

CLAUDIA CRISTINA ALVES PEREIRA

**Influência de dieta enteral suplementada com
arginina e antioxidantes sobre a cicatrização cutânea
experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani

São Paulo

2006

**Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo
propósito debaixo do céu.**

**Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e
tempo de colher o que se plantou...**

Eclesiastes 3:1,2

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Everaldo,
que amo tanto, por ser meu companheiro e amigo. Durante todos esses anos juntos, sempre estive presente no desenvolvimento desse projeto e nunca deixou de me incentivar e apoiar nas dificuldades encontradas para obter o sucesso em mais essa etapa de nossas vidas.

Aos meus pais Edvaldo e Neuza,
exemplos de simplicidade e perseverança. Ensinaram-me a nunca desistir de um sonho mesmo diante das dificuldades que a vida nos traz.

Karen, Júnior e Luciana,
meus queridos irmãos. Eu os amo muito.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A DEUS,

pela oportunidade e capacitação para alcançar o sucesso.

A Ti toda honra, glória e o louvor para todo o sempre.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg,
meu orientador que admiro muito. Através de seus ensinamentos, competência, seriedade e ética nos ensina a sermos mais que simples pesquisadores. Obrigada pelo empenho, dedicação e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani,
co-orientadora no desenvolvimento dessa tese, pelo apoio, confiança, sugestões e críticas que muito enriqueceram a qualidade científica desse projeto.

Dr. Victor Arias e Profa. Dra. Angela Flávia Logullo,
pelo apoio, sugestões e sabedoria em compartilhar seus conhecimentos de anatomia-patológica.

Prof. Dr. Daniel Gianella,
por conceder a oportunidade de desenvolver as análises de expressão gênica em seu Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas (LIM 25) da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da FMUSP.

Profa. Dra. Thaís Mauad e Prof. Dr. Luiz Fernando Burns,
por disponibilizar o analisador de imagens do Departamento de Patologia da FMUSP e auxiliar as análises histológicas do colágeno.

Raquel S. M. M. Torrinhas,
bióloga, coordenadora do laboratório Metanutri, que admiro por sua
competência como pesquisadora e por demonstrar sua amizade e apoio nos
momentos difíceis na execução dessa tese.

Aos pesquisadores do Laboratório Metanutri,
Graziela Ravacci, Camila Marques, Thiago Manzoni Jacintho, Lilian Mika
Horie, e Letícia De Nardi pelas sugestões e incentivo nos momentos de
dificuldades e pelos inúmeros momentos de alegria.

Patrícia B. Macedo (Paty),
que me auxiliou e se dedicou de forma extremamente responsável e
carinhosa durante o desenvolvimento experimental com os animais.

A Elaine Muniz da Silva,
secretária do Metanutri, que permaneceu no apoio administrativo durante o
desenvolvimento desse projeto.

Dr. Pedro Luiz Bertevello,
pelo ensinamento prático da técnica cirúrgica de gastrostomia.

Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro,
pelo apoio e sugestões na fase inicial desse projeto.

Teresa Cristina Costa Barretto,
pelo apoio na padronização e desenvolvimento das dietas AIN93.

Luciana, Renata, Amanda e Natalie Caroline,
acadêmicas de biologia e nutrição, pela ajuda durante a padronização dos
métodos experimentais.

Suely Nonogaki,
profissional competente, que nos ajudou na padronização e confecção das
reações de imunistoquímica dos miofibroblastos.

Prof. Dr. Ricardo Giorgi, Angela e Patrícia,
pesquisadores do LIM 25, que foram extremamente acolhedores e
fundamentais para o ensinamento das técnicas de expressão gênica.

Dra. Maria Lucia Hirata Katayama,
pela freqüente disponibilidade em discutir os resultados obtidos de
expressão gênica e pelas valiosas sugestões sempre pertinentes.

Elizangela,
secretária da pós-graduação do Departamento de Oncologia da FMUSP,
pela atenção, dedicação e disponibilidade.

Empresa Support,
pela fornecimento das dietas enterais utilizadas no projeto e pelo apoio
técnico-científico.

Numico Research,
pelo auxílio que possibilitou a execução desse trabalho.

FAPESP,
pelo apoio na concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 05/54185-5).

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO 02

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processo de Cicatrização de Feridas 05

2.2. Nutrição e Cicatrização 18

3. JUSTIFICATIVA 29

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral 31

4.2. Objetivos Específicos 31

5. MÉTODOS

5.1. Local das Atividades Experimentais	33
5.2. Planejamento Experimental	33
5.3. Animais	35
5.4. Adaptação ao ambiente da pesquisa	35
5.5. Procedimentos Experimentais	37
5.5.1. Desnutrição	37
5.5.2. Procedimentos Cirúrgicos	38
5.5.2.1. Anestesia	38
5.5.2.2. Gastrostomia	38
5.5.2.3. Lesão Cutânea Dorsal	42
5.6. Grupos Experimentais	43
5.6.1. Nutrição Pós-Trauma	45
5.7. Monitorização dos Animais	49
5.7.1. Administração por Via Gastrostomia e Ingestão Alimentar	49
5.7.2. Variação Percentual de Peso Corpóreo Pós-Trauma	50
5.8. Coleta de Tecido e Sacrifício dos Animais	51
5.9. Medida da Área Digitalizada da Lesão Cutânea	52
5.10. Análise Histológica e Imunoistoquímica	54
5.10.1. Avaliação Microscópica do Tecido de Granulação	54
5.10.1.1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina	55

5.10.1.2. Coloração pelo Picrossírius	56
5.10.1.3. Método Imunoistoquímico para Avaliação dos Miofibroblastos	57
5.11. Análises de Biologia Molecular	58
5.11.1. Extração de RNA Total	58
5.11.2. PCR em Tempo Real	59
5.12. Análise Estatística	62
6. RESULTADOS	65
7. DISCUSSÃO	101
8. CONCLUSÕES	123
9. REFERÊNCIAS	126

ANEXOS

APÊNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
β-Actina	beta actina
μg	micrograma
<	menor que
=	igual
>	maior que
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
Ct	threshold cycle
Depec	dietildicarbonato
DNA	ácido dexoxiribonucleico
dp	desvio padrão
Dr	doutor
ed.	edição
et al	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	grama
h	horas
HE	hematoxilina e eosina
kcal	quilocaloria
kg	quilograma
KGF	fator de crescimento do queratinócito

LIM	Laboratório de Investigação Médica
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
ml/h	mililitro por hora
ng	nanograma
nm	nanômetro
°C	grau celsius
p.	página
PCR	reação em cadeia de polimerase
PDGF α	fator de crescimento derivado das plaquetas alfa
PT	pós-trauma
q-PCR	reação em cadeia de polimerase quantitativa
rev	revista
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	rotação por minuto
TGF β	fator de crescimento transformador beta
T _m	temperatura de Melt
UA	unidade arbitrária
UNICAMP	Universidade de Campinas
v.	volume
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta oral padrão formulada para ratos adultos	36
Tabela 2	Grupos Experimentais	44
Tabela 3	Velocidade e volume de administração enteral no período pós-trauma	46
Tabela 4	Composição das dietas enterais industrializadas administradas por via gastrostomia	47
Tabela 5	Protocolo utilizado nas reações de real-time	60
Tabela 6	Seqüência de oligonucleotídeos utilizados na expressão gênica	61
Tabela 7	Comparação das médias e desvios padrão da oferta e ingestão de calorias e nitrogênio no período PT	66
Tabela 8	Comparação das médias e desvios padrão da oferta e ingestão de arginina e nutrientes antioxidantes no período PT	67
Tabela 9	Médias e desvios padrão da variação percentual de perda de peso no 14 ^o dia pós-trauma	68
Tabela 10	Médias e desvios padrão da porcentagem de fechamento da ferida cutânea	69

Tabela 11	Alterações de epitelização e espessura encontradas no 7º e 14º dias pós-trauma	72
Tabela 12	Alterações presentes na derme (recomposição, presença de fibroblastos ou fibrócitos e qualidade do núcleo dos fibroblastos) no 7º e 14º dias PT	75
Tabela 13	Alterações da intensidade do infiltrado inflamatório no 7º e 14º dias pós-trauma	76
Tabela 14	Médias e desvios padrão dos valores de vascularização no 7º e 14º dias pós-trauma	77
Tabela 15	Médias e desvios padrão dos valores da contagem de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) no 7º e 14º dias PT	79
Tabela 16	Médias e desvios padrão da quantidade de colágeno total	81
Tabela 17	Alterações da expressão imunoistoquímica de miofibroblastos no 7º e 14º dias pós-trauma	85
Tabela 18	Médias e desvios padrão da expressão gênica do TGF-β ..	86
Tabela 19	Médias e desvios padrão da expressão gênica do VEGF ..	88
Tabela 20	Médias e desvios padrão da expressão gênica do PDGF ...	90
Tabela 21	Médias e desvios padrão da expressão gênica do KGF	92

Tabela 22	Médias e desvios padrão da expressão gênica do colágeno tipo 3	94
Tabela 23	Médias e desvios padrão da expressão gênica do colágeno tipo 1	96
Tabela 24	Resumo dos resultados obtidos na presente pesquisa	98
Tabela 25	Resumo dos resultados obtidos na presente pesquisa	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dinâmica dos eventos celulares e bioquímicos do processo de cicatrização cutânea	07
Figura 2	Eventos celulares envolvidos nas diferentes fases da cicatrização	17
Figura 3	Representação do metabolismo da arginina	23
Figura 4	Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no decorrer do projeto	34
Figura 5	Passagem do cateter pela parede muscular abdominal	40
Figura 6	Tunelização do cateter para região retroauricular	40
Figura 7	Abertura na região do corpo gástrico	40
Figura 8	Inserção e sutura do cateter no estômago	40
Figura 9	Fixação do estômago na parede abdominal após gastrostomia	40
Figura 10	Aspecto final do animal após gastrostomia e sutura da peça metálica	40
Figura 11	Gaioleiro metabólico e bombas de infusão	41
Figura 12	Animal com swivel em gaioleiro metabólico individual.....	41

Figura 13	Lesão cutânea dorsal e respectivas identificações	42
Figura 14	Exemplo de silhueta desenhada para padronizar a captação de imagens	53
Figura 15	Mesa com suporte para câmara fotográfica digital	53
Figura 16	Aspecto microscópico do tecido de granulação, no 7º dia pós-trauma	80
Figura 17	Aspecto microscópico do tecido de granulação, no 14º dia pós-trauma	80
Figura 18	Identificação do colágeno total. Pele de rato nutrido controle	83
Figura 19	Identificação do colágeno total no tecido de granulação de rato previamente desnutrido	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagem de fechamento da ferida cutânea	70
Gráfico 2	Colágeno total nos diferentes grupos experimentais	82
Gráfico 3	Médias e desvios padrão da expressão gênica do TGF-beta	87
Gráfico 4	Médias e desvios padrão da expressão gênica do VEGF	89
Gráfico 5	Médias e desvios padrão da expressão gênica do PDGF	91
Gráfico 6	Médias e desvios padrão da expressão gênica do KGF	93
Gráfico 7	Médias e desvios padrão da expressão gênica do colágeno tipo 3	95
Gráfico 8	Médias e desvios padrão da expressão gênica do colágeno tipo 1	97

RESUMO

Pereira CCA. Influência de dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes sobre a cicatrização cutânea experimental [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 183p.

Introdução: Arginina e antioxidantes estão associados à melhora funcional de cicatrização. Formulação enteral suplementada com arginina e antioxidantes tem sido proposta para corrigir déficit nutricional e garantir substratos ideais para uma boa cicatrização. Ainda não existem informações disponíveis sobre os possíveis mecanismos envolvidos. **Objetivo:** Avaliar o efeito da nutrição enteral suplementada com arginina e antioxidantes sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos nutridos e previamente desnutridos, em termos de avaliação morfo-estrutural, bioquímica e biologia molecular. **Método:** Ratos isogênicos, machos, adultos com peso entre 250 a 350 g, foram divididos aleatoriamente em seis grupos. Três grupos foram mantidos nutridos com alimentação com dieta padrão AIN-93M e três grupos foram submetidos ao regime de desnutrição por 14 dias, com perda de peso corpóreo entre 12 e 15% em relação ao peso corpóreo inicial. Após esse período, os grupos de ratos nutridos e os previamente desnutridos, foram submetidos à lesão cutânea dorsal padronizada e gastrostomia. A seguir, os ratos receberam aleatoriamente dieta por via oral, dieta enteral padrão ou dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes por via gastrostomia, durante 14 dias pós-trauma (PT). A área da lesão cutânea no dia do trauma, no 7º e 14º dias PT foram medidas por fotografia digital. No 7º e 14º dias PT, em tecido de granulação

cicatricial, por meio de análise histológica, foram avaliadas as variáveis reepitelização, infiltrado inflamatório, recomposição da derme, quantificação do colágeno total e miofibroblastos (imunoistoquímica). Amostras do tecido de granulação, retiradas no 7º dia PT, foram submetidas à análise de expressão gênica de fatores de crescimento (TGF-beta, KGF, PDGF, VEGF) e colágenos (tipo I e III). **Resultados:** Ratos nutridos apresentaram maior fechamento da lesão cutânea quando comparados aos previamente desnutridos, no 7º e 14º dias PT, independente dos diferentes tipos de dieta administrados por via gastrostomia. No 14º dia PT, ratos nutridos apresentaram maior reepitelização, intensidade de infiltrado inflamatório e recomposição da derme, quando comparados aos ratos previamente desnutridos, independente da oferta de dieta por via oral, dieta enteral padrão e suplementada. Ratos nutridos e previamente desnutridos, no 7º e 14º dias PT, não apresentaram diferença na quantidade de colágeno total e miofibroblastos, independente do tipo de dieta enteral administrada por via gastrostomia. No 7º dia PT, ratos nutridos apresentaram aumento na expressão gênica dos fatores de crescimento TGF-beta e KGF e colágenos I e III, quando comparados aos ratos previamente desnutridos, independente da dieta enteral administrada por via gastrostomia. **Conclusões:** 1 - Com estado nutricional mantido, a cicatrização ocorre de maneira adequada, independente da dieta oral, enteral padrão ou suplementada. 2- A desnutrição retarda a cicatrização em termos de epitelização, recomposição da derme e contração da ferida cutânea, independente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada. 3- Após uma semana de

trauma cutâneo, a expressão gênica de fatores de crescimento ligados à cicatrização apresentaram-se alterados em virtude da desnutrição prévia, e não foram revertidos independentemente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada. 4- Após uma semana de trauma cutâneo, a expressão gênica dos colágenos tipo I e III ligados à cicatrização apresentaram-se alterados em virtude da desnutrição prévia, e não foram revertidos independentemente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada.

Descritores: Cicatrização de feridas, Nutrição enteral, Arginina, Antioxidantes, Substâncias de crescimento, Colágeno, Expressão gênica, Ratos endogâmicos Lew.

SUMMARY

Pereira CCA. Influence of enteral diet supplemented with arginine and antioxidants on experimental cutaneous wound healing. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 183p.

Introduction: Arginine and antioxidants are associated with functional enhancement of healing. Arginine and antioxidants supplemented enteral formulas have been used to revert nutritional deficits and to guarantee substrates to ideal healing. The possible mechanisms involved have not been totally elucidated. **Objective:** To examine the effect of enteral nutrition supplemented with arginine and antioxidants on cutaneous wound healing process in nourished and previously malnourished rats in morphological structural, biochemical and molecular analyses. **Methods:** Isogenic rats, male, adults, weighting 250 to 350 g, were divided in six groups. Three groups were maintained nourished with oral diet AIN-93 and three groups were submitted to malnutrition process for 14 days, with 12 to 15% of body weight loss. Nourished and previously malnourished groups were submitted to dorsal cutaneous wound and gastrostomy. The rats received oral diet, standard enteral diet or enteral diet supplemented with arginine and antioxidants through gastrostomy during 14 days post trauma (PT). The cutaneous wound area on day of trauma, 7th and 14th days post-trauma were calculated. At 7th and 14th day, histological variables (re-epithelization, inflammatory infiltrate, dermal recomposition and total collagen quantification) and myofibroblasts were analyzed at granulation tissue. Growth factors (TGF-beta, KGF, PDGF and VEGF) and collagens (type I and III) gene

expression analyses were performed at samples from the granulation tissue.

Results: Nourished rats showed higher contraction of cutaneous wound when compared with previously malnourished rats, on 7th and 14th days post trauma (PT) independent of different enteral diet administered through gastrostomy. On 14th day PT, nourished rats showed higher re-epithelization, inflammatory infiltrate intensity and dermal recomposition when compared to previously malnourished rats, independent of physiologic solution, standard enteral diet and supplemented enteral diet with arginine and antioxidants. Total collagen quantification and myofibroblasts semi-quantification, did not show any significant difference, independent of the enteral diet type, administered through gastrostomy in nourished and previously malnourished rats, at 7th and 14th days PT. Nourished rats showed higher levels of TGF-beta, KGF, collagen type I and III gene expression when compared to previously malnourished rats, independent of the enteral diet type administered through gastrostomy at the 7th day PT.

Conclusions: 1- Adequate healing process occurs with the maintenance of nutritional status, independent of the feeding of a oral diet, standard enteral diet or supplemented enteral diet with arginine and antioxidants, 2- Previous malnutrition state slower re-epithelization, dermal recomposition and contraction, independent of refeeding with oral diet, standard enteral diet or supplemented enteral diet with arginine and antioxidants refeeding. 3- Previous malnutrition reduce the levels of growth factors gene expression involved on wound healing, independent of refeeding with oral diet, standard enteral diet or supplemented enteral diet with arginine and antioxidants after

seven days post-trauma. 4- Previous malnutrition reduce the levels of collagens type I and III gene expression involved on wound healing, independent of refeeding with oral diet, standard enteral diet or supplemented enteral diet with arginine and antioxidants after seven days post-trauma.

Descriptors: Wound healing, Enteral nutrition, Arginine, Antioxidants, Growth substances, Collagen, Gene expression, Rats Inbred Lew.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Na prática clínica, a oferta de nutrientes pode ocorrer por via oral, enteral e parenteral. Nos últimos anos houve importante desenvolvimento de formulações nutricionais especializadas para atender necessidades particulares de órgãos e sistemas, disponíveis sob a forma de suplementos orais ou formulações para uso por sondas enterais. Dentre elas, encontram-se fórmulas hiperprotéicas, enriquecidas de arginina e nutrientes antioxidantes como zinco, selênio, vitamina C e E, desenhadas para atender as necessidades decorrentes do processo cicatricial e otimizar o seu desenvolvimento (Desneves et al., 2005).

Entre as condições envolvidas na cicatrização estão os ferimentos com perda de substância e as úlceras por pressão. As primeiras, geralmente decorrentes de trauma físico, ocorrem em indivíduos até então hígidos, enquanto as úlceras por pressão acometem indivíduos restritos ao leito, portadores de doenças crônico-degenerativas e na maioria das vezes com distúrbios nutricionais. Ambas as condições implicam em instituir adequado aporte de macro e micronutrientes para lograr cicatrização ótima (Phillips, 2000).

A ferida não cicatrizada pode se tornar colonizada ou infectada e constituir fonte de morbidade e mortalidade (Orgill e Demling, 1988; Roberts et al., 1998). Em situações clínicas adversas, a inflamação tecidual de grandes proporções pode, via liberação desenfreada de mediadores locais e sistêmicos, iniciar mudanças fisiológicas e metabólicas responsáveis pela

síndrome da resposta inflamatória sistêmica e evoluir para disfunção múltipla de órgãos (Orgill e Demling, 1988; Thornton et al., 1997; Roberts et al., 1998; Clark et al., 2000).

Para que a ótima cicatrização ocorra, deve existir um conjunto de condições que incluem boa perfusão tecidual, ausência de debris, sistema imunológico e fibroblástico eficientes e, em pacientes cirúrgicos, adequada técnica cirúrgica (Phillips, 2000; Moreira, 2000).

A intensidade do reparo da ferida guarda relação direta com as necessidades de energia e proteína. A deficiência de proteína, potencialmente presente nas condições de trauma como queimadura, fratura, incisão cirúrgica e contusão grave, prejudica o processo de cicatrização, favorecendo maior risco de infecções (Peacock, 1960; Modolin et al., 1982, 1984). Fisiologicamente, a depleção protéica no processo cicatricial prolonga a fase inflamatória e prejudica a fibroplasia. Ocorre diminuição da proliferação fibroblástica, angiogênese, produção de colágeno e, conseqüentemente, menor reparo tecidual da ferida (Pollack, 1979; Stadelmann et al., 1998; Scholl e Langkamp-Henken, 2001).

É de interesse atender às necessidades nutricionais adequadas para recuperar ou manter o estado nutricional do paciente, para que não haja comprometimento do processo cicatricial por ausência de nutrientes específicos (Ruberg, 1984).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Processo de Cicatrização de Feridas

O processo de cicatrização representa resposta imediata e dinâmica do organismo à lesão tecidual com o objetivo de restaurar a continuidade anatômica, estrutural e funcional (Barbul, 1990b; Thornton et al., 1997).

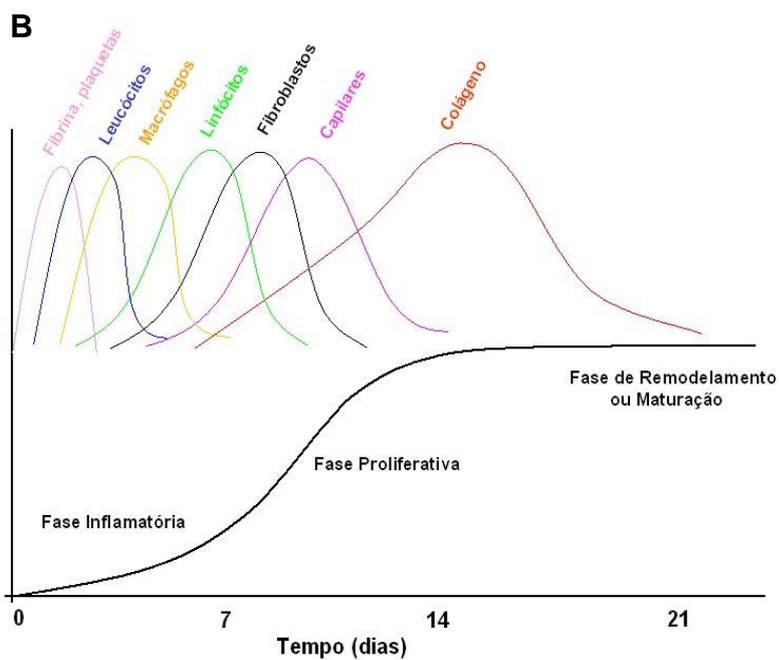
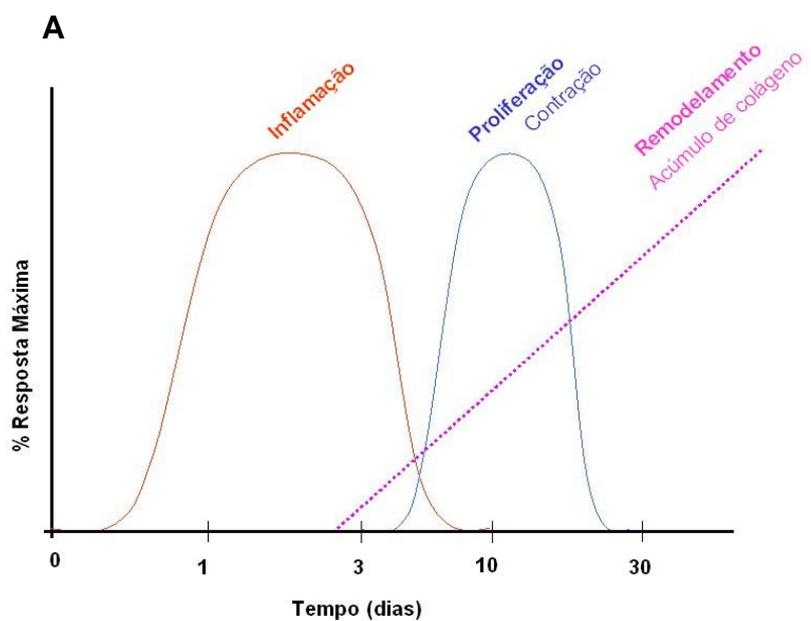
Após dano tecidual, o tecido conjuntivo cutâneo reage de maneira integrada e complexa para o seu reparo (Singer e Clark, 1999; Phillips, 2000).

Sob ponto de vista histológico, o processo cicatricial pode ser definido como a substituição do tecido lesado por um tecido conjuntivo fibroso, que no seu estado permanente formará uma cicatriz, com preservação da estrutura e função do tecido normal (Diegelmann, 1997). Para que isso ocorra, é necessária a participação de cadeia complexa de eventos celulares e bioquímicos, coordenada e sinalizada por citocinas e fatores de crescimento que promovem a interação entre células (Gillitzer e Goebeler, 2001; Efron et al., 2001).

Embora os eventos envolvidos na cicatrização ocorram de forma dinâmica, do ponto de vista morfológico é possível separá-los seqüencialmente em fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Witte e Barbul, 1997) (Figura 1). A fase inflamatória é caracterizada pela participação ativa de células do sistema imune, para contenção de microorganismos na ferida, segue-se proliferação de fibroblastos e formação

de capilares, que constitui a fase proliferativa. O depósito de colágeno na ferida, constituindo a fase de remodelamento. As diferentes fases da progressão morfológica da cicatrização encontram-se esquematizadas na figura 1.

Figura 1 - Dinâmica (A) e eventos celulares e bioquímicos (B) das três fases que compreendem o processo de cicatrização cutânea (adaptado de Regan e Barbul, 1994; Singer e Clark, 1999).



Fase Inflamatória

A fase inflamatória começa logo após a ruptura dos vasos sanguíneos locais, com extravasamento dos constituintes do sangue e formação de coágulo. A formação de coágulo, com participação ativa de plaquetas é importante elemento na cicatrização, ao determinar hemostasia e contribuir para a junção das bordas da ferida e formação de matriz extracelular (MEC) provisória, na qual fibroblastos e células endoteliais se aglomeram. Após a formação do coágulo, ocorre retração até quase metade do seu tamanho, levando à aproximação das extremidades dos vasos sanguíneos, o que minimiza a perda de sangue (Falanga et al., 1988; Singer e Clark, 1999; Lorena et al., 2002). Além disso, as plaquetas produzem substâncias quimiotáticas e fatores de crescimento envolvidos na proliferação celular, que ativam macrófagos e fibroblastos (Witte e Barbul, 1997; Stadelmann et al., 1998; Lorena et al., 2002). Um deles é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que é quimioatraente para neutrófilos e macrófagos e potente mitógeno para fibroblastos (Hudson-Goodman et al., 1990). O PDGF, experimentalmente, age como potente estimulante na formação de tecido de granulação (Steenfos et al., 1989), aumenta o influxo de macrófagos extracelulares e o depósito de glicosaminoglicanos em feridas (Pierce et al., 1991).

Minutos após o início do trauma, neutrófilos migram para o local da ferida. Os neutrófilos caracterizam-se por ser a primeira linha de defesa celular contra infecções (Springer, 1994; Thornton et al., 1997) e agir na área

da ferida destruindo os microorganismos por fagocitose e liberação de enzimas hidrolíticas. Os neutrófilos também são fontes de citocinas pró-inflamatórias que podem ser sinalizadores precoces na ativação de fibroblastos e queratinócitos (Brown, 1995).

Em resposta a agentes quimiotáticos, como proteínas da MEC e fatores de crescimento, os monócitos circulantes chegam posteriormente ao local da lesão, marginalizam-se nos capilares e nas vênulas, migram através do endotélio e diferenciam-se em macrófagos (Bouissou et al., 1988; Knighton e Fiegel, 1989; Clark et al., 2000). Os macrófagos fagocitam células danificadas e mortas, bem como antígenos estranhos. A ativação de macrófagos coordena a liberação de citocinas, que influem na angiogênese e fibroplasia e desencadeiam a síntese de óxido nítrico que possui diversas funções incluindo propriedades antimicrobianas (Phillips, 2000). Além disso, macrófagos produzem e liberam fatores de crescimento que controlam a formação do tecido de granulação, estimulam a proliferação de células mesenquimais e a migração e proliferação de fibroblastos, produzem proteases que digerem a fibrina e o colágeno desvitalizado e removem os neutrófilos, dando lugar à proliferação celular (Martin, 1997; Singer e Clark, 1999). Ambos elementos celulares, neutrófilos e monócitos, são recrutados a partir do sangue circulante em resposta à mudanças moleculares na superfície das células endoteliais (Stadelmann et al., 1998).

A reepitelização da ferida tem início aproximadamente um ou dois dias após o trauma. As células da epiderme próximas ao local da lesão começam a proliferar, migrar e se diferenciar das células epiteliais. A própria ausência

de células vizinhas na margem da ferida pode ser um sinal para que a migração e proliferação de células epidermais ocorram (Lorena et al., 2002), mas existe ainda a liberação local de fatores de crescimento específicos. Dentre estes, destacam-se o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e aumento de seus receptores (Martin, 1997).

O KGF parece agir estimulando a reepitelização, ao apresentar papel mediador nas interações epitélio-mesênquima. Exerce potente efeito mitogênico sobre diferentes tipos de células epiteliais e pode proteger essas células de vários insultos. Devido às propriedades descritas, o KGF apresenta funções protetoras, pois participa no processo de reparo de diversos tecidos e órgãos (Werner, 1998; Wearing e Sherratt, 2000; Auf Demkeller et al., 2004).

As citocinas interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) regulam a expressão gênica do KGF nos fibroblastos. As isoformas KGF-1 e KGF-2, em conjunto com a interleucina 6 (IL-6), auxiliam a proliferação, migração e diferenciação dos queratinócitos para o interior da lesão (Smola et al., 1993; Xia et al., 1999).

Os queratinócitos presentes na margem da lesão são células responsáveis pela reepitelização. Para que o processo de reepitelização inicie, é necessária a passagem de queratinócitos através do coágulo de fibrina e sua presença entre a interface do coágulo com a derme normal. Para favorecer essa passagem é necessária a degradação da barreira de fibrina por meio da ação de enzimas proteolíticas. Nesta condição, a

principal enzima proteolítica é a plasmina, derivada do plasminogênio interiorizado no coágulo. No entanto, as metaloproteinases (MMP) presentes na MEC também podem clivar proteínas específicas da matriz. Um exemplo é a MMP-1, que degrada especificamente colágenos e, provavelmente, pode auxiliar a proliferação de queratinócitos, pela redução dos colágenos I e III degradados no local de adesão ao substrato dérmico. Os queratinócitos basais que migraram para a área desprovida de lâmina basal regulam a secreção de MMP-1 (Saarialho-Kere, 1994).

A reepitelização segue com o reaparecimento de proteínas da membrana basal a partir das margens para o interior da área lesada. As células da epiderme retornam ao seu fenótipo normal, desde que novamente fixadas para restabelecer a membrana basal e a base da derme (Singer e Clark, 1999; Lorena et al., 2002).

A partir do momento em que a superfície da ferida é recoberta por uma camada de queratinócitos, a migração celular da epiderme é bloqueada e ocorre o restabelecimento da lâmina basal a partir das margens em direção ao centro da ferida (Werner et al., 1998).

A regulação da fase inflamatória é fundamental para organizar todo o processo cicatricial e impedir a proliferação e disseminação descontrolada de microorganismos na ferida e a hiper-inflamação que, por sua vez, pode desencadear graves conseqüências para a função do órgão acometido (Thornton et al., 1997).

Fase Proliferativa / Fibroplasia

Durante a fase proliferativa ocorre secreção de fatores de crescimento que estimulam a migração dos fibroblastos, mobilizam a infiltração de células inflamatórias para o local da lesão e fazem com que células epiteliais iniciem seu crescimento a partir das bordas da ferida (Witte et al., 1997; Stadelmann et al., 1998).

Os fibroblastos são derivados de células mesenquimais, particularmente aquelas associadas ao revestimento externo dos vasos sanguíneos. Eles proliferam após terem sido estimulados por fatores de crescimento e citocinas produzidas inicialmente por plaquetas, macrófagos e linfócitos e migram para o interior da ferida e participam da formação de tecido de granulação. Constituem o principal elemento celular no processo de reparo cicatricial, atingindo o pico de proliferação no 7º dia pós-trauma (Regan et al., 1994). Os fibroblastos são responsáveis ainda pela síntese, deposição e remodelamento da MEC (Singer e Clark, 1999) e pela produção da maioria das proteínas estruturais usadas durante a reconstrução tecidual. Produzem alguns componentes da matriz incluindo a fibronectina, ácido hialurônico e glicosaminoglicanas e elastina, principal proteína constituinte das fibras elásticas. A intensa atividade proliferativa e sintética dos fibroblastos é conhecida como fibroplasia (Regan e Barbul, 1994; Phillips, 2000).

Em resposta ao fator de crescimento transformador beta (TGF- β), com pico de síntese no 7º e 14º dias pós-trauma (Chen et al., 1992). Em resposta

ao TGF- β , os fibroblastos produzem grande quantidade de colágeno, principal constituinte da MEC da ferida e responsável pela resistência tênsil da ferida. O colágeno é detectado na ferida já no 3º dia pós-trauma, com aumento progressivo e rápido por três semanas. O colágeno é inicialmente depositado sem orientação, na forma de fibrilas de colágeno. Posteriormente essas fibrilas são reorganizadas e alinhadas em feixes orientados ao longo da linha da ferida (Ehrlich et al., 1996).

No tecido de granulação há alta concentração de colágeno do tipo III. Durante a proliferação do tecido de granulação, o colágeno do tipo III é substituído por colágeno do tipo I (Bailey et al., 1975).

A maior quantidade de colágeno maduro (tipo I) nas bordas do tecido de granulação é induzida em resposta ao aumento do TGF- β . Isto indica que o TGF- β pode iniciar a rápida maturação do colágeno na ferida (Pierce et al., 1989).

No decorrer da fase proliferativa, alguns fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), PDGF e TGF- β , atuam, com a ajuda de metaloproteinases, estimulando a angiogênese e síntese de componentes da MEC, incluindo proteoglicanos, fibronectina e elastina (Hackam e Ford, 2002).

Angiogênese é parte fundamental do processo cicatricial na fase de fibroplasia. O VEGF, sintetizado por queratinócitos presentes no tecido adjacente à ferida, exerce atividade sobre células endoteliais que são as principais mediadoras na angiogênese (Frank et al., 1999; Neufield et al.,

1999). A baixa tensão de oxigênio, que ocorre na hipóxia tecidual durante da ferida, é o maior indutor do VEGF que também pode ser mediado pelo TGF- β (DETMAR et al., 1997). Além disso, a produção de VEGF é amplificada na presença de óxido nítrico, sintetizado pelas células endoteliais (Frank et al., 1999).

A neovascularização envolve alterações fenotípicas das células endoteliais, migração direcionada e vários estímulos mitogênicos, além de depender de fatores quimiotáticos fornecidos por células vizinhas e pela MEC (Tonnesen et al., 2000).

Os vasos recém-formados participarão na provisão de nutrientes e oxigênio para o tecido de granulação. Além disso, toda a migração e interação entre células inflamatórias para o local da lesão será realizada através dos vasos endoteliais da membrana basal (Singer e Clark, 1999).

Durante a fase de neovascularização do processo cicatricial, diferencia-se, no tecido de granulação, uma célula com características intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, denominada miofibroblasto. Essa célula tem morfologia equiparável aos fibroblastos, porém, contém maior quantidade de actina e miosina (Desmoulière e Gabbiani, 1996). A diferenciação em miofibroblastos pode ser induzida pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Montesano e Orci, 1988; Powell et al., 1999).

Diversas são as atividades do miofibroblasto nas interações epitélio-mesênquima, que o tornam importante componente da organogênese e morfogênese. Os miofibroblastos participam na secreção de mediadores

inflamatórios, expressão de fatores de crescimento e seus receptores e na secreção e formação da MEC e de moléculas de membrana basal. Dessa forma, especificamente durante a cicatrização de feridas, os miofibroblastos exercem papel de destaque na formação e reparo da MEC e na proliferação e diferenciação de elementos epiteliais, vasculares e neurogênicos (Powell et al., 1999).

Devido à sua propriedade contrátil, os miofibroblastos ajudam a reduzir a área cruenta da ferida e favorecem a reepitelização (Gabbiani et al., 1971; Desmoulière et al., 2005). Finalmente, participam da reabsorção da MEC e na orientação das fibras colágenas e sua associação com outros fibroblastos aumentam a força tênsil cicatricial (Montadon et al., 1977; Modolin et al., 1982).

Fase de Remodelamento / Maturação

Também chamada de fase de maturação, a fase de remodelamento é a última e a mais longa fase da cicatrização. Tem como característica principal o depósito de colágeno na ferida (Levenson et al., 1965; Witte e Barbul, 1997). Essa fase é reconhecida pela redução gradual do número de células inflamatórias agudas e crônicas e o término da angiogênese e da fibroplasia (Regan e Barbul, 1994).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibras colágenas. Esse processo inicia-se durante a formação do tecido de granulação e prossegue durante

meses após a reepitelização. A produção e degradação de colágeno equilibram-se na cicatriz, de modo que, embora a produção de colágeno continue elevada, ela não aumenta de tamanho. Fibras defeituosas de colágeno são digeridas gradativamente pelas colagenases e outras proteases produzidas localmente por macrófagos, neutrófilos e células epidérmicas (Falanga et al., 1988; Goslen, 1988).

As glicosaminoglicanas são degradadas continuamente para que alcancem as concentrações encontradas na derme normal. Até a formação da cicatriz definitiva, constituída quase exclusivamente por fibras colágenas, há diminuição da formação de novos vasos e de elementos celulares, inclusive de fibroblastos, que sofrem apoptose (Stadelmann et al., 1998).

Com a restauração da circulação sanguínea e o aumento dos níveis de oxigênio na área afetada, ocorre facilitação da síntese do colágeno e da proliferação celular e inibição da angiogênese e da migração celular (Detmar et al., 1997).

Nas cicatrizes cutâneas, a redução da angiogênese pode ser confirmada pela observação da coloração local que, gradualmente, passa de uma coloração rosada para um tom esbranquiçado, graças à redução da vasculatura do tecido conjuntivo. Os anexos da pele, como os folículos pilosos e as glândulas sofrem uma reparação limitada (Falanga et al., 1988).

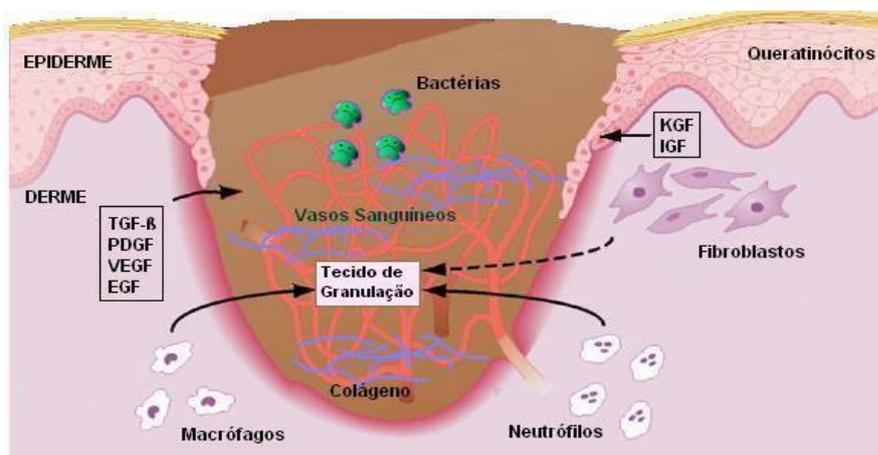
É durante a fase de remodelamento que a força tênsil da ferida aumenta progressivamente, embora de maneira lenta. A elasticidade da ferida aumenta aproximadamente 50% após cinco semanas. Uma cicatriz cutânea completamente madura tem apenas 70% de resistência da pele

normal, que é adquirida durante meses ou anos (Thornton et al., 1997; Witte e Barbul, 1997; Singer e Clark, 1999).

A duração da fase de maturação depende de variáveis como idade e estado nutricional do indivíduo, local da ferida, tipo de lesão e duração dos processos inflamatório e proliferativo (Stadelmann et al., 1998).

Cabe ressaltar novamente que os eventos envolvidos nas diferentes etapas do processo cicatricial ocorrem de maneira simultânea com a participação conjunta de diferentes tipos celulares e mediadores bioquímicos, conforme ilustra a figura 2.

Figura 2 - Representação da dinâmica de eventos celulares envolvidos nas diferentes fases da cicatrização de uma ferida, mediados por fatores de crescimento, na formação de tecido de granulação (adaptado de Goldman, 2004).



2.2. Nutrição e Cicatrização

Estado nutricional adequado é fator importante para lograr processo de cicatrização ótimo, pois a dinâmica tecidual exige energia, substratos plásticos provenientes de proteínas e micronutrientes (Roberts et al., 1998).

O processo de cicatrização encontra-se prejudicado e mesmo retardado em vigência de desnutrição experimental e clínica (Law e Ellis, 1990; Zaizen et al., 1990; Himes, 1999). Em pacientes desnutridos, existe diminuição do acúmulo de hidroxiprolina, em relação a pacientes nutridos (Haydock e Hill, 1986).

A desnutrição protéica pode prejudicar a cicatrização de feridas por prolongar a fase inflamatória, diminuir a síntese e proliferação fibroblástica, angiogênese e a síntese de colágeno e proteoglicanos. Pode ainda reduzir a força tênsil de feridas, limitar a capacidade fagocítica de leucócitos e aumentar a taxa de infecção de feridas (Ruberg, 1984; Haydock et al., 1988; Mayes e Gotshemitch, 1998). Essas manifestações foram comprovadas em animais submetidos à restrição protéica que apresentaram retardo na cicatrização de feridas (Kobak et al., 1947; Daly et al., 1972; Irvin, 1978).

Atualmente, a terapia nutricional pretende, ao lado de fornecer energia e substratos nutricionais, influenciar de maneira farmacológica funções orgânicas prejudicadas pelo estado patológico do paciente, particularmente, quando imunossupressão e/ou hiperinflamação estão presentes. Nessas condições, a oferta enteral ou parenteral de nutrientes com funções

imunomoduladoras se associam a benefícios como aumento da celularidade e promoção de funções imunológicas (Suchner et al., 2000).

O objetivo da terapia nutricional na cicatrização de feridas é prevenir ou repor a depleção dos nutrientes essenciais ao organismo, aumentar a velocidade e a qualidade da cicatrização e reduzir riscos de infecções e outros problemas que possam retardar e/ou prejudicar o processo de reparo tecidual e aumentar o tempo de internação hospitalar (Kiyama et al., 1998; Moreira, 2000).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a nutrição enteral precoce após dano tecidual pode ser favorável ao processo de cicatrização (Delany et al., 1990; Schroeder et al., 1991; Zaloga et al., 1992), quando comparada à nutrição parenteral (Kiyama et al., 1998). Nesse sentido, torna-se de especial interesse estudar o emprego de formulações enterais enriquecidas de arginina e nutrientes antioxidantes como zinco, selênio, vitamina C, que podem otimizar o processo cicatricial e reduzir os riscos envolvidos na infecção de feridas.

Arginina

A arginina pode modular importantes atividades biológicas, funções metabólicas e imunológicas. O organismo, sob condições de trauma grave, necessita de maior quantidade desse nutriente, que passa a ser classificado como aminoácido condicionalmente essencial (Witte e Barbul, 2003; Stechimiller et al., 2005).

A arginina atua como agente timotrófico, estimulante da resposta das células T, e aumenta a resposta fibroblástica durante o processo de reparação de tecidos (Witte e Barbul, 2003).

A arginina corpórea pode ser obtida por via oral e por síntese endógena. Após a ingestão de arginina, 40% sofre degradação intestinal pela arginase e o restante é absorvido via portal (Sitren e Fischer, 1977). O catabolismo protéico não contribui para a produção de arginina e óxido nítrico (NO) e, por isso em situações de estresse grave, há necessidade de suplementar arginina (Williams et al., 2002; Witte et al., 2002).

A maior fonte precursora para a síntese da arginina é a citrulina circulante e também a citrulina obtida a partir dos aminoácidos prolina, glutamato e glutamina no intestino (Wu, 1998).

A arginina participa na síntese protéica, como substrato no ciclo da uréia e produção de óxido nítrico (NO). Também é substrato para ornitina, precursora de poliaminas e outras moléculas envolvidas na cicatrização e regeneração tecidual (Mills, 2001). A arginina age, indiretamente, na indução da secreção do fator de crescimento insulina símile (IGF-1), importante proteína para o crescimento celular. O IGF-1 induz a enzima ornitina descarboxilase (ODC), fator limitante na síntese de poliaminas, fundamental na divisão, diferenciação e crescimento celular (Zaloga et al., 2004; Langkamp-Henken et al., 1998). As poliaminas são importantes para angiogênese e apresentam funções antioxidantes ao proteger as células de danos decorrentes do estresse oxidativo (Igarashi et al., 2000).

Durante o processo cicatricial, a degradação da arginina, sinalizada por citocinas e fatores de crescimento (Albina et al., 1990; Alderton et al., 2001), é direcionada para duas diferentes vias, via óxido nítrico sintase (NOS) e via arginase (Abd-El-Aleem et al., 2000) (Figura 3). A enzima NOS apresenta 3 isoformas que são expressas na pele (Frank et al., 2002) por diferentes tipos celulares como queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, capilares endoteliais e macrófagos (DeGeorge et al., 1997). A síntese máxima de NOS é 24 a 72 horas pós-trauma e tem como produto final o NO e citrulina (Singer e Clark, 1999; Frank et al., 2002). O NO age no aumento da permeabilidade vascular, angiogênese. Possui ação citotóxica na eliminação de bactérias presentes no local da ferida e induz a formação de colágeno, quando produzido por fibroblastos (Schaeffer et al., 1999; Witte e Barbul, 2003).

A via arginase ocorre, em geral, 72 horas após trauma, com a diminuição na produção de NO. Existem 2 tipos de arginase, a arginase tipo I é muito expressa no citoplasma hepático e participa do ciclo da uréia, enquanto a enzima arginase tipo II é de localização mitocondrial no tecido extra-hepático (Evoy et al., 1998; Zaloga et al., 2004), sendo que ambas participam na degradação de arginina em ornitina. A arginase I apresenta maior atividade na produção de poliaminas enquanto a arginase II está direcionada para síntese de arginina a ornitina, prolina e glutamato (Shi et al., 2002; Witte e Barbul, 2003).

A ação *in vitro* da arginina sobre a síntese de colágeno ainda não está bem definida. Evidências sugerem que os efeitos possam ser mediados por meio da síntese de NO, embora, a síntese de colágeno pelos fibroblastos

não ocorra em concomitância com a indução de síntese de NO (Witte et al., 2000).

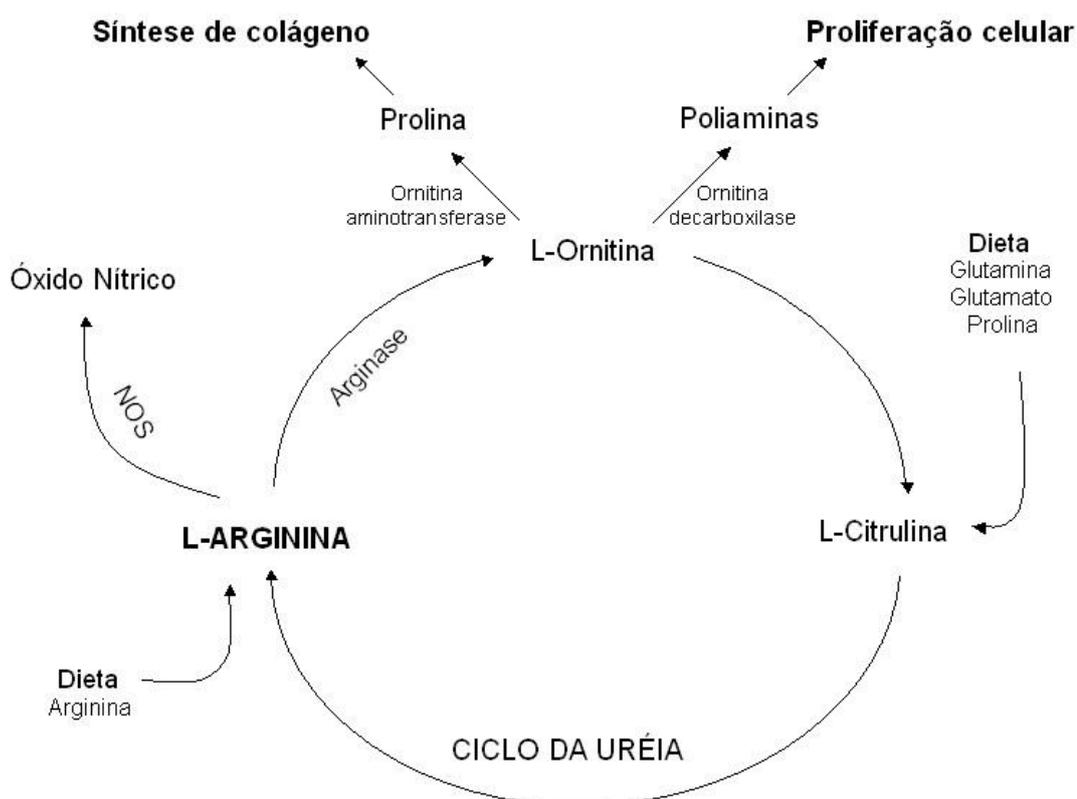
O NO pode afetar também o processo cicatricial ao participar na regulação de algumas metaloproteinases geradas por fibroblastos e expressas durante a fase de remodelamento. Assim, a função da arginina na cicatrização é em parte dependente do NO (Agren, 1994).

O efeito da suplementação de arginina não está relacionado ao aumento na produção de NO, embora descrevam-se aumento nos níveis plasmáticos de arginina e metabólitos do NO após a suplementação de arginina (Wu et al., 1999). A deficiência de arginina plasmática não influencia diretamente a diminuição da síntese de NO, sugerindo que o *pool* de arginina endógena seja suficiente para a síntese de NO (Castillo et al., 1995). Desconhecemos se baixas taxas de arginina tecidual possa ser fator limitante para a síntese local de NO (Witte e Barbul, 2003).

A suplementação de arginina parece ter efeito favorável sobre o aumento da função imunológica e na cicatrização de feridas. Neste sentido, Kirk et al. (1993) realizaram um estudo randomizado e duplo-cego para investigar o efeito da suplementação oral de arginina (17 gramas de L-arginina) sobre a cicatrização e função de células T. Foram avaliados 45 voluntários sadios com idade acima de 65 anos (21 mulheres e 24 homens) que se submeteram à inserção de um cateter de polivinil-álcool na região dorsal para avaliar a resposta fibroblástica, o conteúdo de hidroxiprolina e proteínas totais. Após duas semanas, o grupo suplementado com arginina apresentou aumento significativo de hidroxiprolina, quantidade total de

proteínas e maior resposta dos linfócitos periféricos à estimulação mitogênica ou ialogênica. Os níveis séricos de IGF-1 também foram significativamente maiores no grupo suplementado.

Figura 3 - Representação do metabolismo da arginina (adaptado de Witte e Barbul, 2003; Stechmiller et al., 2005).



Nutrientes Antioxidantes

A vitamina C possui ação antioxidante e melhora a função imunológica. Portanto, na presença de trauma, suas necessidades podem estar aumentadas, pois nessa fase há aumento na demanda metabólica para manutenção do sistema imunológico e síntese de novos tecidos (Mackay e Miller, 2003).

O papel da vitamina C durante o processo de cicatrização é fundamental, pois atua como co-fator para a síntese de colágeno, proteoglicanos e outros componentes da MEC, como vasos sanguíneos responsáveis pelo fornecimento de nutrientes para os tecidos em formação (Porto Da Rocha et al., 2002; Ruberg, 2003; Kaplan et al., 2004). Além disso, a vitamina C é necessária para a hidroxilação eficiente de resíduos de prolina e lisina, para a formação e liberação do procolágeno e subsequente conversão em colágeno e aumenta a função dos neutrófilos que participam na prevenção de infecções (Gross, 2000).

A deficiência de vitamina C causa alterações nas fibras colágenas e na MEC que podem levar a manifestações cutâneas, baixa adesão de células endoteliais e diminuição da tensão elástica das fibras teciduais. Como a cicatrização depende parcialmente da oxidação de vitamina C, a depleção desta vitamina pode retardar o processo cicatricial (Goetzi et al., 1974; Nicosia et al., 1991).

A vitamina E é lipossolúvel e se acumula como importante agente estabilizador da membrana celular (Mayes & Gotshemitch, 1998; Ruberg,

2003; Mackay e Miller, 2003), protegendo-a dos efeitos oxidantes de radicais livres sobre sua camada fosfolipídica (Havlik, 1997; Hamilton, 2000).

Os efeitos benéficos da vitamina E podem estar relacionados de forma direta no processo de reparo e regeneração tecidual, ou até mesmo de forma indireta, através dos efeitos desse nutriente sobre o sistema imunológico (Gray, 2003) e por agir como antioxidante lipolítico na prevenção da peroxidação lipídica e maior estabilidade da membrana celular (Havlik, 1997).

Musalmah et al. (2002) avaliaram os efeitos da suplementação oral de alfa-tocoferol como agente antioxidante e no fechamento de feridas em ratos diabéticos com ferida dorsal. Verificaram que a suplementação de vitamina E agiu como antioxidante, por reduzir os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) e aumentar a atividade da glutatona peroxidase, e acelerou o fechamento da ferida, ao comparar com ratos sem suplementação de tocoferol.

Durante o reparo tecidual, pode haver declínio nos níveis séricos de zinco devido ao seu maior recrutamento para o processo cicatricial. Outros fatores que contribuem para depleção de zinco incluem diarreia crônica, desnutrição protéico-calórica, fístula intestinal de alto débito, má absorção, uso crônico de corticóides e a própria ingestão insuficiente desse mineral (Moreira, 2000).

O zinco é um mineral traço essencial para divisão celular, síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas necessárias no processo de cicatrização de tecidos. Aproximadamente 300

enzimas necessitam de zinco para realizar suas funções (Prasad, 1995; Ruberg, 2003).

A deficiência de zinco está associada à perda de elasticidade do tecido, baixa resistência do sistema imunológico por declínio dos linfócitos e células *natural killers* (NK), redução da taxa de epitelização e da função fibroblástica e, provavelmente, enfraquecimento de células da superfície da ferida (Fernandez-Madrid et al., 1973; Agren et al., 1990).

Moraes et al. (2000) avaliaram a influência da suplementação dietética de cromo e óxido de zinco na cicatrização de feridas cutâneas em ratos normais e diabéticos. Foram retirados fragmentos de pele dorsal dos animais no 15º, 22º e 36º dias após tratamento com óxido de zinco e cromo adicionados à água. No 22º dia de avaliação, não houve diferença significativa entre os grupos na redução da área das feridas. No 36º dia pós-trauma os ratos diabéticos tratados com zinco e cromo apresentaram áreas das feridas operatórias significativamente menores que os animais controles.

O selênio atua no sistema de defesa antioxidante celular, que envolve fatores enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, tireodoxina reductase) e não-enzimáticos (glutathione e ácido úrico) (Munz et al., 1997).

Gumustekin et al. (2004) avaliaram o efeito da falta seguida da reposição de selênio e nicotina sobre a cicatrização cutânea em ratos submetidos à queimadura. Os resultados demonstraram, através de análises microscópicas realizadas no local da lesão, maior número de fibroblastos e vasos sanguíneos no grupo com suplementação de selênio. Além disso,

houve aumento da quantidade de leucócitos e de imunoglobulina G (IgG) nos ratos com reposição de nicotina, quando comparado com os que foram realimentados com selênio. Os autores concluíram que a suplementação de selênio, quando comparada à suplementação de nicotina, pode acelerar o processo cicatricial por prevenir a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo induzido pela nicotina.

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O principal objetivo a ser alcançado no tratamento de feridas que necessitam de cicatrização é o seu rápido fechamento e o estabelecimento de cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (Singer e Clark, 1999).

Considerando-se que o estado nutricional pode interferir no processo cicatricial e que nutrientes como arginina e alguns minerais e vitaminas com efeitos reconhecidamente antioxidantes podem promover etapas desse processo, torna-se de especial interesse avaliar o real impacto desses nutrientes na cicatrização frente a diferentes condições nutricionais e compreender alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos entre nutrição e cicatrização de feridas.

Modelos experimentais são úteis para a pesquisa de cicatrização, pois, resguardando os aspectos éticos, permitem criar em laboratório de investigação condições que se assemelham às encontradas na prática clínica.

Nesse sentido, o presente estudo buscou avaliar o efeito da oferta de dieta enteral suplementada com arginina e nutrientes antioxidantes sobre variáveis relacionadas ao processo de cicatrização de feridas em ratos sob diferentes condições nutricionais.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Verificar a influência da administração de dieta enteral suplementada com arginina, selênio, zinco, vitaminas E e C sobre variáveis envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos nutridos e previamente desnutridos.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar, seqüencialmente, no tecido de granulação de feridas cutâneas de ratos nutridos e previamente desnutridos, os efeitos de dieta enteral suplementada com arginina, selênio, zinco, vitamina E e C sobre:

- Contração da ferida cutânea
- Modificações histológicas
- Colágeno total
- Presença de miofibroblastos
- Expressão gênica dos fatores de crescimento TGF- β 1, VEGF- α , PDGF- α , KGF e dos colágenos tipo I e III (somente no 7º dia pós-trauma)

5. MÉTODOS

5. MÉTODOS

5.1. Local das Atividades Experimentais

As atividades da presente pesquisa foram desenvolvidas no Grupo de Metabologia e Nutrição em Cirurgia - Metanutri no Laboratório de Fisiologia e Distúrbios Esfincterianos (LIM 35), da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia, em parceria com o Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas (LIM 25) da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica e com o Laboratório de Oncologia Experimental da Disciplina de Oncologia do Departamento de Radiologia (LIM 24) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

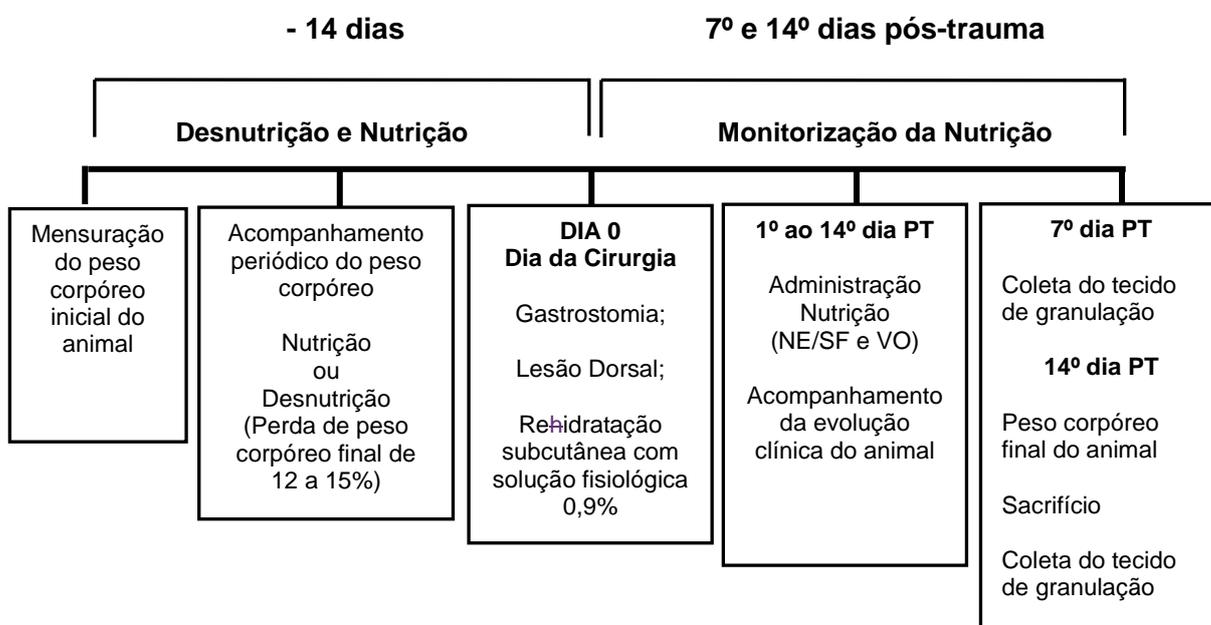
5.2. Planejamento Experimental

A influência de uma dieta enteral suplementada com arginina, selênio, zinco, vitaminas E e C sobre o processo de cicatrização cutânea foi avaliada em ratos adultos isogênicos nutridos e previamente desnutridos. Após período de adaptação ao ambiente de pesquisa, os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupos desnutridos ou mantidos nutridos, e submetidos a gastrostomia cirúrgica para acesso nutricional enteral e a lesões cutâneas dorsais padronizadas. A seguir, os animais foram

novamente distribuídos de forma aleatória, em diferentes grupos experimentais de acordo com o tratamento nutricional pós-trauma (PT). A evolução clínica dos ratos foi diariamente acompanhada, com controle da administração da solução enteral, da ingestão da dieta oral e do peso corpóreo. No 7º e 14º dias pós-trauma, avaliou-se a área de lesão e realizou-se coleta do tecido de granulação das feridas cutâneas. As amostras coletadas foram submetidas a análises histológicas, imuno-histoquímicas e dosagens moleculares.

A figura 4 ilustra as atividades desenvolvidas ao longo dos experimentos.

Figura 4 - Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados no decorrer do projeto.



5.3. Animais

Foram utilizados 65 ratos isogênicos, da cepa *Lewis*, machos, adultos e com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas (UNICAMP).

5.4. Adaptação ao ambiente de pesquisa

Previamente aos procedimentos experimentais, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais e mantidos em temperatura de 21°C, sob ciclos diurnos/noturnos de luz e com livre acesso à água e ração purificada AIN-93M (Rhoster Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista - São Paulo, Brasil) (Tabela 1) pelo período de sete dias, para se adaptarem ao ambiente de pesquisa.

Tabela 1 - Composição da dieta oral padrão purificada formulada para ratos adultos (AIN-93). Concentração expressa em g/kg de dieta. Segundo Reeves et al., 1993.

<u>Componentes</u>	<u>Quantidades (g)</u>
<u>Carboidratos</u>	
<u>Amido de Milho</u>	<u>465,69</u>
<u>Amido de Milho Dextrinizado</u>	<u>155,00</u>
<u>Sacarose</u>	<u>100,00</u>
<u>Celulose Microfibras</u>	<u>50,00</u>
<u>Proteína e Aminoácidos</u>	
<u>Caseína</u>	<u>140,00</u>
<u>L-Cistina</u>	<u>1,80</u>
<u>Lipídios</u>	
<u>Triglicerídios de Cadeia Longa (Óleo de Soja)</u>	<u>40,00</u>
<u>Mistura de Sais</u>	
<u>Mix Salina AIN-93 M</u>	<u>35,00</u>
<u>Mistura de Vitaminas</u>	
<u>Mix Vitamínico AIN-93 M</u>	<u>10,00</u>
<u>Bitartarato de Colina</u>	<u>2,50</u>
<u>Tert-Butilhidroquinona</u>	<u>0,008</u>

5.5. Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais previstos no protocolo do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidado adequado para minimizar a presença e intensidade de dor, decorrente do ato cirúrgico e da presença de ferida.

5.5.1. Desnutrição

Após o período de adaptação, um grupo de animais foi designado à desnutrição, recebendo 50% do total em gramas da dieta purificada padrão AIN-93M (Tabela 1) ingerida pelos animais que compuseram o grupo nutrido e que receberam a mesma dieta *ad libitum*. Durante o período de desnutrição, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais e foram pesados diariamente. Os animais foram considerados desnutridos quando atingiram perda de peso corpóreo entre 12 e 15%, em relação ao peso corpóreo inicial, que ocorreu 14 dias após restrição alimentar.

5.5.2. Procedimentos Cirúrgicos

5.5.2.1. Anestesia

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram pesados em balança digital (Marte Balanças®), com o auxílio de um recipiente de peso previamente conhecido e anestesiados por injeção intraperitoneal de 100 mg/Kg de peso corpóreo de Cloridrato de Ketamine (Ketalar®/Parke-Davis) e 2% de Cloridrato de Xilazina (Rumpun®/Bayer), com seringa de 1,0 ml e agulha de insulina. Após anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região cervical, abdominal e dorsal seguida de antisepsia local, com uso de água, detergente neutro e álcool 70%.

Um grupo de animais nutridos e outro de desnutridos não foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, servindo de controle ao estresse cirúrgico.

5.5.2.2. Gastrostomia

Para início dos procedimentos cirúrgicos, posicionou-se o animal anestesiado em decúbito dorsal sobre tábua de dissecação coberta por campo cirúrgico estéril. Realizou-se incisão cirúrgica na linha média da região abdominal, que se estendeu do apêndice xifóide à cicatriz umbilical. A seguir, realizou-se túnel subcutâneo a partir da região paramediana

esquerda em direção à região retroauricular e se exteriorizou o cateter de gastrostomia por esse túnel. A parte distal do cateter de gastrostomia foi acoplada a uma peça intermediária metálica dotada de uma agulha curva e fixa à pele por sutura com pontos separados com fio mononylon 3-0 (Ethicon Indústria e Comércio).

Após identificação do estômago, realizou-se uma abertura na região do corpo gástrico, por onde se introduziu um cateter de silicone tipo silastic nº 602-175 (D'Altomare Química Ltda. – São Paulo). Fixou-se o cateter no estômago por meio de sutura seromuscular em bolsa de tabaco com fio mononylon 4-0 (Ethicon Indústria e Comércio). Fixou-se a região gástrica peri gastrostomia ao peritônio parietal por meio de 4 pontos separados com fio de sutura mononylon 4-0 (Ethicon Indústria e Comércio) (Figuras 5 a 10).

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais. A peça metálica intermediária foi conectada a um dispositivo giratório (swivel) de livre movimentação (Yamagushi et al., 1989; Galizia et al., 2005). O swivel, por sua vez, foi conectado a um tubo intermediário de polietileno com a extremidade adaptada para conexão a equipo com bureta graduada (*Burette Micro Pump Set - Abbott - Vented 124 Inch*) ligada à bomba de infusão (*Life Care Pump – Abbott*) (Figuras 11 e 12).

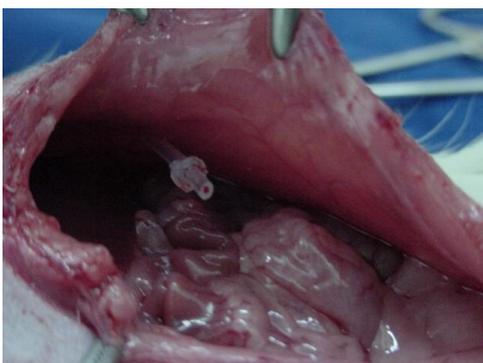


Figura 5 - Passagem do cateter pela parede muscular abdominal



Figura 6 - Tunelização do cateter para região retroauricular

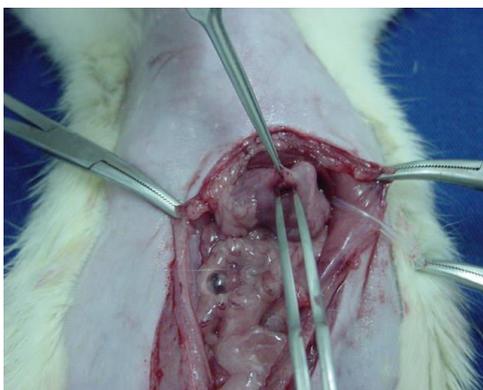


Figura 7 - Abertura na região do corpo gástrico

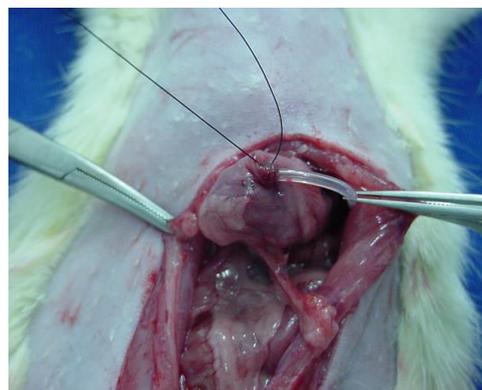


Figura 8 - Inserção e sutura do cateter no estômago

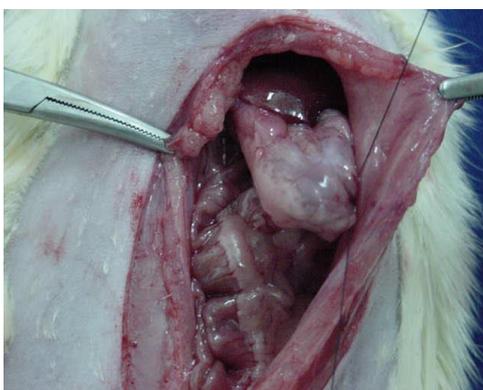


Figura 9 - Fixação do estômago na parede abdominal após gastrostomia



Figura 10 - Aspecto final do animal após gastrostomia e sutura da peça metálica



Figura 11 - Gaioleiro metabólico (Nalgene®
Brand Products, Rochester, Nova Iorque - US)
e bombas de infusão ao lado

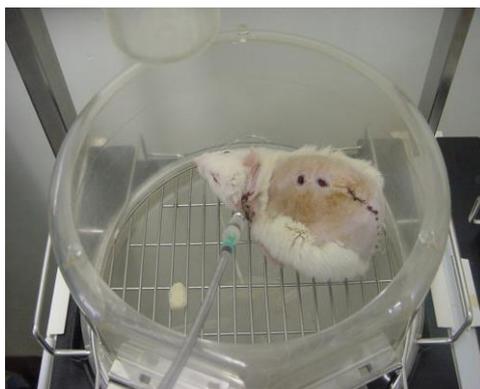


Figura 12 - Animal com swivel em
gaioleiro metabólico individual

5.5.2.3. Lesão Cutânea Dorsal

Após realização da gastrostomia, os animais, ainda sob efeito anestésico, foram posicionados e fixos em decúbito ventral horizontal para demarcar quatro áreas circulares identificadas como A, B, C e D (Figura 13). O diâmetro de cada círculo mediou 1,3 centímetro (cm), com espaçamento de 0,5 cm entre as lesões proximais (A e B), 0,5 cm entre as distais (C e D) e 1,5 cm entre as proximais e distais. Após demarcação dos círculos, com carimbo desenvolvido especialmente para esta finalidade, realizou-se a incisão e excisão da pele, com auxílio de uma pinça e tesoura, removendo-se todas as camadas da pele, até a exposição da fásciafascia muscular dorsal.

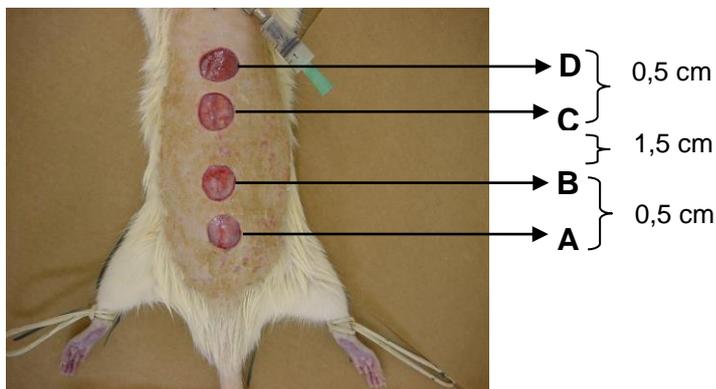


Figura 13 - Lesão cutânea dorsal e respectivas identificações

5.6. Grupos Experimentais

Após as intervenções cirúrgicas, os animais foram distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos experimentais. Com exceção dos animais controles nutridos e desnutridos que não foram submetidos às intervenções cirúrgicas, todos os demais animais receberam dieta via oral, nutrição enteral ou solução fisiológica via gastrostomia e água *ad libitum*. Os diferentes grupos experimentais do presente estudo encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos Experimentais

Grupos	Animais (n)	Descrição
Controle N	04	Ratos nutridos [#]
Controle DN	04	Ratos desnutridos ^{##}
N(VO)	10	Ratos nutridos + G (SF) + VO
N(DP)	10	Ratos nutridos + G (Dieta P) + VO
N(DS)	10	Ratos nutridos + G (Dieta S) + VO
PD(VO)	09	Ratos desnutridos + G (SF) + VO
PD(DP)	09	Ratos desnutridos + G (Dieta P) + VO
PD(DS)	09	Ratos desnutridos + G (Dieta S) + VO

Ratos nutridos sem intervenção cirúrgica e lesão cutânea dorsal

Ratos desnutridos sem intervenção cirúrgica e lesão cutânea dorsal

N = Nutrido

DN = Desnutrido

PD = Previamente desnutridos

G = Gastrostomia

SF = Solução fisiológica (Cloreto de Sódio a 0,9%*)

VO = Dieta oral padrão (AIN-93M^{**})

Dieta P = Dieta enteral padrão (Hiper Diet Multifiber^{***})

Dieta S = Dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes (Cubison^{***})

* Baxter Hospitalar Ltda.

** Rhoster Indústria e Comércio Ltda.

*** Nutricia NV Holanda – Support Produtos Nutricionais Ltda.

5.6.1. Nutrição Pós-Trauma

Grupos N(VO) e PD(VO)

A partir do 1º dia de pós-trauma, os animais pertencentes a estes grupos receberam diariamente em torno de 16 gramas de dieta oral AIN-93 (tabela 1) e administração de solução fisiológica, via gastrostomia, que teve seu volume aumentado gradativamente (tabela 3).

Grupos N(DP) e PD(DP)

A partir do 1º dia de pós-trauma, os animais pertencentes a estes grupos receberam diariamente em torno de 4 gramas de dieta oral AIN-93M (tabela 1) e dieta enteral padrão (Hiper Diet Multifiber®), via gastrostomia, que teve seu volume aumentado gradativamente (tabela 3). A composição da dieta enteral padrão encontra-se descrita na tabela 4.

Grupos N(DS) e PD(DS)

Os animais pertencentes a estes grupos, após os procedimentos cirúrgicos receberam diariamente, a partir do 1º dia de pós-trauma, aproximadamente, 4 gramas de dieta via oral AIN-93M (tabela 1) e dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes (Cubison®) via

gastrostomia, que teve seu volume aumentado gradativamente (tabela 3). A composição da dieta enteral Cubison® encontra-se descrita na tabela 4.

Tabela 3 - Velocidade e volume de administração enteral dos diferentes grupos no período pós-trauma (PT).

Período Pós-trauma	Velocidade de Administração (ml/h)	Volume Administrado (ml/dia)
Dia Cirurgia*	0,3	7,2
1º dia PT	0,5	12,0
2º dia PT	1,0	24,0
3º dia PT	1,5	36,0
4º dia PT	2,0	48,0
5º ao 14º dia PT	2,5	60,0

* No dia do trauma todos os animais, independente do grupo experimental, receberam pela gastrostomia glicose a 5% (Baxter Hospitalar Ltda) na velocidade de 0,3 ml/h.

Tabela 4 - Composição das dietas enterais industrializadas administradas via gastrostomia. Quantidade expressa por ml de dieta.

Nutrientes	Dieta Suplementada	Dieta Padrão
	Cubison®	Hiper diet multifiber®
Energia	1 Kcal	1 Kcal
Proteína	0,055 g	0,040 g
Nitrogênio	0,006 g	0,006 g
Arginina	0,003 g	-
Lipídios	0,033 g	0,039 g
Carboidratos	0,125 g	0,123 g
Fibras dietéticas	0,015 g	0,015 g
Minerais		
Sódio	1,000 mg	1,000 mg
Potássio	1,500 mg	1,500 mg
Cloro	1,250 mg	1,250 mg
Cálcio	0,800 mg	0,800 mg
Fósforo	0,720 mg	0,720 mg
Magnésio	0,230 mg	0,230 mg
Oligoelementos		
Ferro	0,016 mg	0,016 mg
Zinco	0,020 mg	0,012 mg
Cobre	2,000 µg	1,800 µg
Manganês	0,004 mg	0,003 mg
Flúor	0,001 mg	0,001 mg
Molibdênio	0,100 µg	0,100 µg
Selênio	0,096 µg	0,057 µg
Cromo	0,067 µg	0,067 µg
Iodo	0,130 µg	0,130 µg

Nutrientes	Dieta Suplementada	Dieta Padrão
	Cubison®	Hiper diet Multifiber®
Vitaminas		
Vitamina A	0,820 µg	0,820 µg
Carotenóides	0,002 mg	0,002 mg
Vitamina D	0,007 µg	0,007 µg
Vitamina E	0,075 mg	0,013 mg
Vitamina K	0,053 µg	0,053 µg
Tiamina	0,002 mg	0,002 mg
Riboflavina B2	0,002 mg	0,002 mg
Niacina	0,018 mg	0,018 mg
Ácido Pantotênico	0,005 mg	0,005 mg
Vitamina B6	0,002 mg	0,002 mg
Ácido fólico	0,300 µg	0,270 µg
Vitamina B12	0,002 µg	0,002 µg
Biotina	0,040 µg	0,040 µg
Vitamina C	0,380 mg	0,100 mg
Colina	0,370 mg	0,370 mg

5.7. Monitorização dos Animais

As informações de peso corpóreo, administração por via gastrostomia, ingestão alimentar, ingestão de água, estado clínico do animal e características das fezes e urina foram registradas ao longo de todo o experimento (desde os procedimentos de nutrição e desnutrição até o dia do sacrifício do animal) em fichas individualizadas.

5.7.1. Administração por Via Gastrostomia e Ingestão Alimentar no Período Pós-Trauma

As dietas enterais ou solução fisiológica foram administradas de forma contínua, via gastrostomia, com auxílio de bomba de infusão de alta precisão (*Life Care Pump – Abbott*). A quantidade administrada foi monitorada individualmente e diariamente e registrada pela bomba de infusão, através da diferença entre volume inicial (ml) e o volume após 24 horas (ml) da solução adicionada em bureta graduada (*Burette Micro Pump Set - Abbott - Vented 124 Inch*).

A ingestão de dieta oral pelos animais foi avaliada individualmente e diariamente, através da diferença entre o peso da dieta ofertada (gramas) e peso da dieta encontrada após 24 horas (gramas) no reservatório alimentar individual.

Foram calculadas as quantidades totais de calorias, nitrogênio, arginina, selênio, zinco, vitamina C e E, que corresponderam as quantidades

administradas por via gastrostomia e ingeridas por via oral. Após obtenção das quantidades dos nutrientes ofertados, diariamente, aos animais ao longo do experimento, realizou-se a média aritmética de cada grupo experimental.

5.7.2. Variação Percentual de Peso Corpóreo Pós-Trauma

Para determinação da variação percentual de peso corpóreo, os animais foram pesados em balança digital (Marte Balanças®), com o auxílio de um recipiente de peso previamente conhecido, no dia da cirurgia e 14^o dia pós-trauma. A variação percentagem do peso corpóreo, de cada animal, foi calculada pela diferença entre peso corpóreo final (14^o dia PT) e peso corpóreo inicial (dia da cirurgia), dividida pelo peso corpóreo inicial e considerada positiva se houve ganho e negativa se houve perda de peso. Por fim, calculou-se a média de variação percentual de peso de cada grupo experimental, somando-se as variações de peso individuais dos animais e dividindo-se pelo número de ratos de cada grupo.

5.8. Coleta de Tecido e Sacrifício dos Animais

A coleta do tecido de granulação das feridas cutâneas dorsais foi padronizada: as duas lesões distais (A e B) no 7º dia e as duas lesões proximais restantes (C e D) no 14º dia pós-trauma.

No 7º dia pós-trauma os animais foram pesados e anestesiados, conforme descrito no item 5.5.2.1. Procedeu-se excisão completa da lesão “A” incluindo porção de pele normal que se encontrava presente ao redor da lesão. Este fragmento “A” (pele normal + tecido de granulação) foi cortado ao meio, fixado e armazenado para a realização de análises histológicas e imuno-histoquímicas. A lesão cutânea “B” retirada conteve apenas tecido de granulação e foi armazenada em nitrogênio líquido, para estudo da expressão gênica. Após a retirada das amostras “A e B”, realizou-se sutura contínua em todos os planos com mononylon 4-0 (Ethicon Indústria e Comércio), obtendo-se aproximação completa das bordas da ferida

No 14º dia pós-trauma procedeu-se anestesia, retirada e armazenamento das lesões “C e D”, conforme descrito para as lesões A e B. A lesão C (pele normal + tecido de granulação) foi dividida ao meio, fixada e destinada às análises histológicas e imuno-histoquímicas. A lesão “D” conteve apenas tecido de granulação e foi armazenada para futuras análises de biologia molecular. Após a retirada das duas lesões restantes (C e D), todos os animais que compuseram os diferentes grupos experimentais foram sacrificados por meio de exsanguinação obtido por punção cardíaca.

5.9. Medida da Área Digitalizada da Lesão Cutânea

A captação das imagens digitais das lesões cutâneas foi realizada no momento do trauma (dia zero) e no 7º e 14º dias pós-trauma. Desenhou-se no dia do trauma, a silhueta de cada animal (Figura 14). Nos 7º e 14º dias pós-trauma, os animais anestesiados foram contidos em uma tábua de cortiça sobre a sua silhueta em molde de papel. Procedeu-se a captação de imagens das lesões cutâneas, com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (*Sony Digital Mavica 1.3 Mega Pixels – MPEGMOVIE*) fixada em um suporte específico para máquina fotográfica (Figura 15). O registro fotográfico das imagens foi realizado de maneira uniforme para os diferentes ratos, mantendo-se uma distância de 62 cm entre a câmera digital e a tábua de cortiça para, juntamente com o molde confeccionado para cada animal, evitar diferenças de tamanho da lesão nas fotos. As imagens captadas foram gravadas em disquete e posteriormente transferidas para um microcomputador Pentium IV 1.4 Ghz.

Os cálculos de área da lesão foram realizados com o auxílio do software de imagens ImageJ 1.29x, disponível para domínio público no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health – USA. Com auxílio de um *mouse*, procedeu-se o contorno manual da imagem, e estabeleceu-se uma unidade aleatória (pixels), que possibilitou a obtenção de um valor numérico correspondente à área de cada lesão cutânea analisada.

Após os valores absolutos terem sido transformados em porcentagem, para o 7º dia pós-trauma, estabeleceu-se a média aritmética das quatro

medidas obtidas de cada área das 4 lesões cutâneas. Para o 14º dia pós-trauma, realizou-se a média aritmética das duas lesões cutâneas restantes. Para a obtenção das médias de cada grupo, somaram-se as médias de cada rato e dividiu-se o resultado encontrado pelo número de animais presentes no grupo.

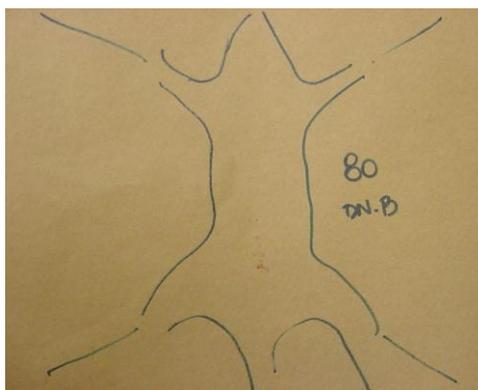


Figura 14 - Exemplo de silhueta desenhada para facilitar a fixação do animal e padronizar a captação de imagens



Figura 15 - Mesa com suporte para câmera fotográfica digital e rato posicionado para registro fotográfico

5.10. Análise Histológica e Imuno-histoquímica

Juntamente com a amostra de tecido de granulação, em ambos os períodos de 7^o e 14^o dias pós-trauma, foi retirado parte do tecido da pele que compreende área adjacente à lesão, que serviu de controle nas análises histológicas e imuno-histoquímica.

As amostras destinadas às análises histológicas foram separadas em frascos identificados e fixadas em formalina 10% tamponada com sais de fosfato. Em seguida foram encaminhadas para processamento histológico e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados com três micra de espessura e utilizados para coloração de hematoxilina-eosina, picrossírius e imuno-histoquímica. As amostras destinadas às reações de imuno-histoquímica foram preparadas em lâminas tratadas com 3-Aminopropyltriethoxy-silano (Sigma A3648, EUA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C.

5.10.1. Avaliação Microscópica do Tecido de Granulação

Aspectos relacionados à cicatrização do tecido foram verificados microscopicamente, utilizando-se método quantitativo, qualitativo e semiquantitativo, para avaliação do grau de recuperação do epitélio e do estroma através da coloração de hematoxilina-eosina e picrossírius. Adicionalmente, utilizamos método imuno-histoquímico para identificação de miofibroblastos no parênquima cicatricial.

5.10.1.1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE)

Cada lâmina pertencente a cada rato contendo as reações histológicas foram avaliadas em microscópio óptico (*NIKON - JAPAN e Zeiss - Modelo Standard*), independentemente por dois observadores. Cada observador definiu 5 campos, dispostos no tecido de granulação, examinados inicialmente em aumento panorâmico para a identificação dos melhores campos representativos da lesão e, a seguir, para avaliação, foram analisados sob aumentos de 200x a 400x, dependendo do parâmetro em questão.

A fim de avaliar o grau de recuperação do tecido, foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos do tecido de granulação dos animais dos diferentes grupos experimentais: contagem diferencial de vascularização e células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) e o parâmetro de intensidade do infiltrado inflamatório foi categorizado em escala de zero (0) a três (3+) cruzes, sendo 0 = ausência; 1 = pouco; 2 = moderado e 3 = intenso.

Parâmetros qualitativos do tecido também foram avaliados microscopicamente em escala categórica: epitelização da epiderme (completa/incompleta), espessura do epitélio (fino/médio/espesso), recomposição da derme (total/parcial), prevalência de componentes celulares (fibroblastos/fibrócitos) e qualidade do núcleo dos fibroblastos (denso/frouxo).

5.10.1.2. Coloração pelo Picrossírius

A quantificação do colágeno total presente no tecido de granulação foi realizada com a utilização de um sistema de análise de imagens, constituído pelo software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (*Media Cybernetics – Silver Spring, MD, EUA*), instalado em um microcomputador PC, conectado a uma câmara digital (*JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japão*), acoplada a um microscópio óptico (*Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha*).

As amostras de todos os animais foram analisadas nos períodos do 7^o e 14^o dias pós-trauma. Para quantificar o colágeno total presente na ferida, foram escolhidos aleatoriamente 5 campos do tecido de granulação, em aumento de 200x, e as imagens foram capturadas através do analisador de imagens. Foram obtidas as medidas (μm^2) da quantidade de colágeno e a área total do campo predeterminado. Para se obter o valor numérico da quantidade de colágeno total presente tornou-se necessário obter a relação entre a medida da área total e a quantidade de colágeno de cada um dos campos. Após a obtenção da área de colágeno, obteve-se a média aritmética das medidas para cada rato e, posteriormente, a média de cada grupo experimental.

5.10.1.3. Método de Imuno-histoquímica para Avaliação da Expressão do Anticorpo Anti-Alfa Actina de Músculo Liso (Miofibroblastos)

As reações de imuno-histoquímica para verificação dos miofibroblastos foram realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolpho Lutz, seguindo o protocolo de reações que se encontra no Anexo 1.

Os miofibroblastos foram analisados através da identificação com anticorpo anti-alfa actina de músculo liso, clone 1A4 (*Dako, Glostrup, Dinamarca*).

A avaliação semiquantitativa da presença de miofibroblastos seguiu a escala categórica de uma (1+) a três (3+) cruzes, semelhante ao padrão utilizado anteriormente para quantificar aspectos de recuperação do tecido. As amostras foram examinadas inicialmente em aumento panorâmico para se identificarem os melhores campos representativos da lesão e, a seguir, para avaliação, foram analisados sob aumento de 200x.

5.11. Análises de Biologia Molecular

No presente estudo, o tecido destinado às análises de biologia molecular foi o tecido de granulação, retirado no 7º dia pós-trauma, sem a presença de tecido cutâneo íntegro. As amostras foram armazenadas em frascos criogênicos livres de DNase, RNase e pirogênios e estocados em nitrogênio líquido, destinadas às dosagens moleculares para a identificação dos fatores de crescimento TGF- β , VEGF, PDGF- α , KGF e os colágenos tipo I e III.

5.11.1. Extração de RNA Total do Tecido

Para extração do RNA total, foram pulverizados aproximadamente 50 a 100 mg do tecido de granulação, que foram depositadas em tubos contendo 1,5 ml de TRIzol (*Trizol Reagent, Life Technologies*). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos (*Eppendorf Centrifuge 5117R / Eppendorf Scientific Inc., Hamburg, Germany*). A solução foi transferida para um novo tubo e acrescentou-se 300 μ l de clorofórmio gelado, sendo o conteúdo misturado em agitador de tubos. As amostras foram novamente deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e levadas para centrifugação a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi removida para um novo tubo, ao qual adicionou-se 750 μ l de álcool isopropílico. Após permanecer 20 horas a -20°C, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 ml de etanol 75% acrescido de água tratada com dietildicarbonato (DEPEC), sendo as amostras novamente submetidas à centrifugação a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado para haver a recuperação do precipitado, o qual foi dissolvido em 20 µl de água DEPEC (*Merck, Alemanha*). Em seguida as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -70°C.

A concentração de RNA foi determinada com auxílio do espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 e 280 nm (*Eppendorf BioPhotometer / Eppendorf Scientific Inc., Hamburg, Germany*) e corrida eletroforética em gel de agarose 2%, para visualização da integridade do RNA.

5.11.2. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

No presente estudo a análise da expressão gênica foi determinada por meio de PCR em tempo real através da quantificação relativa dos genes de interesse (TGF- β , VEGF, PDGF- α , KGF e os colágenos tipo I e III) em relação a um gene endógeno (β -actina).

Para assegurar a comparação entre os genes estudados, determinou-se inicialmente a eficiência de amplificação dos genes de interesse e do controle endógeno. Para isto, foram amplificadas curvas de diluições seriadas de uma amostra de RNA para cada um dos genes, partindo de 500

ng de RNA total. Para comparar a eficiência da amplificação dos genes, subtraímos os valores do limiar de fluorescência (Ct) do gene de interesse dos valores de Ct do gene endógeno. Observou-se diferença maior de 20% na eficiência de amplificação entre os genes de interesse em relação ao endógeno, dessa forma utilizou-se o método comparativo descrito por Pfaffl (2001).

As reações de real-time foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research), utilizando-se o kit comercial SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step Quantitect Syber Green RT-PCR (Invitrogen Life Technologies), com o protocolo recomendado pelo fabricante (Tabela 5).

Tabela 5 - Protocolo utilizado nas reações de real-time. Valores expressos em μL por amostra de RNA.

Reagentes	$\mu\text{L}/\text{amostra}$
2x SYBR Green Reaction Mix	7,50
SYBR Green One-step Enzyme Mix	0,30
Primer Sense 10 μm	0,30
Primer Antisense 10 μm	0,30
Água Milliq Autoclavada	3,07
Amostra RNA (34 ng/ μl)	3,53

Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir da seqüência de RNAm do gene em questão contidos no site

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Em seguida, foi elaborado o oligonucleotídeo iniciador utilizando-se o programa *Primer 3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3).

As seqüências selecionadas dos oligonucleotídeos estão discriminadas na tabela 6.

Tabela 6 - Seqüência de oligonucleotídeos utilizados na expressão gênica do tecido de granulação do 7º dia pós-trauma.

Genes	Seqüência dos primers 5' → 3'
β-Actina	Left – TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA Right – GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA
TGF-beta1	Left – ATA CGC CTG AGT GGC TGT CT Right – TGG GAC TGA TCC CAT TGA TT
VEGF	Left – GCC CAT GAA GTG GTG AAG TT Right – ACT CCA GGG CTT CAT CAT TG
PDGF-alfa	Left – ATG CCT TGG AGA CAA ACC TG Right – GTC AAG AAG TTG GCC GAT GT
KGF	Left – CTG TGG CAG TTG TAA TTG TG Right – ACA GGA AGC CCC TTT TGA TT
Colágeno I (alfa I)	Left – ACA TGC CGT GAC CTC AAG AT Right – ATG TCC ATT CCG AAT TCC TG
Colágeno III (alfa I)	Left – CTG GTC CTG TTG GTC CAT CT Right – ATG CCA TTA GAG CCA CGT TC

5.12. Análise Estatística

Para responder aos objetivos de interesse para as medidas de variação de peso corporal dos ratos ao longo do experimento, quantidade de calorias, nitrogênio, arginina, selênio, zinco, vitamina C e vitamina E e expressão gênica do fator de crescimento TGF- β foram utilizadas análises de variâncias com dois fatores (estado nutricional e dieta) e testada a possível interação entre os fatores.

As variáveis da expressão gênica dos demais fatores de crescimento e colágenos tipos I e III, a análise de variâncias foi precedida pela transformação logarítmica das variáveis para a melhor adequação de suas distribuições à distribuição normal.

As medidas de porcentagem de cicatrização, quantificação do colágeno total e intensidade de vascularização foram utilizadas análises de variâncias com medidas repetidas com três fatores, sendo eles o tempo de observação, a dieta e o estado nutricional.

Para comparar a quantidade dos números de neutrófilos, linfócitos e macrófagos foram utilizadas equações de estimação generalizadas com distribuição de Poisson e função de ligação identidade supondo matriz de correlações componente simétrica.

As variáveis de epitelização e espessura da epiderme, recomposição da derme e núcleo de fibroblastos (variáveis qualitativas), na avaliação do 7^o e 14^o dias pós-trauma, foram utilizados modelos de regressão logística, usando como variáveis explanatórias a dieta e o estado nutricional dos ratos.

A intensidade do infiltrado inflamatório, fibroblastos e miofibroblastos, no 7^o e 14^o dias pós-trauma, foram usados testes de qui-quadrado.

Foi considerado o valor de 5% de probabilidade para o valor de alfa ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Os resultados da presente pesquisa serão apresentados na mesma seqüência proposta no capítulo de métodos.

6.1. Administração por Via Gastrostomia e Ingestão Oral no Período Pós-Trauma

6.1.1. Calorias e Nitrogênio Totais

Não houve diferenças significativas na quantidade diária da oferta e ingestão de calorias e nitrogênio totais (via oral + gastrostomia) para os diferentes grupos experimentais (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação das médias e desvios padrão da oferta e ingestão de calorias (Kcal/dia) e nitrogênio (gramas/dia), no período pós-trauma, para os diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Calorias (Kcal/dia)				
Grupos		Médias	dp	n
Nutridos N	VO	64,3	7,4	10
	DP	61,8	2,9	10
	DS	65,4	4,0	10
Previamente Desnutridos PD	VO	66,7	9,0	9
	DP	63,5	4,7	9
	DS	60,7	5,2	9
Nitrogênio (grama/dia)				
Grupos		Médias	dp	n
Nutridos N	VO	0,360	0,041	10
	DP	0,362	0,017	10
	DS	0,395	0,026	10
Previamente Desnutridos PD	VO	0,372	0,050	9
	DP	0,370	0,027	9
	DS	0,368	0,030	9

dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

6.1.2. Arginina e Nutrientes Antioxidantes

As quantidades administradas (por via oral + gastrostomia) de arginina, selênio, zinco, vitamina C e vitamina E não apresentaram diferenças significativas ao serem comparadas entre os animais nutridos e previamente desnutridos, fixando-se o grupo de animais com a mesma dieta. No entanto, conforme esperado, encontrou-se maior quantidade destes nutrientes administrados aos grupos que receberam a dieta enteral suplementada em relação à dieta enteral padrão e ao controle com dieta oral (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das médias e desvios padrão da oferta e ingestão de arginina e nutrientes antioxidantes, no período pós-trauma, para os diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Arginina (g)	Selênio (μg)	Zinco (mg)	Vitamina C (mg)	Vitamina E (mg)
Nutridos N	VO	0,072 \pm 0,008	0,003 \pm 0,0003	0,56 \pm 0,06	0,0 \pm 0,0	1,20 \pm 0,14
	DP	0,023 \pm 0,003	2,345 \pm 0,2169	0,67 \pm 0,04	4,1 \pm 0,4	0,92 \pm 0,04
	DS	0,412 \pm 0,025	4,131 \pm 0,2690	1,07 \pm 0,06	16,6 \pm 0,8	3,64 \pm 0,21
Previamente desnutridos PD	VO	0,075 \pm 0,010	0,003 \pm 0,0004	0,58 \pm 0,08	0,0 \pm 0,0	1,25 \pm 0,17
	DP	0,030 \pm 0,004	2,115 \pm 0,2261	0,68 \pm 0,05	3,7 \pm 0,4	0,98 \pm 0,08
	DS	0,403 \pm 0,020	4,089 \pm 0,2040	1,02 \pm 0,04	16,1 \pm 0,8	3,53 \pm 0,18
Análise Estatística para N e PD		C > VO ($p < 0,001$) C > B ($p < 0,001$) VO > B ($p < 0,001$)	C > VO ($p < 0,001$) C > B ($p < 0,001$) VO < B ($p < 0,001$)	C > VO ($p < 0,001$) C > B ($p < 0,001$) VO < B ($p < 0,001$)	C > VO ($p < 0,001$) C > B ($p < 0,001$) VO < B ($p < 0,001$)	C > VO ($p < 0,001$) C > B ($p < 0,001$) VO > B ($p < 0,001$)

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

6.2. Variação Percentual de Peso Corpóreo Pós-Trauma

Em média, os animais perderam peso pós-trauma. A perda de peso, no entanto, não foi diferente sob o ponto de vista estatístico, entre todos os grupos do experimento ao se comparar entre nutridos e previamente desnutridos, independentemente da dieta ofertada por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia (Tabela 9).

Tabela 9 - Médias e desvios padrão da variação percentual de perda de peso, no 14º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (%)	dp	n
Nutridos N	VO	- 3,6	12,7	10
	DP	- 2,2	9,3	10
	DS	- 3,6	6,5	10
Previamente Desnutridos PD	VO	- 9,9	9,0	9
	DP	- 7,1	7,1	9
	DS	- 2,0	3,3	9

dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

6.3. Medida da Área Digitalizada da Lesão Cutânea

Ratos nutridos apresentaram maior porcentagem (8,6%) no fechamento da lesão cutânea quando comparado aos ratos previamente desnutridos, independentemente da oferta de dieta oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia. Isso foi observado no primeiro período (entre o dia da cirurgia e o 7º dia pós-trauma) e também no segundo período (entre o 7º e o 14º dias pós-trauma) ($p < 0,001$). Para todos os grupos experimentais, houve maior fechamento no segundo período em relação ao primeiro período. Não houve diferenças significativas no fechamento da lesão cutânea ao se considerar a dieta oral ou as diferentes dietas enterais administradas para os animais nutridos e previamente desnutridos (Tabela 10 e Gráfico 1).

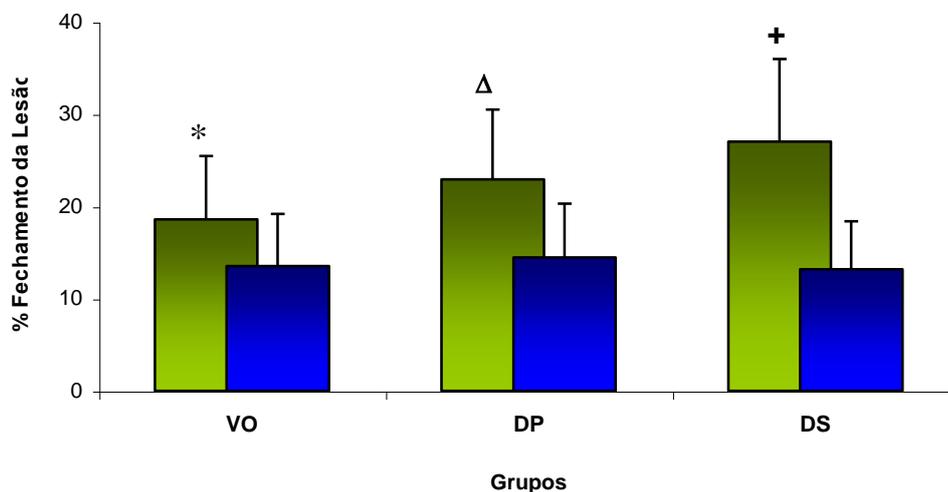
Tabela 10 - Médias e desvios padrão da porcentagem de fechamento da ferida cutânea nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Períodos	Médias (%)	dp	n
Nutridos N	VO	0 - 7 dias	18,58	6,87	10
		7 - 14 dias	81,10	6,89	10
	DP	0 - 7 dias	22,94	7,55	9
		7 - 14 dias	82,77	3,83	10
	DS	0 - 7 dias	27,04	8,92	10
		7 - 14 dias	80,90	6,31	10
Previamente Desnutridos PD	VO	0 - 7 dias	13,53	5,65	9
		7 - 14 dias	74,48	7,16	9
	DP	0 - 7 dias	14,46	5,85	9
		7 - 14 dias	75,53	8,46	6
	DS	0 - 7 dias	13,20	5,18	9
		7 - 14 dias	71,16	11,36	9

dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 1 - Médias e erros padrão da porcentagem de fechamento da ferida cutânea nos diferentes grupos experimentais.

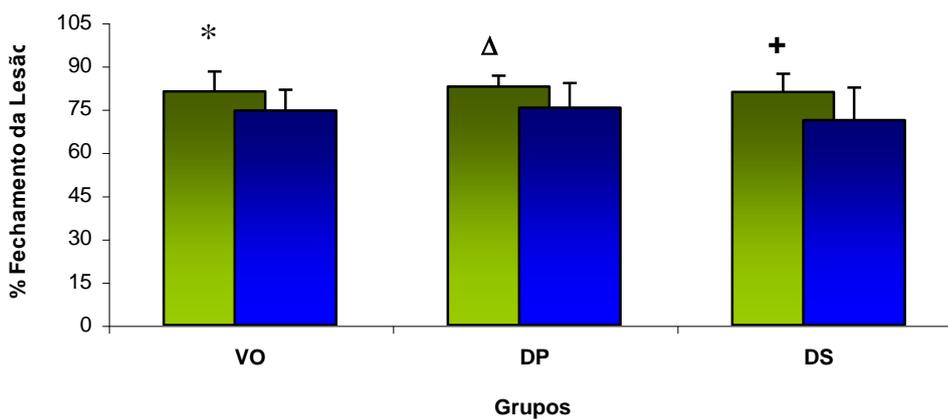


■ 0-7º Dia PT - Nutridos

■ 0-7º Dia PT - Previamente Desnutridos

Período de 0-7º Dia Pós-Trauma ($p < 0,001$)

* N(VO) > PD(VO) Δ N(DP) > PD(DP) + N(DS) > PD(DS)



■ 7-14º Dia PT - Nutridos

■ 7-14º Dia PT - Previamente Desnutridos

Período de 7-14º Dia Pós-Trauma ($p < 0,001$)

* N(VO) > PD(VO) Δ N(DP) > PD(DP) + N(DS) > PD(DS)

6.4. Avaliação Histológica

6.4.1. Avaliação Microscópica da Epitelização e Espessura da Epiderme

O estudo da epitelização da ferida cutânea não apontou diferenças significativas entre os animais nutridos e previamente desnutridos, no 7º dia pós-trauma, independente da dieta oral ou dieta enteral administrada.

No 14º dia pós-trauma, os ratos nutridos apresentaram maior frequência de epitelização completa quando comparados aos animais previamente desnutridos, independentemente da dieta ofertada por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia ($p=0,002$) (Tabela 11).

Não houve diferenças estatísticas no grau de espessura da epiderme entre ratos nutridos e previamente desnutridos, independentemente da dieta oral ou dieta enteral administrada no 7º e 14º dias pós-trauma (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição dos animais dos distintos grupos experimentais de acordo com as alterações de epitelização e espessura no 7º e 14º dias pós-trauma. Valores submetidos à regressão logística, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Epitelização				Espessura					
		7º PT		14º PT		7º PT			14º PT		
		C	I	C	I	F	M	E	F	M	E
Nutridos N	VO	1	8	6	3	9	0	0	6	3	0
	DP	0	10	6	4	10	0	0	7	3	0
	DS	1	9	4	5	10	0	0	6	3	0
Previamente Desnutridos PD	VO	0	9	0	8	6	3	0	3	5	0
	DP	0	9	2	6	9	0	0	6	2	0
	DS	0	9	1	8	8	1	0	8	1	0

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

C - Completa; I - Incompleta; F - Fina; M - Média; E - Espessa

6.4.2. Avaliação Microscópica Relacionada à Derme

O remodelamento da derme no processo cicatricial foi acompanhado pela análise dos parâmetros de recomposição, predominância de fibroblastos ou fibrócitos, características do núcleo dos fibroblastos e intensidade de infiltrado inflamatório.

A derme mostrou-se parcialmente recomposta, no 7^o dia pós-trauma, em todos os animais dos diferentes grupos experimentais.

No 14^o dia pós-trauma, os grupos de ratos nutridos apresentaram maior número de animais com recomposição total da derme quando comparado aos ratos previamente desnutridos, independentemente da dieta oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia ($p=0,009$) (Tabela 12).

A freqüência de fibroblastos e fibrócitos no tecido de granulação, no 7^o dia pós-trauma, dos animais nutridos e previamente desnutridos não se mostrou diferente, independentemente da dieta ofertada por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia.

No 14^o dia pós-trauma, os ratos nutridos apresentaram maior quantidade de fibrócitos quando comparados aos animais previamente desnutridos, independentemente da dieta oral ou dieta enteral administrada (Tabela 12).

Animais nutridos e previamente desnutridos dos distintos grupos apresentaram fibroblastos com núcleo frouxo, independentemente da oferta

de dieta por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia no 7º dia pós-trauma.

Ratos nutridos, no 14º dia pós-trauma, apresentaram maior número de fibroblastos com núcleos densos quando comparados aos ratos previamente desnutridos ($p=0,002$), independentemente da oferta de dieta oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia. Os ratos previamente desnutridos que receberam dieta enteral padrão apresentaram maior quantidade de fibroblastos com núcleos densos quando comparados aos ratos previamente desnutridos que receberam dieta oral ($p=0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição dos animais dos distintos grupos experimentais de acordo com as alterações presentes na derme (recomposição, presença de fibroblastos ou fibrócitos e qualidade do núcleo dos fibroblastos) no 7º e 14º dias pós-trauma. Valores de recomposição da derme e característica do núcleo de fibroblastos foram submetidos à regressão logística, considerando $p < 0,05$. Valores referentes à presença de fibroblastos e fibrócitos foram submetidos ao teste Qui-quadrado, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Recomposição				Fibroblastos / Fibrócitos						Núcleo dos Fibroblastos			
		7º dia PT		14º dia PT		7º dia PT			14º dia PT			7º dia PT		14º dia PT	
		P	T	P	T	B	C	B+C	B	C	B+C	F	D	F	D
Nutridos N	VO	9	0	3	6	7	0	2	0	7	2	8	1	1	8
	DP	10	0	3	7	8	0	2	0	7	3	10	0	1	9
	DS	10	0	5	4	8	0	2	3	5	1	10	0	3	6
Previamente Desnutridos PD	VO	9	0	7	1	9	0	0	7	1	0	9	0	7	1
	DP	9	0	6	2	9	0	0	1	2	5	9	0	2	6
	DS	9	0	6	3	8	0	1	6	1	2	9	0	6	3

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

P - Parcial; T - Total; B - Fibroblastos; C - Fibrócitos; B + C - Fibroblastos e fibrócitos

F - Frouxo; D - Denso

6.4.3. Intensidade de Infiltrado Inflamatório na Derme

A intensidade de infiltrado inflamatório, no 7º dia pós-trauma, dos animais nutridos e previamente desnutridos não se mostrou diferente, independentemente da oferta de dieta oral ou administração de dieta enteral por via gastrostomia.

Ratos previamente desnutridos, no 14º dia pós-trauma, apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório quando comparados aos ratos nutridos ($p=0,01$), independentemente da oferta de dieta por via oral ou tipo de dieta enteral administrada por via gastrostomia (Tabela 13).

Tabela 13 - Distribuição dos animais dos distintos grupos experimentais de acordo com as alterações da intensidade do infiltrado inflamatório no 7º e 14º dias pós-trauma. Valores foram submetidos ao teste Qui-quadrado, considerando $p<0,05$.

Grupos		Infiltrado Inflamatório 7º dia PT				Infiltrado Inflamatório 14º dia PT			
		A	P	M	I	A	P	M	I
Nutridos N	VO	0	0	5	4	2	5	2	0
	DP	0	1	6	3	4	5	1	0
	DS	0	2	3	5	1	6	1	1
Previamente Desnutridos PD	VO	0	0	5	4	0	2	4	2
	DP	0	0	6	3	1	4	3	0
	DS	0	0	8	1	0	1	8	0

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

A - Ausente; P - Pouco; M - Moderado; I - Intenso

6.4.4. Contagem Diferencial de Vascularização na Derme

Para todos os grupos do experimento, a quantidade de vascularização foi maior no 7º dia pós-trauma quando comparados ao 14º dia pós-trauma ($p < 0,0001$). Ratos nutridos e previamente desnutridos não apresentaram diferença significativa, independentemente da oferta de dieta oral ou administração de dieta enteral por via gastrostomia (Tabela 14).

Tabela 14 - Comparação das médias e desvios padrão dos valores de vascularização, no 7º e 14º dias pós-trauma, dos distintos grupos experimentais. Valores foram submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Dias	Médias	dp	n
Nutridos N	VO	7º Dia	81,33	25,38	9
		14º Dia	57,78	30,41	9
	DP	7º Dia	91,00	27,40	10
		14º Dia	49,80	28,25	10
	DS	7º Dia	70,90	41,08	10
		14º Dia	49,78	14,75	9
Previamente Desnutridos PD	VO	7º Dia	74,22	18,16	9
		14º Dia	43,44	25,74	9
	DP	7º Dia	75,78	29,81	9
		14º Dia	57,75	27,26	8
	DS	7º Dia	62,75	31,48	8
		14º Dia	49,11	21,27	9

dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

6.4.5. Contagem Diferencial de Células Inflamatórias na Derme

Ratos previamente desnutridos, no 7^o dia pós-trauma, apresentaram maior quantidade de neutrófilos quando comparados aos ratos nutridos ($p=0,01$), independentemente da administração de dieta por via oral ou dieta enteral por via gastrostomia.

Ainda, no 7^o dia pós-trauma, os animais nutridos apresentaram maior quantidade de linfócitos quando comparados aos ratos previamente desnutridos ($p=0,02$), independentemente da oferta de dieta oral ou tipo de dieta enteral administrada por via gastrostomia.

O número médio de macrófagos, no 7^o dia pós-trauma, apresentou aumento significativo apenas nos animais previamente desnutridos que receberam dieta enteral padrão quando comparados aos previamente desnutridos com dieta oral ou dieta enteral suplementada ($p=0,02$).

A quantidade de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, no 14^o dia pós-trauma, dos animais nutridos e previamente desnutridos não se mostrou diferente, independentemente da oferta de dieta oral ou tipo de dieta enteral administrada por via gastrostomia (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação das médias e desvios padrão dos valores da contagem de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), no 7^o e 14^o dias pós-trauma, para os diferentes grupos experimentais. Valores submetidos ao modelo de Poisson, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Neutrófilos		Linfócitos		Macrófagos	
		7 ^o dia PT	14 ^o dia PT	7 ^o dia PT	14 ^o dia PT	7 ^o dia PT	14 ^o dia PT
Nutridos N	VO	9,11 ± 5,37	3,33 ± 3,81	108,78 ± 103,9	84,44 ± 40,44	20,33 ± 17,61	2,89 ± 3,30
	DP	19,90 ± 25,74	4,60 ± 6,67	138,8 ± 128,92	104,7 ± 53,65	40,20 ± 40,81	4,70 ± 5,25
	DS	6,90 ± 4,36	22,44 ± 38,5	139,5 ± 119,0	130,22 ± 92,81	19,40 ± 18,21	11,11 ± 16,51
Previamente Desnutridos PD	VO	52,22 ± 72,52	15,44 ± 16,13	76,22 ± 29,41	101,11 ± 39,39	24,44 ± 24,16	6,33 ± 5,61
	DP	12,33 ± 9,68	3,88 ± 5,74	66,44 ± 30,05	89,00 ± 33,59	70,89 ± 60,70	3,25 ± 3,88
	DS	87,88 ± 142,31	4,89 ± 4,11	43,88 ± 22,44	93,78 ± 52,12	36,75 ± 35,94	9,11 ± 12,88

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

As figuras 16 e 17 demonstram o aspecto microscópico do tecido de granulação no 7^o e 14^o dias pós-trauma.

Figura 16 – Aspecto microscópico do tecido de granulação, no 7º dia pós-trauma, de animal nutrido que recebeu dieta por via oral. Aspecto ricamente vascularizado e grande quantidade de células. A - aumento de 50x; B - aumento de 640x.

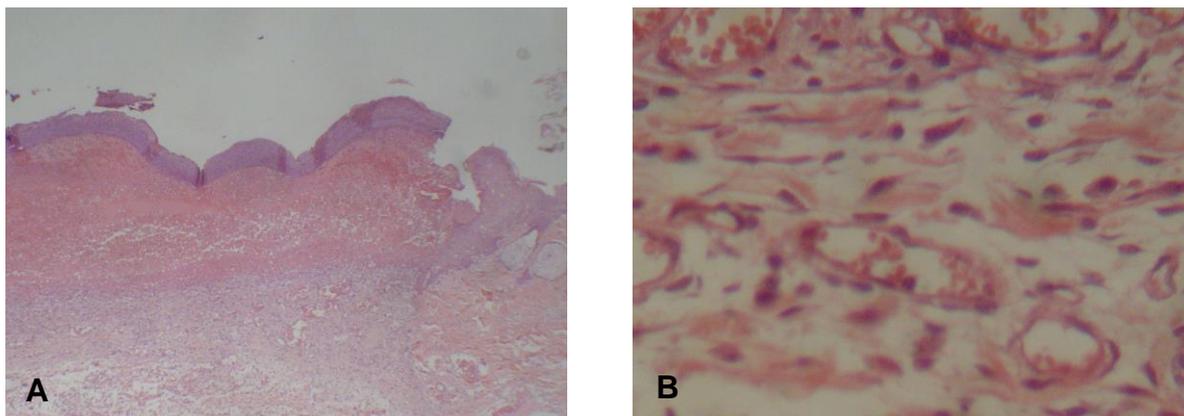
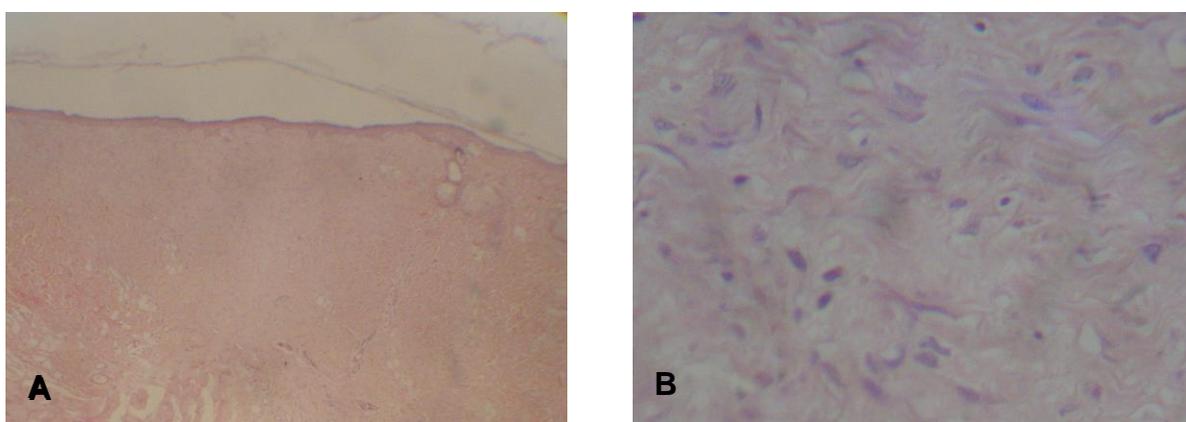


Figura 17 – Aspecto microscópico do tecido de granulação, no 14º dia pós-trauma, de animal nutrido que recebeu dieta por via oral. Aspecto de diminuição dos vasos sanguíneos e células. A - aumento de 50x; B - aumento de 640x.



6.4.6. Quantificação de Colágeno Total

Para todos os grupos do experimento, os valores de colágeno total foram maiores no 14º dia pós-trauma quando comparados ao 7º dia pós-trauma ($p < 0,0001$). A quantificação de colágeno total não apontou diferença significativa, no 7º e 14º dias pós-trauma, ao comparar os ratos com oferta de dieta por via oral ou dietas enterais administradas por via gastrostomia (Tabela 16 e Gráfico 2).

As figuras 18 e 19 mostram a identificação do colágeno total em corte histológico de pele normal e no tecido de granulação.

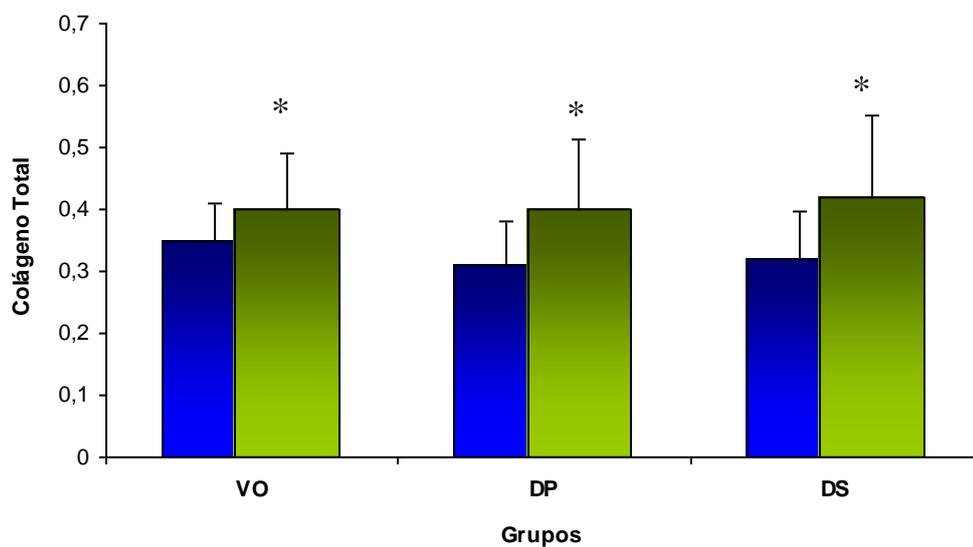
Tabela 16 - Médias e desvios padrão da quantidade de colágeno total (μm^2) nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias com medidas repetidas, considerando $p < 0,05$.

Grupos	Dias	Médias (μm^2)	dp	n	
Nutridos N	VO	7º Dia	0,31	0,067	8
		14º Dia	0,38	0,069	9
	DP	7º Dia	0,31	0,043	10
		14º Dia	0,37	0,034	8
	DS	7º Dia	0,31	0,046	8
		14º Dia	0,34	0,043	8
Previamente Desnutridos PD	VO	7º Dia	0,35	0,060	9
		14º Dia	0,40	0,089	9
	DP	7º Dia	0,31	0,072	9
		14º Dia	0,40	0,112	8
	DS	7º Dia	0,32	0,077	9
		14º Dia	0,42	0,131	9

dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

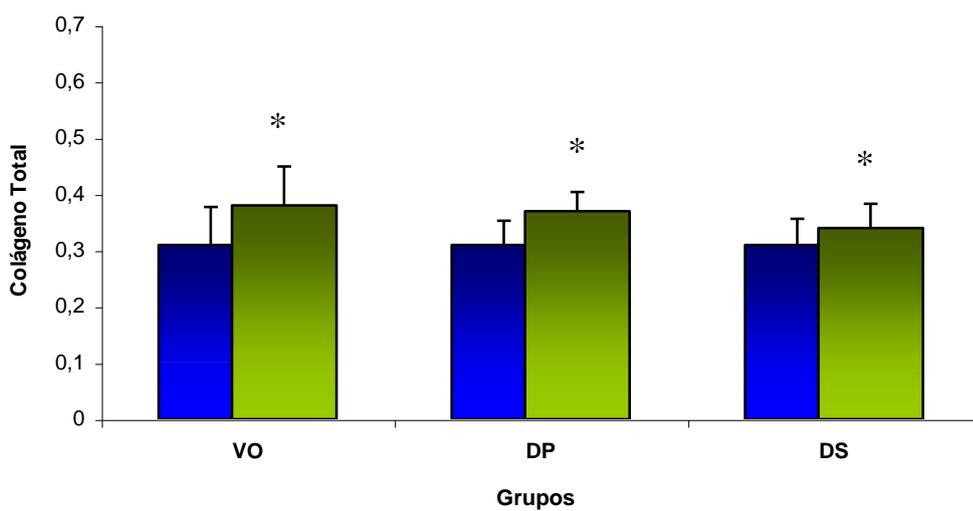
VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 2 - Médias e desvios padrão da quantidade de colágeno total (μm^2) nos diferentes grupos experimentais.



Ratos Previamente Desnutridos

* 14^o Dia PT > 7^o Dia PT ($p < 0,001$)



Ratos Nutridos

* 14^o Dia PT > 7^o Dia PT ($p < 0,001$)

Figura 18 - Identificação do colágeno total. Microfotografia de corte histológico de pele de rato nutrido controle, que não foi submetido à intervenção cirurgia e trauma cutâneo dorsal. Aumento de 200x.

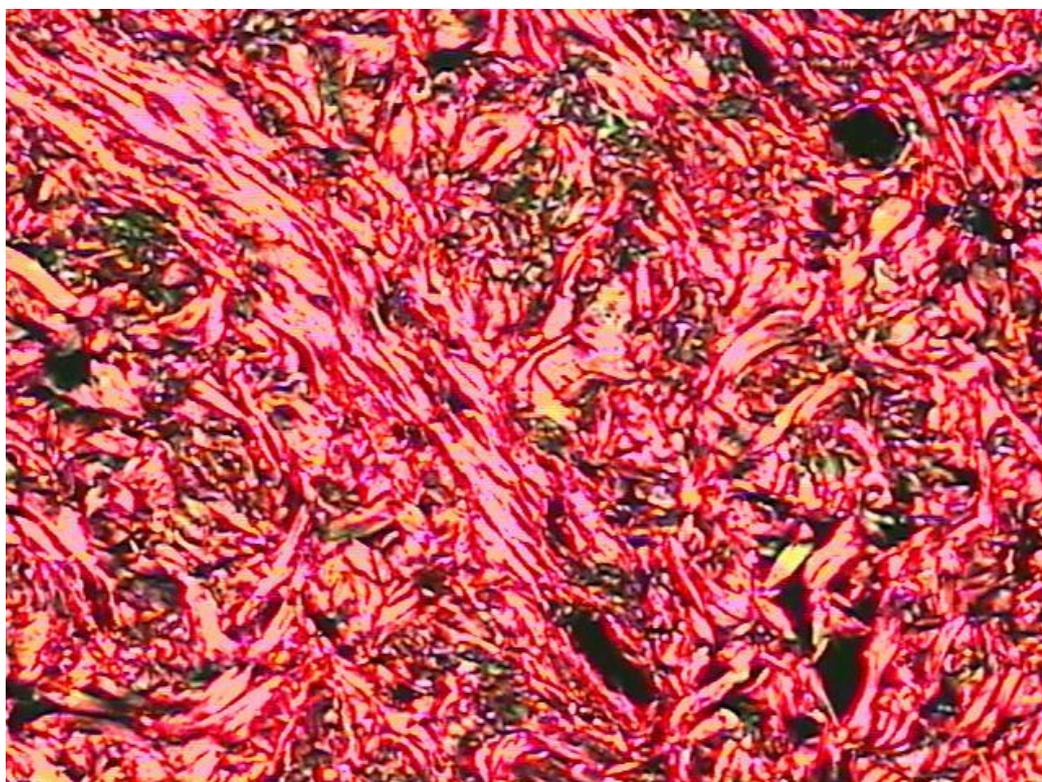
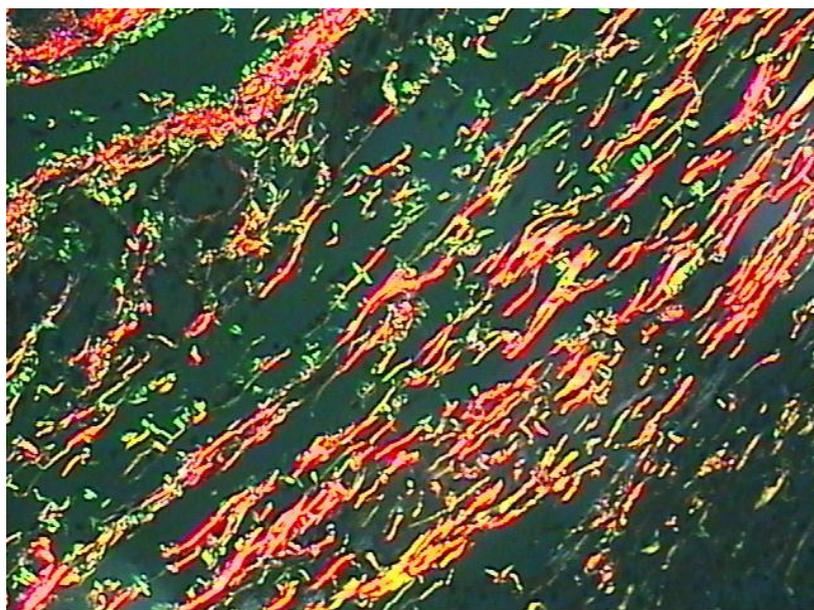
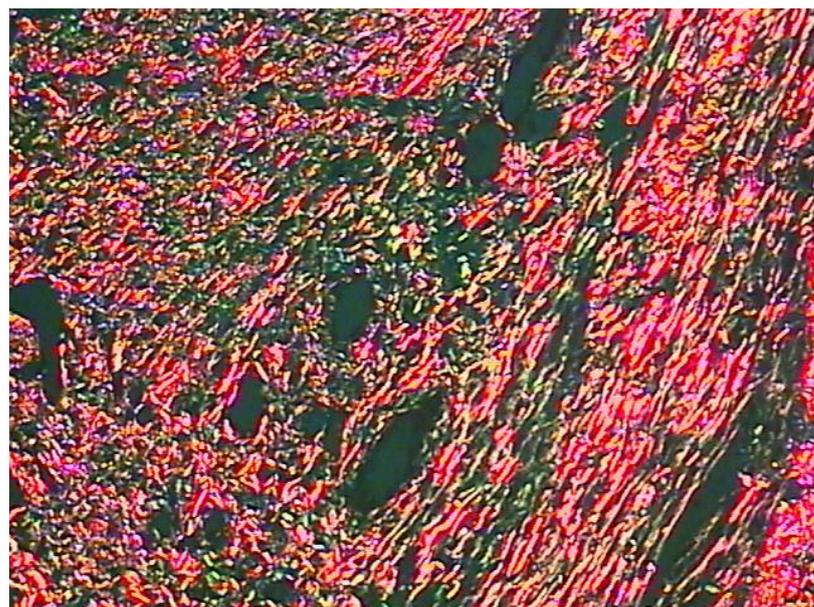


Figura 19 - Identificação do colágeno total. Microfotografia de corte histológico do tecido de granulação de rato previamente desnutrido e submetido a gastrostomia e trauma cutâneo dorsal que recebeu dieta por via oral. **A** - 7º dia pós-trauma; **B** - 14º dia pós-trauma. Aumento de 200x.

**A****B**

6.5. Avaliação Imunoistoquímica da Expressão de Miofibroblastos

Não houve diferenças estatísticas na avaliação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação entre ratos nutridos e previamente desnutridos, independentemente da oferta de dieta oral ou tipo de dieta enteral administrada no 7º e 14º dias pós-trauma (Tabela 17).

Tabela 17 - Distribuição dos animais dos distintos grupos experimentais de acordo com as alterações da expressão de miofibroblastos no 7º e 14º dias pós-trauma. Valores foram submetidos ao teste Qui-quadrado, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Miofibroblastos 7º dia PT				Miofibroblastos 14º dia PT			
		A	P	M	I	A	P	M	I
Nutridos N	VO	3	3	3	0	1	3	3	2
	DP	9	0	1	0	0	6	3	1
	DS	4	3	3	0	5	2	1	2
Previamente Desnutridos PD	VO	7	1	1	0	2	4	2	1
	DP	7	1	0	1	3	3	3	0
	DS	5	3	0	1	3	1	2	2

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

A - Ausente; P - Pouco; M - Moderado; I - Intenso

6.6. Análise da Expressão Gênica

6.6.1. Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)

Ratos previamente desnutridos que receberam as dietas enterais padrão e suplementada tenderam a apresentar maior quantidade média de TGF- β que os ratos previamente desnutridos que receberam dieta por via oral ($p = 0,06$). Comparando-se apenas os ratos que receberam dieta por via oral, observou-se maior expressão de TGF- β (média 0,96) em ratos nutridos quando comparado aos previamente desnutridos ($p = 0,01$) (Tabela 18 e Gráfico 3).

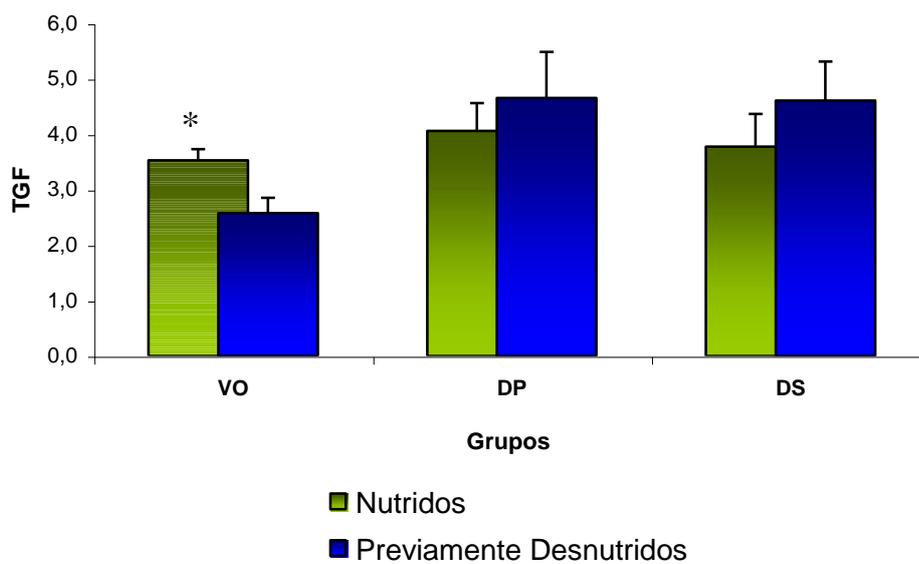
Tabela 18 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de TGF- β (UA), no 7^o dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	3,53	0,57	8
	DP	4,06	1,58	10
	DS	3,78	1,85	10
Previamente Desnutridos PD	VO	2,58	0,83	9
	DP	4,66	2,49	9
	DS	4,61	2,11	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 3 - Médias e erros padrão da expressão gênica de TGF- β (UA), no 7^o dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



* N(VO) > PD(VO) (p = 0,01)

6.6.2. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Ratos nutridos que receberam dieta enteral suplementada apresentaram maior expressão de VEGF (0,51 UA), quando comparados aos animais previamente desnutridos que receberam a mesma dieta ($p = 0,04$) (Tabela 19 e Gráfico 4).

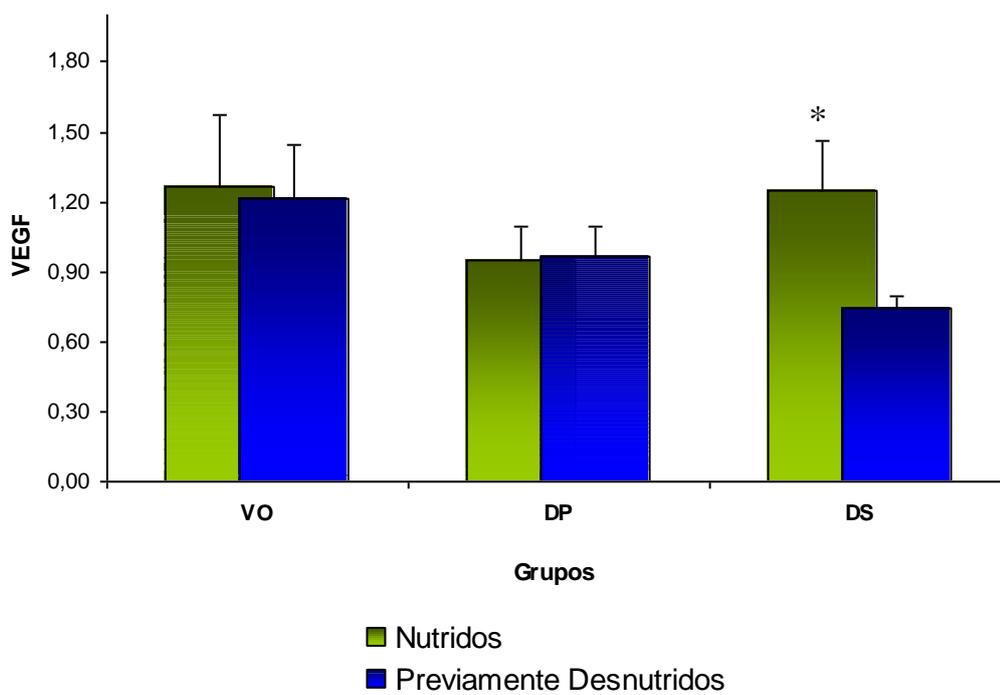
Tabela 19 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de VEGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	1,27	0,97	10
	DP	0,95	0,46	10
	DS	1,25	0,66	10
Previamente Desnutridos PD	VO	1,21	0,70	9
	DP	0,97	0,37	9
	DS	0,74	0,16	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 4 - Médias e erros padrão da expressão gênica de VEGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



* N(DS) > PD(DS) (p = 0,04)

6.6.3. Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF)

Não foram observadas diferenças significativas na quantidade média de PDGF, no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais (Tabela 20 e Gráfico 5).

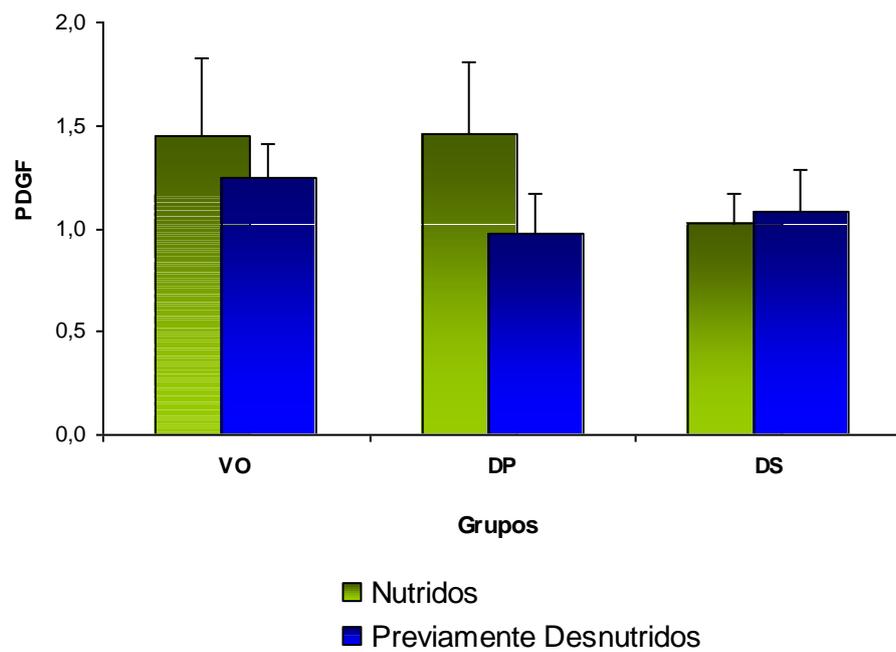
Tabela 20 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de PDGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	1,45	1,15	9
	DP	1,46	1,12	10
	DS	1,02	0,45	10
Previamente Desnutridos PD	VO	1,24	0,51	9
	DP	0,97	0,60	9
	DS	1,08	0,62	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 5 - Médias e erros padrão da expressão gênica de PDGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



Sem diferença estatística

6.6.4. Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF)

Ratos nutridos apresentaram maior quantidade de KGF quando comparados aos ratos previamente desnutridos, independente da oferta de dieta por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia ($p = 0,03$) (Tabela 21 e Gráfico 6).

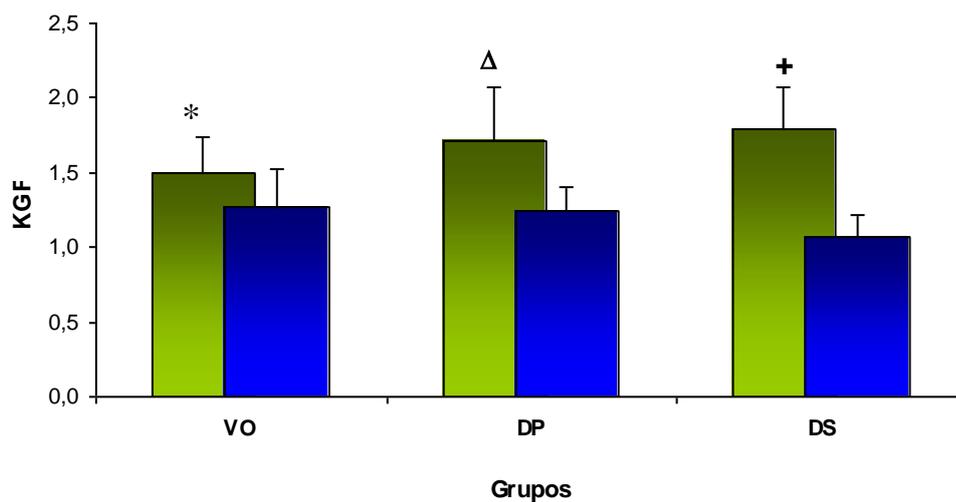
Tabela 21 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de KGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	1,50	0,72	9
	DP	1,71	1,16	10
	DS	1,79	0,89	10
Previamente Desnutridos PD	VO	1,27	0,78	9
	DP	1,24	0,50	9
	DS	1,07	0,45	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 6 - Médias e erros padrão da expressão gênica de KGF (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



■ Nutridos
■ Previamente Desnutridos

* N(VO) > PD(VO) (p=0,03)

Δ N(DP) > PD(DP) (p=0,03)

+ N(DS) > PD(DS) (p=0,04)

6.6.5. Expressão Gênica do Colágeno 3

Ratos nutridos apresentaram maiores quantidades médias de colágeno 3 quando comparados aos ratos previamente desnutridos ($p = 0,006$), independentemente da oferta de dieta por via oral ou dieta enteral administrada por via gastrostomia (Tabela 22 e Gráfico 7).

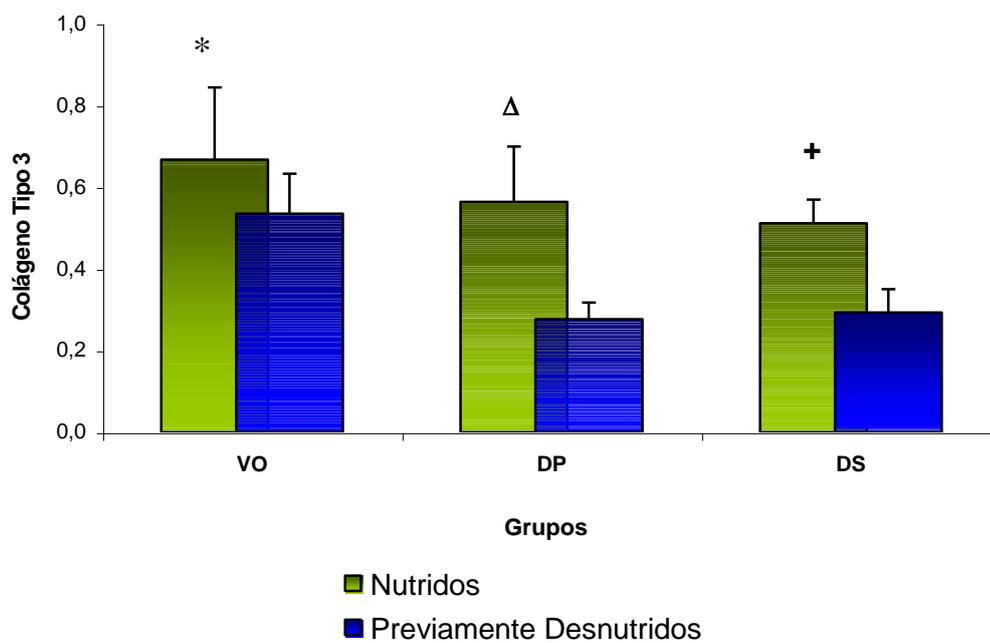
Tabela 22 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de colágeno 3 (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	0,67	0,53	9
	DP	0,56	0,43	10
	DS	0,51	0,18	10
Previamente Desnutridos PD	VO	0,54	0,29	9
	DP	0,28	0,12	9
	DS	0,29	0,17	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 7 - Médias e erros padrão da expressão gênica de colágeno 3 (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



* N(VO) > PD(VO) (p=0,01)

Δ N(DP) > PD(DP) (p=0,01)

+ N(DS) > PD(DS) (p=0,01)

6.6.6. Expressão Gênica do Colágeno 1

Ratos nutridos apresentaram maiores quantidades médias de colágeno 1 quando comparados a ratos previamente desnutridos ($p = 0,03$). Ratos nutridos e previamente desnutridos que receberam dieta por via oral apresentaram maior quantidade de colágeno 1 quando comparado aos que receberam as dietas enterais padrão e suplementada por gastrostomia ($p = 0,05$) (Tabela 23 e Gráfico 8).

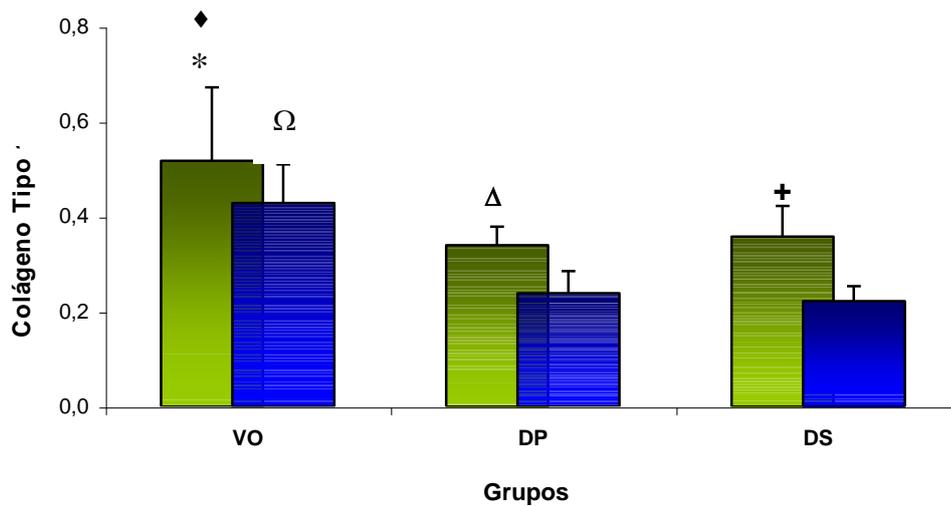
Tabela 23 - Médias e desvios padrão da expressão gênica de colágeno 1 (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais. Valores submetidos à análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

Grupos		Médias (UA)	dp	n
Nutridos N	VO	0,52	0,47	9
	DP	0,34	0,12	10
	DS	0,36	0,21	10
Previamente Desnutridos PD	VO	0,43	0,25	9
	DP	0,24	0,14	9
	DS	0,22	0,10	9

UA – Unidade arbitrária; dp – Desvio padrão; n – Número de ratos

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Gráfico 8 - Médias e erros padrão da expressão gênica de colágeno 1 (UA), no 7º dia pós-trauma, nos diferentes grupos experimentais.



■ Nutridos
 ■ Previamente Desnutridos

* N(VO) > PD(VO) (p=0,01)

Δ N(DP) > PD(DP) (p=0,01)

+ N(DS) > PD(DS) (p=0,01)

♦ N(VO) > N(DP) e N(DS)

Ω PD(VO) > PD(DP) e PD(DS)

6.7. Resumo dos Resultados

Para melhor interpretação, a tabela 24 e 25 apresenta o resumo dos resultados obtidos.

Tabela 24 – Resumo dos resultados obtidos, na presente pesquisa, das diferentes variáveis envolvidas no processo cicatricial, no 7º e 14º dias pós-trauma, nos distintos grupos experimentais.

Variáveis	7º dia PT	14º dia PT	7º vs 14º dia PT
	Análises Histológicas		
Intensidade de Infiltrado inflamatório	N = PD	PD > N	7º > 14º
Neutrófilos	PD > N	N = PD	7º > 14º
Linfócitos	N > PD	N = PD	7º > 14º
Macrófagos	PD(DP) > PD(DS) e PD (VO)	N = PD	7º > 14º
Vascularização	N = PD	N = PD	7º > 14º
Epitelização completa	N = PD	N > PD	7º < 14º
Espessura da epiderme	N = PD	N = PD	7 = 14
Predominância de fibrócitos	N = PD	N > PD	7º < 14º
Núcleo denso dos fibroblastos	N = PD	N > PD PD(DP) > PD(VO)	7º < 14º
Recomposição total da derme	N = PD	N > PD	7º < 14º
Análise Imunoistoquímica			
Miofibroblastos	N = PD	N = PD	N = PD
Quantificação Colágeno Total			
Colágeno total	N = PD	N = PD	7º < 14º
Medida da Área da Lesão			
Fechamento da Lesão	N > PD	N > PD	7º < 14º

PT – Pós-Trauma; N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

Tabela 25 – Resumo dos resultados obtidos, na presente pesquisa, das análises da expressão gênica, no 7º dia pós-trauma, nos distintos grupos experimentais.

Variáveis	7º dia PT
	Análise da Expressão Gênica
TGF-beta	N(VO) > PD(VO)
VEGF	N(DS) > PD(DS)
PDGF	N = PD
KGF	N > PD
Colágeno 3	N > PD
Colágeno 1	N > PD N(VO) > N(DP) e N(DS) PD(VO) > PD(DP) e PD(DS)

PT – Pós-Trauma; N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido

VO – Dieta por via oral; DP – Dieta enteral padrão; DS – Dieta enteral suplementada

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Do planejamento experimental

O rato foi o animal escolhido para a presente pesquisa por apresentar características biológicas que possibilitam facilidade de manuseio e acompanhamento, ter resistência à manipulação, baixo custo e ser amplamente utilizado em estudos que evidenciam a influência da nutrição sobre o metabolismo corpóreo.

Foram utilizados ratos adultos, machos, com peso corpóreo entre 250 e 350 gramas. Optou-se por utilizar ratos isogênicos, da cepa *Lewis*, com o intuito de diminuir a variabilidade dos resultados obtidos. Animais isogênicos são modificados geneticamente através do acasalamento de irmãos, fazendo com que características parentais estejam presentes. Esse tipo de animal faz com que a variabilidade genética seja diminuída ou eliminada, o que resulta em características uniformes.

Na literatura são encontrados diversos modelos experimentais para o estudo de desnutrição e cicatrização. Alguns obtêm perda de peso corpóreo ao ofertar dietas com redução, em quantidades variadas, de calorias e nitrogênio, ou mesmo quando submetem os animais a jejum por período prolongado. Muitos são os autores que se valem de dietas isentas de proteínas para desencadear o processo de desnutrição. Modolin et al. (1982), para lograr desnutrição, submeteram ratos à dieta absolutamente privada de nitrogênio por 21 dias. Semelhantemente, Endo et al. (2002)

ministraram a ratos dieta isenta de nitrogênio por sete dias. Nas mesmas linhas de pesquisa, Oishi et al. (2002), durante oito dias, ofereceram dieta livre de proteínas a ratos para subsequente avaliar as consequências da desnutrição sobre a produção de hidroxiprolina. O objetivo da presente pesquisa foi aplicar um modelo de desnutrição que tenha semelhanças a prática clínica. Após vários estudos pilotos realizados em nosso laboratório, o modelo de desnutrição adotado para a presente pesquisa baseou-se na restrição dietética (calórica-protéica e micronutrientes). Em relação a ingestão de ratos controle da mesma idade, ofereceu-se a metade da dieta padrão AIN 93 consumida por ratos controles mantidos em nutrição. Os animais foram controlados diariamente e, após 14 dias de restrição alimentar, apresentaram de 12 a 15% de perda de peso em relação ao seu peso corpóreo inicial, enquanto o grupo controle ganhou peso. O procedimento adotado se adequou aos nossos objetivos, pois ocorreu perda lenta de peso corpóreo e a quantidade de peso corpóreo perdida confirmou desnutrição e permitiu manipulação traumática posterior com sobrevivência dos ratos.

Terapia nutricional é utilizada no tratamento integral de pacientes com trauma (Moreira, 2000). A via de administração de nutrientes tem influência específica. A nutrição por via enteral está associada à diminuição das complicações sépticas, efeito trófico, preservação da estrutura da mucosa do trato gastrointestinal e na manutenção da resposta imunológica local e sistêmica (Lin et al., 1996) quando comparada à nutrição parenteral, que pode induzir atrofia da mucosa intestinal (Weser et al., 1985).

A nutrição por via enteral foi comparada à parenteral em um estudo de cicatrização experimental. Kiyama et al. (1998) observaram, experimentalmente, no 5º dia pós-trauma cutâneo, aumento na resistência tênsil de sutura em lesão dorsal e aumento da proteína total no grupo que recebeu nutrição enteral (NE) quando comparado à dieta isocalórica e isonitrogenada administrada por via parenteral (NP). Utilizando-se de esponjas de polivinil-álcool implantadas em tecido subcutâneo dorsal, verificaram maior expressão no colágeno tipo I no grupo que recebeu NE e não observaram diferenças no colágeno tipo III entre os grupos NE e NP.

A nutrição enteral precoce tem efeito benéfico sobre variáveis nutricionais, diminuição da permanência hospitalar, sepse após trauma e no processo cicatricial (Chiarelli et al., 1990; Jenkins et al. 1991; Moore & Joones, 1986). Especificamente sobre a cicatrização cutânea, Zaloga et al. (1992) verificaram menor perda de peso e aumento de duas vezes na resistência tênsil em animais com NE precoce quando comparados ao que receberam NE administrada 72 horas pós-trauma.

Considerando as vantagens descritas para o início precoce da nutrição sobre o processo cicatricial, o presente experimento optou por iniciar a administração de glicose 5% via gastrostomia e 24 horas após o ato operatório as diferentes dietas. As quantidades diárias administradas foram aproximadamente 60 kcal e 0,36 gramas de nitrogênio, conforme recomendação para as necessidades de ratos adultos em manutenção. Esta quantidade oferecida em nossa pesquisa, está em consonância com aqueles usados por Kiyama et al. (1998, 1999).

Do modelo experimental

O processo de cicatrização de feridas experimentais têm sido estudado com o objetivo de tentar compreender os mecanismos envolvidos durante o processo de reparo em humanos. No entanto, modelos experimentais obrigam cautela na interpretação dos resultados, pois existem diferenças fundamentais entre animais e humanos (Brown et al., 1993).

Experimentalmente, três métodos podem ser utilizados para avaliar o processo cicatricial: a determinação da força necessária para romper o tecido cicatrizado, observação do índice de fechamento da ferida e a verificação/quantificação de um evento ocorrido durante o processo de reparo (Goodson, 1987).

Salientam-se entre os diversos modelos disponíveis, os de incisões dorsais com implante subcutâneo de esponjas de celulose ou polivinil-álcool, que são utilizados para analisar o exsudato da ferida (Efron et al., 2001; Shukla et al., 1998; Mistry et al., 1994).

Os modelos de feridas abertas permitem estudar os principais mecanismos envolvidos na cicatrização, como contração, reepitelização e formação do tecido de granulação que envolve a ação de diferentes células até o momento da formação de uma cicatriz (Galiano et al., 2004). Entre nós, Modolin et al. (1982 e 1984) realizaram lesão cutânea em forma retangular na região dorsal de ratos nutridos e desnutridos para avaliar o processo cicatricial. ~~De seu lado,~~ Rasik & Shukla (2000) estudaram o estado

antioxidante em feridas crônicas valendo-se de quatro lesões cutâneas circulares realizadas no dorso de ratos diabéticos. Ainda, Muangman et al. (2004) realizaram lesão cutânea circular de 6 mm no dorso de ratos diabéticos para verificar se a aplicação tópica de fator de crescimento do nervo (NGF) apresenta ação sobre o aumento do reparo cicatricial.

O modelo escolhido para o desenvolvimento da presente pesquisa permitiu estudar seqüencialmente o processo de cicatrização de uma ferida aberta, nos diferentes eventos celulares, moleculares e de contração. A ferida foi realizada através da retirada de quatro fragmentos da pele dorsal, expondo a fásciafascia muscular. O modelo experimental desenvolvido permitiu a redução do número de ratos no experimento, pois em cada rato foi possível avaliar eventos ocorridos no momento do trauma (cirurgia), no 7º e 14º dias pós-trauma.

Dos efeitos da desnutrição sobre a cicatrização cutânea

A cada ano, o sistema de saúde dispense vultosos recursos financeiros para o tratamento de feridas cutâneas decorrentes de trauma como acidentes, queimaduras, cirurgias de grande porte ou úlceras por pressão em pacientes acamados. As feridas não cicatrizadas podem gerar problemas sócio-econômicos, como diminuição da produtividade e da qualidade de vida desses indivíduos, que é agravada na vigência de desnutrição de macro (energético-protéica) e micronutrientes (Stadelmann et al., 1998).

A desnutrição protéica altera o metabolismo de várias proteínas em diferentes partes do organismo, incluindo a pele, com retardo no processo de cicatrização cutânea (Patel, 2005).

Em que pesem o conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de cicatrização de feridas, pesquisas ainda são necessárias para determinar condicionantes que possam interferir nos eventos celulares, bioquímicos e gênicos envolvidos durante as fases que seguem o processo cicatricial.

O processo de cicatrização tecidual ocorre através de eventos inseridos em três diferentes fases (inflamatória, proliferativa e remodelamento) que são sobrepostas (Witte e Barbul, 1997).

A cicatrização de feridas inicia-se no momento da ruptura tecidual, com a fase inflamatória (Phillips, 2000). Na presente pesquisa, a quantidade de infiltrado inflamatório no tecido de granulação não apresentou diferença

no 7º dia pós-trauma nos distintos grupos experimentais. Uma possível explicação admite que os animais previamente desnutridos e realimentados com diferentes dietas possam ter iniciado a fase inflamatória mais tardiamente que os nutridos, mas que no 7º dia pós-trauma já tivessem alcançado o mesmo padrão de infiltrado inflamatório que os animais nutridos. Fato semelhante aconteceu em estudo desenvolvido por Modolin et al. (1982), que verificaram diminuição da resposta inflamatória no 1º dia pós-trauma nos animais desnutridos, porém no 4º dia pós-trauma os achados de inflamação não apresentaram diferenças em relação aos nutridos, muito embora os autores continuaram a alimentar os animais desnutridos com dieta aprotéica.

De outro lado, os animais previamente desnutridos apresentaram aumento do infiltrado inflamatório no 14º dia pós-trauma. Isso poderia, eventualmente, ser explicado pelo início mais tardio e ainda a permanência desses animais na fase inflamatória enquanto os animais nutridos já se encontravam na fase proliferativa com diminuição da quantidade de células inflamatórias.

Durante a fase inflamatória, células específicas agem na retirada de tecidos desvitalizados e bactérias e estimulam o reparo tecidual. As primeiras células a chegar no ambiente da ferida são os neutrófilos, que liberam grânulos para propiciar o debridamento do exsudato inflamatório presente na ferida. Os neutrófilos ativados liberam radicais livres e enzimas lisossomais (proteases, collagenases e elastases) que degradam

componentes desvitalizados da matriz extracelular anterior e auxiliam no controle da infecção através da limpeza da ferida (Stadelmann et al., 1998).

Por meio da contagem diferencial das células inflamatórias, verificamos no presente trabalho, no 7º dia pós-trauma, aumento da quantidade média de neutrófilos nos animais previamente desnutridos quando comparados aos nutridos. É possível que os animais previamente desnutridos realmente estivessem iniciando mais tardiamente a fase proliferativa e os neutrófilos ainda permanecessem em níveis elevados.

As quantidades das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), no 14º dia pós-trauma, apresentaram-se sem diferença entre os animais nutridos e os previamente desnutridos. Pode-se sugerir que os animais, independente do seu estado nutricional, nesse tempo (14º dia PT) já se apresentavam na fase proliferativa.

A reepitelização têm início horas após o trauma e segue até o fechamento total da ferida. Representa uma seqüência de eventos que envolvem a migração e proliferação de células epiteliais adjacentes ao local da ferida. O fator de crescimento do queratinócito (KGF) tem papel mitogênico nas células epiteliais durante o processo de reepitelização (Auf Demkeller et al., 2004).

Em nosso modelo experimental, houve aumento da expressão gênica do KGF, no 7º dia pós-trauma, nos ratos nutridos quando comparados aos previamente desnutridos. No entanto, no mesmo momento, a avaliação microscópica de epitelização da área da ferida não apresentou diferenças entre ratos nutridos e previamente desnutridos dos diferentes grupos

experimentais. Diferenças foram encontradas com aumento de epitelização, no 14º dia pós-trauma, nos animais nutridos ($p=0,002$) em relação aos previamente desnutridos. Assim, é possível que a expressão gênica aumentada de KGF no 7º dia pós-trauma dos ratos nutridos tenha se confirmado na maior epitelização da ferida cutânea no 14º dia pós-trauma.

O tecido de granulação é composto por uma matriz composta de fibroblastos, fibrócitos, células inflamatórias e novos vasos sanguíneos. Os fibroblastos produzem grande variedade de substâncias importantes no processo cicatricial. Durante o 2º ou 3º dias pós-trauma, os fibroblastos agem principalmente na proliferação e migração celular (Singer & Clark, 1999).

Em nosso experimento, no 7º dia pós-trauma, houve maior quantidade de fibroblastos, em relação a fibrócitos em todos os grupos experimentais. Aparentemente, a desnutrição prévia nos animais renutridos não afetou o número de fibroblastos.

Na presente pesquisa, no 14º dia pós-trauma, os ratos previamente desnutridos apresentaram maior quantidade de fibroblastos e presença de núcleos frouxos quando comparados aos nutridos independente da dieta oral ou enteral administrada por via gastrostomia. Isso pode sugerir que os ratos previamente desnutridos ainda estão em plena fase de proliferação, enquanto os ratos nutridos podem estar com diminuição da fase proliferativa.

O processo de recomposição da derme, avaliado na presente pesquisa, apontou que no 7º dia pós-trauma, todos os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram recomposição parcial. A

recomposição total da derme foi observada no 14º dia pós-trauma, sendo que ratos nutridos apresentaram maior frequência de recomposição total que os previamente desnutridos, independente da dieta enteral administrada. Essa observação corrobora com os achados do aumento do número de fibroblastos e a característica de núcleos frouxos nos animais previamente desnutridos. A análise conjunta dos resultados sugere que os animais previamente desnutridos apresentam retardo e dificuldade de progredir para a recomposição total da derme, mesmo com a realimentação por duas semanas.

Alguns fatores de crescimento possuem diferentes habilidades de promover o processo cicatricial por estimular a angiogênese, proliferação celular, síntese e degradação da matriz extracelular e serem quimiotáticos para células inflamatórias e fibroblastos (Goldman, 2004).

O PDGF e TGF-beta são liberados a partir de plaquetas ativadas. Ambos irão agir na indução da proliferação dos fibroblastos e estimular a produção da matriz extracelular e seus componentes (Staldemann et al., 1998).

Nossos achados não revelaram diferenças de expressão do PDGF nos diferentes grupos experimentais. Uma possível explicação diz respeito ao momento de pico de expressão gênica do PDGF, por volta do 3º dia pós-trauma, com estímulo para a proliferação de fibroblastos e quimiotáticos para neutrófilos (Martin, 1997). Assim, em nossa pesquisa, o estudo no 7º dia pós-trauma pode ter sido tardio para encontrar aumento na expressão desse fator de crescimento.

O TGF-beta age como potente mediador na formação da matriz extracelular e na produção de colágeno (Desmoulière et al., 1993). Durante o processo cicatricial, o pico de ação do TGF-beta pode variar entre o 7º e 14º dias pós-trauma (Chen et al., 1992). Está associado à síntese de colágeno tipo I pelos fibroblastos e diminuição na produção de metaloproteinases, eventos que ocorrem durante a formação do tecido de granulação (Yang et al., 1997).

A expressão gênica do TGF-beta no presente trabalho foi maior no 7º dia pós-trauma nos ratos nutridos quando comparados aos animais previamente desnutridos. Isto ocorreu de maneira significativa para os animais que receberam dieta por via oral, embora tenha sido verificada tendência para este fato também nos outros grupos.

O colágeno é o principal elemento constituinte do tecido conjuntivo. Existem pelo menos 13 tipos de colágenos. Os colágenos tipo I e III são os principais responsáveis pela resistência tênsil da pele (Prockop et al., 1979).

A produção de colágeno I e III é gerenciada pela expressão gênica de mRNA dos respectivos colágenos. Na presente pesquisa foram estudadas a biologia molecular dos colágenos I e III e a quantidade de colágeno total.

A quantidade de colágeno total, em todos os grupos experimentais, apresentou-se maior no 14º dia quando comparado ao 7º dia pós-trauma. Uma possível explicação é que a síntese de colágeno apresenta seu primeiro pico 7 dias após a lesão, com predominância das fibras imaturas (colágeno 3) que se tornam histologicamente visíveis na ferida. Com o decorrer da fase de remodelamento ocorre o progressivo aumento nas

quantidades de colágeno total, até o fechamento da lesão onde ocorrerá o equilíbrio entre a síntese e degradação das fibras colágenas (Stadelmann et al., 1998).

Trabalhos têm sido realizados para determinar os efeitos da deficiência protéica no conteúdo de colágeno da pele (Anasuya et al., 1970; Angeleli et al., 1978). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da desnutrição especificamente sobre os conteúdos de colágeno I e III.

Oishi et al. (2002) verificaram diminuição nos níveis de expressão gênica de mRNA dos colágenos I e III presentes na pele em ratos submetidos ao processo de desnutrição com dieta isenta de proteína por 8 dias.

Os resultados da presente pesquisa parecem concordar com Oishi et al. (2002), pois no 7º dia pós-trauma, os animais previamente desnutridos, independente da dieta ofertada por via oral ou dietas enterais administradas por via gastrostomia, apresentaram diminuição na expressão gênica dos níveis de mRNA dos colágenos I e III quando comparados aos animais nutridos. Chama a atenção o fato de que para animais nutridos e previamente desnutridos a expressão gênica de colágeno tipo I foi menor nos animais alimentados com dietas enterais industrializadas (padrão e suplementada). O significado biológico desse achado poderia refletir uma desigualdade entre a ração AIN-93 e as dietas formuladas, no sentido de estimular a expressão gênica de colágeno tipo I.

A diminuição na expressão gênica dos colágenos I e III nos ratos previamente desnutridos, pode ter sido causada pela depleção dos

nutrientes durante o período de desnutrição e ainda não totalmente compensado no 7º dia pós-trauma.

O processo de vascularização presente no tecido de granulação é coordenado pelos fatores VEGF e EGF-básico, que alcançam seu pico entre o 3º e 7º dias pós-trauma (Bennett et al., 1993). No presente trabalho, e conforme esperado, a intensidade de vascularização mostrou-se maior no 7º dia pós-trauma quando comparado ao 14º dia pós-trauma ($p=0,01$). No entanto, nesse momento, encontramos ausência de expressão gênica do VEGF, provavelmente porque o 7º dia pós-trauma já é tardio para ocorrer a expressão gênica desse fator indutor da angiogênese.

A contração da ferida é responsável por reduzir a área da ferida. Para acompanhar o fechamento da ferida cutânea, foram digitalizadas imagens das quatro feridas no dia do trauma, 7º e 14º dias pós-trauma. Os ratos nutridos apresentaram maior fechamento da ferida cutânea quando comparados aos previamente desnutridos, nos dois períodos analisados (dia da cirurgia até o 7º dia e desse até o 14º dia pós-trauma), independentemente das dietas administradas. Os valores da porcentagem de fechamento da área da lesão apontam maior fechamento entre o 7º e o 14º dia pós-trauma. Esse achado é esperado, na medida em que grande parte do primeiro período (cirurgia ao 7º dia) é preenchida pela fase inflamatória. A fase proliferativa tem início por volta do 5º dia pós-trauma, com aumento dos principais elementos responsáveis pelo fechamento da ferida (Regan & Barbul, 1994).

A principal célula responsável pela contração da ferida é o miofibroblasto. Trata-se de célula especializada que contém alfa-actina de músculo liso (Gabbiani et al., 1971). O miofibroblasto, presente no tecido de granulação, é o principal tipo celular envolvido no reparo tecidual, através da deposição de componentes da matriz extracelular (tenascina, fibronectina, metaloproteinases e colágenos I e III) (Zhang et al., 1994). Os miofibroblastos podem ser avaliados pela expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-alfa actina de músculo liso que, no presente estudo, não se mostraram diferentes entre os distintos grupos experimentais deste trabalho, independente do seu estado nutricional, da dieta administrada e em relação aos tempos do 7º e 14º dias pós-trauma. É possível que, embora a quantidade das células seja mantida em todos os grupos experimentais, sua função e eficiência na contração sejam diferentes, o que poderia explicar os achados de contração da área da ferida.

Dos efeitos das dietas sobre a cicatrização cutânea

A pele é o maior órgão do organismo e necessita de suprimentos metabólicos constantes para manter sua estrutura e função. Deficiências nutricionais podem levar a alterações associadas à diminuição da integridade da pele e promover a maior frequência de feridas cutâneas (Patel, 2005).

A cicatrização é um processo complexo que envolve hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelamento, eventos coordenados por diferentes citocinas e fatores de crescimento, que são associados com aumento da atividade metabólica. Esses eventos são dependentes de adequado aporte de oxigênio, energia, síntese de proteínas e diversas reações enzimáticas que envolvem vitaminas e minerais (Patel, 2005).

Atualmente, os cuidados destinados aos pacientes que apresentam feridas não cicatrizadas, ou mesmo aqueles que se submeterão à cirurgia de grande porte, incluem o acompanhamento do estado nutricional e a identificação de possíveis deficiências de calorias, proteínas, vitaminas e minerais (Lewis et al., 1993).

A desnutrição protéica e de vitaminas pode prejudicar o sistema imunológico, com diminuição da atividade fagocítica e função linfocitária. Feridas agudas podem não ser afetadas pela diminuição da resposta imunológica, no entanto, o fechamento de feridas crônicas sofre com a insuficiente ação do sistema imune e somente apresenta eficiente ação no

momento do reestabelecimento do déficit nutricional (Stadelmann et al., 1998).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado os efeitos benéficos da suplementação da arginina na resistência tênsil e no acúmulo de colágeno de feridas cutâneas (Seifter et al., 1978; Barbul et al., 1985; Barbul et al., 1990; Kirk et al., 1993; Shi et al., 2000; Witte et al., 2002; Shi et al., 2003). No entanto, não existem trabalhos experimentais que avaliam o efeito da suplementação da arginina em feridas crônicas (Stechmiller et al., 2005).

No presente trabalho, a quantidade de arginina administrada, aproximadamente 1,2 g/kg/dia, compara-se com a mesma quantidade ofertada por diferentes trabalhos apresentados na literatura. Os valores administrados de arginina estão em concordância com o estudo desenvolvido por Witte et al. (2002), que por 10 dias, após implante subcutâneo de esponjas, administraram 1g/kg/dia de arginina. Na mesma linha de pesquisa, Shi et al. (2003), para verificar o acúmulo de colágeno, administraram 1g/kg/dia de arginina, por via intraperitoneal, por 10 dias em ratos diabéticos. Apesar das quantidades de arginina serem semelhantes às propostas na literatura pertinente, em nosso modelo experimental, os efeitos da suplementação da arginina e nutrientes antioxidantes no fechamento de ferida cutânea aberta em ratos nutridos e previamente desnutridos submetidos à realimentação não foi significativo.

As razões para as diferenças de nossos achados com a literatura talvez sejam devidas às diferenças metodológicas adotadas para o estudo do colágeno.

A variação percentual de peso corpóreo não apresentou diferença entre os animais que receberam dieta via oral, dieta enteral padrão e suplementada, independentemente do estado nutricional. Esse nosso resultado tem apoio em Nirgiotis et al. (1991), que após oferta de dieta enteral suplementada com arginina, não encontraram diferença no peso corpóreo quando comparados aos animais controles.

Quando os resultados foram interpretados em termos dos tipos de dietas utilizadas, os dados da presente pesquisa não encontraram diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas que se relacionam ao processo cicatricial. Aspectos devem ser considerados na tentativa de compreendermos as diferenças entre os resultados encontrados na presente pesquisa e os apresentados pela literatura.

Uma hipótese para explicar os dados não significativos entre as dietas administradas aos animais previamente desnutridos, indagaria se a perda de peso corpóreo de 12 a 15% seria suficiente para esgotar as reservas de arginina, vitaminas e minerais. Para responder a essa pergunta, seria de interesse conduzir um programa de desnutrição crônica, com evidências concretas de que os estoques endógenos de arginina e micronutrientes estariam depletados.

Outro fato a se considerar é que todos os animais dos diferentes grupos experimentais, nutridos e os previamente desnutridos, foram

realimentados com dietas de alta qualidade em termos de nutrientes e segurança biológica, e que promovem os mesmos efeitos benéficos, não sendo possível, a grosso modo, distinguir uma melhor formulação dietética. Como a dieta AIN 93 é formulada especialmente para ratos e as outras dietas são para seres humanos, podemos especular que no mínimo, a nutrição por gastrostomia, com as formulações enterais industrializadas, são tão boas quanto a dieta AIN-93.

No presente estudo, observamos que a cicatrização de ferida cutânea, em animais nutridos e previamente desnutridos, foi semelhante com a dieta enteral padrão e a dieta enteral suplementada. É possível que as variáveis de cicatrização cutânea analisadas no presente modelo experimental não tenham sido aptas para determinar diferenças atribuídas aos nutrientes que compõe a dieta enteral suplementada. Torna-se necessário, no futuro, desenvolver modelos experimentais que explorem essa possibilidade.

Chama a atenção o fato de que o modelo de lesão cutânea utilizado no presente trabalho é de ferida aberta que cicatriza por segunda intenção, diferente dos modelos experimentais de sutura, que cicatrizam em primeira intenção, que demonstraram efeito benéfico da arginina sobre a resistência tênsil e o acúmulo de hidroxiprolina. Estes aspectos foram estudados por Nirgiotis et al. (1991), ao comparar o efeito de dieta enteral padrão e dieta enteral suplementada com arginina (Vivonex) sobre cicatrização. Os autores verificaram em animais, com implante dorsal subcutâneo de cilindros de politetrafluoroetileno, maior albuminemia, aumento do timo, peso do baço,

ativação mitogênica linfocitária e índice quimiotático de macrófagos no grupo de animais suplementados com arginina. Não encontraram diferença no conteúdo de hidroxiprolina entre os grupos, mas houve aumento na resistência tênsil das feridas no grupo de animais alimentados com dieta enteral suplementada com arginina.

Ainda utilizando a metodologia de implante subcutâneo dorsal de esponjas de polivinil-álcool, Shi et al. (2003) estudaram ratos diabéticos e controles que foram subdivididos em dois outros grupos e que receberam injeção intraperitoneal de 1g/kg/dia de arginina ou solução salina. Quando comparados aos animais que receberam injeção de solução salina, os ratos diabéticos apresentaram menor resistência tênsil em relação aos controles sem diabetes. Após a administração de arginina, ambos os grupos apresentaram aumento na resistência tênsil e aumento de hidroxiprolina. Os autores concluíram que a cicatrização de feridas em ratos diabéticos pode ser parcialmente corrigida pela suplementação de L-arginina.

Guardadas as devidas diferenças entre estudos clínicos e experimentais, Williams et al. (2002) avaliaram em estudo duplo-cego, em 30 pacientes voluntários saudáveis, idade média de 75 anos, o efeito da suplementação oral de uma mistura contendo arginina, glutamina e beta-hidroxi-metilbutirato (HMB) no acúmulo de colágeno. Os autores não verificaram diferenças no conteúdo de hidroxiprolina, após 7 dias de implante subcutâneo de tubos de politetrafluoretileno na região do músculo deltóide. No 14^o dia após implante, os indivíduos que receberam suplementação, apresentaram 67% mais do acúmulo de colágeno. Esta

observação deve ser acompanhada da informação que o HMB, metabólito da leucina, regula a proteólise muscular e aumento no conteúdo de hidroxiprolina em ratos, e a glutamina apresenta efeitos benéficos em cicatrização de anastomose colônica, dessa maneira, o efeito da arginina não pode ser avaliado isoladamente.

Aparentemente, os efeitos favoráveis da arginina se manifestam com a maior produção de hidroxiprolina, aminoácido componente da molécula de colágeno, e resistência tênsil da ferida. Torna-se de interesse estudar em continuidade esses aspectos.

Perspectivas

Os resultados da presente pesquisa permitem vislumbrar novas oportunidades de pesquisa na área de nutrição e cicatrização. Entre eles, o estudo imuno-histoquímico dos colágenos tipo I e III, a prática de desnutrição crônica, a aplicação de testes funcionais, de força tênsil da ferida, em novos modelos a serem desenvolvidos e, dentro das possibilidades éticas, estudar o comportamento gênico em condições de cicatrização como úlceras diabéticas, úlceras por pressão e mesmo queimaduras, perante dietas enterais suplementadas.

8. CONCLUSÕES

8. Conclusões

Nas condições da presente pesquisa, em que ratos nutridos e previamente desnutridos portadores de ferida cutânea padronizada foram alimentados com ração, nutrição enteral padrão e suplementada, por via gastrostomia por 14 dias, pode-se concluir que:

- 1- Com estado nutricional mantido, a cicatrização ocorre de maneira adequada, independente da dieta oral, enteral padrão ou suplementada.
- 2- Desnutrição retarda a cicatrização em termos de epitelização, recomposição da derme e contração da ferida cutânea, independente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada.
- 3- Após uma semana de trauma cutâneo, a expressão gênica de fatores de crescimento ligados à cicatrização apresentaram-se alterados em virtude da desnutrição prévia, e não foram revertidos independentemente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada.

4- Após uma semana de trauma cutâneo, a expressão gênica dos colágenos tipo I e III ligados à cicatrização apresentaram-se alterados em virtude da desnutrição prévia, e não foram revertidos independentemente da realimentação com dieta oral, enteral padrão ou suplementada.

Corolário

As dietas enterais padrão e suplementada favorecem o processo de cicatrização, nos estados de nutrição e desnutrição prévia, da mesma forma com que a ração específica para animais de experimentação.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

Abd-El-Aleem SA, Ferguson MWJ, Appleton I, Kairsingh S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 2000;191:434-42.

Agren MS, Franzen L. Influence of zinc deficiency on breaking strength of 3-week-old skin incisions in the rat. *Acta Chir Scand* 1990;156:667-70.

Albina JE, Mills CC, Henry WL, Cadwell MD. Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol*. 1990; 144:3877-80.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.

Anasuya A, Narasinga RBS. Relationship between body collagen and urinary hydroxyproline excretion in young rats fed on a low-protein or low-calorie diet. *Br J Nutr*. 1970;24:97-107.

Angeleli AYO, Burini RC Campana AO. Body collagen nitrogen in protein-deficient adult rats. *J Nutr*. 1978;108:1147-54.

Auf Demkeller U, Krampert M, Kumin A, Braun S, Werner S. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:607-12.

Bailey AJ, Sims TJ, Le Lous, Bazin S. Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975;66:1160-5.

Barbul A, Fishel RS, Shimazu S. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. *J Surg Res.* 1985;38:328-34.

Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.* 1990a;108:331-7.

Barbul A. Immune aspects of wound repair. *Clin Plastic Surg.* 1990b;17:433-42.

Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993;165:729-37.

Bouissou H, Pieraggi M, Julian M, Uhart D, Kokolo J. Fibroblasts in dermal tissue repair. Electron microscopic and immunohistochemical study. *Int J Dermatol.* 1988;27:564-70.

Brown EJ. Phagocytosis. *Bioassays.* 1995;17:109-17.

Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, Van De Water L. Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol.* 1993;142:793-801.

Castillo L, Sanchez M, Vogt J, Chapman TE, DeRojas-Walker TC, Tannenbaum SR, Ajami AM, Young VR. Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1995;268:E360-7.

Chen TI, Bates RI, Xu Y, Ammann AJ, Beck LS. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 modulation of biochemical and cellular events in healing of ulcer wounds. *J Invest Dermatol.* 1992;98:428-35.

Chiarelli A, Enzi G, Casadei A, Baggio B, Valerio A, Mazzoleni F. Very early nutrition supplementation in burned patients. *Am J Clin Nutr.* 1990, 5: 1035-9.

Clark MA, Plank LD, Hill LG. Wound healing associated with severe illness. *World J Surg.* 2000;24:648-54.

Daly JM, Vars HM, Dudrick SJ. Effects of protein depletion on the strength of colonic anastomoses. *Surg Gynecol Obstet.* 1972;134:751-6.

DeGeorge GL, Heck DE, Laskin JD. Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis: multiple modes of action of nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54:103-12.

Delany HM, Demetriou AA, Teh E, Levenson SM. Effect of early postoperative nutritional support on skin wound and colon anastomosis healing. *J Parent Ent Nutr.* 1990;14:357-61.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Rep Regen.* 2005;13:7-12.

Desmoulière A, Gabbiani G. The role of the myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, ed. *The Molecular and cellular biology of wound repair.* 2ed. New York: Plenum Press 1996:391-423.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122:103-11.

Desneves KJ, Todorovic BE, Cassar A, Crowe TC. Treatment with supplementary arginine, vitamin C and zinc in patients with pressure ulcers: A randomised controlled trial. *Clinical Nutrition*. 2005;24:979-87.

Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*. 1997;108:263-8.

Diegelmann RF. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. *J Urol*. 1997;157:298-302.

Efron DT, Most D, Shi HP, Tantry U, Barbul A. A novel model of studying wound healing. *J Surg Res*. 2001;98:16-20.

Ehrlich HP, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen*. 1996;4:203-10.

Endo Y, Fu Z, Abe K, Arai S, Kato H. Dietary Protein quantity and quality affect rat hepatic gene expression. Nutrient gene interactions. *J Nutr*. 2002;132:3632-7.

Evoy D, Lieberman MD, Fahey TJ. Immunonutrition: The Role of Arginine. *Nutrition*. 1998;14:611-17.

Falanga V, Zitelli JA, Eaglstein WH. Wound healing. *J Am Acad Dermatol.* 1988;19:559-63.

Fernandez-Madrid F, Prasad AS, Oberleas D. Effect of zinc deficiency on nucleic acids, collagen, and noncollagenous protein of the connective tissue. *J Lab Clin Med.* 1973;82:951-61.

Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Pfeilschifer J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.* 2002;61:882-8.

Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* 1999;13:2002-14.

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971;27:549-50.

Galiano RD, Michaelis J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Rep Reg.* 2004;12:485-92.

Galizia MS, Alves CC, Tamanaha EM, Torrinhas RS, Leite FC, Neto AH, Gama-Rodrigues J, Waitzberg DL. A new swivel for small animals in enteral and parenteral nutrition experiments. *J Surg Res.* 2005;128:3-8.

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69:513-21.

Goetzl EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KF. Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. *J Clin Invest.* 1974;53:813-8.

Goldman R. Growth Factors and chronic wound healing: Past, present and future. *Adv Skin Wound Care.* 2004;17:24-35.

Goodson WH. Application of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) tubing to the study of human wound healing. *J Biomater Appl.* 1987;2:101-17.

Goslen JB. Wound healing for the dermatologic surgeon. *J Dermatol Surg Oncol.* 1988;14:959-72.

Gray M. Does oral supplementation with vitamins A or E promote healing of chronic wounds? *J Wound Ostomy Nurs.* 2003;30:290-4.

Gross RL. The effect of ascorbate on wound healing. *Int Ophthalmol Clin.* 2000;40:51-7.

Gumustekin K, Seven B, Karabulut N, Aktas O, Gursan N, Aslan S, Keles M, Varoglu E, Dane S. Effects of sleep deprivation, nicotine, and selenium on wound healing in rats. *Int J Neurosc.* 2004;114:1433-42.

Hackam DJ, Ford HR. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surg Infect.* 2002;3(Suppl 1):S23-35.

Hamilton IM, Gilmore WS, Benzie IF, Mulholland CW, Strain JJ. Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br J Nutr.* 2000;84(3):261-7.

Havlik RJ. Vitamin E and wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:1901-2.

Haydock DA, Flint MH, Hyde KF, Reilly HC, Poole CA, Hill GL. The efficacy of subcutaneous gortex implants in monitoring wound healing response in experimental protein deficiency. *Connect Tissue Res.* 1988; 17:159-69.

Haydock DA, Hill GL. Impaired wound healing in surgical patients with varying degrees of malnutrition. *J Parent Ent Nutr.* 1986;10:550-4.

Himes D. Protein-calorie malnutrition and involuntary weight loss: the role of aggressive nutritional intervention in wound healing. *Ostomy Wound Manage.* 1999;45:46-51.

Hudson-Goodman P, Girard N, Jones MB. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung.* 1990;19:379-84.

Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271:559-64.

Irvin TT. Effects of malnutrition and hyperalimentation wound healing. *Surg Gynecol Obstet.* 1978;146:33-7.

Jenkins M, Gottschlich M, Baumer T. Enteral feeding during operative procedures. *Abstr J Parent Enteral Nutr.* 1991;15:22S.

Kaplan B, Gonul B, Dinçer S, Kaya ND, Barbul A. Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surg Today.* 2004;34:747-51.

Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery.* 1993;114:155-9.

Kiyama T, Witte MB, Thornton FJ, Barbul A. The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. *J Parent Ent Nutr.* 1998;22:276-9.

Knighton DR, Fiegel VD. The macrophages: effector cell wound repair. *Prog Clin Biol Res.* 1989;299:217-26.

Kobak MW, Benditt EP, Wissler RW. The relation of protein deficiency to experimental wound healing. *Surg Gynecol Obstet.* 1947;85:751-6.

Langkamp-Henken B, Johnson LR, Viar MJ, Geller AM, Kotb M. Differential effect on polyamine metabolism in mitogen and superantigen-activated human t-cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1425:337-47.

Law NW, Ellis H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal and colonic anastomoses in protein-malnourished rats. *Surgery.* 1990;107:449-54.

Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, Bernard CW, Rosen H. The healing of rat skin wounds. *Ann Surg.* 1965;161:293-308.

Lewis BK, Hitchings H, Bale S, Harding KG. Nutritional status of elderly patients with venous ulceration of the leg - report of a pilot study. *J Hum Nutr Diet.* 1993;6:509-15.

Lin MT, saito H, Fukushima R, Inaba T, Fukatsu K, Inoue T, Furukawa S, Han I, Muto J. Route of nutritional supply influences local, systemic and remote organ responses to intraperitoneal bacterial challenge. *Ann Surg* 1996; 223: 84-93.

Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmoulière A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2002;10:86-92.

Mackay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine*. 2003;8:359-72.

Martin P. Wound healing – Aiming for perfect regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.

Mayes T, Gotshemitch MM. Burns and Wound Healing. In: Matarese LE; Gottschilich MM. Contemporary Nutrition Support Practice- Clinical Guide. 2ed. New York: Sauders. 1998;595-615.

Mills C. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol*. 2001; 21: 399-426.

Mistry D, Andrassy RJ, Pizzini R, Parks D. Quantitative analysis of collagen accumulation during protein malnutrition. *J Ped Surg*. 1994;29:863-5.

Modolin MLA, Bevilacqua RG, Margarido NF, Gonçalves EL. Cicatrização das feridas abertas na desnutrição com hipoproteinemia. Estudo experimental. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1982;37:275-8.

Modolin MLA, Bevilacqua RG, Margarido NF, Lima Gonçalves EL. The effects of protein malnutrition on wound contraction: An experimental study. *Ann Plast Surg*. 1984;5:428-30.

Montadon D, D'Andiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Surg*. 1977;4:325-46.

Montesano R, Orci L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:4894-7.

Moore EE, Jones TN. Benefits of immediate jejunostomy feeding after major abdominal trauma – A prospective, randomized study. *J Trauma*. 1986; 26: 874-80.

Moraes SP, Chaves FR, Banci S, Rover PA, Georgetti F, Neto JAR. Zinco e cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*. 2000;27:394-9.

Moreira JCM. Desnutrição e cicatrização de feridas. In: Waitzberg DL. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo, Atheneu, 2000. Cap. 26, p. 411-21.

Muangman P, Muffley LA, Anthony JP, Spenny ML, Underwood RA, Olerud JE, Gibran NS. Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Rep Regen*. 2004;12:44-52.

Munz B, Frank S, Hubner G, Olsen F, Werner S. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. *Biochem J*. 1997;326:579-85.

Musalmah M, Fairuz AH, Gapor MT, Ngah WZ. Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002;(Suppl 7):S448-51.

Nicosia RF, Belser P, Bonanno E, Diven J. Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1991; 27A:961-6.

Nirgiotis JG, Hennessey PJ, Andrassy RJ. The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat. *J Ped Sur*. 1991; 26:936-41.

Oishi Y, FU Z, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Effects of protein deprivation on alpha 1(I) and alpha 1 (III) collagen and its degrading system in rat skin.

Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66:117-26.

Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing.

Crit Care Med. 1988;16:899-908.

Patel GK. The role of nutrition in the management of lower extremity wounds.

Lower Extrem Wounds. 2005;4:12-22.

Peacock EE. Effects of dietary proline and hydroxiprolin on tensile strength of healing wounds. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960;105:380-3.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 2001;29:2003-7.

Phillips SJ. Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO*

Journal. 2000;46:2-5.

Pierce GF, Berg JV, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe TA. Platelet derived growth factor-BB and transforming growth factor beta-1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am*

J Pathol. 1991;138:629-46.

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Gramates P, Deuel TF. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2229-33.

Pollack SV. Wound healing. Nutritional factors affecting wound healing. *J Dermatol Surg Oncol*. 1979;5:615-19.

Porto da Rocha R, Lucio DP, Souza TL, Pereira ST, Fernandes GJ. Effects of a vitamin pool on the tissue necrosis process: experimental study on rats. *Aesthetic Plast Surg*. 2002;26:197-202.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999;277:C1-9.

Prasad AS. Zinc: an overview. *Nutrition*. 1995;11:93-9.

Prockop DJ. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med*. 1979;301:13-23.

Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Path*. 2000;81:257-63.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR. AIN 93: Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute ad Hoc writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1993;123:1938-51.

Regan MC, Barbul A. The cellular biology of wound healing. In Fischer JA (ed): Fibrin Sealing in Surgical and Nonsurgical Fields, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1994.

Roberts PR, Black KW, Santamauro JT, Zaloga GP. Dietary peptides improve wound healing following surgery. *Nutrition.* 1998;14:266-9.

Ruberg RL. Role of nutrition in wound healing. *Surg Clin North Am.* 2003;64:2-7.

Ruberg RL. Role of nutrition in wound healing. Symposium on Wound Management. *Surg Clin North America.* 1984;64:705-14.

Saarialho-Kere UK, Pentland AP, Berkedal-Hansen H, Parks WC, Welgus HG. Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J Clin Invest.* 1994;94:79-88.

Schaeffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg.* 1999;16:262-7.

Scholl DMM, Langkamp-Henken B. Nutrient Recommendations for wound healing. *J Intraven Nurs*. 2001;24:124-132.

Schroeder D, Gillanders L, Mahr K, Hill GL. Effects of immediate postoperative enteral nutrition on body composition, muscle function, and wound healing. *J Parent Ent Nutr*. 1991;15:376-83.

Seifter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery*. 1978;84:224-30.

Shi HP, Efron DT, Most D, Tantry US, Barbul A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*. 2000;128:374-8.

Shi HP, Fishel RS, Efron DT, Williams JZ, Fishel MH, Barbul A. Effect of supplemental ornithine on wound healing. *J Surg Res*. 2002;106:299-302.

Shi HP, Most D, Efron DT, Witte MB, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Rep Regen*. 2003;11:198-203.

Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Bioch Biop Res Com*. 1998;244:434-9.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341:738-46.

Sitren H, Fischer H. Nitrogen in rats fed on diets enriched with arginine and glycine: improve nitrogen retention after trauma. *Br J Nutr*. 1977;3:195-208.

Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol*. 1993;122:417-29.

Springer TA. The traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-14.

Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Impediments to wound healing. *Am J Surg*. 1998;176(Suppl 2A):39s-47s.

Stechmiller JK, Childress B, Cowan L. Arginine supplementation and wound healing. *Nutr Clin Prat*. 2005;20:52-61.

Steenfos HH, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Goodson WH. Selective effects of tumor necrosis factor-alpha on wound healing in rats. *Surgery*. 1989;106:171-6.

Suchner U, Kuhn KS, Furst P. The scientific basis of immunonutrition. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:553-63.

Thornton FJ, Schaffer MR, Barbul A. Wound healing in sepsis and trauma. *Shock*. 1997;8:391-401.

Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000;5:40-6.

Wearing HJ, Sherratt JA. Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing. *Math Biosci*. 2000;165:41-62.

Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9:153-65.

Weser E, Babbitt J, Vandeventer A. relationship between enteral glucose load and adaptative mucosal growth in the small bowel. *Dig Dis Sci*. 1985; 30: 675-81.

Williams JZ, Barbul A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann Surg.* 2002;236:369-74.

Witte M, Barbul A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. *Clin Cir Am North.* 1997;3:509-27.

Witte MB, Barbul A, Shick MA, Vogt N, Becker HD. Upregulation of arginase expression in wound derived fibroblasts. *J Surg.* 2002;105:35-42.

Witte MB, Barbul A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003;11:419-23.

Witte MB, Thornton FJ, Efron DT, Barbul A. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. *Biol Chem.* 2000;4:572-82.

Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr.* 1999;129:1347-54.

Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 1998;128:1249-52.

Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J Pathol.* 1999;188:431-8.

Yamagushi N, Waitzberg DL, Gonçalves EL. Intermediário de livre movimentação para esquema de nutrição parenteral em ratos. *Acta Cir Bras.* 1989;4:122-4.

Yang CC, Lin SD, Yu HS. Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *J Dermatol Sci.* 1997;14:162-9.

Zaizen Y, Ford EG, Costin G, Atkinson JB. Stimulation of wound bursting strength during protein malnutrition. *J Surg Res.* 1990;49:333-6.

Zaloga GP, Bortenschlager L, Black KW, Prielipp R. Immediate postoperative enteral feeding decreases weight loss and improves wound healing after abdominal surgery in rats. *Crit Care Med.* 1992;20:115-8.

Zaloga GP, Siddiqui R, Terry C, Marik PE. Arginine: mediator or modulator of sepsis? *Nutr Clin Pract.* 2004; 19:201-15.

Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 1994;145:114-25.

ANEXOS

ANEXO 1

Método Imunoistoquímico para Avaliação da Alfa-Actina de Músculo Liso (Miofibroblastos) no Tecido de Granulação

As reações de imuno-histoquímica seguiram o seguinte protocolo:

a) Desparafinização

As lâminas previamente preparadas foram submetidas a banhos seqüenciais, iniciados com:

- Xilol a 60° por 20 minutos (min);
- Xilol à temperatura ambiente por 20 min;
- Etanol 100% três vezes, 30 segundos (seg) em cada passagem;
- Etanol 95% por 30 seg;
- Etanol 80% por 30 seg;
- Etanol 70% por 30 seg;

A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada;

b) Recuperação de antígenos

Foi realizado pelo uso do calor úmido, com panela de pressão (Eterna® Nigro) com solução de ácido cítrico 10 mM (Merck 1.00244, Alemanha) pH 6,0;

- Resfriamento da panela por 10 min sob água corrente e 10 min à temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em águas correntes e destiladas;

c) Bloqueio da peroxidase endógena

- Utilizando água oxigenada de 20 volumes (quatro vezes de cinco minutos cada);
- Lavagem em água corrente e PBS 10 mM (phosphate-buffered saline) pH 7,4;

d) Diluição do anticorpo primário

O anticorpo primário anti-actina- α de músculo liso, clone 1A4 da classe IgG2a que reconhece a isoforma α da actina de músculo liso foi diluído em solução PBS + BSA 1% (bovine serum albumin) (Sigma A9647, EUA) + azida sódica 0,1% em título previamente estabelecido (Tabela 6).

Tabela 6. Identificação e diluição do anticorpo utilizado na reação de imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
Monoclonal Mouse Anti Human Alpha-Smooth Muscle Actin	1A4	1:4000	Dako, Glostrup, Dinamarca – cod M0851

- Incubação à 37° C por 30 min e por 18 h à 4° C em câmara úmida;
- Lavagem das lâminas três vezes em PBS (3 min cada);

e) Incubação com o anticorpo secundário biotilado (Biotinylated Link Universal) do kit LSAB + System-HRP (Dako Cytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min à 37°C;

- Lavagem das lâminas três vezes em PBS (3 min cada);

f) Incubação com o Streptavidin-HRP do kit LSAB+ System-HRP (Dako Cytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min à 37° C;

- Lavagem das lâminas três vezes em PBS (3 min cada);

g) Revelação com o cromógeno – 100mg% de DAB (3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) (Sigma D5637, EUA), 1 mL de água oxigenada 20 volumes, 1 mL de Dimetilsulfóxido (Synth Pdots Labors Ltda), 100 mL de PBS;

- Incubar por 5 min à 37° C;

- Lavagem em água corrente e destilada por 3 min;

h) Contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 min;

- Lavagem em água corrente e destilada;

i) Diferenciação em água amoniacal

- Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%);

- Lavagem em água corrente e destilada;

j) Desidratação das lâminas

- Etanol 50% por 30 seg;

- Etanol 80% por 30 seg;

- Etanol 95% por 30 seg;
- Etanol 100% por 30 seg;
- Xilol 4 vezes por 30 seg cada;

k) Montagem com lamínula e Entellan (Merck 1.07961, Alemanha).

Controles positivo e negativo atestaram a fidelidade da reação imunoistoquímica. Como controle positivo e negativo da reação foi utilizada tonsila palatina humana.

O controle negativo da reação imunoistoquímica consistiu na omissão do anticorpo primário.

Foram realizados ainda os controles negativos de todos os caso experimentais deste estudo, procedimento esse realizado em cada lâmina com o caso corado pelo anticorpo (Ac) actina de músculo liso clone 1A4 e o seu respectivo controle negativo, pela omissão do Ac primário.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

PESO DOS ANIMAIS NO PERÍODO PÓS-TRAUMA

Grupos que Receberam Dieta Por Via Oral e Solução Fisiológica Via Gastrostomia

Grupos	Cirurgia	7º PT	14º PT
N(VO)	340,10	303,70	310,70
	277,10	270,40	280,10
	290,70	289,00	303,60
	311,00	317,90	333,30
	317,90	303,60	306,70
	241,80	262,00	272,70
	197,40	243,40	265,30
	307,00	284,20	275,00
	280,30	276,00	293,50
	288,30	280,60	284,40
PD(VO)	249,90	279,60	275,90
	247,40	289,50	305,40
	215,10	261,20	273,00
	221,80	260,70	263,90
	262,90	273,50	279,30
	250,90	247,10	267,80
	254,90	261,50	269,00
	249,10	257,30	265,30
	264,70	284,90	279,20

PT – Pós-Trauma; N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido

VO – Dieta via oral

Grupos que Receberam Dieta Enteral Padrão Via Gastrostomia

Grupos	Cirurgia	7º PT	14º PT
N(DP)	302,30	290,40	288,20
	316,10	300,20	297,60
	307,60	305,10	295,70
	233,50	240,20	239,90
	236,10	234,00	264,70
	210,80	219,50	258,10
	234,50	233,90	251,80
	249,50	248,10	247,40
	304,30	299,60	284,80
	349,70	329,30	330,00
PD(DP)	250,60	276,90	248,10
	249,80	284,60	271,70
	251,30	265,80	269,60
	217,80	211,40	251,10
	230,10	197,10	218,80
	222,30	216,20	254,80
	220,30	228,90	233,90
	229,40	240,10	236,60
	202,30	185,40	231,80

PT – Pós-Trauma; N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido

DP – Dieta enteral Padrão

Grupos que Receberam Dieta Enteral Suplementada Via Gastrostomia

Grupos	Cirurgia	7º PT	14º PT
	289,50	312,60	314,70
	296,20	297,60	308,50
	289,70	298,80	291,10
	322,40	318,40	311,60
N(DS)	251,80	251,30	261,10
	249,20	252,00	266,70
	215,30	235,30	240,60
	206,20	213,90	232,90
	290,10	274,00	270,90
	304,00	293,20	306,50
	229,20	235,80	239,50
	228,70	232,70	274,40
	218,20	223,10	259,70
	209,60	225,50	257,90
PD(DS)	242,00	242,10	230,70
	240,40	256,40	270,30
	306,30	304,70	319,60
	272,40	264,80	287,30
	257,40	258,50	296,50

PT – Pós-Trauma; N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido

DS – Dieta enteral Suplementada

APÊNDICE 2

DADOS PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

TGF-BETA					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
3,88	1,78	3,16	0,80	0,53	4,98
3,64	2,79	1,74	5,38	3,82	2,07
3,42	2,24	5,57	6,62	4,17	6,71
4,10	2,24	4,73	8,22	5,72	4,69
4,12	2,83	4,85	1,44	3,84	1,87
2,56	1,85	3,25	2,59	2,88	8,57
3,69	2,53	2,30	5,57	1,35	3,34
2,86	2,35	7,09	5,44	5,59	4,62
	4,58	3,78	5,87	6,30	4,69
		4,13		3,60	

VEGF					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
0,88	1,77	0,89	0,80	1,50	0,89
0,52	2,79	0,26	0,90	0,48	0,63
2,16	1,38	1,34	1,33	1,68	0,95
3,20	0,76	1,36	1,79	1,63	0,51
0,39	0,76	0,32	0,59	2,30	0,80
0,78	0,54	0,68	0,77	1,08	0,56
1,50	0,85	1,38	0,75	0,45	0,70
0,71	1,23	1,60	0,92	1,84	0,70
	0,82	0,83	0,89	6,30	0,93
		0,85		0,35	

PDGF					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
0,75	1,35	0,65	0,90	0,36	1,03
0,78	0,69	1,05	1,02	1,04	1,37
2,61	0,55	1,93	0,98	1,94	0,41
3,82	0,64	4,44	2,19	1,61	0,49
0,98	2,03	0,82	1,52	0,96	2,20
2,14	1,43	1,22	0,98	0,84	0,23
0,68	1,39	1,06	0,33	1,01	1,27
0,64	1,44	1,53	0,22	0,95	1,38
0,64	1,67	1,18	0,60	0,83	1,32
		0,67		0,69	

N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido; VO – Dieta via oral; DP – Dieta enteral padrão;
DS – Dieta enteral suplementada

KGF					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
1,50	2,79	1,53	1,45	3,55	1,49
2,79	0,31	0,71	1,03	2,78	1,53
2,44	1,20	3,90	1,80	1,10	1,06
1,20	2,22	2,25	1,28	1,92	1,85
1,10	1,48	0,78	0,55	0,84	0,91
1,84	0,79	2,17	1,06	2,38	0,77
0,72	0,88	0,85	0,62	0,93	0,73
0,96	0,74	3,29	2,09	1,82	0,49
0,91	0,99	0,57	1,31	1,46	0,77
		1,06		1,14	

COLÁGENO 3					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
0,31	0,44	0,41	0,50	0,42	0,20
1,26	0,90	1,67	0,35	0,69	0,18
0,82	0,97	0,58	0,31	0,68	0,19
0,61	0,37	0,71	0,27	0,51	0,29
0,36	0,64	0,24	0,11	0,23	0,20
1,76	0,27	0,58	0,35	0,55	0,06
0,17	0,24	0,30	0,28	0,42	0,49
0,27	0,22	0,66	0,20	0,53	0,55
0,45	0,77	0,22	0,12	0,81	0,48

COLÁGENO 1					
N(VO)	PD(VO)	N(DP)	PD(DP)	N(DS)	PD(DS)
0,29	0,35	0,29	0,36	0,15	0,27
0,67	0,67	0,30	0,17	0,70	0,24
0,38	0,74	0,56	0,21	0,16	0,26
0,47	0,62	0,27	0,37	0,32	0,07
0,29	0,68	0,10	0,03	0,12	0,34
1,71	0,13	0,35	0,36	0,65	0,35
0,25	0,21	0,45	0,20	0,27	0,15
0,31	0,19	0,28	0,05	0,36	0,20
0,29	0,27	0,41	0,40	0,53	0,12
		0,39		0,32	

N – Nutrido; PD – Previamente Desnutrido; VO – Dieta via oral; DP – Dieta enteral padrão;

DS – Dieta enteral suplementada