



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

JULIANA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NA CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA E MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA
TÉRMICA**

Recife

2018

JULIANA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NA CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA E MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA
TÉRMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Luciana Maria Silva de Seixas Maia

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Juliana Barbosa da

Efeitos da suplementação com L-Arginina na cicatrização cutânea e muscular de ratos submetidos à queimadura térmica/ Juliana Barbosa da Silva- 2018.

58 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Luciana Maria Silva de Seixas Maia

Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em

Morfotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Cicatrização de ferimentos 2. Arginina 3. Queimaduras I. Maia, Luciana Maria Silva de Seixas (orient.) II. Aguiar Junior, Francisco Carlos Amanajás de (coorient.) III. Título

615.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-194

JULIANA BARBOSA DA SILVA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NA CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA E MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA
TÉRMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 27/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Liriane Baratella Evêncio (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, verdadeiro motivador desta trajetória,
seja a Ele a glória e honra.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela graça e proteção, e por ter me dado condições de ter chegado até aqui.

A minha família, Levi, Célia e Reinan, pelo amor e apoio incondicional.

A Paulo Arkanjo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

A orientadora Luciana Maria Silva de Seixas Maia, pelo carinho, paciência e disposição em me ajudar durante este mestrado. Obrigada por me acolher tão bem.

Ao co-orientador Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, que nunca hesitou em me ajudar, sou grata pela oportunidade e confiança. Você é um exemplo de professor, pesquisador e incentivador.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Fármacos do CAV pela ajuda durante a realização dos experimentos, em especial a Simone Ferreira e Willamis Batista.

As minhas companheiras de luta, Sanielly Torres, Isabelly Barbosa e Bárbara Carneiro, sou grata por conhecê-las e compartilhar essa experiência com vocês.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro Acadêmico de Vitória e ao Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia pela oportunidade em realizar esse mestrado e por tudo que a mim proporcionou.

Aos demais familiares e amigos, agradeço o apoio e orações.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização e finalização deste trabalho, muito obrigada!

“Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória,
pois, a Ele eternamente. Amém!” (Romanos 11.36)

RESUMO

Avaliamos os efeitos da suplementação com L-arginina no processo de cicatrização cutânea e muscular de ratos adultos submetidos à queimadura térmica. Utilizamos 24 Ratos *Wistar*, dividindo-os em controle (C - água) e experimental (ARG - 0,5g/Kg), via administração orogástrica. Os animais foram submetidos à queimadura térmica provocada por chapa de alumínio de 2 x 2 cm aquecida a 100 °C, pressionada em seu dorso por 1 minuto. Decorridos 7, 14 e 28 dias após a queimadura foram anestesiados e eutanasiados, os tecidos lesados foram retirados e processados seguindo a técnica histológica de rotina e corados por Hematoxilina-Eosina (H.E) e picrosirius-red. Foi avaliado: evolução ponderal, fechamento da ferida, morfometria do colágeno, quantificação de células inflamatórias, fibroblastos, vasos neoformados e células musculares. A estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, sendo significativo quando $p < 0,05$. L-arginina não influenciou no ganho de peso dos animais ($p=0,470$; $p=0,574$; $p=0,486$) e nem na concentração de colágeno total ($p=1$; $p=0,655$; $p=0,057$ no 7°, 14° e 28° dias respectivamente). Também não induziu diferenças no fechamento da ferida, existindo apenas uma diminuição do perímetro no 28° dia de experimento ($p < 0,029$). Quanto à histomorfometria, a arginina promoveu menor inflamação ($p=0,013$; $p=0,001$; $p=0,001$; $p=0,002$) e maior neovascularização cutânea e muscular ($p < 0,001$). O aumento dos fibroblastos na pele ($p=0,001$) e de células musculares no glúteo máximo do grupo tratado refere regeneração cutânea e muscular, enquanto que no grupo C a quantidade de fibroblastos parece ter causado fibrose. Esses dados apontam que a suplementação de L-arginina apresentou melhorias na cicatrização cutânea e regeneração muscular de ratos queimados.

Palavras chave: Arginina. Terapia nutricional. Cicatrização cutânea. Regeneração muscular. Queimadura.

ABSTRACT

We evaluated the effects of L-arginine supplementation on the cutaneous and muscular healing process of adult rats submitted to thermal burn. We used 24 Wistar rats, dividing them in control (C - water) and experimental (ARG - 0.5g / kg), through gastric administration. The animals were submitted to thermal burn caused by 2 x 2 cm aluminum plate heated at 100 °C, pressed on their back for 1 minute. After 7, 14 and 28 days after the burn, they were anesthetized and euthanized, the injured tissues were removed and processed following the routine histological technique and stained by Hematoxylin-Eosin (H.E) and picosirius-red. It was evaluated: weight evolution, wound closure, collagen morphometry, quantification of inflammatory cells, fibroblasts, neoformed vessels and muscle cells. The statistic was performed by the Mann-Whitney test, being significant when $p < 0.05$. L-arginine did not influence the animals weight gain ($p = 0.470$, $p = 0.574$, $p = 0.486$) and neither did total collagen concentration ($p = 1$, $p = 0.655$, $p = 0.057$ at 7, 14 28 days respectively). It also did not induce differences in wound closure, with only a perimeter reduction occurring on the 28th day of the experiment ($p < 0.029$). As for histomorphometry, arginine promoted less inflammation ($p = 0.013$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.002$) and greater cutaneous and muscular neovascularization ($p < 0.001$). The increase in fibroblasts in the skin ($p = 0.001$) and muscle cells in the gluteus maximus of the treated group refers to cutaneous and muscular regeneration, whereas in group C the amount of fibroblasts seems to have caused fibrosis. These data indicate that supplementation of L-arginine showed improvements in cutaneous healing and muscle regeneration of burned rats.

Keywords: Arginine. Nutritional therapy. Cutaneous healing. Muscle regeneration. Burn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS QUEIMADURAS	21
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DO REPARO TECIDUAL.....	23
FIGURA 3 - FÓRMULA QUÍMICA DA L-ARGININA	25
FIGURA 4 - METABOLISMO DA L-ARGININA	26
FIGURA 5 - MÉTODO UTILIZADO PARA INDUÇÃO DAS QUEIMADURAS TÉRMICAS NO DORSO DO ANIMAL.....	29
FIGURA 6 - IMAGEM HISTOLÓGICA SOB LUZ POLARIZADA ILUSTRANDO O COLÁGENO BIRREFRINGENTE.....	32
FIGURA 7 - FOTOGRAFIAS DO ASPECTO DA QUEIMADURA EM DIFERENTES ESTÁGIOS.....	33
GRÁFICO 1 - ACOMPANHAMENTO E DIFERENÇA PONDERAL ENTRE OS GRUPOS C E ARG.....	34
GRÁFICO 2 - EVOLUÇÃO DO FECHAMENTO DA FERIDA, CONSIDERANDO A MENSURAÇÃO DA ÁREA E PERÍMETRO DA FERIDA, OBTIDAS DESDE A INDUÇÃO DA QUEIMADURA ATÉ OS DIFERENTES ESTÁGIOS PÓS-OPERATÓRIOS	35
GRÁFICO 3 - MENSURAÇÃO DA ÁREA OCUPADA POR FIBRAS COLÁGENAS NOS GRUPOS C E ARG AVALIADOS EM DECORRÊNCIA DO TEMPO DE EXPERIMENTO.....	35
GRÁFICO 4 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE CONSIDERANDO CÉLULAS INFLAMATÓRIAS, FIBROBLASTOS E VASOS NEOFORMADOS, RESPECTIVAMENTE A, B E C.....	36
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIAS DOS CORTES HISTOLÓGICOS DA PELE DE RATOS TRATADOS COM L-ARGININA (LADO DIREITO) E ANIMAIS CONTROLE (LADO ESQUERDO)	37

GRÁFICO 5 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MÚSCULO (<i>GLUTEUS MAXIMUS</i>) CONSIDERANDO CÉLULAS INFLAMATÓRIAS, FIBROBLASTOS, CÉLULAS MUSCULARES E VASOS NEOFORMADOS, RESPECTIVAMENTE A, B, C E D	39
FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIAS DOS CORTES HISTOLÓGICOS DO MÚSCULO <i>GLUTEUS MAXIMUS</i> DE RATOS TRATADOS COM L-ARGININA (LADO DIREITO) E ANIMAIS CONTROLE (LADO ESQUERDO).....	40

LISTA DE SÍMBOLOS

L-	Levógiro
-	Hífen
/	Barra
g	Gramma
Kg	Quilograma
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
=	Sinal de igual
+	Sinal de mais
<	Menor que
>	Maior que
%	Por cento
°	Grau
±	Sinal de mais ou menos
x	Sinal de multiplicação
µm	Micrometro
ml	Mililitros
h	Hora
cm ²	Centímetro quadrado

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	- American Burn Association
ARG	- Arginina
ATP	- Adenosina trifosfato
ATP-PC	- Adenosina trifosfato - fosfocreatina
C	- Controle
CAV/UFPE	- Centro Acadêmico da Vitória/Universidade Federal de Pernambuco
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	- Universidade Federal de Pernambuco
CNEF	- Congresso Nacional de Educação Física
CO ₂	- Gás carbônico
CTQ	- Centro de Tratamento de Queimados
EAST	- Eastern Association for the Surgery of Trauma
EPM	- Erro Padrão Médio
H.E	- Hematoxilina-Eosina
JPEN	- Journal of Parenteral and Enteral Nutrition
NBF	- Solução de Formol Neutro Tamponado
NO	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico Sintase
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PE	- Pernambuco
SCQ	- Superfície Corpórea Queimada
SIB-UFPE	- Sistema Integrado de Bibliotecas- Universidade Federal de Pernambuco

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TN - Terapia Nutricional

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 PELE: CARACTERÍSTICAS, FUNÇÕES E HISTOFISIOLOGIA.....	18
2.2 MÚSCULO: ANATOMIA, HISTOFISIOLOGIA E REGENERAÇÃO MUSCULAR.....	18
2.3 QUEIMADURAS	20
2.3.1 Epidemiologia, classificação e alterações fisiológicas	20
2.3.2 Cicatrização de queimaduras	22
2.4 A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS	23
2.4.1 Terapia nutricional e Imunonutrição	24
2.4.2 Arginina	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	28
4.2 ANIMAIS E ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL	28
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ADMINISTRAÇÃO DA L-ARGININA	28
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (REALIZAÇÃO DAS QUEIMADURAS TÉRMICAS).....	29
4.5 OBTENÇÃO DA MENSURAÇÃO DO FECHAMENTO DA FERIDA	30
4.6 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO OBTIDO	30
4.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32

5 RESULTADOS	33
5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MACROSCÓPICOS DA QUEIMADURA	33
5.2 ACOMPANHAMENTO PONDERAL.....	34
5.3 FECHAMENTO DA FERIDA	34
5.4 CONCENTRAÇÃO DO COLÁGENO TOTAL.....	35
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE.....	36
5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA MUSCULAR (<i>GLUTEUS MAXIMUS</i>).....	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A – Apresentação de trabalho científico em evento acadêmico.....	57
ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE.....	58

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras são responsáveis por um alto índice de mortalidade que somam aproximadamente 300.000 casos por ano no mundo (TAKEJIMA *et al.*, 2011). A alta complexidade no tratamento de um grande queimado requer altos investimentos financeiros, instituições com infraestrutura adequada, e uma equipe multiprofissional especializada e atenta às novas tecnologias de modo a tratar e recuperar a saúde do paciente (HENRIQUE *et al.*, 2013).

São classificadas de acordo com sua profundidade, sendo as de terceiro grau ou de espessura integral as queimaduras mais graves de todas as lesões térmicas, pois se estendem pela epiderme e derme com danos profundos, levando à alteração hemodinâmica, sendo geralmente indolores e com a aparência da pele variando de cor branca até a cor negra e carbonizada, com intensa formação de cicatrizes (STEIN *et al.*, 2013; ESCOTT-STUMP *et al.*, 2010).

O suporte nutricional desempenha um papel importante na promoção da cicatrização de queimaduras, estudos atuais indicaram que a terapia nutricional enteral precoce é segura e eficaz, o que pode melhorar as reações metabólicas e todo o curso clínico, encurtando assim o tempo de cicatrização (CHEN *et al.*, 2014). Nos últimos anos, a arginina atraiu grande atenção devido aos seus efeitos benéficos no campo da nutrição clínica, em razão de suas ações nos mecanismos fisiológicos de cicatrização e reparo de tecidos, bem como sua participação nos mecanismos de defesa imunológica (CÔRREA-NETO *et al.*, 2009).

A arginina, aminoácido essencial, atua como um substrato para a síntese de proteína, a proliferação celular, a neurotransmissão, a vasodilatação, a imunidade e a cicatrização de feridas (ONO *et al.*, 2014). É também um precursor de óxido nítrico, ureia, ornitina, prolina e outras moléculas, e tem um papel importante na síntese de colágeno (STECHMILLER *et al.*, 2005). Em condições normais, a quantidade de arginina pode satisfazer as necessidades diárias, no entanto, após queimaduras, o corpo humano não pode manter um balanço nitrogenado positivo ou funções fisiológicas normais, enquanto que a suplementação com arginina pode aliviar a hipofunção imune e aumentar a síntese proteica após traumatismos por queimaduras (ZHANG *et al.*, 2016).

Seu papel como potente imunomodulador na cicatrização já vêm sendo evidenciado. Estudos experimentais demonstram que a complementação da dieta com

L-arginina, em ratos, aumenta a força tênsil e deposição de colágeno no tecido lesionado em processo cicatricial (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Trabalhos científicos também revelam que a associação da dieta enteral enriquecida com L-arginina, fibras e antioxidantes tem diminuído a taxa de sepse em pacientes críticos, e que a suplementação de arginina (17 g/dia) foi capaz de melhorar a cicatrização e resposta imune em humanos (SILVA *et al.*, 2012). Desta forma, a arginina mostrou ser benéfica na cicatrização por numerosos estudos em roedores e seres humanos, conforme afirmação de Gundoğdu *et al.* (2015).

Apesar da efetividade da arginina em promover etapas da cicatrização já está evidenciada, ainda existem lacunas frente à este nutriente e a cicatrização de queimaduras graves, também não existe um consenso sobre a dosagem estabelecida, tempo de uso, nível de segurança e vias de administração versus rotas metabólicas envolvidas nesse processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE: CARACTERÍSTICAS, FUNÇÕES E HISTOFISIOLOGIA

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo responsável por cobrir aproximadamente dois metros quadrados de área total da superfície corporal de um adulto (ROCHA, 2009). Têm sua temperatura e espessura variáveis, sendo sua temperatura normal variando entre 32°C a 36°C e espessura entre dois ou três milímetros conforme a localização anatômica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Funcionalmente, é responsável pela proteção contra atrito, perda de água, radiação ultravioleta e invasão de microrganismos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Participa ainda no processo de termorregulação, no metabolismo e armazenamento de vitaminas e lipídeos, regula os fluxos sanguíneo e linfático e devido à presença de terminações nervosas especializadas se torna um importante órgão sensorial (ROCHA, 2009).

É composta por duas camadas, a epiderme formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e a derme formada por conjuntivo frouxo e denso não modelado, subjacente à pele encontra-se um tecido adiposo subcutâneo chamado hipoderme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Essas duas camadas apresentam células especializadas e entre elas destacam-se os queratinócitos encontrados na epiderme e os fibroblastos e macrófagos encontrados na derme (SZWED et al. 2015).

A derme é composta principalmente por fibroblastos que produzem colágeno tipos I e III, fibras elásticas e matriz extracelular, sendo essa camada responsável pela tonicidade, elasticidade e firmeza da pele. Podemos dividir a derme em camadas superior, média e profunda ou inferior, estando a maior concentração de fibroblastos e fibras colágenas na região superior (EÇA et al. 2015). Um dano ocasionado na pele como uma injúria, pode afetar sua fisiologia, em especial se acometer a camada dérmica (SZWED et al. 2015).

2.2 MÚSCULO: ANATOMIA, HISTOFISIOLOGIA E REGENERAÇÃO MUSCULAR

O glúteo máximo (*gluteus maximus*) é um dos principais músculos responsáveis pelo movimento dos quadris, grande parte de suas fibras musculares atravessam perpendicularmente a articulação sacroilíaca sendo a contração do glúteo máximo capaz

de produzir potentes forças de compressão nesta articulação, além de suas inserções proximais e distais permitirem que exista uma transferência de forças entre a coluna vertebral, pélvis e joelho (BARKER *et al.*, 2014; STECCO *et al.*, 2013).

O glúteo máximo é o músculo com maior área de secção transversal dos membros inferiores, formado por um equilíbrio entre o número de fibras do tipo I e II, pode ser dividido em porção superior e inferior de acordo com a sua função, porém ambas as porções contribuem para a abdução e rotação externa e interna da anca (SELKOWITZ *et al.*, 2016; FUJISAWA *et al.*, 2014).

Por ser muito importante no movimento corporal, qualquer lesão no glúteo máximo pode causar alterações estruturais e funcionais no músculo. A lesão muscular é caracterizada por rompimento dos miofilamentos, anormalidade mitocondrial e do retículo sarcoplasmático, descontinuidade do sarcolema, desequilíbrio hidro-eletrolítico e necrose celular. Podemos observar nas lesões sinais de fibras lesadas e/ou em regeneração, além de fibras já regeneradas (TIDBALL *et al.*, 1995; SVERZUT & CHIMELLI, 1999).

Nesse contexto, as fibras lesadas e/ou em regeneração são identificadas pela presença de alguns detalhes perceptíveis como, por exemplo, o infiltrado celular, que é a presença de células inflamatórias e/ou células satélites, e a basofilia, que se trata do aumento da atividade ribossômica, a presença de núcleos centralizados com nucléolos proeminentes, caracterizando síntese proteica e a hipercontração dos miofilamentos, que indica acúmulo de Ca^{++} (CARPENTER & KARPATI, 1984). Já com relação aos sinais de fibras regeneradas, estas são caracterizadas pela presença de fibras fragmentadas e fibras com núcleos centralizados (ENGEL & ARMOSTRONG, 1994).

De forma geral o organismo vivo possui a capacidade de regeneração, alterando suas capacidades estruturais e funcionais de acordo com as condições ambientais impostas em um determinado sistema, esta habilidade é claramente observada no músculo estriado esquelético, sendo a regeneração muscular um dos exemplos que demonstram a plasticidade do sistema musculoesquelético, ou seja, a capacidade adaptativa do músculo frente a um estímulo externo (FERRARI *et al.*, 2005).

Segundo WILLIAMS *et al.*, (1995), a regeneração do tecido muscular esquelético é limitada, e se a lesão é muito grande como nas queimaduras graves, a regeneração pode não ocorrer e o músculo perdido é então substituído por tecido conectivo. Após uma lesão muscular, entram em ação as células satélites, responsáveis

pela reconstituição do músculo, estas quando ativas se proliferam por divisão mitótica e se fundem umas às outras para formar novas fibras musculares esqueléticas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ROSS & ROMRELL, 1993).

Finalmente, o processo final de regeneração envolve a reinervação, pois estudos mostram que a regeneração da fibra muscular pode ocorrer independente da integridade nervosa, desde que a lâmina basal esteja intacta (JARVINEN *et al.*, 2000). Uma vez regenerada, há a necessidade da presença da junção neuromuscular para manter a integridade da fibra, evitando, assim, sua atrofia e degeneração, o que resulta na sua maturação funcional e histoquímica do músculo, sendo este processo dependente diretamente do bom funcionamento do sistema imunológico do organismo (FERRARI *et al.*, 2005).

Segundo Souza *et al.*, (2015) vários estudos clínicos, utilizando animais e seres humanos, vêm demonstrando a capacidade de alguns nutrientes específicos em modular respostas imunológicas e inflamatórias em diversas patologias, inclusive na regeneração muscular.

2.3 QUEIMADURAS

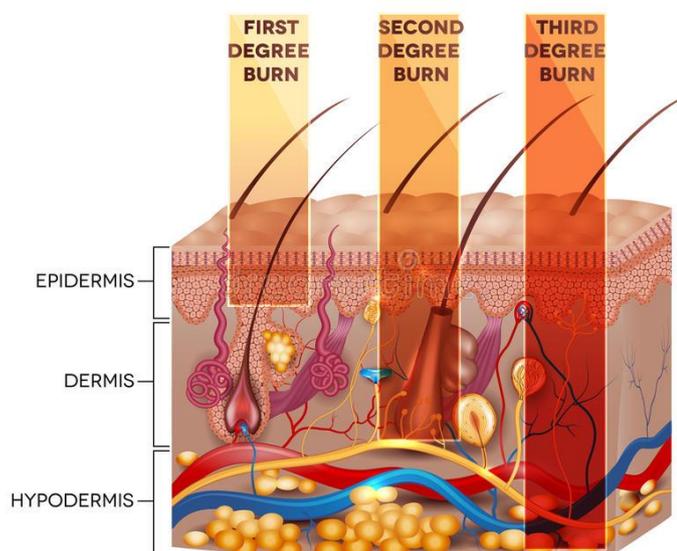
2.3.1 Epidemiologia, classificação e alterações fisiológicas

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 300.000 pessoas morrem anualmente vítimas de queimaduras, já no Brasil estima-se que ocorram por volta de 1.000.000 de acidentes com queimaduras por ano (STEIN *et al.*, 2013). Henrique *et al.*, (2013), relatou os desafios de tratar um paciente queimado no país, estando o Brasil com um número reduzido de Centro de Tratamento de Queimados (CTQ).

A queimadura é considerada uma das lesões mais devastadoras que o corpo humano pode sofrer, afetando pessoas de todas as idades e ambos os sexos (ANDRETTA *et al.*, 2013). São lesões parciais ou totais da pele e seus anexos, podendo atingir camadas como derme, epiderme, tecido celular subcutâneo, músculo, tendões e ossos (P. JÚNIOR *et al.*, 2010). Podem ser classificadas quanto sua etiologia em: térmicas, elétricas, químicas e por radiação e podem ser influenciadas por diversos fatores, envolvendo a duração e a intensidade do calor, espessura da pele e área exposta, a vascularidade e idade (STEIN *et al.*, 2013).

Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras (2018), são classificadas de acordo com a profundidade das queimaduras e avaliadas quanto à extensão da Superfície Corpórea Queimada (SCQ). Quanto ao grau de profundidade da lesão são classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau, sendo as de 1º grau acometendo a camada mais externa da pele (a epiderme), as de 2º grau apresentam envolvimento dérmico, podendo ser superficiais ou profundas e as queimaduras de 3º grau ou de espessura integral acometem toda a epiderme e derme com danos profundos atingindo os tecidos subcutâneos, podendo até lesar músculos e estruturas ósseas, ilustrado na figura 1 (GIORDANI *et al.*, 2016).

Figura 1- Classificação das queimaduras.



Fonte: ROCHA (2009).

De acordo com a gravidade da queimadura, classificam-se em queimaduras leves, moderadas e graves, sendo que as leves possuem as seguintes características: deve ser de 1º grau ou 2º grau abaixo de 10% de SCQ, e 3º grau abaixo de 2% de SCQ. Já as queimaduras moderadas são as de 2º grau entre 10% e 20% de SCQ e 3º grau entre 3% e 5% de SCQ. As queimaduras graves correspondem as de 2º grau acima de 20% de SCQ e 3º grau acima de 10% de SCQ (STEIN *et al.*, 2013).

As queimaduras são acompanhadas por grandes mudanças metabólicas, imunes e endócrinas e, independentemente de sua causa, determinam lesões locais e sistêmicas. Nas queimaduras pequenas, existe uma reação unicamente local, enquanto nas

queimaduras moderadas e graves ocorre uma reação local maior, podendo ser acompanhada de graves repercussões sistêmicas (AGUIAR *et al.*, 2014).

Sua alta taxa de mortalidade deve-se principalmente à instalação de dois fatores: a infecção da ferida e o quadro de hipermetabolismo. No primeiro, a infecção pode evoluir com septicemia devido à exposição de vasos e invasão de micro-organismos na circulação sistêmica, corroborando para possíveis complicações renais, adrenais, cardiovasculares, pulmonares, musculoesqueléticas, hematológicas e gastrointestinais (GONELLA *et al.*, 2014). Já no hipermetabolismo ocorre perda exagerada de massa magra corporal, o que vem a causar a instalação da desnutrição, pela resposta hiperdinâmica com aumento da temperatura corporal, do consumo de glicose e oxigênio, da formação de CO₂, glicogenólise, lipólise e proteólise (AGUIAR *et al.*, 2014).

2.3.2 Cicatrização de queimaduras

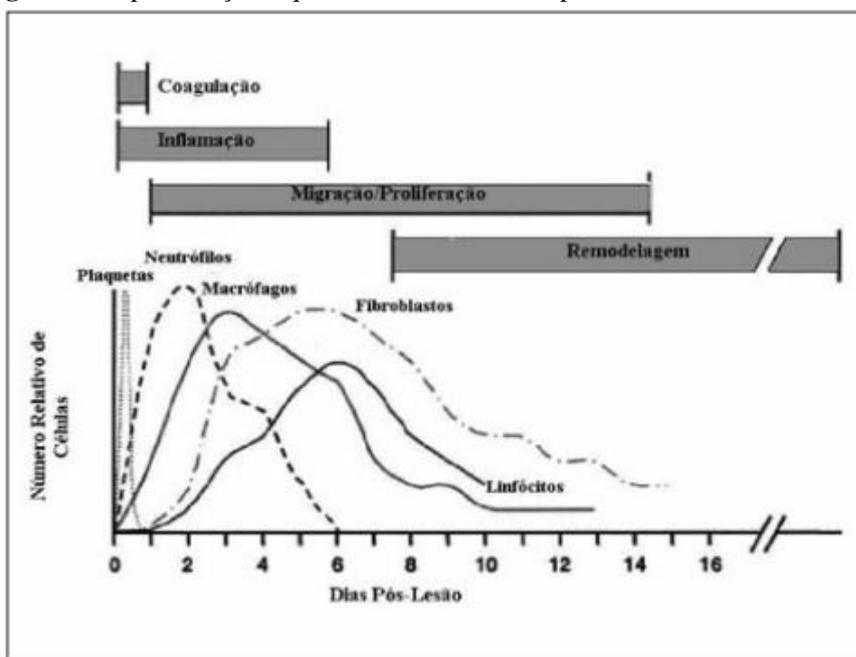
Segundo Pierine & Assunção (2014), a injúria térmica provoca no organismo uma resposta local traduzida por necrose de coagulação tecidual e progressiva trombose dos vasos adjacentes num período de 12 a 48 horas. Sendo a ferida da queimadura a princípio estéril, porém o tecido necrosado rapidamente se torna colonizado por bactérias endógenas e exógenas, produtoras de proteases, que levam a liquefação e separação da escara, dando lugar ao tecido de granulação responsável pela cicatrização da ferida que se caracteriza por alta capacidade de retração e fibrose nas queimaduras de terceiro grau.

Szwed *et al.*, (2015) propôs que a cicatrização de feridas começa logo após o dano tecidual e consiste em mecanismos complexos de interações extracelulares, mediadores químicos, células locais e inflamatórias que interagem para a regeneração do tecido lesionado, buscando restabelecer satisfatoriamente a função e a aparência do local afetado. A cicatrização compreende 3 fases com limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: fase inflamatória, proliferativa e fase de remodelamento (PAGNANO *et al.*, 2009).

A fase inflamatória inicia logo após o surgimento da lesão sendo caracterizada por dois processos que buscam limitar a lesão tecidual: a hemostasia e a resposta inflamatória aguda, ocorrendo liberação de plaquetas e de neutrófilos responsáveis pela

liberação de fatores de crescimento com ação sobre os queratinócitos e os fibroblastos (OLIVEIRA & DIAS, 2012). Já a fase proliferativa ou de cicatrização, divide-se em quatro etapas: reepitelização, angiogênese, proliferação de fibroblastos e colágeno tipo III, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos para posterior formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (SZWED *et al.*, 2015). A última fase corresponde à remodelação ou maturação, nesta fase o colágeno agora tipo I se deposita de forma mais organizada para promover o fechamento final do tecido, figura 2 (PAGNANO *et al.*, 2009).

Figura 2 - Representação esquemática das fases do reparo tecidual.



Fonte: Mendonça & Coutinho-Netto (2009).

2.4 A INFLUÊNCIA DA NUTRIÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS

2.4.1 Terapia nutricional e Imunonutrição

A terapia nutricional (TN) é um dos campos que atraem muita atenção pelo seu papel na aceleração da cicatrização de pacientes queimados, ganhando enorme importância nos últimos 20 anos, pois tornou-se peça fundamental nos cuidados dispensados ao paciente crítico devido às evidências científicas comprovarem que o estado nutricional interfere diretamente na sua evolução clínica como na redução da morbimortalidade, diminuição da resposta catabólica, incremento do sistema imune, manutenção da integridade funcional do trato gastrointestinal, além de contribuir para

um menor tempo de internação e conseqüentemente redução no custo do tratamento (DIESTEL *et al.*, 2013; FONTOURA *et al.*, 2006; MCCLAVE *et al.*, 2009).

A TN utiliza alimento especialmente formulado, industrializado ou não, empregado exclusivo ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação, conforme as necessidades nutricionais do paciente, e tem por objetivo a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BLANC *et al.*, 2015). Na prática clínica, a oferta dessas fórmulas pode ocorrer por via oral, enteral e parenteral, e são classificadas quanto à complexidade dos nutrientes em fórmulas poliméricas, oligoméricas, monoméricas e dietas modulares (WAITZBERG, 2000).

A terapia nutricional precoce tornou-se importante componente no tratamento de pacientes críticos, prevenindo a translocação bacteriana, a úlcera de decúbitos e os efeitos de hipermetabolismo (SILVA *et al.*, 2012). Em pacientes queimados, a *American Burn Association* (ABA) indica a terapia nutricional o quanto antes possível, assim como a *Eastern Association for the Surgery of Trauma* (EAST), que recomenda que a terapia nutricional enteral seja iniciada logo após a admissão do paciente, não ultrapassando período superior a 18 horas, pois acima desse período pode resultar maior taxa de gastroparesia e necessidade de nutrição parenteral (MOSIER *et al.*, 2011).

Segundo Heyland *et al.*, (2001), a habilidade dos nutrientes em influenciar a atividade de células do sistema imune de maneira clinicamente significativa é definida como imunonutrição. Em pacientes que requerem nutrição artificial (enteral e/ou parenteral), sua ação pode ser observada também na modificação de processos pró-inflamatórios (incluindo o estresse oxidativo) e na melhora da barreira intestinal, prevenindo a translocação bacteriana (CALDER, 2003). Existem diversas fórmulas imunomoduladoras no mercado, enriquecidas especialmente por nutrientes tais como glutamina, arginina, nucleotídeos, ácidos graxos ômega 3 e antioxidantes, recomendadas com o intuito de modular a resposta imune e inflamatória e reduzir a incidência, principalmente, de complicações infecciosas (HEYLAND *et al.*, 2001, DIESTEL *et al.*, 2013).

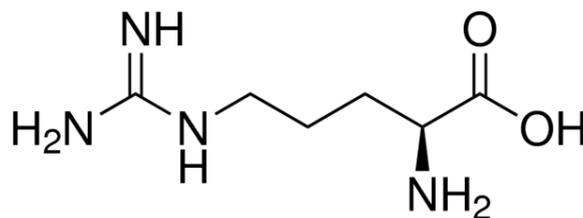
De acordo com Ono *et al.*, (2014), a deficiência de proteína e de aminoácidos em condições de reparo cicatricial, prejudica o processo de cicatrização favorecendo maior risco de infecções. Fisiologicamente, a depleção proteica no processo cicatricial prolonga a fase inflamatória e prejudica a fibroplasia, ocorrendo diminuição da

proliferação fibroblástica, da angiogênese e da produção de colágeno, e, conseqüentemente, ocorre menor reparo tecidual da ferida.

2.4.2 Arginina

Dentre os aminoácidos imunomoduladores estudados na cicatrização de pacientes queimados destaca-se a arginina (Figura 3). A arginina torna-se aminoácido condicionalmente essencial nos períodos de estresse metabólico, sendo a sua utilização maior do que a produção endógena (STECHMILLER *et al.*, 2005). A utilização da arginina pelo organismo é derivada através da proteína da dieta, degradação de proteínas pelo metabolismo ou pela produção endógena de arginina pelos rins. Uma vez que está envolvido em vários processos metabólicos, uma deficiência de arginina tem o potencial de alterar muitas funções celulares e de órgãos (BAKSHI & MORRIS, 2016).

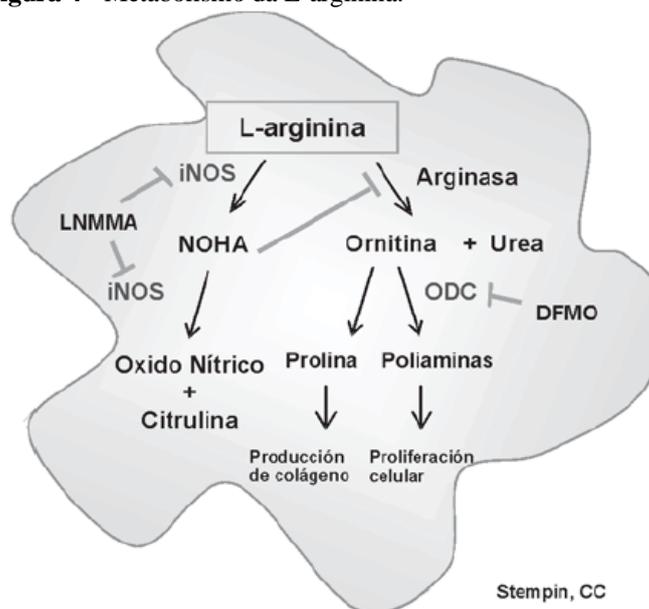
Figura 3 - Fórmula química da L-arginina.



Fonte: Sigma-Aldrich®

A arginina é precursora do óxido nítrico, da ornitina e da prolina, entre outras moléculas, e é recrutada nas fases agudas e crônicas da cicatrização. Seu catabolismo nas feridas em cicatrização ocorre por duas principais vias: isoenzimas que sintetizam óxido nítrico e através das duas isoenzimas arginases, como elucidado na figura 4 (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Figura 4 - Metabolismo da L-arginina.



Fonte: STEMPIN & CERBÁN (2007).

Os mecanismos de ação propostos da arginina na cicatrização parecem estar relacionados com o fato desta ser precursora da ligação prolina-colágeno melhorando a força tênsil, e pela sua capacidade em induzir a produção de certos hormônios como a insulina e o hormônio do crescimento humano, que medeiam os mecanismos de cicatrização (STEIN *et al.*, 2013). Como também, a arginina é o único substrato para a síntese de óxido nítrico, sendo que este apresenta função fundamental nos processos inflamatórios, favorecendo um estado de oxirredução tecidual adequado, limitando o aparecimento de aterosclerose, e favorecendo a resposta citotóxica das células imunológicas e mantendo o fluxo sanguíneo (MARTINS, 2011).

Embora muitos estudos demonstrem eficácia na suplementação de arginina na cicatrização, a quantidade adequada de sua suplementação, tempo de uso, vias de administração e rotas metabólicas frente a queimaduras graves devem ser melhor elucidados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com L-arginina no processo de cicatrização cutânea de ratos submetidos à queimadura térmica em tempos distintos da cronologia do reparo tecidual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se a indução da queimadura altera o peso dos animais e se há diferenças entre o grupo suplementado com L-arginina e o grupo controle.
- Analisar se a suplementação com L-arginina acelera o fechamento final da ferida comparando as diferenças histométricas sobre a área e perímetro da queimadura.
- Comparar as características histológicas do processo de cicatrização entre o grupo suplementado com L-arginina e o grupo controle, verificando se há diferenças na quantidade de vasos neoformados, fibroblastos, infiltrado inflamatório e produção de fibras colágenas, através de histomorfometria e de técnicas histoquímicas durante o processo de reparo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo faz parte da linha de pesquisa métodos clássicos e avançados do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da UFPE, sendo sua normatização de acordo com as recomendações do Sistema Integrado de Bibliotecas (SIB-UFPE).

Foi realizado de acordo com as normas de experimentação animal dispostas na legislação nacional, sendo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA – UFPE/CCB), sob protocolo nº 0031/2016 (ANEXO 1).

As condições ambientais do biotério são semi-controladas, com temperatura média de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos no biotério do Centro Acadêmico de Vitória-CAV/UFPE, onde os experimentos cirúrgicos foram realizados.

4.2 ANIMAIS E ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL

Foram utilizados 24 ratos machos da linhagem *Wistar*, adulto-jovens, pesando 250-350g. Durante todo protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas (dimensões de 51 cm \times 35.5 cm \times 18.5 cm) e tiveram livre acesso a ração Labina (Purina® Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

O peso corporal dos animais foi mensurado semanalmente durante todo o período experimental, com o auxílio de uma balança eletrônica (Filizola MF-3/1, Indústrias Filizola S.A. São Paulo, Brasil) presente no biotério.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ADMINISTRAÇÃO DA L-ARGININA

Os ratos foram divididos em três grupos: 7, 14 e 28 dias, sendo estes subdivididos em suplementado (ARG) e controle (C), n=4/grupo. O grupo ARG foi suplementado diariamente via gavagem com 0,5g/kg de L-arginina (Sigma-Aldrich®) diluídos em 1ml de água, enquanto o grupo controle recebeu apenas água em mesmo volume (1 ml) e via de administração, ambos no horário de 13-14h.

A arginina foi adquirida comercialmente através da empresa Sigma, sendo sua apresentação em pó, solúvel em água. A quantidade de arginina a ser administrada

seguiu a mesma dose de ONO (2009), sendo então calculada com base no peso corporal médio dos animais respeitando as recomendações da AIN (1993) (Reeves e col., 1993).

O preparo diário das soluções era realizado minutos antes de sua administração, sendo a L-arginina pesada e administrada através de sonda orogástrica. A gavagem era realizada sempre no mesmo horário e consistiu em contenção do animal, introdução da cânula de gavagem e injeção lenta do líquido na cavidade gástrica através de cânulas de polietileno, de pequeno calibre e flexíveis conectadas a seringas de vidro de 3,0 mL.

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (REALIZAÇÃO DAS QUEIMADURAS TÉRMICAS)

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico que consistiu, primeiramente, em pesagem em balança eletrônica (Filizola MF-3/1, Indústrias Filizola S.A. São Paulo, Brasil).

Em seguida os animais foram anestesiados com a mistura de 50 mg/kg de cloridrato de Ketamina e 10mg/kg de cloridrato de Xilazina por via intraperitoneal. Após a sedação do animal, foram posicionados em decúbito ventral, realizou-se tricotomia e posterior antissepsia com álcool 70% em sua região dorsal mediana. Posteriormente foram submetidos à queimadura térmica de terceiro grau provocada por chapa de alumínio com 2x2cm aquecida a 100°C, e pressionada na pele do dorso do animal por 1 minuto, ilustrado na figura 5.

Figura 5 - Método utilizado para indução das queimaduras térmicas no dorso animal.



Fonte: O Autor (2018).

4.5 OBTENÇÃO DA MENSURAÇÃO DO FECHAMENTO DA FERIDA

Com técnica padronizada, as feridas foram fotografadas durante todo o período experimental. Quando anestesiados, ao apresentarem completo relaxamento muscular, os animais foram posicionados sobre uma superfície plana, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e cabeça em posição lateral. Nesta posição, a ferida foi fotografada em ambiente iluminado e a uma distância padrão, apoiando-se a câmera fotográfica sobre um tripé a uma distância de 30 cm, estando uma régua posicionada lateralmente a ferida.

As imagens foram analisadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Foi calculado 1cm (medido com o auxílio das réguas adjacentes à ferida), tendo-se o resultado na unidade aleatória - pixels, que corresponde ao valor real de 1cm². A seguir, com auxílio de um mouse, procedeu-se o contorno manual da imagem, cujo resultado em centímetros, correspondia ao valor da área da ferida.

4.6 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO OBTIDO

Após 7, 14 e 28 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia através da administração de dose letal (150mg/kg de cloridrato de Ketamina + 30mg/kg de cloridrato de Xilazina, via intraperitoneal). Imediatamente após, os fragmentos dos tecidos lesados da pele e de seu músculo subjacente (*gluteus maximus*) em toda sua extensão (incluindo borda) e profundidade (2cm) foram retirados através de um bisturi (número 11), e seguiram a técnica histológica de rotina para análise em microscopia de luz.

O material coletado foi clivado e mergulhado em uma solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF) e armazenado em geladeira por um período de 48 horas. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo (Leica Biosystems RM2245, Leica Biosystems Inc, USA) ajustado a 5µm, aproximadamente. Assim, os cortes obtidos foram estirados e colocados em lâminas untadas com albumina, desparafinizados, desidratados, corados e montados em lamínula com entellan, após mantiveram-se em

estufa regulada à temperatura de 37°C, por 24 horas para secagem (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Para análise quantitativa das células inflamatórias, células musculares, fibroblastos e vasos neoformados, os preparados histológicos foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E). Já para quantificação das fibras colágenas totais foi utilizada a coloração de picrosirius-red, esta análise será descrita posteriormente.

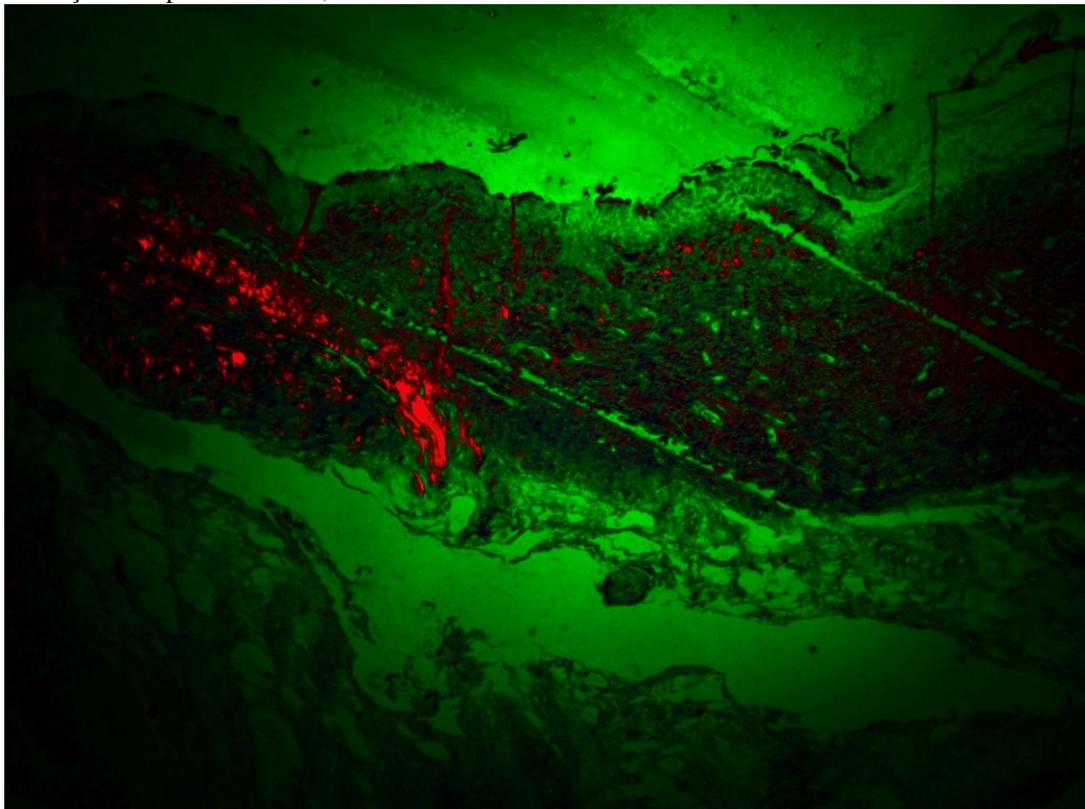
As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-100), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 20 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS

Após coloração por picrosirius-red e montagem, as lâminas histológicas da pele foram analisadas por técnica de microscopia óptica com luz polarizada (Zeiss Primotech, Carl Zeiss Microscopy GmbH Inc, Germany) acoplada em um analisador de imagens computadorizado para quantificação da área por diferencial de cor.

Em aumento de 400 vezes, a calibração do sistema foi realizada pela leitura da área cicatricial, sendo o colágeno total da ferida quantificado através de áreas birrefringentes (com coloração em espectro variando laranja a vermelho), conforme ilustrado na figura 6. Posteriormente, foram selecionadas aleatoriamente 5 imagens por animal e foi calculada a porcentagem das áreas com e sem fibras colágenas.

Figura 6- Imagem histológica sob luz polarizada ilustrando o colágeno birrefringente. Coloração com picosirius-red, aumento de 400X.



Fonte: O Autor (2018).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do software SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *Mann-Whitney* com o intuito de verificar as possíveis diferenças entre os grupos. Para tanto, foi adotado o nível de significância de 5% ou $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MACROSCÓPICOS DA QUEIMADURA

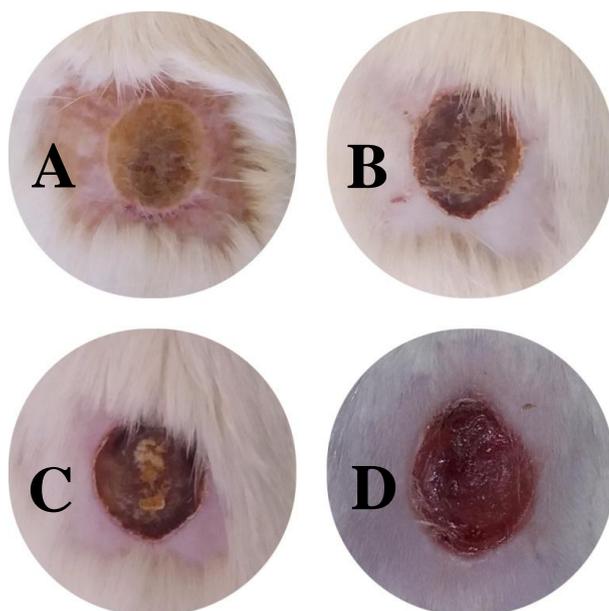
Os animais foram submetidos à queimadura térmica classificada quanto à extensão de sua profundidade em queimadura de terceiro grau, pois a lesão atingiu toda a extensão da pele (epiderme, derme, tecido subcutâneo) inclusive o músculo subjacente (*gluteus maximus*).

Logo após sua indução, as queimaduras apresentaram-se como lesões secas, indolores, bem delimitadas e com coloração marrom devido à imediata carbonização dos tecidos. Após 7 e 14 dias, foi observada a presença de crostas oriundas da dessecação de sangue e/ou líquido inflamatório proveniente da lesão subjacente, sendo estas de aspecto seco, grosso e de cor escura. Ao final do experimento, a crosta já estava quase totalmente desprendida, surgindo então o tecido de granulação com aspecto úmido, brilhante e avermelhado (FIGURA 7).

Por fim, não houve mortalidade entre os animais de ambos os grupos durante o decorrer do estudo, observou-se focos hemorrágicos em alguns animais dos grupos C e ARG, e exsudação purulenta em quatro animais do grupo C.

Não houve regurgitação ou efeitos colaterais com a suplementação de L-arginina no grupo experimental.

Figura 7 - Fotografias do aspecto da queimadura em diferentes estágios. Em A, ferida logo após a queimadura. Em B, 7º dia. Em C, 14º dia, Em D, 28º dia.

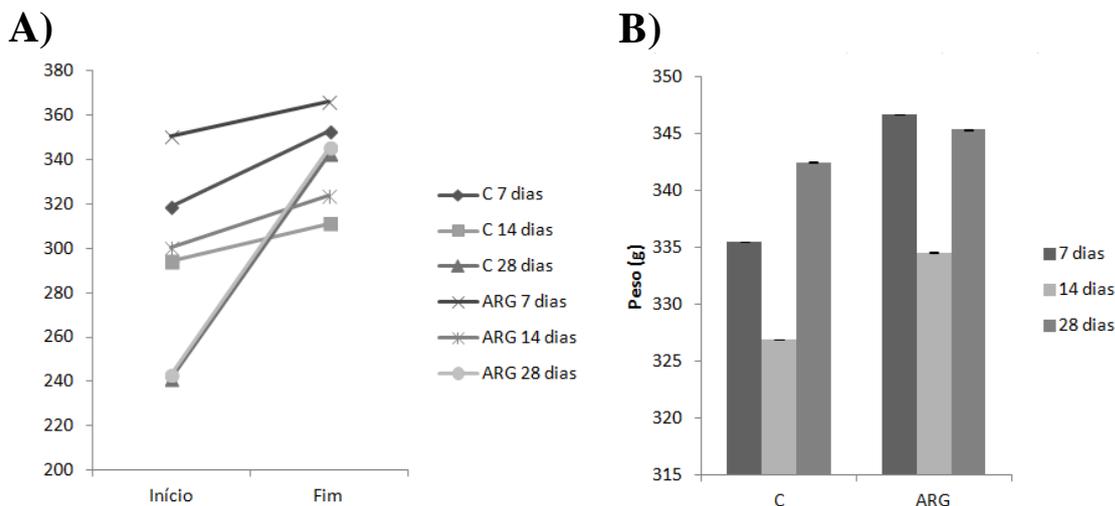


Fonte: O Autor (2018).

5.2 ACOMPANHAMENTO PONDERAL

Não houve perda ponderal, ao decorrer do estudo, em nenhum animal após a indução da queimadura (FIGURA 4), não havendo também diferenças significativas na evolução ponderal entre os grupos no decorrer do experimento (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Acompanhamento e diferença ponderal entre os grupos C e ARG. Em A, Evolução ponderal de cada grupo C e ARG no início e fim de cada experimento, considerando a cronologia de grupos (7, 14 e 28 dias). Não houve perda ponderal após indução da queimadura, e ao final do estudo todos os animais obtiveram ganho de peso positivo. Em B, Diferenças entre o ganho ponderal (média \pm EPM) dos grupos experimentais C e ARG ao decorrer do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos no 7°, 14° e 28° dias sendo valor de $p = 0,470$; $0,574$; $0,486$, respectivamente. Teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$.

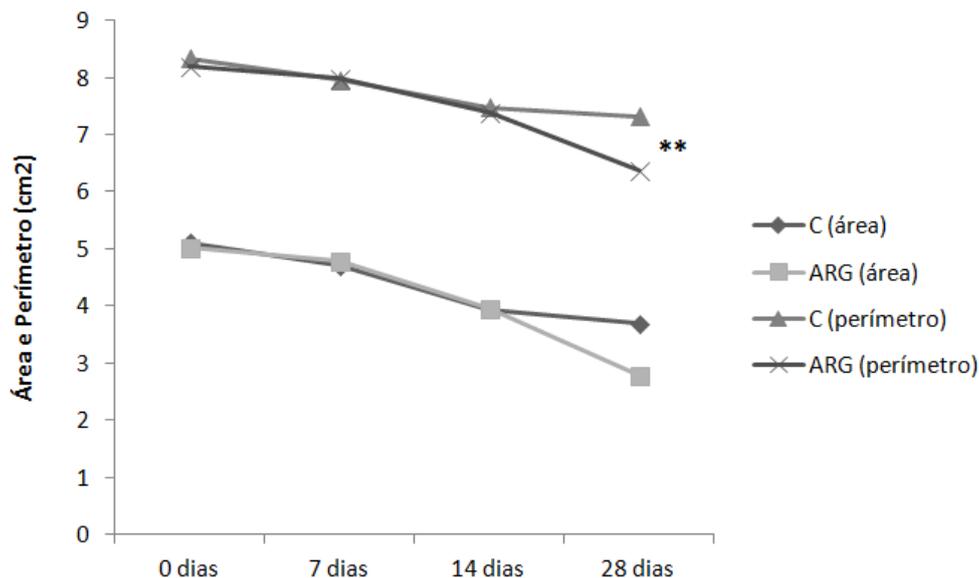


Fonte: O Autor (2018).

5.3 FECHAMENTO DA FERIDA

A mensuração da área e do perímetro da ferida foi avaliada desde a indução da queimadura até os diferentes estágios pós-operatórios. Houve redução na área e perímetro da ferida em todos os grupos ao decorrer do estudo, conforme gráfico 2. Em relação às diferenças entre os grupos, apenas no grupo ARG do 28° dia houve redução do perímetro se comparado ao controle ($p > 0,029$).

Gráfico 2 - Evolução do fechamento da ferida, considerando a mensuração da área e perímetro da ferida, obtidas desde a indução da queimadura até os diferentes estágios pós-operatórios. A área e perímetro diminuíram com o decorrer do tempo em ambos os grupos ARG e C, havendo diferença significativa apenas no perímetro do 28º dia do grupo ARG. **= $p < 0,05$.

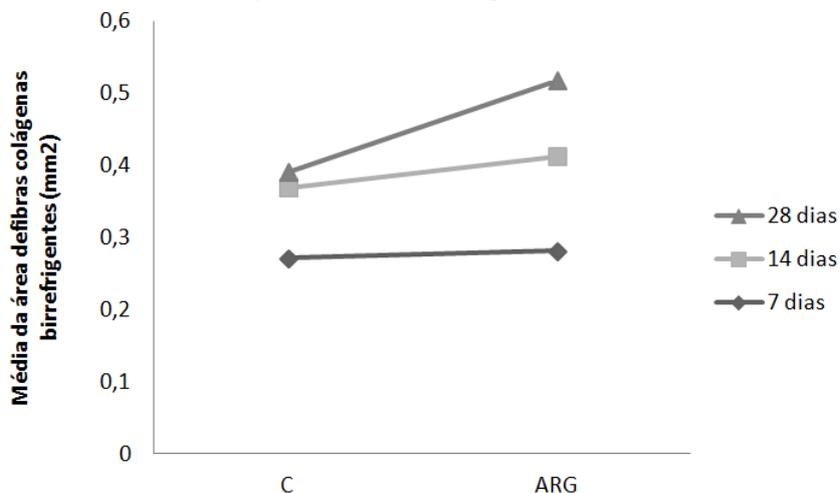


Fonte: O Autor (2018).

5.4 CONCENTRAÇÃO DO COLÁGENO TOTAL

Foi analisada a área ocupada por fibras colágenas no tecido conjuntivo da pele. Não houve diferenças significativas entre os grupos C e ARG ($p=1$ no 7º dia; $p=0,655$ no 14º dia; $p=0,057$ no 28º dia). Dados ilustrados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Mensuração da área ocupada por fibras colágenas nos grupos C e ARG avaliados em decorrência do tempo de experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos no 7º, 14º e 28º dia sendo valor de $p=1, 0,655, 0,057$, respectivamente.

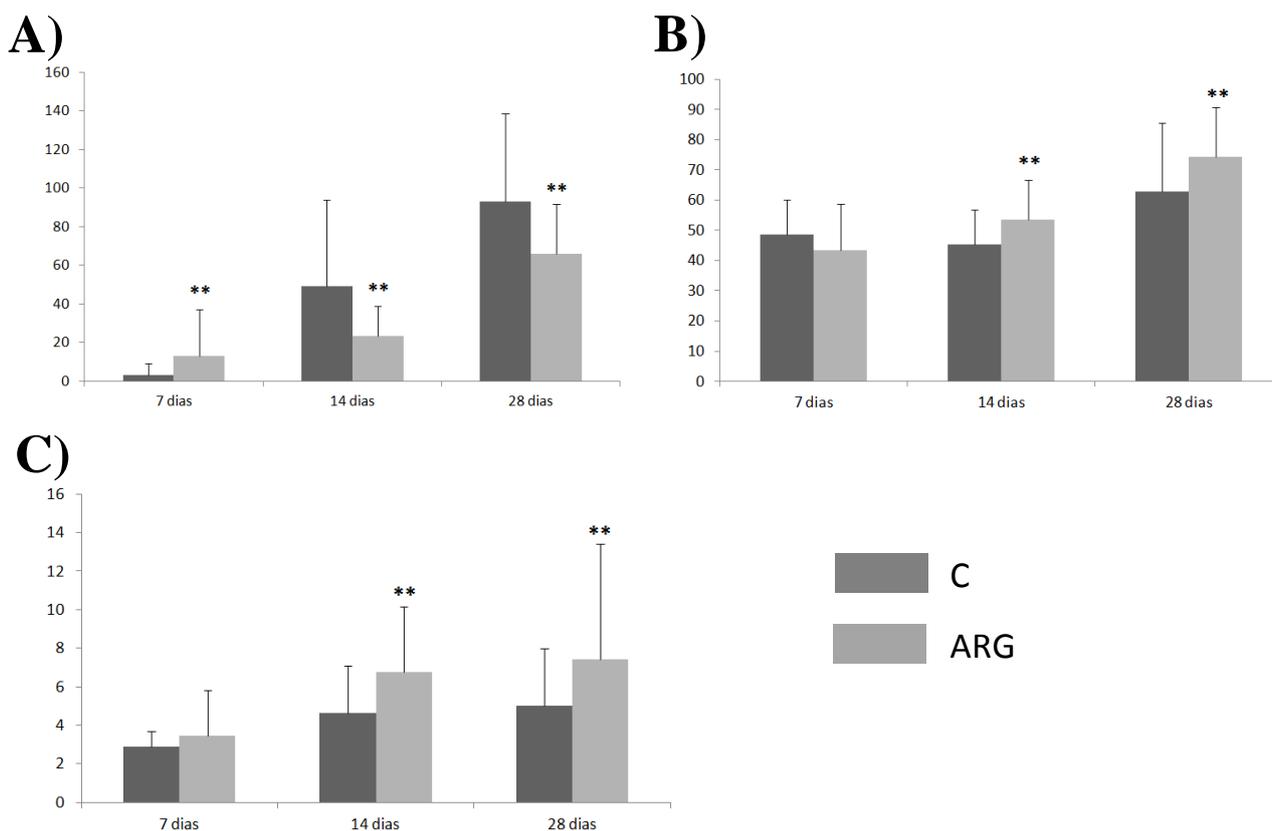


Fonte: O Autor (2018).

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE

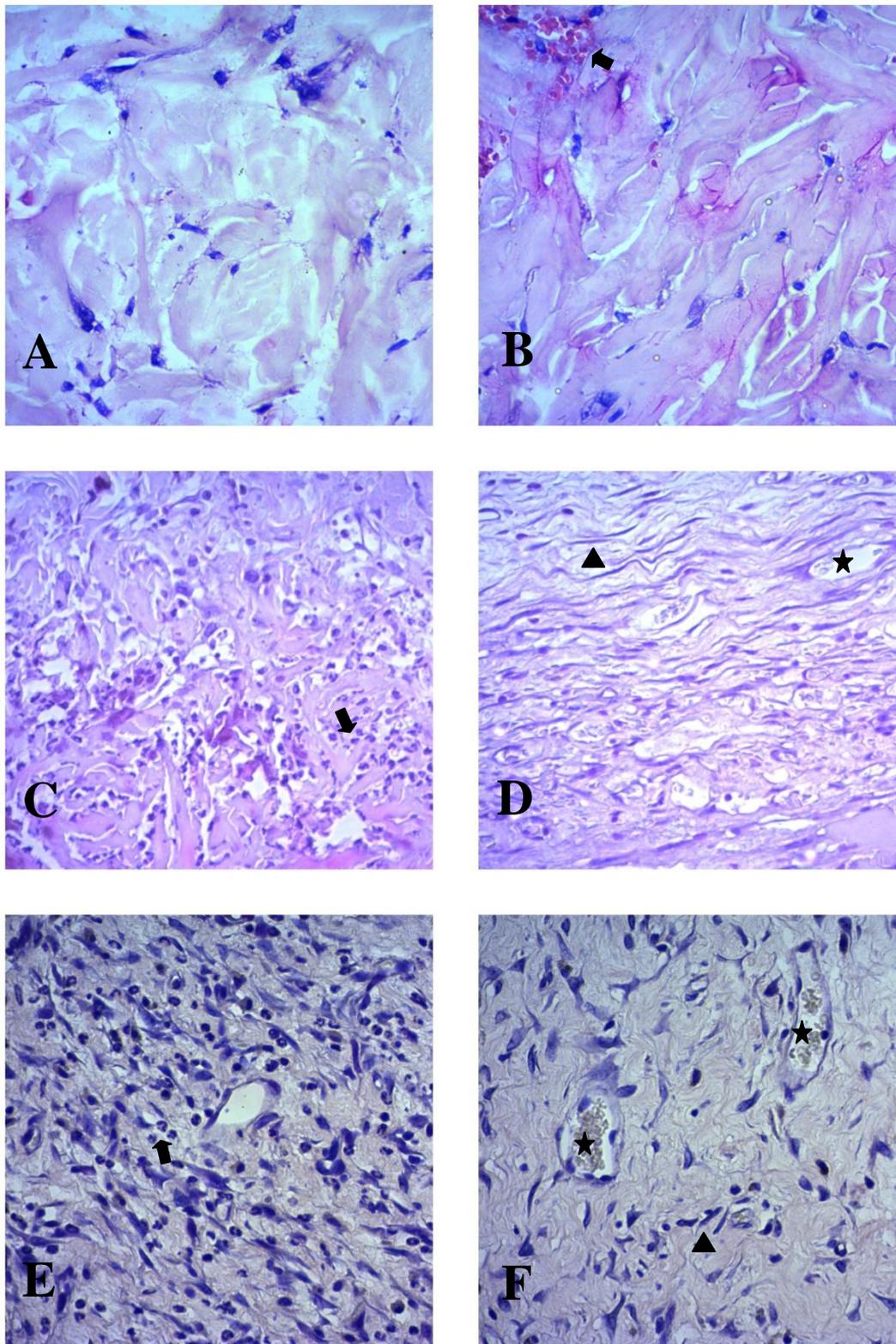
A análise histológica da pele avaliou as células inflamatórias, fibroblastos e vasos neoformados durante a cronologia de reparo tecidual, em ambos os grupos. No 7º dia de experimento observou-se um aumento significativo de células inflamatórias no grupo ARG ($p=0,013$). Todavia, no 14º e 28º dia ocorreu um aumento nas células inflamatórias do grupo C enquanto que a quantidade de fibroblastos e vasos neoformados foram maiores no grupo ARG, sendo o valor de $p < 0,001$ em todos os parâmetros avaliados. Esses dados são ilustrados no gráfico 4 e figura 8.

Gráfico 4 - Análise histológica da pele considerando células inflamatórias, fibroblastos e vasos neoformados, respectivamente A, B e C. Os grupos C e ARG foram avaliados no 7º, 14º e 28º dia do experimento. Houve aumento de células inflamatórias no grupo ARG nos primeiros 7 dias e depois progressivo aumento destas células no grupo C ($p=0,013$; $p<0,001$; $p<0,001$). Já o número de fibroblastos e vasos neoformados foi maior no 14º e 28º dia do grupo ARG ($p<0,001$). Dados são descritos em média \pm EPM. $**=p<0,05$.



Fonte: O Autor (2018).

Figura 8 - Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele de ratos tratados com L-arginina (lado direito) e animais controle (lado esquerdo). Em A e B – 7° dia; em C e D – 14° dia; em E e F – 28° dia. Células inflamatórias sendo representadas por setas, fibroblastos por triângulos e vasos por estrelas. Coloração com Hematoxilina-Eosina, aumento de 400X.



Fonte: O Autor (2018).

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA MUSCULAR (*GLUTEUS MAXIMUS*)

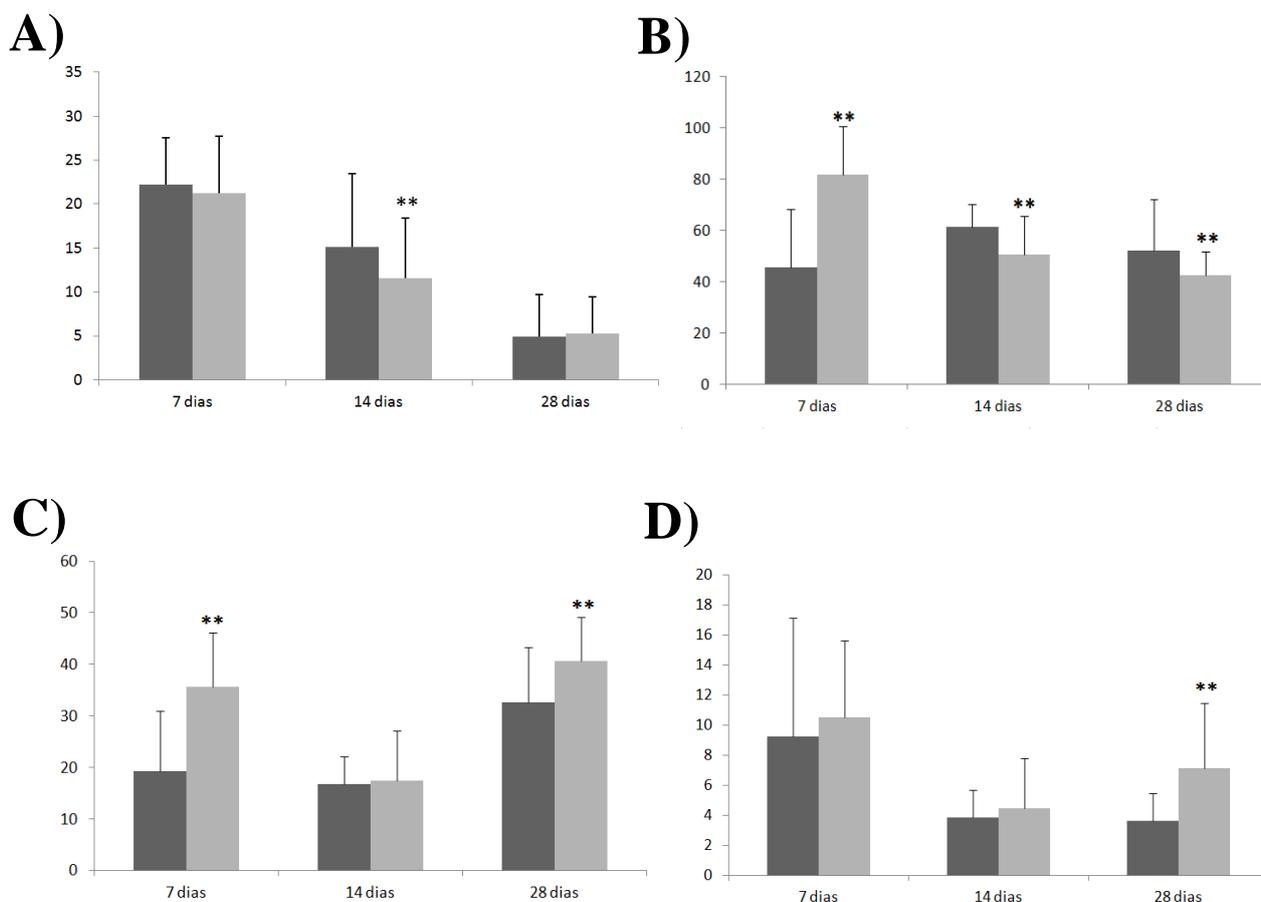
A análise histológica do músculo subjacente à pele queimada, glúteo máximo, avaliou no grupo ARG e C a quantidade de células inflamatórias, fibroblastos, células musculares e vasos neoformados no 7º, 14º e 28º dia de experimento. Houve aumento significativo de fibroblastos e células musculares no grupo ARG durante 7º dia do estudo ($p < 0,001$). Em relação ao 14º dia, observou-se uma maior quantidade de fibroblastos no grupo C ($p < 0,001$) e diminuição de células inflamatórias no grupo ARG ($p < 0,002$). Estes dados estão ilustrados no gráfico 5 e figura 9.

Quanto ao 28º dia, também ocorreu aumento de fibroblastos no grupo C ($p < 0,003$), porém a quantidade de células musculares e vasos neoformados foram maiores no grupo ARG ($p < 0,001$), (GRÁFICO 5; FIGURA 9).

Gráfico 5 - Análise histológica do músculo (*gluteus maximus*) considerando células inflamatórias, fibroblastos, células musculares e vasos neoformados, respectivamente A, B, C e D. Os grupos C e ARG foram avaliados no 7º, 14º e 28º dia do experimento. Houve diferença significativa nas células inflamatórias apenas no 7º dia do grupo ARG ($p<0,002$). O número de fibroblastos aumentou no 7º dia no grupo ARG sendo maior no grupo C a partir do 14º dia ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,003$). A quantidade de células musculares foi maior no grupo ARG, sendo esta diferença significativa no 7º e 28º dia ($p<0,001$). Houve diferença de vasos neoformados apenas no 28º dia no grupo ARG ($p<0,001$). Dados são descritos em média \pm EPM. **= $p<0,05$.

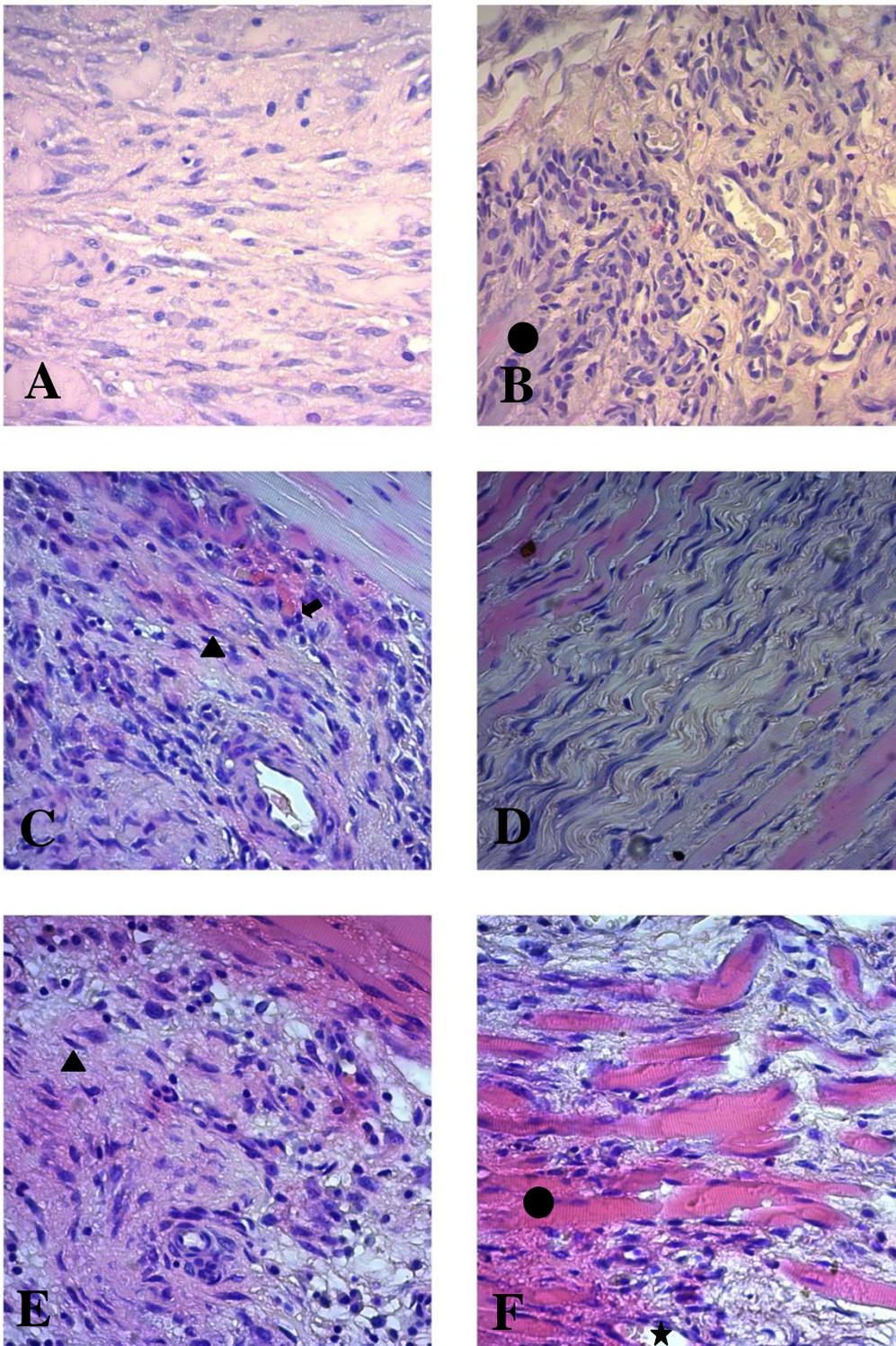


 C
 ARG



Fonte: O Autor (2018).

Figura 9 - Fotomicrografias dos cortes histológicos do músculo *gluteus maximus* de ratos tratados com L-arginina (lado direito) e animais controle (lado esquerdo). Em A e B – 7° dia; em C e D – 14° dia; em E e F – 28° dia. Células inflamatórias sendo representadas por setas, fibroblastos por triângulos, células musculares por círculos e vasos por estrelas. Coloração com Hematoxilina-Eosina, aumento de 400X.



Fonte: O Autor (2018).

Parte dos resultados iniciais desse estudo foi apresentada no IX CNEF- Congresso Nacional de Educação Física, Saúde e Cultura Corporal, evento realizado em Recife-PE em novembro de 2017. O trabalho enviado foi intitulado como: “Efeitos da suplementação com L-arginina no processo de cicatrização muscular em ratos wistar submetidos à queimadura térmica” (APÊNDICE A).

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou o efeito da suplementação de L-arginina no processo de cicatrização cutânea de ratos submetidos à queimadura térmica de 3º grau, e nossos achados confirmaram nossa hipótese de que a suplementação deste aminoácido seria interessante nessa condição.

Com relação à dose de arginina utilizada, não há um consenso quanto à padronização dessa dosagem. Valores distintos foram descritos na literatura, variando de 300 mg/kg/dia a 1 g/kg/dia (SHI, 2007; ONO et al., 2014; WITTMANN, 2005). Em nosso estudo, a dose fornecida foi de 500 mg/kg/dia, dosagem semelhante a de ONO et al., (2014), a escolha dessa dose estava em conformidade com as recomendações da AIN 1993 (Reeves e col., 1993) que estima a composição de nutrientes na dieta de roedores.

Durante o período de experimentação, o acompanhamento do peso dos animais não evidenciou alteração. Não fica então demonstrado influência da suplementação com L-arginina sob o estado nutricional dos animais. Fato semelhante aos achados de ONO et al., (2014) e WITTMANN (2005), onde a variável peso não obteve diferenças entre os grupos suplementados ou não com a L-arginina. De acordo com a literatura, a suplementação com L-arginina somente seria eficaz na presença de déficits nutricionais existentes já no pré-operatório, como sugere GIANOTTI et al. (2002).

Dentre os tipos de queimaduras existentes, nossos animais sofreram a forma mais grave desse tipo de lesão; sendo necessário cerca de 2 anos até completa cicatrização dessa ferida (GIORDANI et al., 2016). Observamos em nosso estudo, devido à gravidade de nossa ferida, um atraso na cronologia normal da cicatrização, em ambos os grupos. O processo cicatricial nas queimaduras deve começar logo após o dano tecidual, consistindo em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares interagindo entre si para que ocorra a reconstituição do tecido lesionado, este processo compreende 3 grandes fases: inflamatória, proliferativa e a de remodelamento (PAGNANO et al., 2009). As alterações nos eventos celulares cicatriciais provocados por queimaduras de 3º grau são característicos em lesões graves, podendo ocorrer alterações no início da formação do tecido de granulação, aumento de células inflamatórias agudas prolongando o tempo da inflamação e atraso no fechamento da ferida (ANDRADE et al., 2013). Tendo em vista que tais atrasos nos

eventos cicatriciais também foram encontrados nos experimentos de Chan et al (2006) e Meireles et al (2009), sugerimos que seria interessante avaliar nosso protocolo de queimaduras em tempos mais distantes do reparo cicatricial.

No que se refere ao fechamento da ferida, o presente estudo demonstrou que a área e o perímetro das queimaduras diminuíram ao decorrer do estudo, confirmando um fechamento gradual das lesões. Entretanto, não ocorreram diferenças na área das feridas entre os grupos, foi observada apenas uma menor diferença no perímetro da ferida no 28º dia no grupo ARG. De acordo com a literatura, o miofibroblasto é a célula responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, pois atua depositando componentes na matriz extracelular (tenascina, fibronectina, metaloproteinasas e colágenos I e III) e forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, sendo esta atividade responsável pela contração da ferida (ONO et al., 2014; Oliveira & Dias, 2012). Desta forma, o fechamento das lesões pode ter relação com o número e/ou o aumento da função dos miofibroblastos. Poderíamos avaliar e confirmar tal afirmativa em estudos posteriores, apesar que também não houve diferenças no fechamento da ferida quando Côrrea-Neto et al., (2009) analisou a quantidade de miofibroblastos entre os grupos suplementados ou não com a arginina.

O colágeno é a proteína mais abundante da derme e o principal responsável pela resistência da ferida. Em sua composição o colágeno possui prolina, e quando há catabolismo de arginina ocorre aumento de prolina e conseqüentemente biossíntese de colágeno (WITTMANN, et al., 2005). Estudos recentes corroboram a ideia de que a suplementação com arginina está associada a aumento na deposição de colágeno nas feridas em cicatrização por apresentarem um aumento significativo no teor da hidroxiprolina, sendo isso um indicador de acúmulo e deposição de colágeno, além de haver melhor resposta imune e maiores valores de força tênsil (CÔRREA-NETO, et al., 2009; RAYNAUD-SIMON et al., 2012). Entretanto, em nosso estudo a mensuração do colágeno total não apresentou diferenças significativas entre os grupos durante a cronologia de reparo tecidual avaliada. Segundo a observação feita por Côrrea-Neto et al., (2009), a síntese de colágeno atinge seu nível máximo entre os 7 e 14 dias após a lesão, ocorrendo o pico entre o 21º e 28º dias de evolução. Podemos atribuir os resultados de nossos achados ao fato de que, houve atraso nos eventos de reparo tecidual provocados pela gravidade da queimadura dificultando uma melhor aparição de

fibras colágenas totais no tempo de estudo analisado, sendo necessário um novo grupo com maior tempo nos eventos de cicatrização.

Quanto às análises histológicas cutânea e muscular, mesmo com a imensa devastação tecidual provocada pela queimadura térmica em nossos animais, pudemos quantificar o infiltrado inflamatório e observamos achados interessantes em relação ao comportamento dessas células durante a evolução cicatricial. Na pele, houve um aumento de células inflamatórias no grupo ARG nos primeiros sete dias, seguido de um aumento exacerbado da inflamação nas fases tardias desse experimento no grupo C. Enquanto que no músculo, também ocorreu uma redução dessas células no grupo ARG, sendo essa diminuição significativa no 14º dia do experimento. As células inflamatórias são de fundamental importância durante a cicatrização, pois atuam contra a contaminação da lesão por agentes externos, promovem a proliferação epitelial, revascularização e remodelação da matriz extracelular (BALBINO et al., 2005). No entanto, a persistência destas células pode ocasionar o atraso na cronologia de reparação, sintomatologia dolorosa e formação de tecido fibrótico exuberante (KRYCZKA & BONCELA, 2015).

Considerando que as células inflamatórias atuam logo na primeira fase da cicatrização e depois devem regredir consideravelmente até o fechamento da ferida, e que estudos prévios garantem que a suplementação com L-arginina através da nutrição enteral desempenha um papel importante na resposta inflamatória (PAGNANO et al., 2009; ZHANG et al., 2016). Atribuímos nossos resultados ao fato de que, a arginina ao ser metabolizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) produz o óxido nítrico (NO), a ativação dessa produção acontece como resposta à uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e estímulos inflamatórios e libera altos níveis de NO, o qual é responsável por estimular a resposta de células angiogênicas, além de promover a circulação local por melhorar o fluxo sanguíneo e a atividade dos vasos (GUNDOĞDU et al., 2015). A ativação dos macrófagos durante a fase inicial da cicatrização também é parcialmente propiciada pelo NO, que age estimulando as propriedades antimicrobianas naturais (MARTINS et al., 2006). Martins et al., (2006) ainda comprova que a inibição da síntese do NO em camundongos afeta a cicatrização das feridas, sugerindo que o NO é um potente antimicrobiano durante a cicatrização. Sendo nossos resultados bastante expressivos quanto às células inflamatórias, podemos associá-los aos dados encontrados na literatura, exercendo a arginina ação interessante na fase inflamatória do grupo ARG.

Para complementar as análises histológicas, também foi possível analisar o quantitativo de fibroblastos nos tecidos da pele, sendo este número maior no grupo suplementado com L-arginina durante o 14° e 28° dia de experimento. Na cicatrização, os fibroblastos atuam se multiplicando e migrando para a borda da ferida, participando ativamente na formação do tecido de granulação, além de produzir proteínas estruturais, como colágeno do tipo I e III e elastina, glicosaminoglicanos, laminina e proteases, que ocasionam deposição e remodelação da matriz extracelular no leito da ferida (ISAAC et al., 2012; KENDAL & FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Nosso resultado coincide com os dados encontrados na literatura, nos quais a suplementação com arginina parece ser substrato para proliferação celular e cicatrização de feridas (ONO et al., 2014). Podemos atribuir esse aumento significativo de fibroblastos no grupo ARG ao metabolismo da própria arginina, que quando degradado pelas arginases, é metabolizado em ornitina, e posteriormente convertida em poliaminas ou prolina (GUNDOĞDU et al., 2015). As poliaminas desempenham um papel importante no crescimento e proliferação celular, síntese de proteínas e ácidos nucleicos e também estão envolvidos na reparação da matriz extracelular enquanto a prolina participa diretamente na composição de colágeno (GUNDOĞDU et al., 2015).

Em relação ao músculo, observamos um comportamento celular distinto dos fibroblastos quando comparado aos resultados das análises nos tecidos da pele. Inicialmente houve aumento de fibroblastos no grupo ARG, seguido de diminuição dessas células no 14° e 28° dia neste grupo. Segundo Ramos et al., (2017), a regeneração do tecido muscular esquelético é limitada, e se a lesão é muito grande, a regeneração pode não ocorrer e o músculo perdido é então substituído por tecido conectivo. Desta forma, sugerimos que o aumento de fibroblastos no tecido muscular do grupo C estava associado à formação de fibrose, pois este resultado não coincide com os demais encontrados nesse estudo, e que como veremos mais a diante, houve um retardo na regeneração muscular quando analisado as células musculares do grupo C. Sendo assim, não há como relacionar aumento de fibroblastos com regeneração muscular em um tecido que apresentou número menor de células musculares.

Neste estudo, a quantidade de vasos neoformados também foi avaliada. Observamos um aumento no número de vasos com a suplementação de L- arginina, sendo este resultado significativo no 14° e 28° dia na pele e no 28° dia no músculo. A angiogênese surge na fase proliferativa da cicatrização, sendo essencial para formação

do tecido de granulação, pois oferece suporte sanguíneo adequado para o alto nível de atividade metabólica que o processo cicatricial requer (SKINOVSKY et al., 2016). Associando a importância da arginina na cicatrização e na angiogênese de feridas, a literatura refere-se ao NO como um potente ativador do “fator vasodilatador associado ao endotélio vascular” que é responsável pela angiogênese (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Considerando também que a deleção genética do NO prejudica tanto a angiogênese quanto a cicatrização de feridas, e que por ser um potente vasodilatador atua elevando o fluxo sanguíneo permitindo as trocas gasosas e a nutrição das células nos tecidos lesados (MORBIDELLI, 1996; SKINOVSKY et al., 2016), nossos resultados estão em conformidade com a literatura, sendo a arginina importante na neovascularização de feridas a partir da produção de NO.

Os dados da literatura são bem escassos quando se diz respeito à regeneração muscular em queimaduras. Porém, os poucos estudos prévios apontam a relação da produção de adenosina trifosfato (ATP) com o favorecimento da angiogênese e o aumento potencial da entrada de células satélites quiescentes no ciclo celular, sendo esses efeitos capaz de tornar a regeneração muscular mais eficiente, reduzindo seu tempo e melhorando sua qualidade (PERTILLE et al., 2012). Em nossos achados a quantidade de células musculares foram maiores no grupo ARG, sendo esse aumento significativo no 7° e 28° dia do experimento, indicando uma maior regeneração muscular neste grupo. Este resultado corrobora com o estudo de Penaforte et al., (2003), que avaliou a utilização da arginina sob retalhos miocutâneos em cicatrização e concluíram que a suplementação com L-arginina tem efeito sobre as concentrações séricas de substratos e sobre a cicatrização cutânea e muscular.

Atribuímos nosso achado, ao fato da arginina também está envolvida na síntese de creatina, fundamental para o metabolismo energético das células musculares (HRISTINA et al., 2014). O ATP representa a molécula energética necessária para as reações bioquímicas envolvidas em quase todas as vias metabólicas sintéticas e também de contração muscular (BROSNAN & BROSNAN, 2007). Quando o músculo necessita, quantidades maiores desta molécula são consumidas e armazenadas através do sistema ATP-fosfocreatina (ATP-PC), sendo este sistema capaz de fornecer ATP muito rapidamente através de reações enzimáticas (BROSNAN & BROSNAN, 2007). Essa função torna-se importante na regeneração muscular visto que a creatina se encontra no sarcoplasma, podendo proteger suas estruturas contra oxidação por espécies reativas de

oxigênio durante a lesão além de manter a energia para o trabalho celular, favorecendo a recuperação muscular (SOUZA JÚNIOR & PEREIRA, 2008).

7 CONCLUSÃO

Embora não havendo diferenças significativas na evolução ponderal, fechamento da ferida e concentração do colágeno total, a suplementação com L-arginina apresentou-se eficaz na cicatrização cutânea e regeneração muscular de ratos queimados, por promover:

- Menor inflamação e maior neovascularização nos tecidos;
- Aumento de fibroblastos na pele e células musculares no glúteo máximo.

Contudo, investigações mais aprofundadas sobre este aminoácido frente à cicatrização de queimaduras de 3º grau faz-se necessária, visto que ainda não estão estabelecidas dosagens e nem tempo de uso, bem como as rotas metabólicas frente às diferentes vias de administração deste suplemento.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, Aglaine de Oliveira; OLIVEIRA, Bárbara Bruna Rodrigues; CARNIB, Lunna Paula de Alencar. A. Efeito dos antioxidantes vitamina C e selênio em pacientes queimados: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 13, n. 2, p. 62-6, ago. 2014.

ANDRADE, Monise Gabriela Lino; CAMELO, Camila Nunes; CARNEIRO, Juliana Araujo; TERÊNCIO, Kamila Peres. Evidências de alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 42-8, 2013.

ANDRETTA, Iliana Barbosa; CANCELIER, Ana Carolina; MENDES, Cíntia; BRANCO, André Figueiredo Calandrini; TEZZA, Mariana Zamprogno; CARMELLO, Flaviany Araújo et al. Perfil epidemiológico das crianças internadas por queimaduras em hospital do sul do Brasil, de 1998 a 2008. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 22-9, 2013.

BAKSHI, Nitya; MORRIS, Claudia. The role of the arginine metabolome in pain: implications for sickle cell disease. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 167-175, mar. 2016.

BALBINO, Carlos Alberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J Pharma Sci**, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.

BARKER, Priscilla.; BRIGGS, Cristopher et al. Anatomy and biomechanics of gluteus maximus and the thoracolumbar fascia at the sacroiliac joint. **Clin Anat**, v. 27, n. 2, p. 234-240, mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959791>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BLANC, Gisely; MEIER, Marineli Joaquim; STOCCO, Janislei Giseli Dorociaki; ROEHRS, Hellen; CROZETA, Karla; BARBOSA, Dulce Aparecida. Effectiveness of Enteral Nutritional Therapy in the Healing Process of Pressure Ulcers: A Systematic Review. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 150-159, fev. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342015000100152>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BROSNAN, John; BROSNAN, Margaret. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 241-61, jul. 2007. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093621>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

CALDER, Philip. Immunonutrition. **Brit Med J**, v. 327, p. 117-8, 2003.
CARPENTER, Stirling; KARPATI, George. **Pathology of skeletal muscle**. 1ª edition. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, 1984. p. 125-126.

CHAN, Rodney; LIU, Perry; PIETRAMAGGIORI, Giorgio; IBRAHIM, Shahrul; HECHTMAN, Herbert; ORGILL, Dennis. Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. **J Burn Care Res**, v. 27, n. 2, p. 202-5, mar. 2006.

CHEN, Ya-Hui; LEE, Chien-Hsing.; HSIAO, Chien-Chou; HSU, Li-Sung; LO, Hui-C. Diverse effects of parenteral arginine on systemic and local oxidant-antioxidant homeostasis and nitrosative stress in rats with subacute peritonitis. **J Surg Res**, v. 187, n. 1, p. 134-141, mar. 2014.

CORRÊA-NETO, Milton Pereira; CAMPOS, Antonio Carlos Ligoki; BRANCO, Alessandra Borges; MATIAS, Jorge Eduardo Fouto. Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 7-14, jan. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202009000100003>. Acesso em: 2 out. 2017.

DIESTEL, Cristina; RODRIGUES, Monica; PINTO, Fernanda; ROCHA, Rachel; SÁ, Patricia. Terapia nutricional no paciente crítico. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 78-84, jul. 2013. Disponível em: <http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=422>. Acesso em: 3 out. 2017.

ESCOTT-STUMP, Sylvia; MAHAN, Kathleen; RAYMOND, Janice. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ENGEL, Andrew; ARMSTRONG, Clara Franzini. **Myology**. 2ª ed. New York: McGraw- Hill, 1994.

EÇA, Lilian Piñeiro Marcolin; PEREIRA, Isis Sousa Oliveira; PINHO, Ariene Murari Soares; ODO, Marina Emiko Yagima. Estudo histológico comparativo e controlado de fibras colágenas da pele humana após terapia celular com fibroblastos. **Surg Cosmet Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 7, 3, p. 206-10, 2015. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265542585002>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

FERRARI, Ricardo José; PICCHI, Leonardo Duarte; BOTELHO, Ana Paula; MINAMOTO, Viviane. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 63-71, maio 2005. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/266318935>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

FLORA FILHO, Rowilson; ZILBERSTEIN, Bruno. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, set. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302000000300012>. Acesso em: 23 nov. 2017.

FONTOURA, Carmen Sílvia Machado; CRUZ, Denise Oliveira; LONDERO, Lisiane Guadagnin; VIEIRA, Renata Monteiro. Avaliação Nutricional de Paciente Crítico. **Rev Bras Ter Intensiva**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 298-306, set. 2006. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2006000300013>. Acesso em: 14 nov. 2016.

FUJISAWA, Hiroyuki; SUZUKI, Hiroto; YAMAGUCHI, Emi; YOSHIKI, Hiromi; WADA, Yui; WATANABE, Aya. Hip muscle activity during isometric contraction of hip abduction. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 26, n. 2, p. 187-190, fev. 2014.

GIANOTTI, Luca; BRAGA, Mario; NESPOLI, Luca; RADAELLI, Giovanni; BENEDEUCE, Aldo Alberto; DI CARLO, Valerio. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. **Gastroenterology**, v.122, n.7, p.1763-70, jun. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055582>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

GIORDANI, Anecy Tojeiro; SONOBE, Helena Megumi; GUARINI, Gabriele; STADLER, Debora Viviane. Complicações em pacientes queimados: revisão integrativa. **Rev. Gest.Saúde**, Brasília, v. 7, n.2, p 535-48, abr. 2016. Disponível em: <<http://periodicos.unb.br/index.php/rgs/article/view/22038>>. Acesso em: 6 set. 2016.

GONELLA, Hamilton Aleardo; QUEVEDO, Fernando; GARBOSSA, Luiz Carlos Duilio. Colonização bacteriana nas primeiras 24 horas das queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 13, n. 2, p. 99-102, set. 2014. Disponível em: <<http://rbqueimaduras.org.br/details/203/pt-BR/colonizacao-bacteriana-nas-primeiras-24-horas-das-queimaduras>>. Acesso em: 6 set. 2016.

GUIMARÃES, Marcus Vinicius Thomé Nora; MOREIRA, Guilherme Henrique Gonçalves; ROCHA, Luana Parminondi; NICOLUZZI, João Eduardo Leal; SOUZA, Carlos José Franco; REPKA, João Carlos Domingues. Ação da l-arginina na evolução de retalhos cutâneos de ratos sob exposição à nicotina. **Rev. Col. Bras. Cir**, Rio de Janeiro, v. 40, n.1, p. 049-054, fev. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912013000100009&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 nov. 2016.

GUNDOĞDU, Riza Haldun; TEMEL, Hande; BOZKIRLI, Bahadır Osman; ERSOY, Eren; YAZGAN, Aylin; YILDIRIM, Zual. The mixture of Arginine, Glutamine, and β -hydroxy- β -methyl butyrate enhances the healing of ischemic wounds in rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 10, n. 5, p. 201-6, Nov. 2015.

HENRIQUE, Danielle de Mendonça; SILVA, Lolita Dopico; COSTA, Adriana Cristina Rodrigues; REZENDE, Ana Paula Marinho Barbosa; SANTOS, Janaína Arcanjo; MENEZES, Michelle de Mello; MAURER, Tiago Claro. Infection control in burn center: review of the literature. **Rev Bras Queim**, Goiânia, v. 12, n. 4, p. 230-234, set. 2013. Disponível em: <<http://rbqueimaduras.org.br/details/181/pt-BR/control-de-infeccao-no-centro-de-tratamento-de-queimados--revisao-de-literatura>>. Acesso em: Acesso em: 20 dez. 2017.

HEYLAND, Daren; NOVAK, Frantisek; DROVER, John; JAIN, Minto; SU, Xiangyao; SUCHNER, Ulrich. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. **JAMA**, Canada, v. 286, n. 8, p. 944-53, ago. 2001.

Disponível em: < <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/194116>>. Acesso em: 7 set. 2017.

HRISTINA, Kocic; LANGERHOLC, Tomaz; TRAPECAR, Martin. Novel metabolic roles of L-arginine in body energy metabolism and possible clinical applications. **J Nutr Health Aging**, v.18, n.2, p. 213-18, fev. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12603-014-0015-5#citeas>>. Acesso em: 30 maio 2017.

ISAAC, Cesar; REGO, Francinni; LADEIR, Pedro Ribeiro Soares; ALTRAM, Silvana; OLIVEIRA, Renata; ALDUNATE, Johnny; PAGGIARO, André; FERREIRA, Marcus Castro. Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos: avaliação histológica. **Rev Bras Cir Plást**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 503-8, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcp/v27n4/04.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2017.

JARVINEN, Tero; KÄÄRIÄINEN, Minna; JÄRVINEN, Markku; KALIMO, H.annu. Muscle strain injuries. **Curr Op Rheumatol**, v.12, p. 155-161, mar. 2000.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**: texto e atlas. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KENDALL, Ryan; FEGHALI-BOSTWICK, Carol. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 123, p. 123, maio 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2014.00123/full>>. Acesso em: 30 out. 2017.

KRYCZKA, Joanna; BONCELA, Jakub. Leukocytes: The Double-Edged Sword in Fibrosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, n. 4, p. 1-10, out. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629055/>>. Acesso em: 30 out. 2017.

MARTINS, Nelson Lúcio Parada; MALAFAIA, Osvaldo; RIBAS-FILHO, Jurandir Marcondes; HEIBEL, Marcel; BALDEZ, Raimundo Nonato; VASCONCELOS, Paulo Roberto Leitão et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu): Estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 66-75, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v21s3/10.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2017.

MCCLAVE, Stephen; MARTINDALE, Robert; MCCARTHY, Mary; ROBERTS, Pamela; TAYLOR, Beth et al. Clinical guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patients: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN). **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 3, p. 277-316, fev. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773077>>. Acesso em: 25 set. 2017.

MEIRELES, Gyselle Cynthia Silva; OLIVEIRA, Priscila Chagas; MOURA, Adriana Pedrosa; SANTOS, Jean Nunes; PINHEIRO, Antônio Luiz Barbosa. A influência do diabetes mellitus na cronologia do reparo de queimaduras. **C&D - Rev Eletrônica Fainor**, Vitória da Conquista, v. 2, n.1, p. 77-86, dez. 2009. Disponível em:

<<http://srv02.fainor.com.br/revista/index.php/memorias/article/view/64/38>>. Acesso em: 12 out. 2017.

MENDONÇA, Ricardo José; COUTINHO-NETTO, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257-62, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v84n3/v84n03a07.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2017.

MORBIDELLI, Lucia; CHANG, Chung Ho; DOUGLAS, Janice; GRANGER, Harris; LEDDA, Fabrizio; ZICHE, Marina. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1, p. 411-5, jan. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769777>>. Acesso em: 14 out. 2017.

MOSIER, Michael; PHAM, Tam; KLEIN, Matthew; GIBRAN, Nicole; ARNOLDO, Brett; GAMELLI, Richard et al. Early enteral nutrition in burns: compliance with guidelines and associated outcomes in a multicenter study. **Journal of Burn Care & Research**, v. 32, n. 1, p. 104-9, fev. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21116188>>. Acesso em: 1 set. 2017.

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de; DIAS, Regina Valéria da Cunha. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, mar. 2012.

ONO, Maria Cecília Closs; FREITAS, Renato da Silva; OKAWA, Luciano; BORGES, Alessandra; BALBINOT, Priscilla; CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki. Influence of immunonutritional supplementation on skin wound healing in rats. **Rev Bras Cir Plást**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 432-438, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.rbcp.org.br/details/1560/en-US/influence-of-immunonutritional-supplementation-on-skin-wound-healing-in-rats>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

PAGNANO, Leonardo de Oliveira; BARALDI-ARTONI, Silvana Martinez; PACHECO, Maria Rita; OLIVEIRA, Daniela. Aspectos básicos do processo cicatricial e fatores gerais relacionados com a reparação tecidual. **MEDVEP Rev cient med vet**, São Paulo, v. 7, n. 12, jan. 2009.

PENAFORTE, Lúcia Regina Albuquerque Góis; GUIMARÃES, Sérgio Botelho; FARIAS, Rômulo Augusto Feio; ALVES, Gisele Collyer; OLIVEIRA, Tatiane Roseno; VASCONCELOS, Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos; VASCONCELOS, Paulo Roberto Leitão. Efeitos da L-Arginina sobre as concentrações in vivo de metabólitos no sangue e em retalho miocutâneo contendo cicatriz cirúrgica, em ratos wistar. **Rev Bras Cir Plast**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 61-6, dez. 2003.

PERTILLE, Adriana; MACEDO, Aline; OLIVEIRA, Cássio. Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com laser de baixa intensidade. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 16, n. 6, p. 495-501, dez. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfis/v16n6/pt_aop050_12_1311.pdf>. Acesso em: 25 set. 2017.

PIERINI, Erica; ASSUNÇÃO, Flávia Fernanda de Oliveira. Recursos estéticos aplicados ao tratamento das queimaduras: revisão de literatura. **MTP&RehabJournal**, v. 12, p. 218-233, mar. 2014.

JUNIOR, Gilson; VIEIRA, Ana Carolina; ALVES, Gracinda. Avaliação da qualidade de vida de indivíduos queimados pós alta hospitalar. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 140-5, out. 2010.

RAMOS, Gabriel Amorim; ARLIANI, Gustavo Gonçalves; ASTUR, Diego Costa; POCHINI, Alberto de Castro; EJNISMAN, Benno; COHEN, Moisés. Rehabilitation of hamstring muscle injuries: a literature review. **Rev Bras Ortop**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 11–16, fev. 2017.

RAYNAUD-SIMON, Agathe; BELABED, Linda; LE NAOUR, Gilles; MARC, Julie; CAPRON, Frédérique; CYNOBER, Luc et al. Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 10, p.1053-1061, nov. 2012. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00003.2012>>. Acesso em: 25 set. 2017.

REEVES, Philip; NILSEN, Forrest; FAHEY, George. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, nov. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

ROCHA, Carolina de Lourdes. Histofisiologia e classificação das queimaduras: Consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, Juiz de Fora, v. 1, n. 3, p. 140 – 147, jan. 2009.

ROSS, Michael; ROMRELL, Lynn. **Histologia**: texto e atlas. 2ªed. São Paulo, Panamericana, 1993. p. 154.

SELKOWITZ, David; BENECK, George; POWERS, Christopher. Comparison of electromyographic activity of the superior and inferior portions of the gluteus maximus muscle during common therapeutic exercises. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 46, n. 9, p. 794-799, ago. 2016.

SHI, H. P.; WANG, S. M.; ZHANG, G. X.; ZHANG, Y. J.; BARBUL, A. Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock. **Wound Repair Regen**, Alexandria, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2007. Disponível em: <<https://www.jospt.org/doi/full/10.2519/jospt.2016.6493>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

SKINOVSKY, James; MALAFAIA, Osvaldo; CHIBATA, Mauricio; TSUMANUMA, Fernanda; PANEGALLI FILHO, Flávio; MARTINS, Marcus Vinícius Dantas de Campos. A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado

em ratos: angiogênese e miofibroblastos. **Rev. Col. Bras. Cir**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 087-092, abr. 2016.

SILVA, Ana Paula Alves; FREITAS, Branca Jardini; OLIVEIRA, Fernanda Luisa Ceragioli; PIOVACARI, Silvia Maria Fraga; NÓBREGA, Fernando José. Nutritional therapy in burns: a review. **Revist Bras Queim**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 135-41, ago. 2012.

Sociedade Brasileira de Queimaduras. **Classificações de Queimaduras**. Disponível em: <<http://sbqueimaduras.org.br>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

SOUZA, Arianne Euclides de Sá; BATISTA, Fernanda Oliveira Carvalho; MARTINS, Thyciana de Carvalho Leal; SALES, Ana Lina de Carvalho Cunha. O papel da arginina e glutamina na imunomodulação em pacientes queimados – revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Goiânia, v. 14, n.4, p. 295-9, mar. 2015.

SOUZA JUNIOR, Tácito Pessoa; PEREIRA, Benedito. Creatina: auxílio ergogênico com potencial antioxidante? **Rev. Nutr**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 349-353, jun. 2008.

STECCO, Antonio; GILLIAR, Wolfgang; HILL, Robert; FULLERTON, Brad; STECCO, Carla. The anatomical and functional relation between gluteus maximus and fascia lata. **J Bodyw Mov Ther**, v. 17, n. 4, p. 512-517, abr. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24139012>>. Acesso em: 27 out. 2017.

STECHMILLER, Joyce; CHILDRESS, Beverly; COWAN, Linda. Arginine supplementation and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v. 20, n.1, p. 52-61, fev. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207646>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

STEIN, Mara Hellen Schwaemmle; BETTINELLI, Rafaela Decesare; VIEIRA, Bruna Maria. Nutritional therapy in big burn patients – a bibliographic review. **Rev Bras Queim**, Goiânia, v. 12, n. 4, p. 235-244, nov. 2013.

STEMPIN, Cinthia; CERBÁN, Fabio. Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parasitos. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 67, p. 67: 737-746, jun, 2007.

SVERZUT, Ana Cláudia Mattiello; CHIMELLI, Leila. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. **Rev Fisioter Univ São Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 132-139, dez. 1999.

SZWED, Dayane Nayara; SANTOS, Vera Lucia Pereira. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cad. da Esc. de Saúde**, Curitiba, v. 1, n. 15, p. 7-17, nov. 2015.

TAKEJIMA, Milka; NETTO, Robson; TOEBE, Bruna; ANDRETTA, Marianne; PRESTES, Manoel; TAKAKI, José. Prevenção de queimaduras: avaliação do conhecimento sobre prevenção de queimaduras em usuários das unidades de saúde de Curitiba. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 85-8, ago. 2011.

TIDBALL, James; SALEM, Georg; ZERNICKE, Ron. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. **J Appl Physiol**, v. 74, n. 3, p. 1280-86, mar. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8482668>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

WAITZBERG, Dan. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 659-676.

WITTMANN, Florian; ANGELE, Peter; WICHMANN, Matthias et al. L-arginine improves wound healing after trauma-hemorrhage by increasing collagen synthesis. **J Trauma**, v. 59, n. 1, p. 162-8, jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096557>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

ZHANG, Yu; GU, Fang; WANG, Fengxian; ZHANG, Yuanda. Effects of early enteral nutrition on the gastrointestinal motility and intestinal mucosal barrier of patients with burn-induced invasive fungal infection. **Pak J Med Sci**, v. 32, n. 3, p. 599-603, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928406/>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

APÊNDICE A – Apresentação de trabalho científico em evento acadêmico

Verifique o código de autenticação: 972022.80530.00864.7 em <https://www.even3.com.br/documentos>

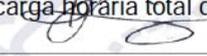
CERTIFICADO IX CNEF

CONGRESSO NACIONAL DE
EDUCAÇÃO FÍSICA, SAÚDE
E CULTURA CORPORAL



Conferimos este certificado a **Simone da Silva Ferreira, José Willamis do Nascimento Batista, Marcelo Braz Lopes da Silva e Juliana Barbosa da Silva**, pela apresentação do trabalho **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO MUSCULAR EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A QUEIMADURA TÉRMICA**, durante sessões científicas do IX Congresso Nacional de Educação Física, Saúde e Cultural Corporal, Tema: O legado das Olimpíadas para o Esporte no Brasil, realizado em Recife - Pernambuco, no período de 07/11/2017 a 11/11/2017, contabilizando carga horária total de 40 horas.




Prof. Dr. José Luis Simões
Presidente do Congresso


Prof. Phd Dr. Edilson Fernandes de Souza
Vice Presidente do Congresso

ANEXO

ANEXO 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 30 de agosto de 2016

Ofício nº 85/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Luciana Maria Silva de Seixas Maia**
Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0031/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Análise histopatológica do processo de cicatrização cutânea de ratos submetidos à queimadura térmica e suplementados com L-arginina**”, registrada com o nº **0031/2016**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Luciana Maria Silva de Seixas Maia** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2016 - 01/09/2017
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	24
Peso/Idade	100-200g/60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério de criação do Departamento de Nutrição/CCS/UFPE

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584