a camada córnea é definida pela abundância de células mortas, achatadas e sem núcleos, além de apresentar uma maior quantidade de queratina sintetizada pelos queratinócitos, ao comparar com a camada basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A derme, localizada abaixo da epiderme, fornece flexibilidade, resistência à tração e elasticidade à pele. Ela é subdividida em duas camadas, a primeira é a papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, que se associa com a base da epiderme pelas papilas dérmicas, sendo rica em vasos sanguíneos. Já a derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, possuindo uma menor quantidade de células e uma grande quantidade de colágeno tipo I e fibras elásticas (ROSS; PAWLINA, 2016). A alta elasticidade da derme pode ser explicada devido à proteína solúvel elastina (feita de fibrilina) que está presente nas fibras elásticas, que são produzidas pelos fibroblastos (a principal célula da derme), que também produzem colágeno, sendo fundamental para o processo de reparação tecidual (ROSS; PAWLINA, 2016). Os fibroblastos, miofibroblastos e células imunológicas, como macrófagos, mastócitos e linfócitos, também contribuem para melhor funcionalidade e integridade desta camada (NGUYEN; SOULIKA, 2019). Além disso, no decorrer do envelhecimento ocorre uma diminuição na produção dos componentes da derme, como fibroblastos, colágeno e elastina, provocando a redução da elasticidade, da vascularização e o aparecimento de rugas (FENSKE; LOBER, 1986).

O colágeno (originado do termo “produção de cola”) é uma proteína fibrosa que está presente na derme, sendo também encontrado em ossos, tendões e cartilagens. A síntese dessa proteína é feita pelos fibroblastos, os quais secretam o procolágeno (molécula precursora) que se matura até formar as fibras colágenas. Algumas vitaminas contribuem para a produção desta proteína, em especial a vitamina C, sendo que sua deficiência pode provocar o escorbuto, que contribui para problemas na cicatrização (CANTY; KADLER, 2005; SHAW et al., 2017).

Esta molécula contém em sua estrutura molecular vários aminoácidos como a glicina, hidroxiprolina e prolina, proporcionando estabilidade e firmeza à pele, é uma fibra resistente que pode inclusive auxiliar na cicatrização de feridas e manter a integridade dos tecidos (BEDOYA et al., 2016; ZAGUE, 2015). Existem cerca de 30 tipos de colágeno, que podem formar longas fibrilas, outros associados a essas fibrilas, e outros que se ancoram a elas (SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021). Os principais tipos de colágeno presentes na pele são os do tipo I e tipo III, sendo que o primeiro é o mais abundante, sendo composto por fibras mais espessas e estão relacionadas com a resistência da pele, e o segundo (também conhecido

como fibra reticular) é formado por fibras mais finas e delicadas (BEDOYA et al., 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Logo abaixo da derme, associada ao tecido conjuntivo frouxo, encontra-se a hipoderme que, apesar de não ser considerada uma porção da pele, é importante para conectá-la aos músculos e ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Os adipócitos, são suas principais células, e juntos formam o tecido adiposo, que contribuem para um bom isolamento térmico e suprimento de energia (KHAVKIN; ELLIS, 2011; ROSS; PAWLINA, 2016). Além disso, este tecido subcutâneo, também apresenta função secretora, pois libera adipocinas (LESLIE BAUMANN; SOGOL SAGHARI; EDMUND WEISBERG, 2009).

A pele possui diversas funções, como a termorregulação, a percepção sensorial e formação de uma barreira física, protegendo o corpo contra atritos externos, desidratação, radiação ultravioleta, além de agentes químicos, físicos e microbiológicos (KHAVKIN; ELLIS, 2011). Outra importante função é a síntese da vitamina D₃, por meio de um processo de isomerização que acontece quando a radiação ultravioleta do sol entra em contato com o tecido cutâneo e seus componentes (COSTA, 2018). O pH da pele é ácido, variando entre 5,4 e 5,9, sendo uma estratégia de proteção para dificultar a sobrevivência de invasores patogênicos (NGUYEN; SOULIKA, 2019; SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006).

Algumas células imunológicas auxiliam para uma melhor funcionalidade da pele, mantendo a homeostase e protegendo contra agressões e possíveis infecções. Em condições favoráveis, essas células monitoram todo o ambiente procurando alguma ameaça. Ao encontrar alguma anormalidade, como no caso de lesões, elas ativam-se e recrutam outras células para o local da lesão, iniciando uma resposta inflamatória. A ajuda de outras células para combater o estímulo inflamatório é importante, porque garante a eficácia da resposta imunológica e a restauração tecidual. Nesse caso, os macrófagos e as células dendríticas contribuem para a fagocitose do patógeno, apresentando o antígeno para a célula T, que juntamente com as células natural killer (NK) também têm função de eliminar células infectadas e tumorais (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

1.2. LESÕES NA PELE

A eficácia da barreira protetora da pele, pode ser prejudicada em caso de lesões cutâneas provocadas por agentes agressores, como por exemplo a queimadura (BARTOSCH et al., 2013). Essas lesões, representam a maior incidência de ferimentos e óbitos no Brasil, sendo um problema de saúde pública, em que 65,8% foram do gênero masculino e 34,2% do gênero feminino (LEITÃO et al., 2014). Um estudo do Ministério da Saúde apontou que, no período de cinco anos entre 2015 e 2020, as queimaduras foram responsáveis por 19.772 óbitos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Nesse sentido, a queimadura é uma lesão grave que resulta em um dano tecidual causado, especialmente, quando a pele está exposta a altas temperaturas (por exemplo: chama de fogo), radiações ou até mesmo em temperaturas muito baixas, promovendo a destruição tecidual, que pode levar a óbito, dependendo da gravidade (BARTOSCH et al., 2013). A queimadura pode provocar uma grave necrose e ser colonizada por uma gama de microrganismos patogênicos, especialmente no período que a lesão estiver exposta e sem proteção até a finalização do reparo tecidual, que pode promover uma reação sistêmica no organismo devido às consequências ao tecido lesionado (QUINN et al., 1985; VALE, 2005). Além disso, o tratamento para queimadura ainda é muito difícil, especialmente porque essa condição induz uma resposta inflamatória, que se não cuidada pode causar complicações graves (RAVAT et al., 2011), deixando a lesão vulnerável a colonização de microrganismos patogênicos devido ao comprometimento da barreira cutânea (QUINN et al., 1985).

As lesões são classificadas de acordo com sua causalidade, profundidade, área afetada e gravidade (BARTOSCH et al., 2013). A profundidade determina a intensidade da queimadura, nesse caso, ela pode ser: de primeiro, segundo e terceiro grau. A de primeiro grau compromete somente a epiderme (mas mantém a integridade da membrana basal), tem ausência de bolhas, não deixa cicatriz, e tende a ter uma rápida recuperação dessa camada. A queimadura de segundo grau atinge a epiderme e parcialmente a derme, causando destruição da camada basal, deixando bolhas e tem uma cicatrização lenta (variando entre 3-4 semanas). Já a queimadura de terceiro grau atinge todos os constituintes da pele, ela não apresenta bolhas e nem sensibilidade, mas pode chegar até o osso, e precisar de enxertia (LATARJET, 1995; VALE, 2005). As queimaduras mais superficiais, como as de primeiro e segundo graus, se não tratadas podem evoluir para casos mais graves (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010).

1.3. REPARO TECIDUAL

Para que o processo de reparação tecidual seja bem-sucedido, são necessárias algumas etapas importantes, como a hemostasia, a inflamação, a proliferação e a remodelação (Fig. 2).

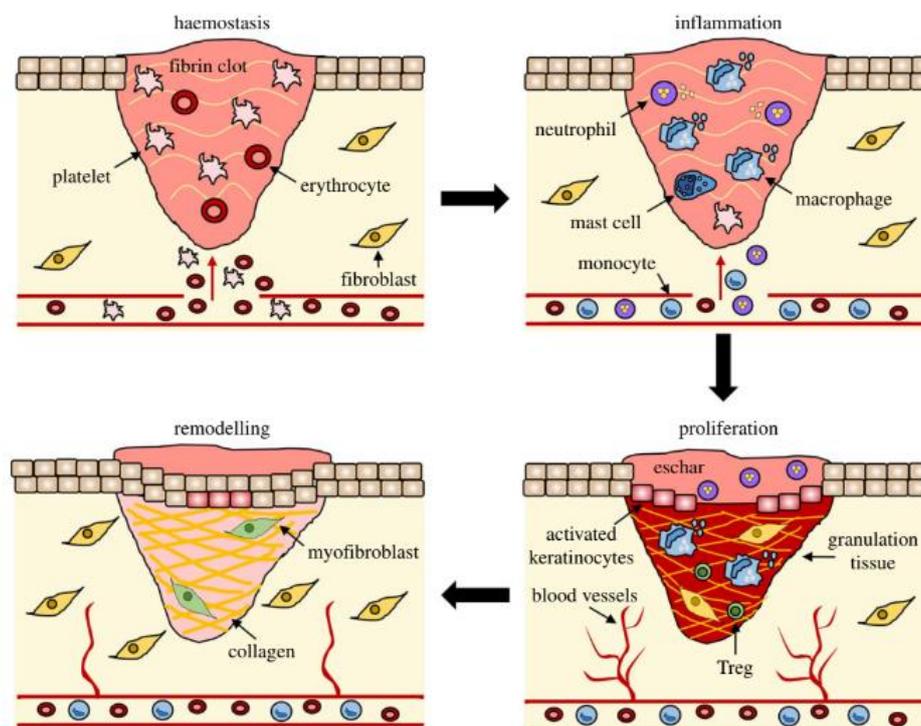


Figura 2. Os estágios do reparo de feridas e seus principais componentes celulares. Imagem adaptada de WILKINSON e HARDMAN (2020).

Quando ocorre uma lesão na pele inicia-se o processo de hemostasia, pela ativação da agregação plaquetária, culminando na formação de um coágulo composto por fibrinas no local lesionado. Além disso, é nesse período inicial que ocorre a produção de fibras reticulares (colágeno tipo III) (LIMA et al., 2022). Posteriormente, na fase inflamatória, ocorre o recrutamento de células do sistema imunológico, como por exemplo macrófagos, neutrófilos e mastócitos, para o local afetado, onde liberam mediadores químicos, que são responsáveis pela contração dos vasos sanguíneos, ocasionando uma diminuição em seu fluxo sanguíneo, conhecido como vasoconstrição (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Estes mediadores também estimulam as respostas pró e anti-inflamatórias, regulando a intensidade da inflamação (STRONCEK; REICHERT, 2007). Como apontado anteriormente, o

colágeno é um dos principais constituintes da derme, contribuindo para uma pele firme, rejuvenescida e resistente, dessa forma, ele também é importante no processo de reparação tecidual. Quando ocorre a hemostasia, essa proteína é exposta, resultando na ativação e agregação plaquetária, e formando coágulos compostos com fibrinas no local lesado. Além disso, é nesse período inicial da etapa da inflamação que ocorre a nova produção das fibras reticulares (colágeno tipo III) que são mais favoráveis ao processo de reparação tecidual (LIMA et al., 2022).

Já na fase proliferativa, ocorre a reepitelização que promove a restauração da epiderme. Os fibroblastos também contribuem para aceleração da reepitelização, ao estimular a migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos vizinhos para o local de interesse, liberando o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (TSIROGIANNI; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006). O processo de angiogênese, também se inicia nesta etapa, e é estimulado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que promove a migração das células endoteliais e formação de novos capilares sanguíneos no local da queimadura. Por fim, a formação de tecido de granulação e deposição de colágeno caracteriza o final da fase proliferativa, que tem a função de nutrir e oxigenar os componentes celulares que ali se encontram (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010; STRONCEK; REICHERT, 2007).

O fibroblasto, principal célula da derme, é ativado pelo fator de crescimento derivado de plaquetas-12 (PDGF-12) para sair do estado de repouso e iniciar a atividade da síntese dos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Além disso, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) estimula a produção de colágeno tipo I e induz a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, a fim de promover a contração da ferida, auxiliando no processo de fechamento da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

De acordo com a literatura, a deposição de colágeno é um processo gradual, que ocorre em todos os processos de reparo tecidual, intensificando-se na fase de remodelação. Essa proteína é um importante constituinte da derme, pois promove um aumento da resistência da ferida e contribui para reorganização e sustentação da matriz extracelular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021; SINGER; CLARK, 1999). Na fase de remodelação, que ocorre por volta do 21º dia da lesão, acontece eventos diretamente relacionados com a distribuição de colágeno na derme da região lesionada. Esta molécula, inicialmente se apresenta na forma de colágeno tipo III e é gradativamente

substituída por colágeno tipo I, que apresenta maior espessura e proporciona maior resistência ao local da ferida. Durante esta reorganização da nova matriz, os fibroblastos e os leucócitos secretam collagenases que degradam o colágeno III, dando lugar ao colágeno do tipo I na nova matriz (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

1.4. COMPOSTOS NATURAIS NA MEDICINA

Tendo em vista a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas que promovam a melhora do processo de reparo tecidual, diversas plantas têm sido estudadas por possuírem em sua composição moléculas bioativas com propriedades medicinais, com capacidade antioxidante, anti-inflamatória e pró-regenerativa. Dentre esses compostos, alguns têm um importante papel contra os radicais livres, como os flavonoides, carotenoides e fenóis (CARVALHO et al., 2006; MANACH et al., 2004).

Nesse contexto, destaca-se o pequizeiro, que é uma árvore frutífera de porte médio, típico do cerrado brasileiro, com cerca de 10 metros de altura e com raízes profundas que facilita sua adaptação em diferentes climas e solos. Vale ressaltar a versatilidade desta árvore, que contribui de várias formas para a sociedade, sendo que a casca pode ser utilizada para fabricação de utensílios, as folhas para a tintura e o fruto para consumo gastronômico (BATISTA et al., 2010; DOMBROSKI et al., 2010; THAMER; PENNA, 2006). Além disso, essa árvore possui uma grande importância medicinal, pois as cascas e folhas possuem propriedades diuréticas, além de poderem ser utilizadas para tratamentos de resfriados (BATISTA et al., 2010). De acordo com a literatura, essas folhas são ricas em taninos (compostos fenólicos), que apresentaram a capacidade para combater tumores, como o sarcoma 180 (câncer de pele) (DOMBROSKI et al., 2010).

O pequi (*Caryocar brasiliense*), que em tupi significa casca espinhosa e que é um fruto carnoso com uma ou mais sementes, apresenta um epicarpo (casca de coloração verde-claro a amarelado), um mesocarpo (parte carnosa, própria para consumo) e um endocarpo (parte que envolve a semente), rígido e espinhoso. O mesocarpo tem em sua composição os carotenoides, que possuem ação antioxidantes e são responsáveis pelo pigmento amarelo-alaranjado dessa região (BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015; DOMBROSKI et al., 2010). Este fruto possui um potencial nutritivo, relacionado com sua rica variedade de compostos, como cálcio, proteínas, esteroides, alcaloides, lipídeos, betacaroteno, vitaminas

e minerais, além de sua atuação como redutor do processo inflamatório (BATISTA et al., 2010; MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008).

Além de ser importante para a gastronomia regional do Centro-Oeste, o óleo extraído da polpa do pequi é rico em nutrientes e compostos bioativos, e contribui para pesquisas científicas, a fim de utilizá-lo como tratamento médico (BATISTA et al., 2010). Este óleo apresenta propriedades medicinais importantes para o tratamento de lesões cutâneas, por exemplo, e pode ser administrado em seres humanos pelas vias oral, interna, tópica ou inalatória, de acordo com o objetivo do tratamento (JANE BUCKLE, 2014). Além disso, possui efetiva ação terapêutica devido a sua baixa polaridade e volatilidade, além de apresentar propriedades lipofílicas (CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012).

De acordo com a literatura, o óleo do pequi atua na redução do estresse oxidativo (MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008), pois apresenta propriedades antioxidantes (que auxiliam no combate a radicais livres) e anti-inflamatória, devido a sua composição ser rica em ácidos graxos insaturados, como ácido oleico e ácido linoleico, contribuindo para reparação tecidual durante a fase proliferativa da cicatrização (BATISTA et al., 2010; BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015). O pequi também apresenta um odor forte, e essa característica está relacionada com alguns dos seus compostos bioativos, como os terpenos (β -ocimeno e o b-eudesmol) e os ésteres (que está relacionado com sabor do fruto) (CORDEIRO et al., 2013).

1.5. ANEXINA-A1

O óleo de pequi pode desempenhar sua ação terapêutica por meio da interação de várias moléculas presentes nos tecidos animais. É possível que a anexina-A1 (AnxA1), proteína 37 quilodaltons (kDA), seja uma delas, pois além de mediar a inflamação, ela está envolvida em importantes papéis fisiopatológicos, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular (SHEIKH; SOLITO, 2018). Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, específica para cada membro da família de anexinas, e uma região C-terminal, formada por quatro a oito dobras repetidas de uma sequência conservada de 70 a 80 aminoácidos, responsável pela afinidade ao cálcio e consequente ligação aos fosfolípídios (RESCHER; GERKE, 2004) (Fig.3).

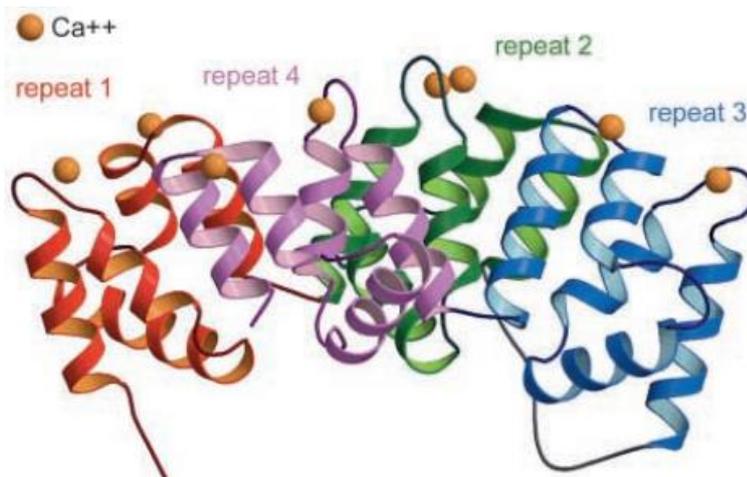


Figura 3. Estrutura da proteína Anexina-A1. Imagem adaptada de RESCHER e GERKE (2004).

Quando esta proteína é ativada, atua nos processos inflamatórios, podendo ser classificada com uma proteína mediadora endógena, e sua síntese é induzida por diversos estímulos, principalmente, pelos glicocorticoides que estão envolvidos na resposta inflamatória e na expressão de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, esta proteína também está vinculada aos efeitos imunossupressores dos glicocorticoides, atuando como mediadora das ações anti-inflamatórias deste hormônio (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; SMITH, 1996). Para executar suas funções, a AnxA1 é secretada e atua de forma autócrina ou parácrina, ligando-se a receptores externos específicos da membrana plasmática da célula alvo (TAYLOR et al., 2000; YANG; HUTCHINSON; MORAND, 1999) e algumas células envolvidas no processo inflamatório, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos, que também expressam AnxA1, compondo cerca de 4% do seu conteúdo intracelular (GOULDING, 1990; MORAND et al., 1994). Além disso, esta proteína inibe a transmigração dos neutrófilos, eosinófilos e basófilos durante a resposta inflamatória, assim como na migração destes leucócitos para locais de inflamação (GETTING; FLOWER; PERRETTI, 1997; GOULDING et al., 1998).

Além de atuar como anti-inflamatório, a AnxA1 possui efeitos apoptóticos em células inflamatórias, cujo mecanismo pode estar relacionado com o aumento de cálcio no interior da célula (SOLITO et al., 2001). Na inflamação granulomatosa da pele de camundongos, foi observado um aumento significativo do nível de AnxA1 expressa nos neutrófilos, resultando em uma maior exposição da porção proteica, sendo que os glicocorticoides e as citocinas podem interferir neste aumento (OLIANI; GIL, 2006). Assim

como os leucócitos, os mastócitos, que são células residentes do tecido conjuntivo, e as células endoteliais, só são ativados quando há algum processo inflamatório (OLIANI et al., 2000). Essas expressões podem ser em diferentes intensidades, como no caso dos mastócitos que estão presentes não só no tecido conjuntivo, mas também nas mucosas, o que pode ocorrer em casos de reações alérgicas (SILVA et al., 2019). A AnxA1 por ser um ótimo mediador para o processo inflamatório, pode restabelecer a migração das células, assim como minimizar a proliferação celular e expressão de citocinas pró-inflamatórias, garantindo assim a homeostase do organismo (CARDIN et al., 2017).

A AnxA1 impede a atividade da fosfolipase A2 (PLA2), que é a principal enzima que participa da produção de mediadores inflamatórios, como os leucotrienos, por meio da ligação com o substrato do PLA2, o ácido araquidônico, ou pela captura do próprio PLA2, impedindo uma possível promoção da inflamação (KIM et al., 2001; NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). As ações anti-inflamatórias da AnxA1 podem expressar-se em locais diferentes, resultando em funções distintas em cada constituinte, o que é possível com ajuda de outras células. Sendo assim, ela também pode inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, e reduzir a transmigração de leucócitos para o local de inflamação, protegendo assim o tecido contra mais danos (CROSARA-ALBERTO et al., 2002). Além disso, a AnxA1, ao influenciar as atividades das moléculas de adesão, selectinas e integrinas, contribui para a diminuição da transmigração de leucócitos para o tecido inflamado (PERRETTI; FLOWER, 1996).

No contexto do remodelamento tecidual, estudos têm mostrado que, seguido a uma inflamação grave, a AnxA1 tem sido eficiente em promover quimiotaxia de células epiteliais provenientes de células-tronco para reparar a camada epitelial do intestino, restabelecendo assim a homeostasia (BABBIN et al., 2006, 2007, 2008; LEONI et al., 2013).

Este projeto, baseado nas informações apresentadas até aqui, buscou investigar tratamentos alternativos que sejam eficazes para o tratamento de queimaduras de segundo grau, investigando um possível potencial do óleo de pequi neste processo, com foco nos eventos celulares e moleculares tanto na epiderme quanto na derme da pele lesionada.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade regenerativa do óleo de pequi na pele de camundongo submetido a queimadura de segundo grau.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar histologicamente a morfologia do tecido lesado;
- Analisar as fibras colágenas na lesão;
- Avaliar a expressão da proteína anexina-A1 na pele.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAL: MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA

As amostras de pele de camundongos Balb-c utilizadas neste estudo são provenientes do desenvolvimento de um projeto anterior intitulado “Estudo do potencial anti-inflamatório e cicatrizante do óleo de pequi em queimaduras de pele em camundongos Balb-c”, cadastrado na SGPP sob o número 73/2022 (STRUTZ, OLIVEIRA e MIMURA, 2023 – dados não publicados), aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso - CEUA UFMT 23108.010533/2022-11.

Em vias gerais, 36 camundongos machos Balb-c (90 dias de idade) foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: i) Controle: grupo controle, com queimadura sem tratamento, tendo apenas aplicação de solução salina na lesão; e ii). Tratado: queimadura com tratamento com óleo de pequi (aplicação tópica diária de 30 μ L sobre a lesão). Cada um desses grupos experimentais foi dividido em três subgrupos, em que os animais foram sacrificados nos dias 7, 14 e 21 após a produção da queimadura (n = 6 / grupo).

Para a indução da queimadura foram utilizados 36 camundongos machos Balb-c, com 90 dias de idade. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com 0,2mL/100g de cetamina e 0,05mL/100 g de xilazina, tiveram seu dorso tricotomizado e, posteriormente,

assepsiado com solução de povidine. Após, um bloco metálico com dimensões de 1,0 cm² foi aquecido por 1 minuto em água a 100°C e, em seguida, posicionado na pele do dorso do animal por 8 segundos para caracterizar uma queimadura de segundo grau (adaptado de SOUZA et al., 2017). Imediatamente após o trauma, as lesões foram cobertas com gaze umedecida em solução salina gelada. Os animais receberam codeína analgésica via gavagem (1mL/kg) logo após a indução da lesão. Além disso, a água oferecida aos camundongos por todo o período experimental também tinha esse analgésico diluído (30mg/L). Ao final do período experimental, os animais foram sacrificados, por meio da administração de superdosagem dos mesmos anestésicos descritos anteriormente, na concentração de 30mg/Kg e 300mg/Kg (xilazina e cetamina, respectivamente) seguindo as orientações do Guia de Eutanásia para Animais em Pesquisa e Ensino, da Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal De São Paulo-Unifesp.

O óleo de pequi foi extraído do mesocarpo dos frutos de *Caryocar brasiliense* provenientes de uma propriedade rural, localizada no município de Pontal do Araguaia-MT (16°00'27,4"S 52°21'01,0"W). Após preparo da amostra da polpa do pequi, a extração lipídica foi realizada por Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente. O solvente foi removido por rotaevaporação a 60°C e o óleo armazenado a baixas temperaturas. A aplicação do óleo de pequi foi iniciada no primeiro dia do procedimento cirúrgico e ocorreu até o dia do sacrifício dos animais.

3.2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A região da lesão cutânea, em toda sua extensão e profundidade, juntamente com a pele íntegra adjacente foi coletada, fixada em paraformaldeído tamponado a 4%, por um período de 24 horas a 4°C. Em seguida, o material foi submetido a um processo de desidratação em banhos crescentes de etanol, seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina (Histosec). Cortes de 4µm foram obtidos por microtomia e submetidos as seguintes colorações:

- Hematoxilina & Eosina (H.E.): para análise morfológica e morfométrica por meio de microscopia óptica. Foram capturadas 5 imagens por lâmina, com aumento final de 200x, para evidenciar as estruturas da epiderme e da derme. A análise morfométrica foi realizada no epitélio com o auxílio do software Image-Pro Plus.

- Picrosírius-Hematoxilina: para análise do colágeno por meio de microscopia de polarização. Foram capturadas 3 imagens por lâmina, com aumento final de 200x, utilizando o filtro polaroide, que evidencia as fibras colágenas deixando-as birrefringentes. As fibras colágenas foram contabilizadas com o auxílio do software ImageJ.

3.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Com o intuito de investigar a ação do óleo de pequi na modulação da proteína anti-inflamatória AnxA1 na pele, foi realizada a técnica de imunohistoquímica como descrito a seguir: os cortes histológicos (4µm) foram confeccionados em lâminas silanizadas e em seguida desparafinizados e hidratados. Posteriormente, os cortes foram incubados em panela de pressão por 4 minutos para a recuperação antigênica utilizando 10mM tampão citrato pH 6,0, seguida pela inativação de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio 3 % em metanol por 30 minutos, do bloqueio de proteínas com soro normal de cabra à 10 % em TBS/BSA à 1%, por 2 horas em câmara úmida e temperatura ambiente. Após, os cortes foram incubados com o anticorpo primário *polyclonal rabbit* anti – anexina A1 (1:1000; Invitrogen, Frederick, MD, USA) diluído em TBS/BSA à %, *overnight*, à 4 °C, em câmara úmida. No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS, incubados com anticorpo anti - *rabbit* (1:100; Invitrogen, Frederick, MD, USA) diluído em TBS/BSA à 1% por 1 hora, lavados em TBS e revelados com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Dako) na concentração 1:20 por 2 minutos. Após esta reação, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris. Os controles negativos das reações foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário.

Para quantificar a expressão da anexina-A1 e realizar a análise densitométrica, foram capturadas cinco imagens de cada lâmina, tanto da região do epitélio da queimadura quanto do epitélio conservado, utilizando um microscópio óptico com objetiva de 40x. Em seguida, as imagens foram analisadas no software Image-Pro Plus para quantificação das células positivas para anexina, e pelo software ImageJ para realização da densitometria.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram demonstrados como média \pm erro padrão das médias. Diferenças estatísticas foram comparadas pela ANOVA, seguidas, se significativas, pelo teste de Bonferroni. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA EPITELIAL

A análise morfológica das lâminas coradas com H.E. demonstrou que o processo de reepitelização foi mais eficiente na pele dos animais que receberam o tratamento com óleo de pequi. Na pele queimada tanto dos animais do grupo Controle quanto do grupo Tratado, apesar de não haver ainda a formação de um novo epitélio aos 7 dias (Fig. 4A-B), foi observada a presença de tecido de granulação no local da queimadura, juntamente com uma casca que recobria o ferimento. Além disso, foi evidente uma maior estratificação de epitélio neo-formado ao 14º dia de tratamento com óleo de pequi, quando comparado com o grupo Controle (Fig. 4C-D). Já aos 21 dias, o epitélio se apresentou com o mesmo aspecto de estratificação em ambos os grupos (Fig. 4E-F).

Para a avaliação histológica da restauração epitelial após a queimadura da pele dos animais dos grupos Tratados com óleo de pequi e Controles, nos períodos de 14 e 21 dias, foi realizada a morfometria epitelial (Fig. 4C-F). Essa análise revelou que o epitélio dos animais do grupo Tratado no período inicial de 14 dias apresentou uma altura significativamente maior em comparação ao respectivo Controle ($p \leq 0,05$; Fig. 4G), indicando uma reepitelização mais acelerada. Já aos 21 dias, a altura epitelial da pele dos animais dos grupos Tratado e Controle não apresentou diferença estatisticamente significativa (Fig. 4G).

A queimadura de segundo grau compromete a epiderme, parte da derme e, conseqüentemente seus anexos. Para reestruturar esses componentes perdidos, o reparo tecidual é iniciado (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Na fase proliferativa, ocorre a reepitelização, na qual os queratinócitos da borda da ferida, estimulados por fatores de crescimento, migram, proliferam e aumentam de tamanho no

local lesado, contribuindo para formação de um novo epitélio (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Além disso, a angiogênese (uma das etapas da fase proliferativa) fornece nutrição e oxigenação para acelerar a formação do tecido de granulação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A cicatrização, embora essencial para restaurar a integridade da pele, pode resultar em cicatrizes patológicas e aumentar o risco de infecções (ZUCOLOTTO et al., 2023). Diante desse cenário, o óleo de pequi foi utilizado como tratamento para acelerar esse processo e diminuir possíveis infecções.

Os resultados observados no presente estudo, que mostraram a formação de um epitélio mais desenvolvido nos animais Tratados, sugerem que o óleo de pequi intensificou os eventos relacionados à fase proliferativa, favorecendo sua aceleração e consequente fechamento mais rápido da ferida. Isso é extremamente importante para minimizar as chances de infecções, que comumente ocorrem em feridas abertas. Esses dados indicam um possível efeito proliferativo do óleo de pequi nas células da epiderme, já que, após a sua administração tópica, o epitélio apresentou-se mais desenvolvido. Tal efeito pode estar relacionado às propriedades terapêuticas desse fruto, que pode estar associado com os ácidos graxos insaturados que estimulam a produção de fatores de crescimento (BATISTA et al., 2010).

Os ácidos graxos insaturados, como o oleico e linoleico, possuem a capacidade de eliminar bactérias. Essa proteção contra microrganismos no ferimento contribui para um reparo tecidual mais rápido e eficiente (BATISTA et al., 2010; BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015). Essas moléculas orgânicas também atuam como mediadores pró-inflamatórios, desencadeando uma rápida resposta inflamatória para minimizar os danos e contribuindo para proteção do local lesado, criando um ambiente úmido e rico em fatores de crescimento que favorecem a reepitelização, sendo fundamental para a resolução da inflamação e regeneração tecidual (BATISTA et al., 2010). Nossos resultados estão alinhados com a literatura, que sugere que os processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios podem ocorrer de forma sincronizada e complementar durante a reparação tecidual (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; SMITH, 2000), demonstrando que o óleo de pequi é um bom agente terapêutico para acelerar a reepitelização.

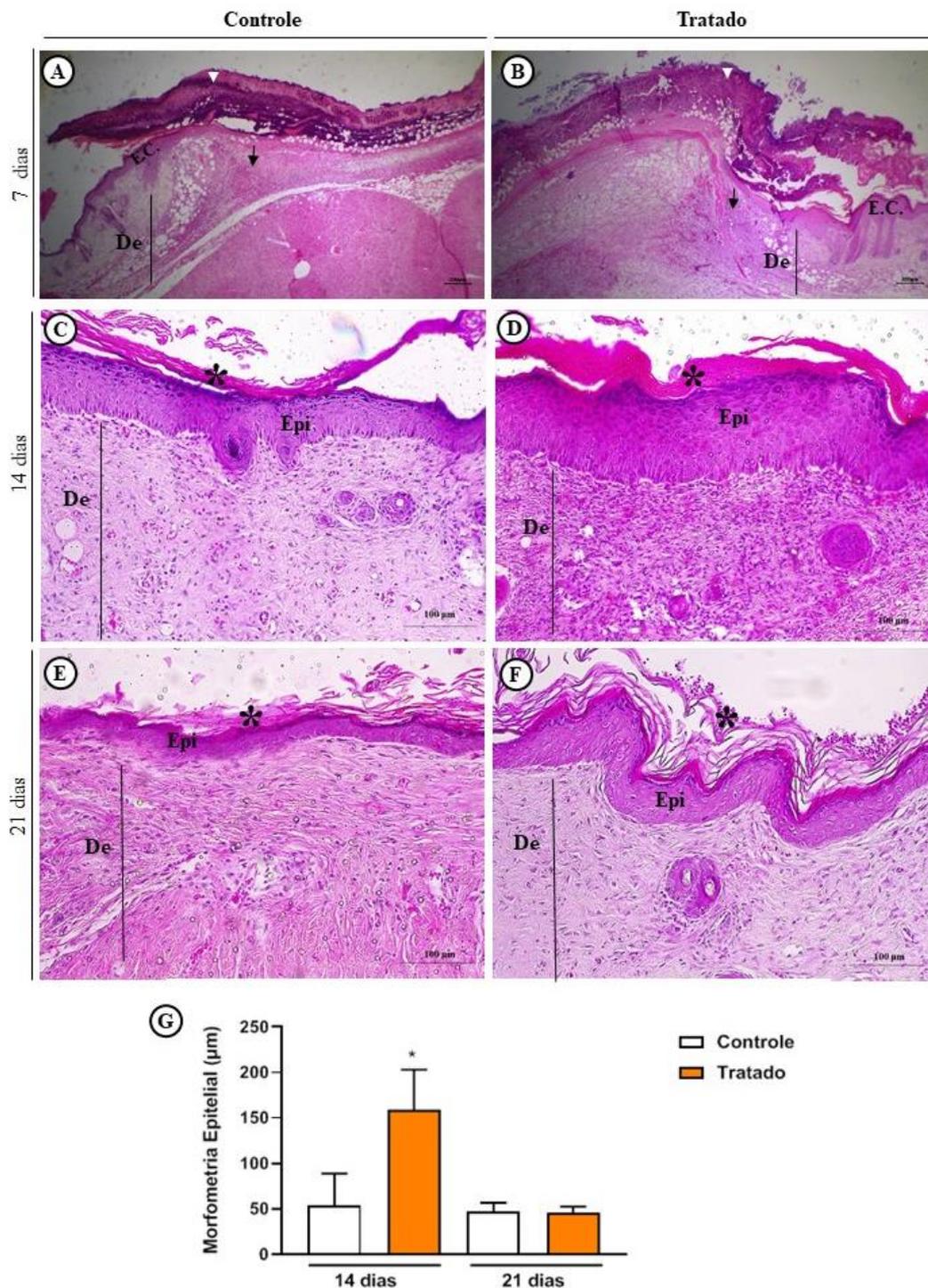


Figura 4. Imagens representativas da reepitelização dos animais dos grupos Controle (n=18) e Tratado (n=18) com óleo de pequi após os períodos de 7, 14 e 21 dias subsequente à queimadura de segundo grau [A-F]. Aumento: 200X. *: queratina; Epi: epitélio; E.C.: epiderme conservada; De: derme; Cabeça de seta: casca da ferida; Seta: Tecido de granulação. Coloração: Hematoxilina & Eosina (H.E). Barra: 100 µm. Morfometria epitelial [G]. Os dados demonstram uma média ± S.E.M. da altura do epitélio em µm. * $p \leq 0,05$ versus respectivo Controle, utilizando o teste estatístico ANOVA.

4.2. AVALIAÇÃO DE COLÁGENO

A síntese da fibra colágena é realizada pelos fibroblastos, que migram para área lesionada para atuar na restauração do tecido afetado, iniciando o processo de reparação. Isso é de extrema importância, já que a resistência à tração da cicatriz é equivalente à quantidade de colágeno existente nela (NASCIMENTO et al., 2016). A estrutura molecular das fibras de colágeno permite a detecção de suas diferentes formas de organizações por meio da birrefringência, que pode ser visualizada com o auxílio de um filtro de polarização (RIBEIRO et al., 2013). Com essa finalidade, amostras da pele queimada dos animais experimentais foram submetidas a coloração de picrossírius-hematoxilina e analisadas por meio de microscopia de polarização, a fim de avaliar as fibras colágenas do tipo I (Fig. 5) e III (fibra reticular; Fig. 6) presentes na derme da pele. A microscopia de polarização permite a visualização de uma birrefringência de tonalidades avermelhada e verde, a qual diferencia o colágeno do tipo I da fibra reticular, respectivamente.

A análise do colágeno tipo I revelou um aumento gradativa na quantidade desse tipo de colágeno com o passar do tempo nos animais dos grupos Controle, com uma maior quantidade aos 21 dias em comparação com grupo 7 dias ($p \leq 0,0$). Já nos animais do grupo Tratado, foi observada a manutenção da quantidade de colágeno do tipo I entre os diferentes períodos analisados (Fig. 5M). Esses dados sugerem que o óleo de pequi pode modular a deposição de colágeno tipo I, interferindo na fase de remodelação da ferida.

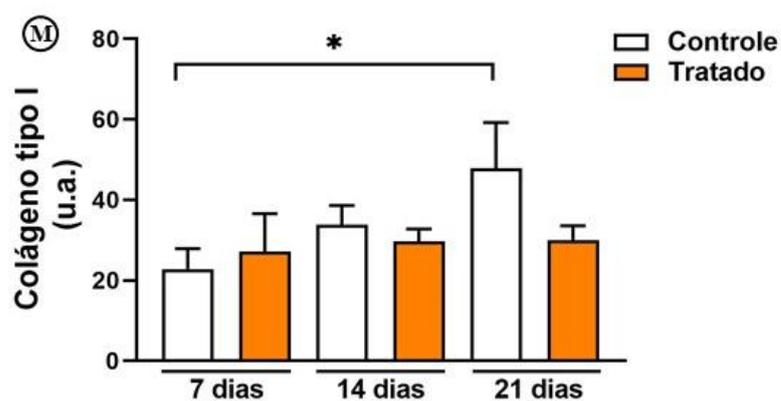
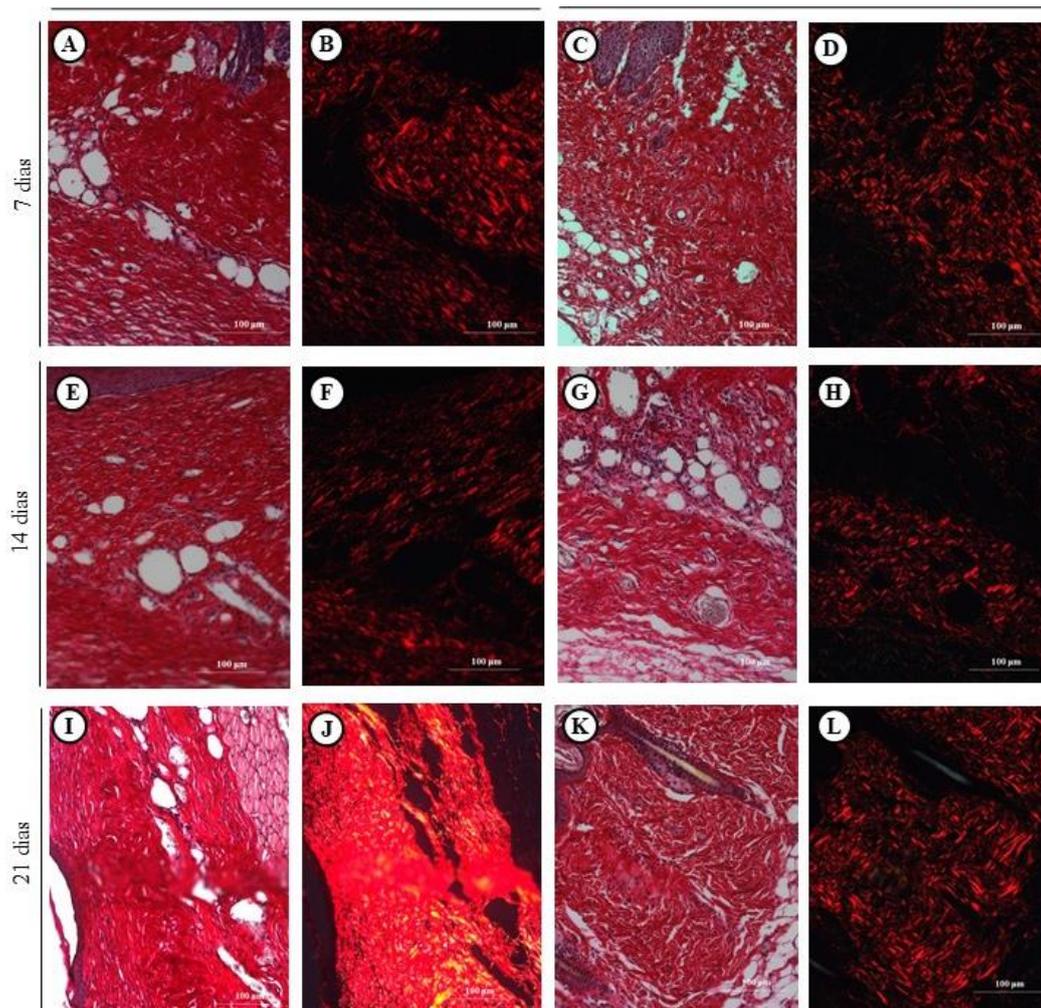


Figura 5. Imagens representativas de cortes histológicos corados com picrosírius-hematoxilina para análise do colágeno tipo I (vermelho/amarelo) nos animais dos grupos Controle (n=18) e Tratado (n=18) com óleo de pequi após o período de 7, 14 e 21 dias subsequente à queimadura de segundo grau sem [A, C, E, G, I e K] e com polarização [B, D, F, H, J e L]. Aumento: 200X. Barra: 100µm. Quantificação do colágeno tipo I [M]. Os dados demonstram uma média \pm S.E.M, * $p \leq 0,05$ versus Controle 7 dias, utilizando o teste estatístico ANOVA.

Em contrapartida, ao analisar as fibras reticulares, observou-se uma quantidade significativamente maior desse tipo de fibra na derme dos animais Tratados em relação aos Controles, nos dias 7, 14 e 21 de tratamento, ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,0001$; $p \leq 0,001$; respectivamente) (Fig. 6M). Esse resultado revela a capacidade do óleo de pequi de modular a deposição de colágeno em todas as fases do processo de regeneração tecidual, prologando a fase de remodelação.

Sabe-se que as fibras colágenas são fundamentais para a fase de remodelação do processo de reparo tecidual, sendo que o colágeno do tipo I (maduro) apresenta uma maior resistência e, conseqüentemente, maior predominância na derme (CUNHA; PARAVIC; MACHADO, 2015), cuja composição é de 80% de colágeno do tipo I e 20% do tipo III (RIBEIRO et al., 2015). É importante ressaltar que, inicialmente, os fibroblastos produzem fibras reticulares (fibras “imaturas”), que gradualmente são degradadas por colagenases e substituídas por colágeno do tipo I em um processo de maturação tecidual (RIBEIRO et al., 2015). O reparo tecidual tem sucesso quando há equilíbrio entre a degradação da matriz antiga e a síntese da nova matriz (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Na etapa final do processo de reparo, ocorre a maturação e a reorganização das fibras na derme, que são responsáveis principalmente por conferir resistência mecânica à pele (CHEN; PRZYBOROWSKI; BERTHIAUME, 2009).

A maior deposição de fibras reticulares nos grupos experimentais Tratados com óleo de pequi, quando comparado aos respectivos grupos Controle, sugere um retardo na maturação do colágeno. Esse fato indica que o óleo de pequi pode estar regulando a remodelação tecidual, possivelmente por meio da inibição da degradação das fibras reticulares e do retardo da síntese de colágeno tipo I.

De acordo com a literatura, o óleo de pequi possui alto teor de diversos subtipos de carotenoides, prevenindo possíveis complicações e minimizando a liberação de mediadores inflamatórios (RABBERS et al., 2019). O processo inflamatório desordenado pode inibir a proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, a deposição de colágeno (BATISTA et al., 2010), que se for exacerbada não é benéfica durante a reparação tecidual, pois pode haver a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides (MEDHI et al., 2013).

O estudo de RODERO (2013) buscou investigar possíveis mecanismos para deposição excessiva de colágeno, demonstrando ser uma possível consequência do aumento precoce da expressão gênica do colágeno tipo I, por volta do segundo dia após o ferimento, mas também foi observado que ocorre uma redução nos dias subsequentes, provavelmente por causa da ação do macrófago, sugerindo ser um bom regulador para essa transcrição, evitando assim possíveis complicações.

A diminuição na deposição de colágeno maduro também foi observada em um estudo, realizado em ratos, utilizando a terapia com dexametasona, um glicocorticoide sintético que promoveu a redução do RNAm para colágenos $\alpha 1$ (I) e $\alpha 1$ (III) na pele dos ratos, reduzindo os níveis de tropocolágeno, além de afetar os níveis de metaloproteinases (MMPs) e colagenases (OISHI et al., 2002). Esses glicocorticoides também podem interferir nos processos de cicatrização ao inibir o PDGF, que estimula a proliferação de fibroblastos (BEER; LONGAKER; WERNER, 1997; TENIUS; BIONDO-SIMÕES; IOSHII, 2007), prejudicando a deposição de colágeno do tipo I, conseqüentemente, comprometendo a formação de um novo tecido. Embora não tenhamos investigado diretamente a atividade das MMPs neste estudo, nossos resultados, que indicam uma redução na deposição de colágeno maduro, sugerem que o óleo de pequi pode estar modulando a remodelação tecidual por meio da influência na síntese e degradação do colágeno. Essa hipótese é corroborada por TZAPHLIDOU (2004), que demonstra que a diminuição dos níveis de colágeno pode estar relacionada à redução da síntese de pró-colágeno pelos fibroblastos, juntamente com o aumento da atividade de MMPs.

Nessa perspectiva, o óleo de pequi demonstrou ser um eficiente modulador do processo de reparação tecidual, aumentando a produção das fibras reticulares e retardando a deposição de colágeno tipo I.

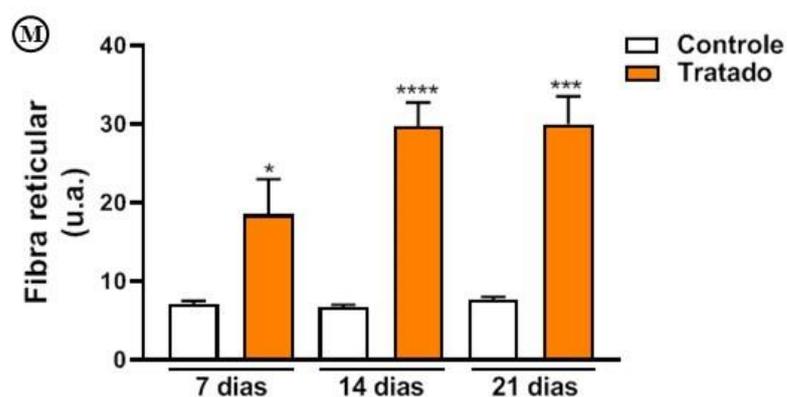
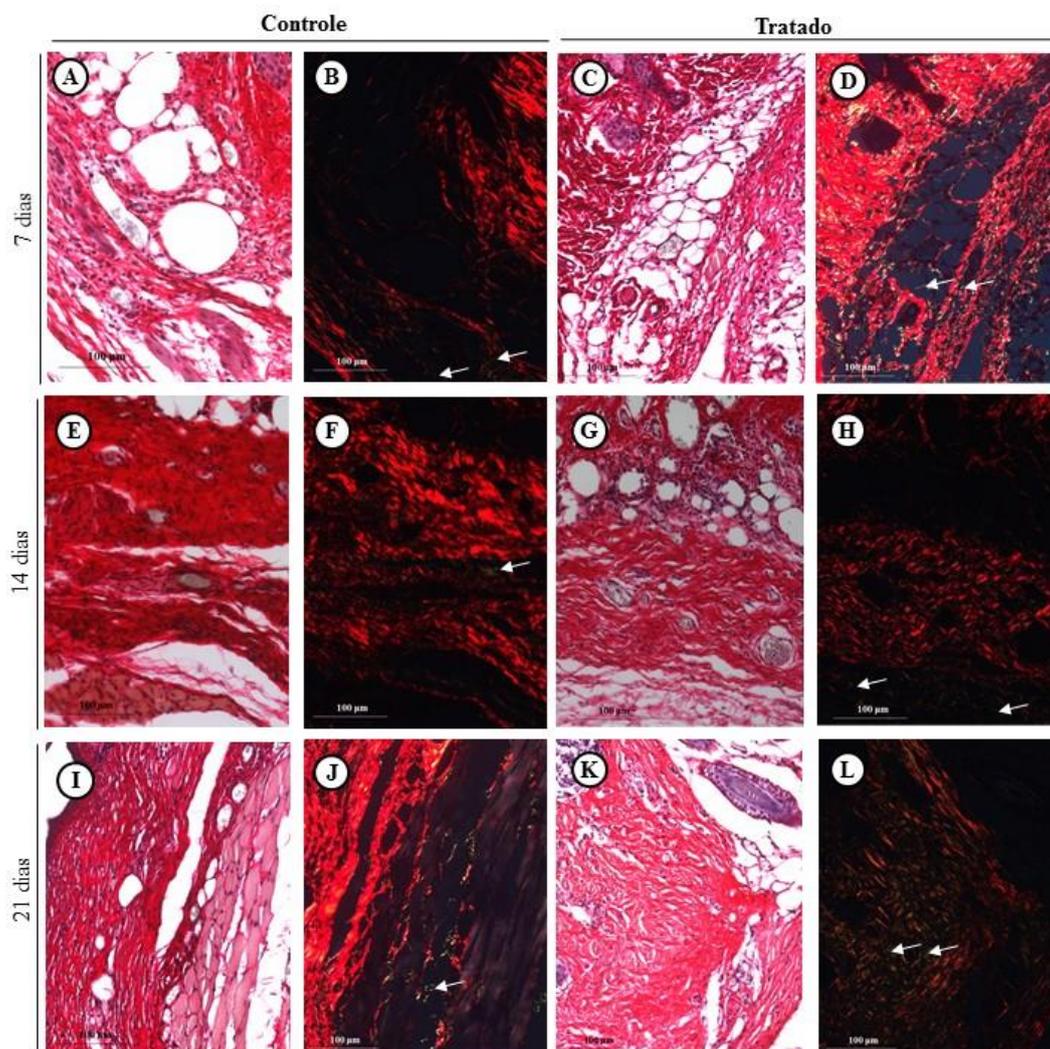


Figura 6. Imagens representativas de cortes histológicos corados com picrosírius-hematoxilina para análise da fibra reticular (verde) dos animais dos grupos Controle (n=18) e Tratado (n=18) com óleo de pequi após o período de 7, 14 e 21 dias subsequente à queimadura de segundo grau sem [A, C, E, G, I e K] e com polarização [B, D, F, H, J e L]. Aumento: 200X. Coloração: Picrosírius-Hematoxilina. Barra: 100 µm. Quantificação das fibras reticulares [M]. Os dados demonstram uma média ± S.E.M. **** $p \leq 0,0001$ versus Controle, *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$ versus Controle, utilizando o teste estatístico ANOVA

4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ANEXINA-A1

A proteína AnxA1 mimetiza a ação anti-inflamatória dos glicocorticoides, atuando diretamente na via do ácido araquidônico (FLOWER, 1988; PERRETTI; GAVINS, 2003), e inibindo o processo de diapedese dos leucócitos, principalmente das células polimorfonucleares, na parede vascular da microcirculação inflamada, por meio da clivagem das proteínas de adesão que ligam os leucócitos ao endotélio (GAVINS; HICKEY, 2012; SOLITO et al., 2000). Além disso, por ser importante na resposta inflamatória (HAYES et al., 2004), essa proteína também atua na reparação tecidual, modulando a produção de colágeno tipo III e contribuindo para o fechamento de feridas (LAI et al., 2018).

Diante dessa importância, decidimos investigar o papel da AnxA1 no processo de reparo cutâneo. Utilizamos a técnica de imunohistoquímica para analisar sua expressão nos diferentes tempos experimentais, tanto no epitélio queimado (Fig. 8A-D), quanto no epitélio conservado adjacente ao local da queimadura (Fig. 7A-F). Essas análises revelaram que a intensidade (densitometria) da expressão da proteína AnxA1 tanto no epitélio conservado (Fig. 7G), quanto no queimado (Fig. 8E), foi semelhante entre os diferentes grupos experimentais em todos os períodos analisados.

Ao analisar a quantidade de células positivas para a proteína AnxA1 no epitélio conservado, foi constatado uma porcentagem de células imunopositivas semelhantes entre os animais dos grupos Tratado e Controle em todos os períodos experimentais analisados (aproximadamente 30%), com exceção do período de 7 dias, quando houve uma menor quantidade de células imunopositivas, principalmente no grupo Tratado ($p \leq 0,05$) (Fig. 7H). Entretanto, ao quantificar as células epiteliais imunomarcadas para AnxA1 no epitélio queimado, aos 14 dias foi observado que nos animais do grupo Tratado com óleo de pequi havia uma menor quantidade desse tipo celular (aproximadamente 8%) em relação ao seu Controle (aproximadamente 15%; $p \leq 0,05$) (Fig. 8F). Já no período de 21 dias, o número de células positivas para AnxA1 no epitélio queimado da pele dos animais Tratados aumentou consideravelmente, atingindo o valor apresentado pela região de pele conservada do mesmo grupo experimental (aproximadamente 30%); enquanto, nos animais Controle de 21 dias apresentou um menor aumento (aproximadamente 22%) (Fig. 8F).

Ainda, ao analisar o epitélio conservado, observamos uma estabilidade na quantidade de células positivas para AnxA1 em torno de 30% nos grupos experimentais de 14 e 21 dias (Fig. 7F), sugerindo um padrão que pode ser utilizado como referência para analisar o epitélio queimado. A literatura apresenta poucas informações sobre a quantidade dessa proteína na pele, mas considerando o potencial anti-inflamatório da AnxA1, a partir desses dados podemos sugerir que o óleo de pequi promoveu uma evolução mais eficiente da reparação tecidual. Sob essa perspectiva, o óleo de pequi demonstrou ter um importante papel na modulação da resposta inflamatória, pois o epitélio queimado apresentou uma quantidade inferior de células imunomarcadas com AnxA1 em 14 dias. No entanto, a resolução do processo cicatricial, caracterizada pela normalização dos níveis de AnxA1, ocorreu apenas em 21 dias de tratamento (Fig. 8F), pois sua concentração estabilizou em torno de 30%, assemelhando-se ao epitélio não lesionado. Embora alguns estudos demonstrem uma variabilidade dessa proteína durante o reparo tecidual (HELENA RIBEIRO SOUZA, 2016), e outros uma maior quantidade durante a proliferação celular (GAVINS; HICKEY, 2012; LIM; PERVAIZ, 2007), nossos resultados divergem desses achados.

A menor quantidade de AnxA1 no epitélio queimado do grupo Tratado, sugere uma atenuação da inflamação e uma aceleração da restauração do epitélio. Além disso, um estudo *in vitro* mostrou que a AnxA1 atua na migração de fibroblastos (BIZZARRO et al., 2012), podendo contribuir para a deposição das fibras reticulares. Consequentemente, a correlação entre a redução da inflamação, a modulação da expressão da AnxA1 e o aumento da deposição de fibras reticulares sugere que o óleo de pequi acelera a regeneração, promovendo um reparo tecidual mais eficiente.

Embora a AnxA1 seja expressa na pele normal, por possuir função estrutural, é na pele lesionada que ela atua em diversos processos biológicos, como inflamação, angiogênese, proliferação e diferenciação celular, além de contribuir para o fechamento de lesões epiteliais (BASTIAN et al., 1993; LEONI et al., 2013; LIM; PERVAIZ, 2007). Outro trabalho (LEONI; NUSRAT, 2016) mostra que a AnxA1 regula o processo inflamatório, induzindo a produção de mediadores anti-inflamatórios e promovendo um importante papel na cicatrização de feridas. Em geral, a expressão desta proteína tende a aumentar nas fases iniciais do processo inflamatório, induzindo a redução da migração de leucócitos e reprogramação dos macrófagos, contribuindo para a resolução da inflamação

(BELVEDERE et al., 2014). É possível que, no nosso modelo experimental, esse aumento tenha ocorrido em um período anterior ao primeiro analisado. Entretanto, os dados do nosso grupo de pesquisa (não publicados) mostraram que o óleo de pequi possui um efeito anti-inflamatório em modelo de heterotransplante de pele, reduzindo a transmigração de neutrófilos do sangue e a quantidade de mastócitos para o tecido lesado, provavelmente por meio da modulação da proteína AnxA1. Dessa forma, a redução da inflamação local, promovida pelo óleo de pequi, pode explicar o motivo pelo qual a AnxA1 apresentou-se reduzida no epitélio queimado dos animais submetidos ao Tratamento com óleo de pequi (Fig. 8).

A redução na expressão da AnxA1, conforme demonstrado por outro estudo (BASTIAN et al., 1993), indica um estado cutâneo mais saudável, corroborando para hipótese central deste estudo, que é de que não há mais uma inflamação exacerbada. A redução dessa expressão nos grupos experimentais pode ser explicada pelas propriedades antioxidantes do óleo de pequi (BATISTA et al., 2010), que inibem a produção de radicais livres, reduzem a atividade de enzimas inflamatórias e modulam a expressão de genes relacionados à inflamação (BATISTA et al., 2010; VIEIRA et al., 2008).

É válido ressaltar que as propriedades terapêuticas do óleo de pequi se devem aos seus inúmeros constituintes, como os compostos fenólicos, que também contribuem para o sucesso do reparo tecidual, e os diferentes tipos de ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico (BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015; VIEIRA et al., 2008). Além disso, a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, também exerce uma potente ação antioxidante, neutralizando os radicais livres e modulando a resposta imunológica (BEZERRA; BARROS; COELHO, 2015; VIEIRA et al., 2008), podendo contribuir para redução da expressão de AnxA1 e aceleração do processo de cicatrização, pois o excesso de radicais livres pode agredir outros tecidos adjacentes e promover o aumento das respostas inflamatórias. Nesse caso, o excesso de radicais livres estimula o estresse oxidativo, o que pode prejudicar alguns eventos que ocorre na cicatrização, como a proliferação celular e a deposição de colágeno (COLSON; GRINSTAFF, 2012; NGUYEN; MOBASHERY; CHANG, 2016).

Os nossos dados sugerem que o óleo de pequi, que sabidamente atua diminuindo a inflamação local, regula a expressão da proteína AnxA1 nas células do epitélio queimado, modula tanto a fase proliferativa quanto a fase de remodelação da reparação tecidual, aumentando a espessura epitelial no local da queimadura e a deposição de fibras reticulares. Assim, em conjunto, esses resultados revelam que o óleo de pequi promove uma melhora significativa do processo de reparação tecidual, por meio da atuação nas suas diferentes etapas, demonstrando um efetivo potencial terapêutico para o tratamento de queimaduras cutâneas de segundo grau em camundongos. Então, o óleo de pequi se destaca como um agente terapêutico promissor para tratamento de queimaduras, podendo ser alvo para futuros tratamentos dermatológicos.

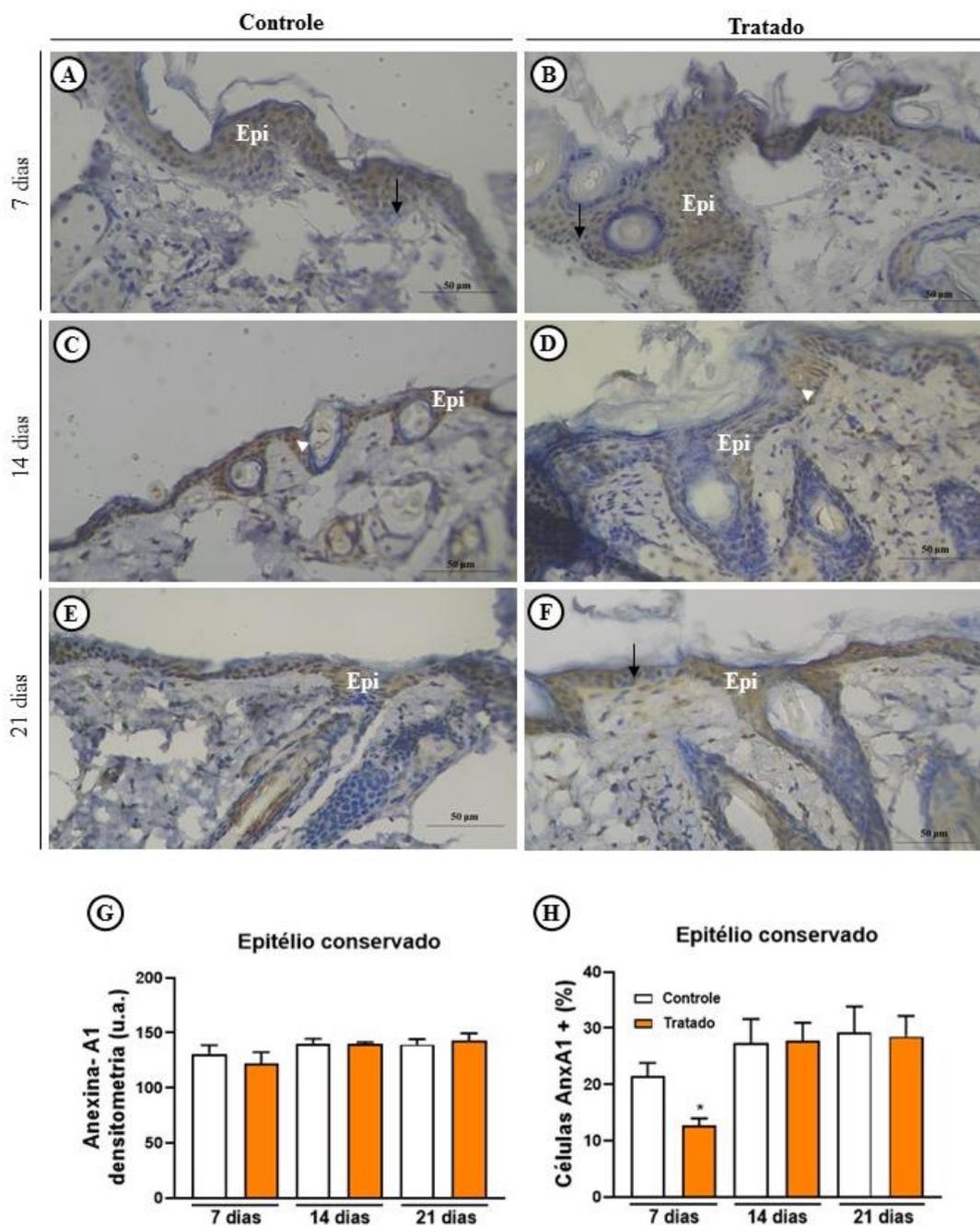


Figura 7. Imagens representativas da imuno-histoquímica para Anexina-A1 na pele conservada dos animais dos grupos Controle (n=18) e Tratado (n=18) com óleo de pequi após o período de 7, 14 e 21 dias da queimadura de segundo grau [A-F]. Aumento: 400X. Epi: epitélio; Seta: célula negativa para AnxA1; Cabeça de seta: célula positiva para AnxA1. Barra: 50µm. **Análises densitométrica [G] e quantitativa [H]** de células positivas para AnxA1 no epitélio conservado. Os dados demonstram uma média ± S.E.M. * $p \leq 0,05$ versus controle, utilizando o teste estatístico ANOVA.

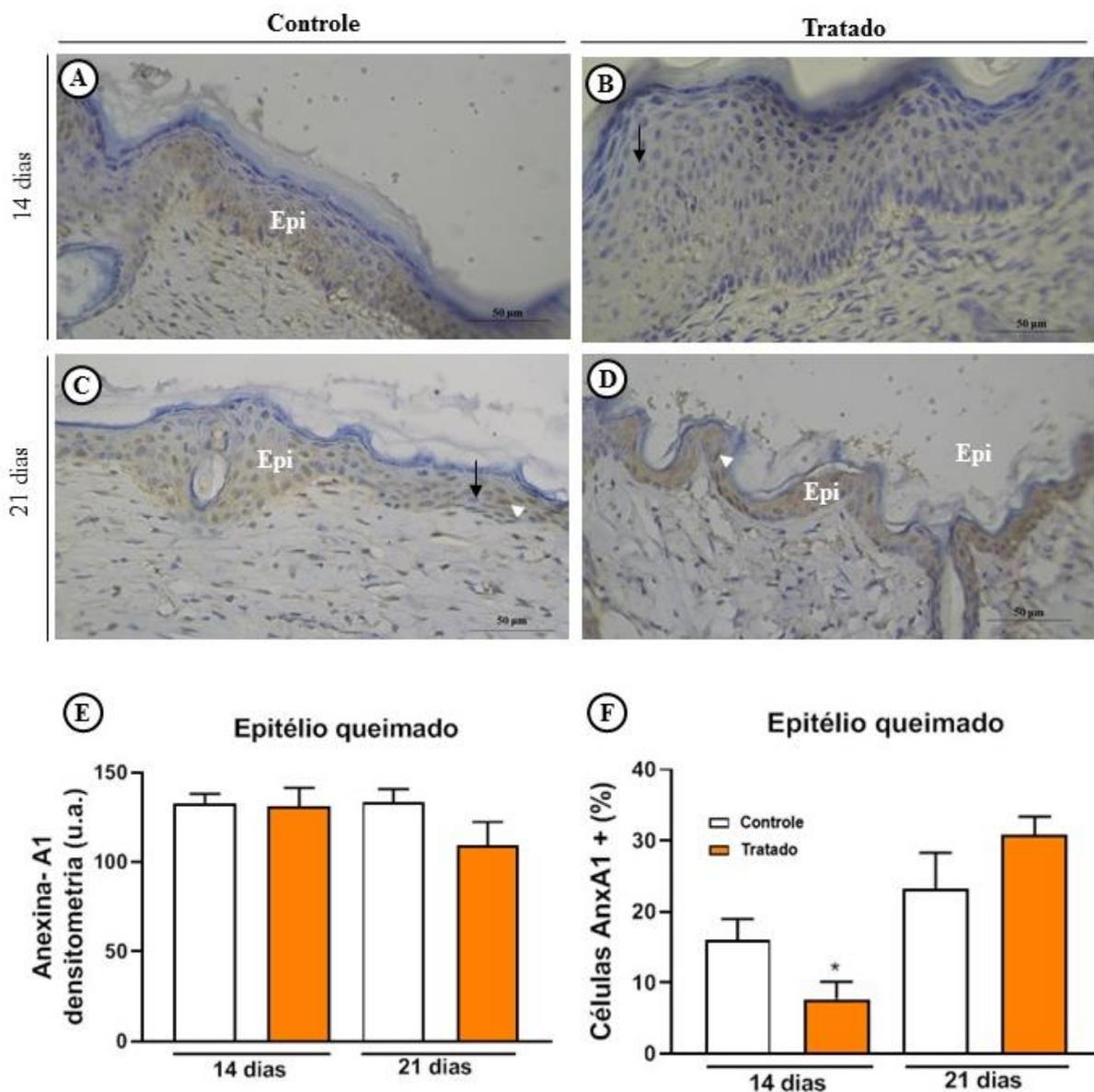


Figura 8. Imagens representativas da imuno-histoquímica para Anexina-A1 na pele queimada dos animais dos grupos Controle (n=18) e Tratado (n=18) com óleo de pequi após o período de 14 e 21 dias subsequente à queimadura de segundo grau [A-D]. Aumento: 400X. Epi: epitélio; Seta: célula negativa para Anx1; Cabeça de seta: célula positiva para Anx1. Barra: 50 μ m. **Análises densitométrica [E] e quantitativa [F]** de células positivas para Anx1 no epitélio queimado. Os dados demonstram uma média \pm S.E.M. * $p \leq 0,05$ versus controle, utilizando o teste estatístico ANOVA.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados podemos concluir que o óleo de pequi:

- Aumenta a espessura epitelial durante a reparação tecidual;
- Inibe a síntese de colágeno tipo I, mas estimula a deposição de colágeno tipo III;
- Promove a redução na quantidade de células positivas para anexina A1 no período de 14 dias e, posteriormente, essa quantidade é normalizada ao 21º dia.

Sendo assim, o óleo de pequi mostra-se promissor como produto terapêutico para acelerar o fechamento da ferida e potencializar o reparo tecidual em queimaduras cutâneas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABBIN, B. A. et al. Annexin I Regulates SKCO-15 Cell Invasion by Signaling through Formyl Peptide Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19588–19599, jul. 2006.
- BABBIN, B. A. et al. Formyl Peptide Receptor-1 Activation Enhances Intestinal Epithelial Cell Restitution through Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Activation of Rac1 and Cdc42. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8112–8121, 15 dez. 2007.
- BABBIN, B. A. et al. Annexin A1 Regulates Intestinal Mucosal Injury, Inflammation, and Repair. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5035–5044, 1 out. 2008.
- BARTOSCH, I. et al. Factors associated with mortality and length of stay in the Oporto burn unit (2006–2009). **Burns**, p. 477–482, maio 2013.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 19–37, 1 jun. 2006.
- BASTIAN, B. C. et al. Localization of annexins in normal and diseased human skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 6, n. 3, p. 225–234, dez. 1993.
- BATISTA, J. S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 441–447, 2010.
- BEDOYA, S. A. O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 147–154, fev. 2016.
- BEER, H.-D.; LONGAKER, M. T.; WERNER, S. Reduced Expression of PDGF and PDGF Receptors During Impaired Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 2, p. 132–138, ago. 1997.
- BELVEDERE, R. et al. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 961, 16 dez. 2014.
- BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 17, n. 4 suppl 2, p. 875–880, 2015.
- BIZZARRO, V. et al. Annexin A1 N-Terminal Derived Peptide Ac2-26 Stimulates Fibroblast Migration in High Glucose Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45639, 21 set. 2012.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound Healing: An Overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 1e-S-32e-S, jun. 2006.
- CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 7, p. 1341–1353, 1 abr. 2005.
- CARDIN, L. T. et al. ANXA1Ac2–26 peptide, a possible therapeutic approach in inflammatory ocular diseases. **Gene**, v. 614, p. 26–36, maio 2017.
- CARVALHO, P. G. B. DE et al. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 397–404, dez. 2006.
- CHEN, M.; PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 37, n. 4–5, p. 399–421, 2009.
- COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3878–3886, 24 jul. 2012.
- CORDEIRO, M. W. S. et al. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1127–1139, dez. 2013.

- COSTA, G. M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 31 jan. 2018.
- CROSARA-ALBERTO, D. P. et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 645–58, jul. 2002.
- CUNHA, M. G. DA; PARAVIC, F. D.; MACHADO, C. A. Histological changes of collagen types after different modalities of dermal remodeling treatment: a literature review. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 4, 2015.
- CUNHA, P. A.; ROQUE, O. R.; NOGUEIRA, M. T. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012.
- DOMBROSKI, J. L. D. et al. Métodos para a superação da dormência fisiológica de *Caryocar brasiliense* Camb. **CERNE**, v. 16, n. 2, p. 131–135, 2010.
- EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777–783, 12 set. 2010.
- FENSKE, N. A.; LOBER, C. W. Structural and functional changes of normal aging skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 571–585, out. 1986.
- FLOWER, R. J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 987–1015, 19 ago. 1988.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2º ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2003.
- GAVINS, F. N. E.; HICKEY, M. J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.
- GETTING, S. J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 6, p. 1075–1082, 3 mar. 1997.
- GOULDING, N. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **The Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1416–1418, jun. 1990.
- GOULDING, N. J. et al. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 0, p. 158–165, 4 dez. 1998.
- HAYES, M. J. et al. Annexin–Actin Interactions. **Traffic**, v. 5, n. 8, p. 571–576, 22 ago. 2004.
- HELENA RIBEIRO SOUZA. **Heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina A1 em modelo de lesão térmica de segundo grau**. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2016.
- JANE BUCKLE. **CLINICAL AROMATHERAPY: essential oils in healthcare**. 3. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, 2014.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto & Atlas**. 13º ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017.
- KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. suppl 1, p. 39–48, mar. 2005.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011.
- KIM, S. W. et al. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15712–9, 11 maio 2001.
- LAI, T. et al. Annexin A1 is elevated in patients with COPD and affects lung fibroblast function. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v.

- Volume 13, p. 473–486, 2018.
- LATARJET, J. A simple guide to burn treatment. **Burns**, v. 21, n. 3, p. 221–225, maio 1995.
- LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157–169, jan. 1994.
- LEITÃO, E. P. D. C. et al. Epidemiological study of patients hospitalized in the burn care unit of the Vila Penteado General Hospital - São Paulo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery**, v. 29, n. 2, 2014.
- LEONI, G. et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 443–454, 2 jan. 2013.
- LEONI, G.; NUSRAT, A. Annexin A1: shifting the balance towards resolution and repair. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 10, p. 971–979, 1 out. 2016.
- LESLIE BAUMANN, M.; SOGOL SAGHARI, M.; EDMUND WEISBERG, M. **Cosmetic Dermatology Principles and Practice**. 2. ed. New York: [s.n.].
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, jan. 2007.
- LIM, L. H. K.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968–975, 10 abr. 2007.
- LIMA, S. S. et al. Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 21, n. 3, p. 644–649, 29 dez. 2022.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, maio 2004.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–408, 2003.
- MATHEW-STEINER, S. S.; ROY, S.; SEN, C. K. Collagen in Wound Healing. **Bioengineering**, v. 8, n. 5, p. 63, 11 maio 2021.
- MEDHI, B. et al. Efficacy and Safety of an Advanced Formula Silicone Gel for Prevention of Post-Operative Scars. **Dermatology and Therapy**, v. 3, n. 2, p. 157–167, 20 dez. 2013.
- MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, jul. 2009.
- MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956–963, dez. 2008.
- MORAND, E. F. et al. Impaired Glucocorticoid Induction of Mononuclear Leukocyte Lipocortin-1 in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 2, p. 207–211, 9 fev. 1994.
- NASCIMENTO, W. M. et al. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*). **ConScientiae Saúde**, v. 14, n. 3, p. 449–455, 2016.
- NGUYEN, T. T.; MOBASHERY, S.; CHANG, M. Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing. In: **Wound Healing - New insights into Ancient Challenges**. InTech, 2016.
- NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1811, 12 abr. 2019.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 157–165, mar. 2005.

- OISHI, Y. et al. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. **British Journal of Dermatology**, v. 147, n. 5, p. 859–868, nov. 2002.
- OLIANI, S. M. et al. An Immunocytochemical and In Situ Hybridization Analysis of Annexin 1 Expression in Rat Mast Cells: Modulation by Inflammation and Dexamethasone. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 9, p. 1429–1438, set. 2000.
- PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 3, p. 605–610, 19 jun. 1996.
- PERRETTI, M.; GAVINS, F. N. E. Annexin 1: An Endogenous Anti-Inflammatory Protein. **Physiology**, v. 18, n. 2, p. 60–64, abr. 2003.
- QUINN, K. J. et al. Principles of burn dressings. **Biomaterials**, v. 6, n. 6, p. 369–377, nov. 1985.
- RABBERS, A. S. et al. Additive effect of pulp pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on the biocompatibility of collagen and gelatin membranes in subcutaneous implants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 811–818, jun. 2019.
- RAVAT, F. et al. La brûlure : une pathologie inflammatoire. **Pathologie Biologie**, v. 59, n. 3, p. e63–e72, jun. 2011.
- RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2631–2639, 1 jun. 2004.
- RIBEIRO, J. F. et al. Skin Collagen Fiber Molecular Order: A Pattern of Distributional Fiber Orientation as Assessed by Optical Anisotropy and Image Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54724, 2013.
- RIBEIRO, M. et al. Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 66–77, jun. 2015.
- RODERO, M. P. et al. Wound-associated macrophages control collagen 1 α 2 transcription during the early stages of skin wound healing. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 143–145, 2 fev. 2013.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Ross Histologia Texto e Atlas- Correlações com Biologia Celular e Molecular**. 7^o ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2016.
- SCHAUMBURG-LEVER, G. New applications of electron microscopy techniques in dermatopathology. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 22, n. 6, p. 483–487, 27 dez. 1995.
- SCHMID-WENDTNER, M.-H.; KORTING, H. C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 6, p. 296–302, 2006.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. v. 53, 23 dez. 2022.
- SHAW, G. et al. Vitamin C-enriched gelatin supplementation before intermittent activity augments collagen synthesis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 136–143, jan. 2017.
- SHEIKH, M.; SOLITO, E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1045, 31 mar. 2018.
- SILVA, J. M. DA et al. Analysis of macrophage subtypes and annexin A1 expression in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **New England Journal of**

- Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.
- SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 2, p. 317, fev. 2000.
- SMITH, S. F. Lipocortin 1: glucocorticoids caught in the act? **Thorax**, v. 51, n. 10, p. 1057–1059, 1 out. 1996.
- SOLITO, E. et al. Annexin 1 Binds to U937 Monocytic Cells and Inhibits Their Adhesion to Microvascular Endothelium: Involvement of the $\alpha 4\beta 1$ Integrin. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1573–1581, 1 ago. 2000.
- SOLITO, E. et al. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 2, p. 217–228, 29 maio 2001.
- SONIA M. OLIANI; CRISTIANE D. GIL. Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica / Anti-inflammatory protein annexin 1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Arq. ciênc. saúde**, p. 186–191, 2006.
- SOUZA, P. G. DE; CASTRO, M. S. DE; SILVA, L. P. DA. A Biologia Da Proliferação Fibroblástica: A Excessiva Deposição Extracelular De Colágeno Durante O Reparo De Lesões Na Pele / The Biology Of Fibroblastic Proliferation: Excessive Extracellular Collagen Deposition During Skin Injury Repair. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28989–29010, 2021.
- STRONCEK, J.; REICHERT, M. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. p. 3–38.
- TAYLOR, A. D. et al. Annexin 1 (Lipocortin 1) Mediates the Glucocorticoid Inhibition of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Stimulated Prolactin Secretion*. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 2209–2219, 1 jun. 2000.
- TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. DE L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 141–149, abr. 2007.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589–595, set. 2006.
- TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37, n. 1, p. S5–S12, abr. 2006.
- TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 173–177, abr. 2004.
- VALE, E. C. S. DO. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 9–19, fev. 2005.
- VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65, 15 jul. 2008.
- YANG, Y.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. F. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 7, p. 1538–1544, jul. 1999.
- ZAGUE, V. Influência da suplementação com colágeno hidrolisado no metabolismo da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos dérmicos humanos derivados de áreas fotoprotetida e fotoexposta, cultivados em monocamada e equivalente dérmico. São Paulo: Universidade de São Paulo, 29 set. 2015.
- ZUCOLOTTI, T. E. et al. Cicatrização de feridas: uma revisão sob o escopo cirúrgico. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 31210–31220, 12 dez. 2023.

7. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO COMITÊ DE ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS DO ARAGUAIA (CEUA-Araguaia)

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.010533/2022-11, do Projeto intitulado “Estudo do potencial anti-inflamatório e cicatrizante do óleo de pequi em queimaduras de pele em camundongos Balb-c”, sob a responsabilidade de **Ketlyn Cristina Rodrigues Strutz** e **Sérgio Marcelino de Oliveira** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Araguaia (Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT / Campus do Araguaia), em reunião ordinária de **01/04/2022**.

CERTIFICATE

We certify that the Protocol Nº 23108.010533/2022-11, related to the Project entitled “Evaluation of the anti-inflammatory and healing action of pequi oil on skin burns in Balb-c mice”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This Project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Araguaia (Federal University of Mato Grosso – UFMT / Campus of Araguaia) in reunion at **04/01/2022**.

Barra do Garças, 01 de Abril de 2022.

Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos

Presidente do CEUA-Araguaia

Portaria CONSEPE no. 07/PROPEq/2020