

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA THAIANA BONATO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM ÁCIDO
GRAXO ÔMEGA 3 NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE FERIDAS
INCISIONAIS E EXCISIONAIS EM RATOS**

CURITIBA

2016

FLAVIA THAIANA BONATO

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM ÁCIDO
GRAXO ÔMEGA 3 NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE FERIDAS
INCISIONAIS E EXCISIONAIS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: FLÁVIA THAIANA BONATO

Título da Dissertação: "INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL
COM ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3 NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE
FERIDAS INCISIONAIS E EXCISIONAIS EM RATOS".

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Marcelus de Araújo Santos Nigro	A	9,0
Alfredo Benjamim Duarte da Silva	A	9,0
Renato da Silva Freitas	A	9,0

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: A

Equivalência: 9,0

Curitiba, 19 de dezembro de 2016.

MEMBROS	ASSINATURA
Marcelus de Araújo Santos Nigro	
Alfredo Benjamim Duarte da Silva	
Renato da Silva Freitas	

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, orientador da presente dissertação, pela paciência, incentivo e auxílio na realização deste projeto;

À Universidade Federal do Paraná por possibilitar minha graduação em medicina e minha evolução acadêmica;

Ao Hospital Evangélico por possibilitar minha formação em Cirurgia Plástica;

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação, pela prestatividade e ajuda;

Aos acadêmicos de medicina Guilherme e Schaola por toda a ajuda durante a realização da fase de experimento;

Ao grande amigo Prof. Arthur Gentili e Prof^a. Dr^a. Tereza Cavalcanti, patologistas, pelo grande auxílio na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Renato da Silva Freitas, pela profunda influência durante minha formação médica, por todos os ensinamentos dentro da Cirurgia Plástica ao longo dos anos. Por ser alvo de grande admiração e estima;

A Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Closs Ono, Dr^a. Priscilla Balbinot por toda a paciência e auxílios durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Marcelus Nigro por toda a paciência e amizade, por escutar pacientemente toda a evolução deste trabalho desde o início de minha residência em Cirurgia Plástica;

A minha querida família, meus pais José Carlos e Angela e minha irmã Fernanda, pela descontração, amor e incentivo;

Ao meu marido Felipe, por ser meu complemento, meu parceiro. Por toda a paciência, compreensão, amor e auxílio.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A cicatrização é um processo complexo que resulta na formação de novo tecido para o reparo de uma solução de continuidade. A desnutrição e as deficiências nutricionais específicas podem ter grande impacto no resultado final de feridas cirúrgicas ou traumáticas. Estudos mostram que o uso do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 pode criar um microambiente mais favorável à cicatrização de feridas. Em outros, devido à sua capacidade de competir pela produção de eicosanoides menos pró-inflamatórios, foi relatado prejuízo à cicatrização. Portanto a influência do ômega-3 sobre a cicatrização cutânea permanece indefinida. **Objetivo:** Avaliar o processo de cicatrização da ferida excisional e incisional da pele de ratos sob o efeito do uso da suplementação nutricional com ácido graxo ômega-3. **Método:** Sessenta ratos fêmeas foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 15 (Epre, Eper, Cpre, Cper) conforme o lipídeo de suplementação (E – óleo de peixe e C – óleo de soja) e o momento de suplementação (pre – somente nos 7 dias antecedentes ao procedimento, per – 7 dias antes e 7 dias após o procedimento). A suplementação do óleo (peixe ou soja) foi administrada através de gavagem diariamente, além da dieta *ad libitum*. Sob anestesia geral, após 7 dias de suplementação nutricional inicial, as ratas foram submetidas a procedimento cirúrgico com confecção de ferida em dorso (2x2cm) que foi deixada cicatrizar por segunda intenção, e ferimento incisional (5cm) no ventre, fechado por meio de sutura. Fotografou-se de forma padronizada a ferida no pós-operatório imediato, assim como no 1º, 3º, 5º e 7º dias para cálculo de área e taxa de contração da ferida. Após a eutanásia no 7º dia, a ferida do dorso foi enviada para estudo imunoistoquímico (miofibroblasto e neovasos) e de colágeno. A ferida do ventre foi submetida a teste tensiométrico utilizando máquina universal de ensaio mecânico Emic®. Os resultados foram analisados estatisticamente, com nível de significância de 5%. **Resultados:** O peso dos animais não mostrou diferença significativa entre os grupos. Na análise da contração nos primeiros dias após o procedimento, o grupo Cpre apresentou-se com maiores taxas de contração da ferida (p= 0,017 para diferença 1PO-3PO e p=0,004 para diferença 3PO-5PO). O grupo Epre mostrou as maiores

taxas de contração na avaliação entre o período de pós-operatório imediato e o 7º dia ($p= 0,002$). O estudo tensiométrico (força máxima e de ruptura) não mostrou diferença entre os grupos, assim como as análises de miofibroblasto e neoangiogênese. Houve associação entre maior força tênsil com maior número de miofibroblastos para o grupo Epre ($p=0,011$) e maior força com maior número de CD34 para o grupo Cpré ($p=0,03$). Para o colágeno, não houve diferença entre os momentos “pré” e “per”, somente entre os grupos experimento e controle, com o primeiro apresentando maior quantidade de colágeno tipo III (imaturo – $p<0,001$). **Conclusão:** A utilização da suplementação enteral com ômega-3 em ratos sem desnutrição não altera o peso, força tênsil da cicatriz, quantidade de miofibroblastos e neoangiogênese. Promove maior taxa de contração da ferida e atraso na deposição de colágeno maduro, em relação à suplementação com óleo de soja.

Palavras-chave: Cicatrização. Ácidos Graxos Ômega-3 Estado Nutricional. Rato. Colágeno. Miofibroblastos. Resistência à Tração.

ABSTRACT

Background: Healing is a complex process that results in new tissue formation for repair of a continuity solution. Malnutrition and specific nutritional deficiencies can have a major impact on the final outcome of surgical or traumatic wounds. Some studies show that the use of omega-3 polyunsaturated fatty acid can create a microenvironment that is more conducive to wound healing. In others, due to its ability to compete for the production of less pro-inflammatory eicosanoids, damage to healing has been reported. Therefore, the influence of omega-3 on cutaneous healing remains undefined. **Aim:** To evaluate the healing process of excisional and incisional wounds of the skin of rats under the effect of nutritional supplementation with omega-3 fatty acid. **Method:** Sixty female rats were randomly divided into four groups of 15 (Epre, Eper, Cpre, Cper) according to the supplementation lipid (E - fish oil and C - soybean oil) and the moment of supplementation (pre - 7 days prior to the procedure, per - 7 days before and 7 days after the procedure). Oil supplementation (fish or soybean) was administered through orogastric gavage daily, in addition to the ad libitum diet. Under general anesthesia, after 7 days of initial nutritional supplementation, the rats were submitted to a surgical procedure with a wound on the back (2x2cm) that was allowed to heal by second intention, and incisional wound (5cm) in the abdomen, closed by suture. The wound was photographed in a standardized way in the immediate postoperative period, as well as in the 1st, 3rd, 5th and 7th days to calculate the area and rate of wound contraction. After euthanasia on the 7th day, the back wound was sent to immunohistochemical study (myofibroblasts and neoangiogenesis) and collagen study. The abdomen wound was submitted to a tensile test using the Emic® universal mechanical test machine. The results were statistically analyzed, with a significance level of 5%. **Results:** The weight of the animals did not show any significant difference between the groups. In the analysis of the contraction in the first days after the procedure, the Cpre group presented with higher rates of wound contraction ($p = 0.017$ for 1PO-3PO difference and $p = 0.004$ for 3PO-5PO difference). The Epre group showed the highest rates of contraction in the evaluation between the immediate postoperative period and the 7th day ($p = 0.002$). The tensiometric study

(maximum and rupture force) showed no difference between groups, as well as the myofibroblast and neoangiogenesis analyzes. There was an association between greater tensile strength with greater number of myofibroblasts for the Epre group ($p = 0.011$) and higher strength with greater number of CD34 for the Cpre group ($p = 0.03$). For the collagen, there was no difference between the "pre" and "per" moments, only between the experimental and control groups, with the first showing higher levels of collagen type III (immature - $p < 0.001$).

Conclusion: The use of enteral supplementation with omega-3 in rats without malnutrition does not alter the weight, tensile strength of the scar, myofibroblasts and neoangiogenesis. It promotes a higher rate of wound contraction and a delay in the deposition of mature collagen in relation to soybean oil supplementation.

Key-Words: Wound-Healing. Fatty Acids Omega-3. Nutritional Status. Rats. Collagen. Myofibroblasts. Tensile Strength.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mediadores e sinalização inflamatória derivada de n3 e n6.....	25
FIGURA 2 - Ácido Linolênico.....	30
FIGURA 3 - Ácido Linoléico.....	30
FIGURA 4 - Ácido Oléico.....	30
FIGURA 5 - Via metabólica dos AGPI.....	33
FIGURA 6 - Vias de produção de eicosanoides.....	35
FIGURA 7 - Divisão dos ratos em grupos.....	41
FIGURA 8 - Demarcação das áreas a serem incisadas.....	44
FIGURA 9 - Após realização de ferida excisional.....	44
FIGURA 10 - Exemplo de evolução das fotografias de um mesmo animal.....	45
FIGURA 11 - Máquina universal de ensaio mecânico Emic®.....	47
FIGURA 12 - Exemplo de estudo de tração.....	47
FIGURA 13 - Relatório gerado pelo <i>software</i> do computador conectado à máquina com valor de força máxima e força de ruptura do corpo de prova.....	48
FIGURA 14 - Exemplo de análise da contração da ferida por meio do <i>software</i>	49
FIGURA 15 - Predominância de colágeno tipo I (maduro, avermelhado).....	50
FIGURA 16 - Predominância de colágeno tipo III (imaturado, esverdeado).....	50
FIGURA 17 - Exemplo de lâmina com imunomarcador para SMA – “positivo” corado em marrom.....	51
FIGURA 18 - Exemplo de lâmina com imunomarcador CD34 – “positivo” corado em marrom.....	51
FIGURA 19 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm ²) entre o POI e 1PO.....	56
FIGURA 20 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm ²) entre o 1PO e 3PO.....	57
FIGURA 21 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm ²) entre o 3PO e 5PO.....	57
FIGURA 22 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm ²) entre o POI e 7PO.....	58
FIGURA 23 - Progressão da contração das feridas com as médias dos valores de cada grupo (sem o desvio padrão).....	59

FIGURA 24 - Relação entre miofibroblasto e força de ruptura para o grupo Epre.....	61
FIGURA 25 - Relação entre CD34 e força de ruptura para o grupo Cpre.....	62
FIGURA 26 - Percentual significativamente menor de colágeno tipo I (maduro) nas feridas dos grupos experimento (Eper e Epre) em relação às feridas do grupo controle (Cper e Cpre).....	63
FIGURA 27 - Percentual significativamente maior de colágeno tipo III (imaturo) nas feridas dos grupos experimento (Eper e Epre) em relação à feridas dos grupos controle (Cper e Cpre).....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ácidos graxos insaturados e suas fontes.....	31
TABELA 2 - Divisão dos animais em grupos.....	41
TABELA 3 - Valores de média e desvio padrão (em gramas) dos pesos de 54 ratos.....	54
TABELA 4 - Valores de média e desvio padrão (em mm ²) dos tamanhos das feridas dos 54 animais separados em 4 grupos, e em 5 tempos distintos.....	55
TABELA 5 - Valores de média e desvio padrão (em mm ²) das diferenças entre os tamanhos das feridas dos 54 animais separados em 4 grupos, e em 5 tempos distintos.....	56
TABELA 6 - Valores de média e desvio padrão (em Kgf) das forças máxima e de ruptura dos 52 animais.....	60
TABELA 7 - Valores das correlações entre a velocidade de contração (diferença entre o tamanho POI e 7PO) e forças máxima e de ruptura.....	60
TABELA 8 - Valores de mediana (valores mínimo e máximo) do miofibroblasto e angiogênese dos 54 animais separados em 4 grupos distintos.....	60
TABELA 9 - Correlações de Spearman entre variáveis de interesse separadas nos 4 grupos distintos.....	61
TABELA 10 - Valores de média desvio padrão do percentual de colágeno para colágeno tipos I e III nos 54 animais separados em 4 grupos distintos.....	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Composição da dieta padrão (Nuvilab® Cobaias).....	40
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA - Ácido araquidônico

AC - Antes de Cristo

AGI - Ácidos graxos insaturados

AGPI - Ácidos graxos poliinsaturados

ALA - Ácido α Linolênico

C - Controle

CD34 - Grupo de diferenciação 34 (*cluster of differentiation*) – antígeno de células hematopoiéticas

CEUA/BIO – UFPR Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

cm - Centímetro

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX - Ciclooxygenase

Cper - Grupo controle que recebeu suplementação por 7 dias antes e 7 dias após o procedimento cirúrgico

Cpre - Grupo controle que recebeu suplementação por 7 dias antes do procedimento cirúrgico

CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DHA - Ácido docosa-hexaenóico

E - Experimento

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EPA - Ácido eicosapentaenóico

Eper - Grupo experimento que recebeu suplementação por 7 dias antes e 7 dias após o procedimento cirúrgico

Epre - Grupo experimento que recebeu suplementação por 7 dias antes do procedimento cirúrgico

et. al. - *et alii* (e outros)

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

g - Grama

IL1 - Interleucina 1

IL10 - Interleucina 10

IL1 β - Interleucina 1 beta

IL6 - Interleucina 6
Kcal - Kilocaloria
Kg - Kilograma
LOX - Lipoxigenase
LTDA - Limitada
mg - Miligrama
ml - Mililitro
mm² - Milímetro quadrado
n. - Número
n3 - Ômega 3
n6 - Ômega 6
n7 - Ômega 7
n9 - Ômega 9
p - Nível de significância estatística
p. - Página
PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas
PF4 - Fator plaquetário 4
PGE1 - Prostaglandina 1
PGE2 - Prostaglandina 2
PGE3 - Prostaglandina 3
PO – Pós-operatório
PVPI - Iodopovidona
SMA - Alfa actina de músculo liso
TGF-β - Fator transformador de crescimento beta
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
TXA2 - Tromboxano 2
TXA3 - Tromboxano 3
UFPR - Universidade Federal do Paraná
v. - Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

= - Igual a

± - Mais ou menos

Δ - Delta

® - Marca registrada

°C - Graus Celsius

α - Alfa

Ω - Ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. CICATRIZAÇÃO	21
2.2 INFLAMAÇÃO	24
2.2.1 Ácidos graxos e inflamação	25
2.3. IMUNONUTRIÇÃO	26
2.4. LIPÍDEOS	28
2.4.1 Ácidos graxos	29
2.4.1.1. Ômega 3.....	31
2.5. MODELO EXPERIMENTAL.....	37
3. MÉTODO	39
3.1. ANIMAIS	39
3.1.1. Comissão de ética em pesquisa	39
3.1.2. Distribuição da amostra e alimentação	39
3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	42
3.3. AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	45
3.3.1. Eutanásia	46
3.3.2. Teste tensiométrico	46
3.3.3. Avaliação da contração das feridas	48
3.3.4. Estudo anatomopatológico	49
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4. RESULTADOS	54
4.1. PESO.....	54
4.2. CONTRAÇÃO.....	55
4.3. TRAÇÃO.....	59
4.4. IMUNOISTOQUÍMICA	60
4.5. COLÁGENO	62
5. DISCUSSÃO	64
5.1 IMUNONUTRIÇÃO E O ÔMEGA-3.....	64
5.2 MÉTODO	66
5.3 RESULTADOS.....	68
5.3.1 Peso.....	68

5.3.2 Contração	68
5.3.3 Tração e colágeno	69
5.3.4 Imunoistoquímica.....	72
6. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo complexo que resulta na formação de novo tecido para o reparo de uma solução de continuidade. Visa restaurar a integridade tecidual local com a formação de uma cicatriz como produto final (FERREIRA e D'ASSUMPÇÃO, 2006).

Apesar de ser um processo dinâmico e contínuo, historicamente e didaticamente o processo de cicatrização é dividido em três fases (inflamação, proliferação e remodelamento). Cada fase é essencial para o sucesso do fechamento da ferida, e intervenções ou o desvio do normal podem levar a alterações do resultado final da cicatriz (JANIS e HARRISON, 2014). O processo de cicatrização é influenciado por diversos fatores como infecção, isquemia, doenças crônicas, drogas e estado nutricional. A desnutrição e as deficiências nutricionais específicas podem ter grande impacto no resultado final de feridas cirúrgicas ou traumáticas (FERREIRA e D'ASSUMPÇÃO, 2006; JANIS e HARRISON, 2014; BROUGHTON, JANIS e ATTINGER, 2006; ARNOLD e BARBUL, 2006; CAMPOS, 2012).

A demanda de ácidos graxos essenciais aumenta após lesão tecidual. Ácido linoleico e araquidônico estão entre os ácidos graxos insaturados importantes para a produção de mediadores inflamatórios. A sua produção endógena é insuficiente para a demanda básica do metabolismo, devendo ser suplementados por meio da nutrição. Deficiência desses lipídeos pode ocorrer em até duas semanas após sua retirada da dieta, porém manifestações clínicas podem não ser aparentes até cerca de sete meses (ARNOLD e BARBUL, 2006).

O papel dos lipídeos na cicatrização ainda não foi vastamente estudado e há dúvida se a incorporação de algum lipídeo em particular pode trazer benefícios à cicatrização. Os ácidos graxos ômega-3 (n3) são poliinsaturados (AGPI), de cadeia longa, cuja primeira dupla ligação encontra-se entre o terceiro e o quarto carbono, contados a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica (TORRINHAS; RODRIGUES e WAITZBERG, 2012).

Devido às suas propriedades imunomoduladoras e efeito menos pró-inflamatório, a administração de n3 em pacientes submetidos a intervenções

cirúrgicas transcende seu valor nutricional, potencialmente modulando a resposta imunológica pós-operatória (CALDER, 2003).

Estudos mostram que o uso dos AGPI n3 pode criar microambiente mais favorável à cicatrização de feridas (McDANIEL, MASSEY e NICOLAOU, 2011; THEILA *et al.*, 2012; GRANT-KELS, 2010). Outros demonstram piores condições das feridas de animais alimentados com n3, com feridas mais fracas e cicatrização de pior qualidade, devido à pobre *cross-linking* e orientação espacial do colágeno (ALBINA, GLADDEN e WALSH, 1993; ARNOLD e BARBUL, 2006).

Existem estudos sobre a influência da imunonutrição em pacientes desnutridos, principalmente em relação a desfechos clínicos, complicações cirúrgicas e cicatrização. Revisão de Ferreira *et al.* (2012) demonstra que vários autores estudam feridas cutâneas em humanos e modelos experimentais com diversas variações de AGPI associados a outras substâncias, porém de forma tópica. Existem poucos estudos sobre a influência do ômega-3, utilizado de forma isolada, sobre a cicatrização cutânea, especialmente no modelo experimental sem desnutrição. Vê-se a necessidade da realização de estudos com a administração isolada do ômega-3 por não existirem dados experimentais que demonstrem que sua suplementação não trará prejuízo à cicatrização cutânea por atenuar a resposta inflamatória.

Ratos fornecem excelente modelo para pesquisa com feridas de pele por permitirem padronização do tipo, tamanho, forma e profundidade da ferida, o que facilita a comparação de dados entre estudos de cicatrização em todos os mamíferos (DUNN *et al.*, 2013; DORSETT-MARTIN e WYSOCKI, 2008). Sendo assim, realizou-se o presente estudo para avaliar a cicatrização cutânea utilizando modelo animal em ratos, sob a influência da suplementação enteral com ômega-3.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é avaliar o processo de cicatrização da ferida excisional e incisional da pele de ratos sob o efeito do uso da suplementação nutricional com ácido graxo n3. Os objetivos específicos consistem em:

- Avaliar a taxa de contração da ferida excisional, correlacionando com a presença de miofibroblastos e neoangiogênese, vistos através de marcação imunoistoquímica com alfa actina de músculo liso e CD34, respectivamente.
- Avaliar a força tênsil da ferida incisional mediante estudo de tração, correlacionando-a com a qualidade de colágeno.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CICATRIZAÇÃO

Os primeiros registros de cuidados com feridas e cicatrização datam de tabuletas de argila Sumérias de 2150 AC. Datando do sexto e sétimo séculos AC há descrições ayurvédicas de planejamento de intervenções sobre feridas objetivando a cura. Hipócrates (400AC) descreveu a importância de drenar pus de uma ferida, e Galeno (130-200AC) descreveu os princípios de cicatrização por primeira e segunda intenções. Os maiores avanços no campo da cicatrização foram feitos durante o século 19, com descrição da importância do controle da infecção, hemostasia e remoção do tecido necrótico. O entendimento moderno das feridas e da cicatrização foca em manejo multifacetado, levando em consideração o ambiente, condições locais e sua receptividade ao tratamento, assim como fatores sistêmicos (SEN e ROY, 2013).

O processo de cicatrização deve ser visto como uma cascata, com diversas vias supra e infra-regulatórias, direcionadas por sinais do tecido da ferida, do seu microambiente, assim como por intervenções locais e sistêmicas.

Cicatrização e nutrição têm uma relação íntima reconhecida há tempos. Má nutrição e deficiência de nutrientes podem ter grande impacto no desfecho de feridas traumáticas e cirúrgicas.

Alterações na cicatrização (feridas infectadas, cicatrização lenta ou deficiente) acarretam prejuízo financeiro ao sistema de saúde em todo o mundo. Há interesse no entendimento do processo básico do fechamento de feridas, na tentativa de modular e melhorar esse processo. A cascata dinâmica e complexa da cicatrização pode ser manipulada por meio de fatores metabólicos e nutricionais (ARNOLD e BARBUL, 2006).

A fase inflamatória tem início imediatamente após o trauma. A lesão tecidual leva à exposição do endotélio vascular e do colágeno subendotelial, o que ativa a cascata da coagulação e inicia a fase inflamatória. As plaquetas agregam-se e entrelaçam-se em uma rede de fibrina. O coágulo formado é rico em colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina, que liberam citocinas e

fatores de crescimento que incitam a resposta inflamatória. A ativação plaquetária é seguida por influxo de células inflamatórias. A fibrina forma um arcabouço que serve de base para as células que ali chegarão, como os neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais (JANIS e HARRISON, 2014; BROUGHTON e JANIS, 2006).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à área de inflamação, atraídos por interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator transformador do crescimento beta (TGF- β), fator plaquetário 4 (PF4) e produtos bacterianos. Os monócitos, também atraídos por esses fatores, são as células mais importantes nesta fase da cicatrização. Transformam-se em macrófagos, realizando debridamento local além de secreção de citocinas e fatores de crescimento que promoverão proliferação endotelial, angiogênese e migração endotelial (JANIS e HARRISON, 2014).

O papel da fase inflamatória na cicatrização é isolar e remover debrís e agentes indesejados antes da reparação tecidual. Os processos reparativos envolvem uma mudança na atividade celular, de inflamação (predominantemente mediada por fagócitos) e catabolismo, para processo anabólico epitelial e mesenquimal. Apesar da fase inflamatória ser essencial, a liberação excessiva de moléculas pró-inflamatórias pode exacerbar o dano tecidual. A inflamação auto resolutiva é normal e necessária. Promove a ativação de fibroblastos e síntese da rede de matriz. Por outro lado, inflamação excessiva em magnitude e duração gera prejuízo à cicatrização (THEILLA ET AL 2012).

A fase proliferativa inicia-se em 2 a 4 dias e tem como protagonistas os fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais. Durante essa fase ocorre epitelização e cobertura epidérmica, angiogênese, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e contração da ferida. Os fibroblastos migram da vizinhança ou diferenciam-se de células tronco locais. São estimulados principalmente por citocinas liberadas pelos macrófagos, sobretudo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento beta (TGF β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (TARDELI e SOUTO, 2011).

A epitelização ocorre a partir dos queratinócitos presentes nas bordas da ferida ou nos apêndices dérmicos (folículos pilosos, glândulas sebáceas). Ocorre liberação celular e mitose, estimulados por fator de crescimento epidérmico (EGF), FGF, TGF β e citocinas. A angiogênese é promovida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e é marcada pela migração endotelial, com formação capilar. A formação de capilares, granulação e deposição tecidual são essenciais à cicatrização. Sua falta pode levar à formação de ferida crônica (JANIS e HARRISON, 2014; BROUGHTON e JANIS, 2006).

A contração da ferida tem início com 4 a 5 dias, estendendo-se por cerca de 3 semanas. É promovida pela transformação do fibroblasto em miofibroblasto. Ele, que contém alfa actina de músculo liso, realiza a contração da ferida (JANIS e HARRISON, 2014; TARDELI e SOUTO, 2011).

A maturação da ferida tem início em 6 a 8 semanas, podendo persistir por um ano ou mais. Envolve a reorganização do colágeno e da matriz extracelular. É clinicamente a fase mais importante da cicatrização. Se houver falha na deposição e reorganização, haverá cicatrização frágil. Por outro lado, se houver depósito excessivo, haverá formação de cicatriz hipertrófica ou quelóide (FERREIRA e D'ASSUMPÇÃO, 2006).

Inicialmente os fibroblastos multiplicam-se e aumentam sua produção de colágeno. Esse colágeno é mais fino e posiciona-se de forma paralela na pele (colágeno tipo III ou imaturo). Com o tempo, a relação do colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I muda, com a diminuição do III e aumento do I (mais grosso e depositado nas linhas de tensão da pele, maduro). Um aumento na formação de colágeno é visto ao redor de 4 a 5 semanas após a lesão inicial, com aumento da resistência dos tecidos e na quantidade de colágeno tipo I (JANIS e HARRISON, 2014). A força tecidual da cicatriz é de cerca de 3% da pele não lesada na primeira semana, subindo para 20% ao redor de 3 semanas e a 80% ao redor de 3 meses (BROUGHTON e JANIS, 2006). O colágeno da pele da cicatriz é sempre diferente daquele encontrado na pele não lesada, assim como a força da cicatriz nunca será igual a da pele não lesada. A resistência da ferida tem relação com a qualidade e a quantidade de colágeno presentes no local (JANIS e HARRISON, 2014; BROUGHTON e JANIS, 2006; TARDELI e SOUTO, 2011).

2.2 INFLAMAÇÃO

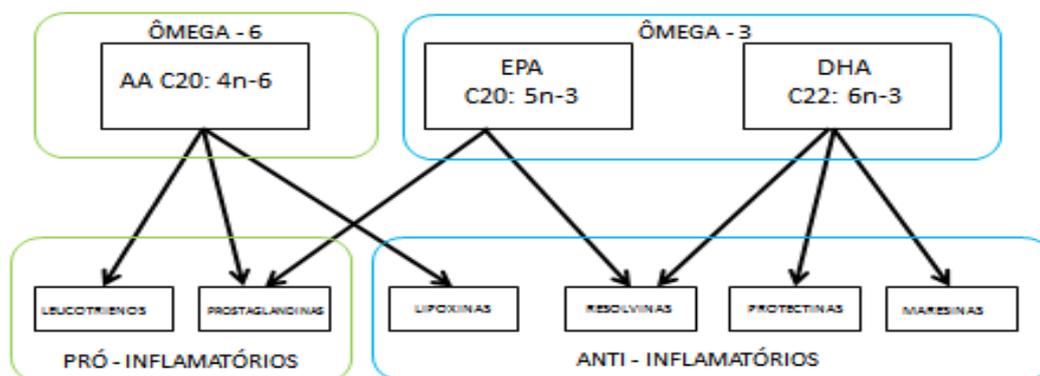
A inflamação é parte da resposta orgânica imediata ao trauma e à infecção. É caracterizada por vermelhidão, edema, calor e dor, ocasionados por aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e migração celular. O objetivo inicial da inflamação é o de eliminar patógenos e toxinas, assim como dar início ao processo de reparação tecidual. Essas respostas devem ser ordenadas e controladas para serem benéficas (SEN e ROY, 2013).

As citocinas têm um papel muito importante no início e perpetuação do processo inflamatório (interleucinas 1 e 6 – IL1 e IL6 respectivamente, além de fator de necrose tumoral α – TNF α , eicosanoides, entre outras). Algumas citocinas como o TNF α e a IL6 entre outras, são mediadores pró-inflamatórios, com estímulo metabólico de fase aguda, aumento na produção de proteínas de fase aguda (proteína C reativa, ceruloplasmina, α antitripsina) e redução de outras (albumina, transferrina). Essa resposta de fase aguda leva a alterações metabólicas, com aumento dos triglicérides circulantes (apesar da maior utilização dos ácidos graxos), intolerância à glicose e consumo protéico. Isso se traduz em aumento da taxa metabólica basal, de gasto energético e de proteólise (GAROFOLO e PETRILLI, 2006).

Apesar de a inflamação ser uma resposta normal, protetora e importante, quando ocorre de forma exuberante e descontrolada pode levar a maior dano e até à morte. Níveis aumentados de IL1, IL6 e TNF α são encontrados em casos como choque tóxico, síndrome respiratória aguda e casos de inflamação crônica como artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais. Inflamação exacerbada é a base patológica para inúmeras doenças. (CALDER, 2006)

O estado de “não inflamação” não ocorre passivamente pela falta de estímulo inflamatório, mas sim pela extensa sinalização para aniquilar a resposta inflamatória existente, onde se incluem os mediadores lipídicos como parte dessa sinalização (lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas – figura 1) (DOBSON, BARROW, KRALOVEC e ADCOCK, 2013).

Figura 1 – Mediadores e sinalização inflamatória derivada de n3 e n6. Adaptado de DOBSON, BARROW, KRALOVEC e ADCOCK, 2013.



2.2.1 Ácidos graxos e inflamação

Os ácidos graxos mais comumente consumidos na dieta são os n3, n6 e n9. Em sua conformação com 18 e 20 átomos de carbono, utilizam as mesmas enzimas (dessaturases $\Delta 6$ e $\Delta 5$ e elongase) para síntese de seus derivados de 20 átomos de carbono, onde se incluem os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e araquidônico (AA), geradores de eicosanóides (metabólitos oxigenados) com maior ou menor potencial inflamatório. A afinidade dessas enzimas com os ácidos graxos dá-se na seguinte ordem: n3>n6>n9 (GAROFOLO e PETRILLI, 2006; CALDER, 2003).

A implicação desse balanço lipídico pode ser vista em diversas situações. Um exemplo é a geração de maior agregação plaquetária, contração de musculatura lisa e aumento de complicações cardiovasculares associadas à dieta ocidental rica em n6.

O balanço entre a ingestão de lipídeos n3 e n6 é uma das estratégias nutricionais mais estudadas para atenuação de resposta inflamatória exacerbada (por exemplo, no paciente oncológico, crítico ou pós trauma). A distribuição dos ácidos graxos essenciais no plasma é modulada pela ingestão

dietética e as manipulações alimentares influenciam diretamente as propriedades desses ácidos graxos (mensageiros, produtores de eicosanoides, liberação de citocinas e composição de membrana celular) (GAROFOLO e PETRILLI, 2006; ANDRADE e CARMO, 2006).

2.3. IMUNONUTRIÇÃO

Má nutrição após agressão resulta de múltiplos fatores, como ingestão prejudicada e distúrbio metabólico. Estudos nas últimas décadas demonstram que mudanças na energia, carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais afetam o processo de cicatrização. A desnutrição pode existir previamente à agressão, ou ser secundária ao catabolismo provocado por ela. As lesões aumentam a taxa metabólica, níveis de catecolaminas, perda na quantidade de água total do corpo e alteração do *turnover* celular, resultando num estado de catabolismo (ARNOLD e BARBUL, 2006).

Desnutrição nem sempre é corretamente diagnosticada pelos profissionais da saúde. A primeira descrição de relação entre desnutrição e mortalidade foi a de Hiram Studley em 1936, com o relato da associação entre perda ponderal e a maior incidência de complicações pós-operatórias. (PAREKH e STEIGER, 2004). Além da associação com aumento das complicações pós operatórias, a desnutrição tem relação com aumento no numero de infecções, aumento do tempo de internamento, mortalidade e custos (MARIK e FLEMMER, 2012).

Estudo populacional demonstrou prevalência de desnutrição de 50% nos pacientes de um hospital em um centro urbano (PAREKH e STEIGER, 2004). O tipo mais comum de desnutrição é a proteico-energética, que comprovadamente leva à diminuição da força tênsil da ferida, redução na função das células T, na atividade fagocítica, nos níveis de anticorpos e complemento, levando à diminuição da habilidade orgânica em defender-se contra infecção. Isso leva a aumento da mortalidade, aparecimento de complicações das feridas e escaras, e diminuição na qualidade de vida (ARNOLD e BARBUL, 2006; THEILLA ET AL 2012).

Presença de doença pré-operatória ou decréscimo na ingestão nutricional no período antes de cirurgia têm um efeito significativo na síntese de colágeno. A nutrição pré-operatória pode ser mais importante para a recuperação da ferida do paciente do que seu status nutricional global (ARNOLD e BARBUL, 2006).

O potencial de modular a atividade do sistema imune mediante intervenção com nutrientes específicos chama-se imunonutrição. Esse termo pode ser aplicado a qualquer situação em que a oferta de nutrientes é alterada para modificar uma resposta imune ou inflamatória. No entanto, a imunonutrição vem sendo mais associada com a tentativa de melhorar o curso clínico de pacientes críticos e cirúrgicos, frequentemente com administração extra de nutrientes na rotina dietética enteral ou parenteral dos mesmos (CALDER, 2003; ONO, MATIAS e CAMPOS, 2014).

Apesar de muitas evidências de que o estado nutricional e a suplementação têm papéis muito importantes no processo de cicatrização, a maioria das feridas cicatriza sem eventos adversos, mesmo nos pacientes desnutridos. Esse fato não justifica negligenciar a importância da nutrição na cicatrização. O objetivo deve ser oferecer uma nutrição ótima para possibilitar que a priorização da cicatrização ocorra num ambiente ideal (ARNOLD e BARBUL, 2006).

O suporte nutricional evoluiu substancialmente nos últimos 20 anos, de uma estratégia meramente suportiva para uma intervenção terapêutica ativa. Entender o efeito dos nutrientes no processo da doença permitiu o desenvolvimento de fórmulas nutricionais especializadas (MARIK e FLEMMER, 2012).

Existem três potenciais alvos para a imunonutrição: função de barreira da mucosa, defesa celular e inflamação (sistêmica ou local). Os principais nutrientes estudados são arginina, glutamina, ácidos graxos n3, nucleotídeos e aminoácidos de cadeia ramificada. Diferentes combinações desses imunonutrientes são encontradas nas dietas enterais e parenterais. Há descrição de que, individualmente, os componentes da imunonutrição modulam componentes da resposta imune celular e mediadores inflamatórios (CALDER, 2003).

Em meta análise de 2007 avaliou-se o uso da imunonutrição (contendo dois ou mais dos seguintes: arginina, n3 e ácidos ribonucléicos) em pacientes com câncer gastrointestinal. Demonstrou-se associação positiva com diminuição das complicações infecciosas e do tempo de internamento, mas sem alteração da mortalidade. A conclusão foi de que a imunonutrição é custo-efetiva e segura para uso nos pacientes com câncer gastrointestinal (ZHENG *et al*, 2007).

Sabe-se que com a administração de nutrientes combinados, há melhora nas complicações cirúrgicas, sem benefícios comprovados sobre diminuição de mortalidade do paciente crítico. Alguns estudos mostram benefícios similares quando os imunonutrientes são administrados não associados, de forma “isolada” (CALDER, 2003; MARIK e FLEMMER, 2012).

2.4. LIPÍDEOS

Os lipídeos são moléculas orgânicas que resultam da ligação entre ácidos graxos e álcool. Encontram-se distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e adipócitos. Suas principais funções são: fornecimento de energia, síntese de estruturas celulares (como as membranas fosfolipídicas), síntese de hormônios, mediadores de resposta inflamatória e participação no processo inflamatório. (TORRINHAS, RODRIGUES e WAITZBERG, 2012). Os lipídeos devem ser considerados mais do que uma fonte de energia e de construção de membranas celulares, pois, em algumas circunstâncias, eles podem agir como agentes farmacológicos, biologicamente ativos. Isso parece ser particularmente verdade no caso do n3, contido no óleo de peixe (CALDER e DECKELBAUM, 1999).

Na alimentação, estão geralmente na forma de triacilgliceróis, que consistem de 3 ácidos graxos acoplados a um glicerol. Triacilglicerol é também a principal forma de armazenamento da gordura.

2.4.1 Ácidos graxos

Ácidos graxos são espécies químicas compostas por cadeias de carbonos e hidrogênios ligados entre si, podendo ter tamanhos variados. São ácidos carboxílicos formados por longas cadeias não ramificadas compostas por número par de átomos de carbono, unidos por ligações simples ou duplas.

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com suas características:

- Número de átomos na cadeia carbônica
 - Longa (14 a 20 átomos de carbono)
 - Média (6 a 12 átomos de carbono)
 - Curta (até 4 átomos de carbono)
- Número de duplas ligações
 - Saturados (sem duplas ligações)
 - Monoinsaturados (uma dupla ligação)
 - Poliinsaturados (mais de uma dupla ligação)

Os ácidos graxos insaturados (AGI) são ainda identificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação contada a partir de seu radical metil (representada pela letra *ômega*), ou a partir de seu grupo funcional (representada pela letra *delta*) – figuras 2, 3 e 4 (TORRINHAS, RODRIGUES e WAITZBERG, 2012; CALDER, 2003).

Figura 2 – Ácido Linolênico. Ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos), poliinsaturado (mais de uma dupla ligação) com a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto carbono a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica (ômega-3).



Figura 3 – Ácido Linoléico. Ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos), poliinsaturado (mais de uma dupla ligação), com primeira dupla ligação entre o sexto e sétimo carbono a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica (ômega-6).



Figura 4 – Ácido Oléico. Ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos), monoinsaturado (dupla ligação), com dupla ligação entre o nono e décimo carbono a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica (ômega-9).



A tabela 1 mostra os principais ácidos graxos insaturados e suas fontes:

<i>Monoinsaturado</i> <i>Ômega-9</i>	<i>Poliinsaturado</i> <i>Ômega- 6</i>	<i>Poliinsaturado</i> <i>Ômega- 3</i>
Ácido Oléico Ácido Palmitoléico	Ácido Linoleico Ácido γ -Linolênico Ácido Araquidônico	Ácido α -Linolênico Ácido eicosapentaenoico Ácido docosa- hexaenoico
Fontes		
Azeite de oliva Óleo de canola	Óleo de açafrão Óleo de soja Óleo de milho Óleo de algodão Óleo de girassol Leite/ carne	Óleo de peixe Óleo de noz Óleo de canola Óleo de soja

Fonte: adaptada de Torrinhas, 2012.

2.4.1.1. Ômega 3

Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (n3) são de cadeia longa (14 a 20 átomos de carbono), com sua primeira dupla ligação entre o terceiro e quarto carbono, a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica.

A observação de que o n3 poderia ter um papel de atenuar a resposta inflamatória começou pela descrição do número reduzido de doenças inflamatórias na população autóctone da Groelândia (MAYER *et. al.* 2003).

O AGPI n3 que é regularmente consumido na dieta é o ácido α -linolênico (ALA). Ele não pode ser produzido pelo organismo e por isso é chamado de essencial (é exclusivamente obtido pela dieta). A necessidade diária de n3 corresponde de 0,5% a 2,0% da ingestão calórica total, dependendo da fonte consultada (ANDRADE e CARMO, 2006).

O ALA, no entanto, por meio de reações enzimáticas (elongações e dessaturações) pode ser convertido em outros n3, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA). Eles têm propriedades biológicas clinicamente importantes, porém sua taxa de conversão a partir do ALA é muito baixa (cerca de 0,2% e 0,05% do ALA ingerido, respectivamente).

EPA e DHA são encontrados em grande quantidade na gordura e óleo de peixe, especialmente os que habitam água gelada e ingerem quantidades significativas de algas.

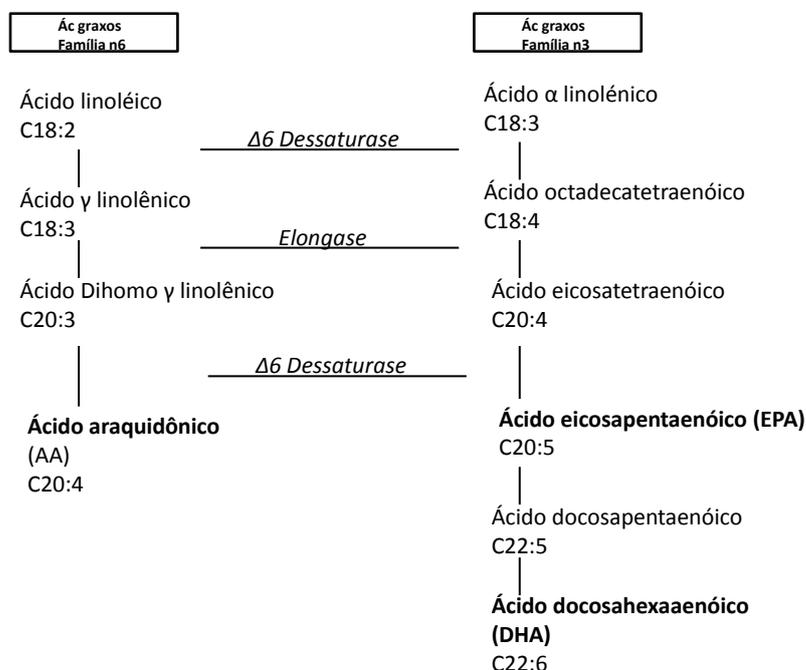
De maneira semelhante aos outros lipídeos, os AGPI n3 fornecem importante quantidade de energia (9,3Kcal/g), participam da síntese de hormônios e estruturas celulares, transporte de vitaminas lipossolúveis e sinalizações intra e extracelulares. Além disso, particularmente EPA e DHA parecem ter efeito modulador da resposta imunológica. (TORRINHAS, RODRIGUES e WAITZBERG, 2012; CALDER e DECKELBAUM, 1999; BJERVE, 1989; TORRINHAS, 2012).

É reconhecido que a demanda por ácidos graxos essenciais aumenta em estados hipermetabólicos. Ácido linoléico e araquidônico estão entre os ácidos graxos insaturados que devem ser repostos na dieta para permitir a produção de prostaglandinas. Pacientes cirúrgicos podem receber AGPI como parte de terapia nutricional por via oral, enteral ou parenteral.

Deficiências de ácidos graxos essenciais dificilmente são vistas clinicamente, exceto nos períodos prolongados de nutrição parenteral que não contém gordura. Deficiência lipídica pode causar disfunção imunológica, dermatite, alopecia, trombocitopenia, má cicatrização, entre outros (ARNORLD e BARBUL, 2006).

A relação entre o consumo de AGPI, inflamação e imunidade pode ser atribuído ao fato de que o perfil lipídico das membranas celulares sofre influência da composição de ácidos graxos da dieta. Uma vez presente na membrana celular leucocitária o EPA, perante estímulo antigênico, vai competir pelas mesmas vias enzimáticas que o ácido araquidônico (AA), da família do ômega-6 (n6), para a síntese de eicosanóides – figura 5.

Figura 5 – Via metabólica dos AGPI. Devido à semelhança química, ácido linoleico e α -linolênico competem pelas mesmas enzimas para sintetizar os derivados com 20 átomos de carbono. *Fonte:* adaptado Calder, 2010.



Os eicosanóides são moléculas altamente bioativas, frequentemente de vida curta, produzidas pelas células para atuarem no seu ambiente. São eles as prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Produzidos em resposta a estímulo fisiológico ou como resposta ao trauma, a partir do ácido dihomo- γ -linolênico, eicosapentaenóico e araquidônico. Pela via da ciclooxigenase, o ácido dihomo- γ -linolênico dá origem aos eicosanóides tipo “1” (prostaglandina1 – PGE1), o eicosapentaenóico os tipo “3” (prostaglandina e tromboxano 3- PGE3, TXA3) e o araquidônico os tipo “2” (prostaglandina, tromboxano2 – PGE2, TXA2). Pela via da lipooxigenase são gerados os leucotrienos, com os derivados do AA recebendo sufixo “4” e os derivados do EPA “5” (ANDRADE e CARMO, 2006).

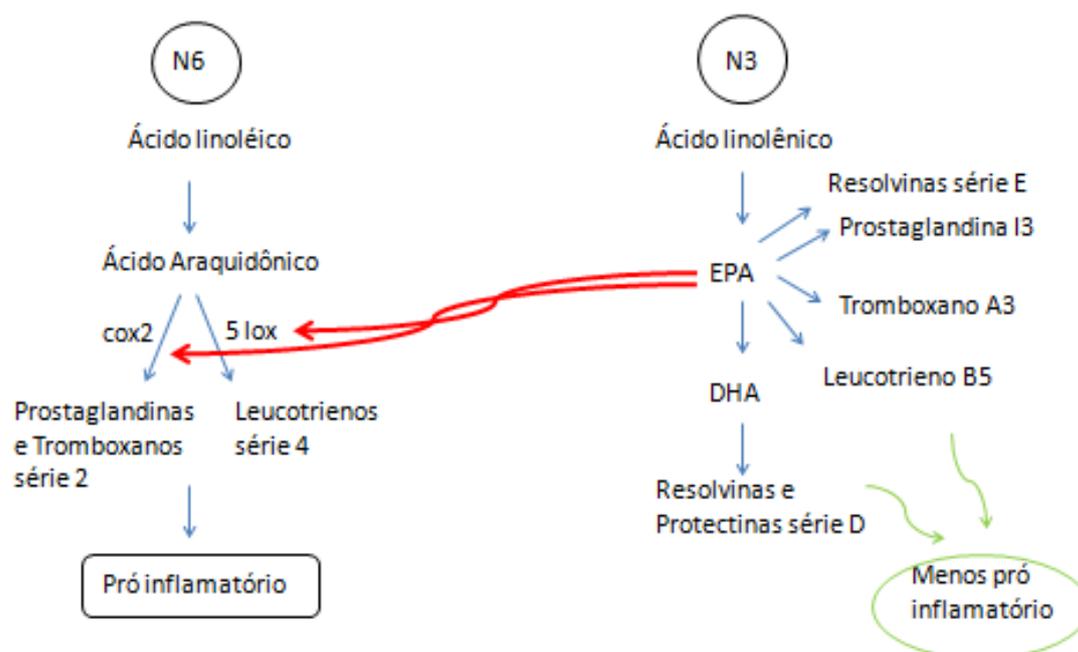
Os eicosanóides, formados a partir de n3 EPA têm potencial inflamatório e imunossupressor menor do que aqueles sintetizados a partir do n6 AA. A PGE3 e TXA3 são menos potentes do que a PGE2 e TXA2. A capacidade dos

AGPI n3 em competir com os AGPI n6 na produção de eicosanóides constitui sua propriedade anti-inflamatória mais estudada (TORRINHAS, 2012; ARNOLD e BARBUL, 2006).

Os ácidos graxos n3, n6, n7 e n9 são substratos para as enzimas de alongação e dessaturação. A enzima $\Delta 6$ dessaturase é uma enzima chave na regulação e produção de AGPI. Sua atividade depende da competição entre os substratos e também é regulada por *feedback* dos produtos originados das séries de ácidos graxos. A velocidade de dessaturação e alongamento difere entre as séries, sendo maior para o n3 e menor para o n9. A $\Delta 6$ ainda é considerada etapa limitante na produção de AGPI, e uma grande quantidade de lipídeos de uma série na dieta pode inibir a dessaturação de outra série que se encontra em menor quantidade (ANDRADE e CARMO, 2006).

Alto consumo de ácido linoleico favorece o aumento do conteúdo de AA nos fosfolipídios de membrana, aumentando a produção de eicosanoides das séries 2 e 4 (prostaglandina E2 e leucotrieno B4) por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), respectivamente. Alta produção desses eicosanoides está relacionada com perpetuação de processos inflamatórios, doenças cardiovasculares e distúrbios imunológicos. Por outro lado, o consumo de ácidos graxos n3, como o ácido α -linolênico, EPA ou DHA (que competem com o AA pelas mesmas vias enzimáticas) inibe competitivamente a oxidação do ácido araquidônico pela COX e 5LOX. É importante acrescentar que o DHA não é substrato da COX e LOX, mas inibe a síntese de eicosanoides n6 por inibir a liberação de AA da membrana celular (figura 6) (BORGES *et al.*, 2013; SILVA, 2007; GLASER *et al.*, 2010; TORRINHAS, 2012; ANDRADE e CARMO, 2006).

Figura 6 - Vias de produção de eicosanoides. Competição por vias enzimáticas leva à produção de eicosanoides com menor potência inflamatória, derivados da família ômega-3. EPA- ácido eicosapentaenoico; DHA – ácido docosahexaenóico; COX- ciclooxigenase; LOX – lipoxigenase.



Fonte: adaptado Calder, 2010.

Os n3 ainda inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , interleucina 1 beta (IL1 β) e interleucina 6 (IL6) e parecem modular positivamente a produção da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL10). Devido às suas propriedades imunomoduladoras e potencial efeito anti-inflamatório, a administração de n3 em pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas transcende seu valor nutricional, potencialmente modulando a resposta imunológica pós-operatória (TORRINHAS, 2012; CALDER, 2003).

Estudos em modelos experimentais indicam que o óleo de peixe (em diversas concentrações) leva à redução de parâmetros imunes, como diminuição da resposta proliferativa de linfócitos, diminuição na atividade das células *natural killers* e prejuízo da fagocitose (ANDRADE e CARMO, 2006).

Em estudo de Hall *et al.* (2006) cães alimentados com altas concentrações de n3 tiveram uma concentração plasmática maior de EPA e DHA e menor de AA. Houve redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e isso modulou a adesão celular. Mostrou-se nesse estudo que os efeitos ocorreram através de alteração na expressão gênica. Relacionou-se a quantidade de n3 com os aumentos plasmáticos e notou-se que a concentração de DHA aumentava em paralelo ao consumo alimentar. Os autores relataram que a dose de n3 mostrou-se mais importante em afetar o perfil plasmático dos lipídeos do que a relação, na dieta, de n6/n3. A adição de ácidos graxos n3 em qualquer quantidade reduziu a abundância relativa de metabólitos de n6, devendo possivelmente existir uma via metabólica dose-dependente diferente para o n3 e o n6. Os cães suplementados com n6 tiveram baixas concentrações plasmáticas de n3 e altas concentrações de ácido linoléico. Quando se adicionou n3, os níveis de ácido linoléico baixaram. Nesse estudo, a resposta máxima de concentração plasmática de DHA ocorreu com cerca de 175mg/kg de peso de n3.

Estudos mostram que o uso dos AGPI n3 pode criar um microambiente mais favorável à cicatrização de feridas. Os ácidos graxos n3 mostraram atuar na cicatrização das feridas por possível ação imunomoduladora, com redução de eventos indesejáveis em pós-operatório após suplementação dietética do mesmo (McDANIEL, MASSEY e NICOLAOU, 2011; THEILLA *et al* 2012).

Trabalho de Vizzotto (2015) mostrou que a suplementação de n3, modula favoravelmente o processo de cicatrização de anastomoses colônicas em ratos submetidos a tratamento quimioterápico, e contribui como importante fator de aporte nutricional na recuperação do estado de desnutrição.

Segundo Arnold e Barbul (2006), os AGPI n3 exibem propriedades menos pró – inflamatórias por inibirem a produção de alguns eicosanóides (como IL1, TNF α) desviando a via metabólica para produção de outros mediadores como eicosanóides derivados de EPA e resolvinas derivadas de EPA e DHA. Os reais benefícios do n3 podem estar mais relacionados à imunomodulação do paciente do que benefícios para a cicatrização *per se*, pois em estudo de Albina, Gladden e Walsh (1993), por exemplo, animais que consumiram dietas ricas em n3 tiveram feridas significativamente mais fracas,

especialmente após 30 dias de nutrição com esse lipídeo. Esses autores acreditam que o ômega-3 altera a fase de fibroplasia e de maturação da cicatrização.

EPA e DHA são capazes de diminuir a produção dos eicosanóides que são potentes mediadores pró-inflamatórios, e o papel do n3 como anti-inflamatório vem sendo estudado. Os mecanismos pelos quais esse efeito é obtido ainda são alvo de investigação, com expressão gênica, composição de membranas celulares e vias de sinalização como objeto. Por razão desses benefícios, especialmente em pacientes críticos, oncológicos e cirúrgicos, estuda-se o uso de dietas com suplementação do n3. Não se sabe, porém, se a ação menos pró-inflamatória dos AGPI n3 ou se a modulação imune, gênica e de vias de sinalização não gera prejuízo à cicatrização cutânea. Não há abundância de estudos sobre a influência no n3 na cicatrização cutânea. Existem estudos sobre a influência desse lipídeo em outros desfechos, e mesmo sobre cicatrização, porém de anastomoses intestinais, sendo escassos os estudos sobre a cicatrização cutânea.

Existe a necessidade da realização de estudos com a administração isolada do ômega-3 por não existirem dados experimentais que demonstrem que sua suplementação não trará prejuízo à cicatrização cutânea por atenuar a resposta inflamatória.

2.5. MODELO EXPERIMENTAL

A dificuldade no processamento da derme devido à sua espessura e opacidade, assim como das feridas com crostas têm dificultado o estudo da cicatrização em mamíferos. Além disso, existem considerações éticas que tornam as pesquisas limitadas (ESCAMÈZ *et al.*, 2004). Para o estudo de uma ferida em seu completo processo de cura seria necessário biopsiar diversas vezes a ferida. Além disso, não seria possível infeccionar propositalmente uma ferida em humano, assim como existem diferenças muito grandes entre cada indivíduo causando erros e pouca reprodutibilidade às pesquisas (PEREZ e DAVIS, 2008).

A maior parte do conhecimento que se têm hoje vem do uso do modelo animal para pesquisa, como o modelo canino e murino. Antigamente as pesquisas eram feitas em grandes modelos animais, como os suínos, mostrando-se pouco práticas. O modelo experimental com ratos é ideal na medida em que são animais pequenos, economicamente viáveis e com genética facilmente modificável, o que permite a criação de diversas situações clínicas (DUNN *et al.*, 2013).

Ratos são um excelente modelo para pesquisa com feridas de pele por permitirem uma padronização do tipo, tamanho, forma e profundidade da ferida, o que facilita a comparação de dados entre estudos de cicatrização em todos os mamíferos (DORSETT-MARTIN e WYSOCKI, 2008). Na maioria dos estudos a dúvida permanece no quanto os resultados podem ser extrapolados para a situação humana *in vivo* (ESCAMÈZ *et al.*, 2004).

A pele de ratos e humanos têm as seguintes características em comum: epiderme, membrana basal, folículos pilosos e derme. Entre as inúmeras diferenças, estão a pele frouxa, a presença de panículo carnoso, ausência de glândulas apócrinas e écrinas e a ausência de formação de cicatrização hipertrófica ou queloideana. A presença de pele frouxa e panículo carnoso favorecem a contração da ferida nos ratos (DORSETT-MARTIN e WYSOCKI, 2008; TOLAZZI *et al.* 2009).

Ainda que sejam animais da mesma espécie e geneticamente iguais, existem variações biológicas entre cada animal. Isso, contudo é muito menos evidente do que nos seres humanos, o que torna os resultados e conclusões mais confiáveis (TOLAZZI *et al.* 2009).

3. MÉTODO

3.1. ANIMAIS

3.1.1. Comissão de ética em pesquisa

O presente projeto esteve de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”. O projeto foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob processo número: 23075.002565/2013-86.

3.1.2. Distribuição da amostra e alimentação

Foram utilizados para o estudo 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), fêmeas, linhagem Wistar com peso médio de 198 gramas, originários do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Foram mantidos, em quarentena por cinco dias antes do início do estudo e durante todo o estudo, no laboratório do centro de pesquisa do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica da UFPR. Foram alojados em grupos de cinco animais por caixa, própria para a espécie, acondicionada em prateleiras. A temperatura foi mantida em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, o ciclo claro/escuro em 12 horas e a umidade relativa do ar não foi controlada.

Receberam água e ração padrão para a espécie *ad libitum* durante o período de aclimação. Posteriormente a dieta foi modificada conforme descrição e tabela a seguir (Tabela 2).

A dieta padrão utilizada foi a Nuvilab® Cobaias, cuja composição encontra-se no quadro 1.

Quadro 1 – Composição da dieta padrão (Nuvilab® Cobaias)

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral aminoácido.	
NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO:	
Umidade (máx.)	12,50%
Proteína Bruta (min.)	23,00%
Extrato Etéreo (min.)	4,00%
Matéria Fibrosa (máx.)	12,00%
Matéria Mineral (máx.)	11,00%
Cálcio (máx.)	1,40%
Fósforo (min.)	0,80%
ENRIQUECIMENTO POR QUILOGRAMA DO PRODUTO:	
VITAMINAS: Vitamina A 12.500 UI, vitamina D3 1.000 UI, vitamina E 15 mg, vitamina C 800 mg, vitamina K3 5 mg, vitamina B1 4 mg, vitamina B2 5 mg, vitamina B6 6 mg, vitamina B12 20 mcg, niacina 40 mg, 1 mg, ácido pantotênico 20 mg, ácido fólico, biotina 0,1 mg, colina 500 mg..	
MICROELEMENTOS MINERAIS: Ferro 40 mg, zinco 60 mg, cobre 6 mg,, iodo 0,3 mg, manganês 40 mg, selênio 0,1 mg, cobalto 1 mg.	
AMINOÁCIDOS: DL-Metionina 200 mg.	
ADITIVOS: Antioxidante 100 mg	

Fonte: Sogorb Indústria e Comercio – Lapa – SP, Brasil.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 15, conforme a figura 7 e tabela 2:

Figura 7 – Divisão dos ratos em grupos.

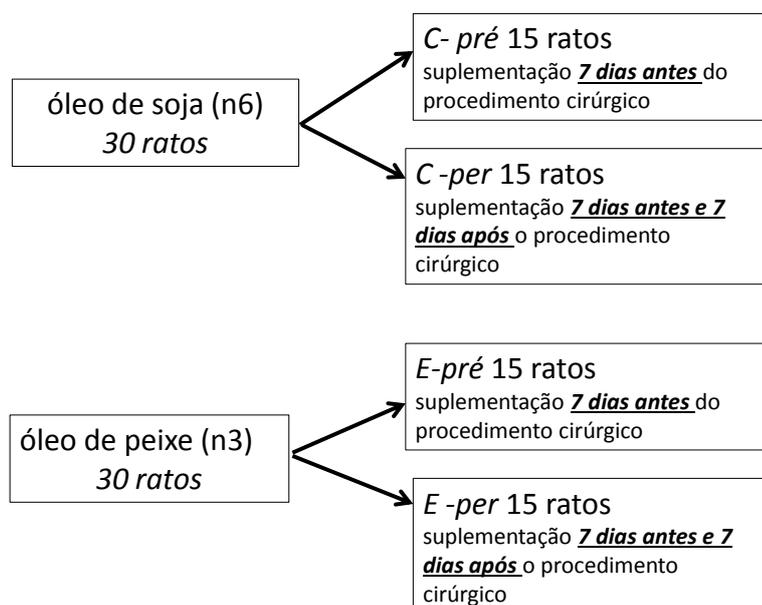


Tabela 2 – Divisão dos animais em grupos.

<i>Grupo</i>	<i>Suplementação</i>
C pré	Óleo soja 7 dias pré operatório
C per	Óleo soja 7 dias pré e 7 dias pós operatório
E pré	Óleo peixe 7 dias pré operatório
E per	Óleo peixe 7 dias pré e pós operatório

Os ratos receberam, conforme o grupo a qual pertenciam (experimento ou controle), 1 a 1,5ml (dependendo do peso) de lipídeo (óleo de soja ou peixe), por meio de gavagem com sonda flexível, sete dias antes do procedimento cirúrgico.

Houve estresse mínimo dos animais durante a suplementação, sem a necessidade de sedação dos mesmos. Foi realizada a gavagem por meio de sonda flexível (sonda uretral números 8 e 10 french) introduzida na cavidade

oral dos animais enquanto seguravam-se os mesmos em posição vertical. Poucas vezes houve regurgitação do conteúdo por parte dos animais, e de quantidades mínimas, decidindo a equipe não realizar nova administração nesses casos.

O óleo de soja utilizado foi o comercial, marca “Soya”, puro, sem adição de vitaminas. Conforme descrição do fabricante: “Óleo de soja (geneticamente modificada a partir de *Agrobacterium sp.*) e antioxidantes TBHQ e ácido cítrico.”

Os que receberam óleo de peixe, receberam produto manipulado (puro) na concentração de 20mg para cada ml e a dose de 100mg por kg de peso do animal. Segundo o fabricante “Drogavet - RH farmácia de manipulação”, emulsão de ácidos graxos ômega- 3 composta por EPA e DHA com proporção de 80:20 e em concentração de 20mg por ml de solução manipulada de óleo de peixe.

A dose para cada rato foi de 100mg de óleo de peixe por kg de peso do animal, resultando em 1 a 1,5ml de solução de óleo de peixe. O mesmo volume de lipídeo foi fornecido da solução de óleo de soja (HALL, PICTON, SKINNER, JEWELL e WANDER, 2006; VIZZOTTTO, CAMPOS, MELLO e CASTILHO, 2015; CASTILHO, CAMPOS e MELLO, 2015).

Neste primeiro momento, todos os animais receberam suplementação lipídica além da dieta *ad libitum*, por 7 dias, antes do procedimento cirúrgico.

Condições de higiene foram mantidas pela troca diária do cepilho, água e limpeza das gaiolas.

3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No dia do procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e submetidos à anestesia intramuscular recebendo 0,2ml/100g peso de uma mistura de 1ml de quetamina (50mg) e 1ml de xilazina (20mg). Durante realização de tricotomia, foi testado o nível anestésico de cada animal e, se necessário, complementada dose de anestesia com mais 10% da inicial.

Após tricotomia da parede abdominal ventral e da região dorsal, realizou-se antissepsia com PVPI tópico (RIODEINE®), segundo informações

do fabricante: “solução aquosa de uso tópico contendo 10% de iodopolividona, que equivale a 1% de iodo ativo”.

Confeccionou-se na pele do ventre, com lâmina fria (lâmina de bisturi nº15) uma ferida incisional de 5cm, em plano total, até o nível da fáscia muscular. A ferida foi frouxamente aproximada com pontos simples (5 pontos, distribuídos igualmente pela ferida) de nylon 4-0, sem confecção de sutura em plano subcutâneo ou subdérmico.

Além da ferida do ventre, no dorso confeccionou-se ferida excisional de 2,0 x 2,0cm. Realizada incisão com lâmina de bisturi (nº15) na porção lateral do quadrado demarcado, dissecação do segmento de pele a ser retirado com tesoura de Metzemaum, em plano anatômico areolar, em nível suprafascial e retirados os bordos demarcados com a mesma lâmina de bisturi (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Demarcação das áreas a serem incisadas.

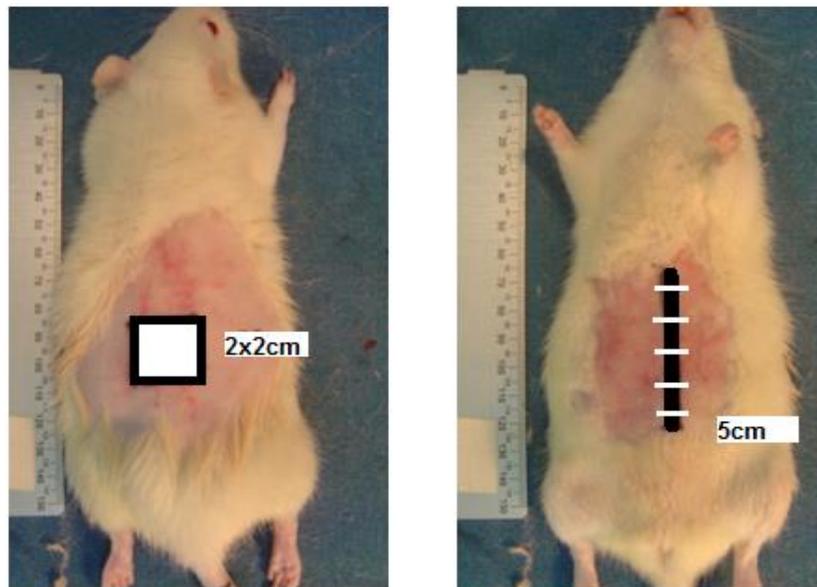


Figura 9 - Após realização de ferida excisional.



Somente após a completa recuperação anestésica os ratos retornaram às suas gaiolas, com livre acesso à água e à ração.

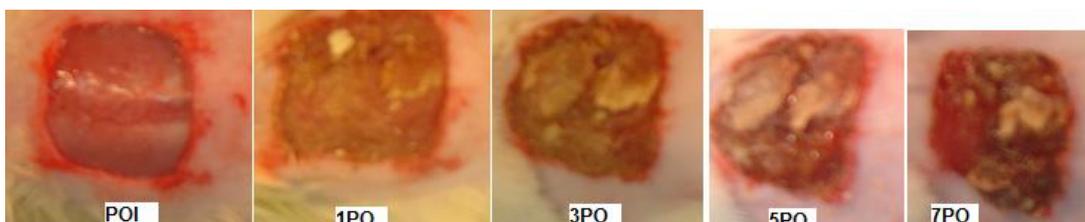
3.3. AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Acompanhados diariamente, os animais pertencentes aos grupos de suplementação pré-operatória, receberam apenas dieta padrão após o experimento cirúrgico. Os animais restantes, do grupo de suplementação per operatória receberam, de acordo com o grupo pertencente (experimento ou controle) suplementação com lipídeo por gavagem com sonda flexível (óleo de peixe ou soja, respectivamente), até a data da eutanásia.

Todos os animais foram pesados nos dias de análise da contração da ferida e fotografia. Não houve a necessidade de sedação dos animais para a gavagem, pesagem e fotografia, com estresse mínimo dos mesmos.

As feridas dorsais foram acompanhadas e fotografadas, com técnica padronizada para análise por *software* (Image J, 1,38x, National Institutes of Health, EUA), para cálculo da taxa de contração. Utilizou-se sempre a mesma distância entre a máquina fotográfica e o animal (por meio de suporte de madeira a 20cm da mesa de fotos) e manteve-se sempre o mesmo local para realização das fotografias, além dos parâmetros da máquina (sem *flash*, com dispositivo macro ativado). As fotos foram realizadas no período pós-operatório imediato e no 1º, 3º, 5º e 7º dias pós-operatórios.

Figura 10 – Exemplo de evolução das fotografias de um mesmo animal.



3.3.1. Eutanásia

No 8º dia de pós-operatório realizou-se a eutanásia com dose letal da mistura de quetamina e xilasina. Retiraram-se as amostras para anatomia patológica (dorso) e para o estudo de tração (ventre). O material para estudo anatomopatológico foi acondicionado em formalina 10%. O material para realização de teste tensiométrico foi imediatamente acondicionado em frascos com soro fisiológico 0,9% e encaminhado para realização do mesmo. Todos os testes foram realizados dentro da primeira hora após a eutanásia.

3.3.2. Teste tensiométrico

Foi realizado o estudo tensiométrico das feridas com material retirado do local da incisão do ventre, em espessura total (toda a pele, até o nível da fáscia muscular), em intervalo máximo de uma hora após a ressecção dos corpos de prova. Utilizou-se a máquina universal de ensaio mecânico Emic® modelo DL-500 MF (INSTRON BRASIL EQUIPAMENTOS CIENTÍFICOS LTDA – São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), (Figuras 11 e 12). Cada estudo gerou um relatório contendo as forças máximas e de ruptura a que o corpo de prova foi submetido (FIGURA 13).

Figura 11 - Máquina universal de ensaio mecânico Emic® modelo DL-500 MF.



Figura 12 – Exemplo de estudo de tração.

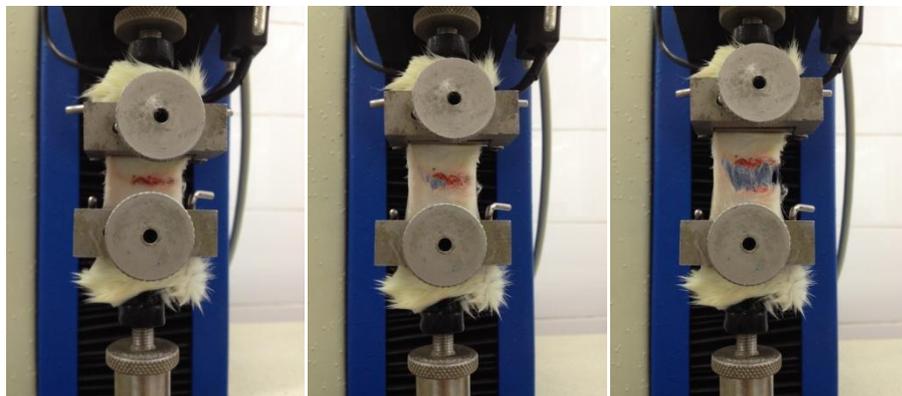


Figura 14 – Exemplo de análise da contração da ferida por meio do *software*.



3.3.4. Estudo anatomopatológico

As feridas excisionais foram retiradas com margem de 5mm de pele normal para envio para análise histopatológica e imunoistoquímica.

Realizou-se coloração com técnica de *Picrosirius Red* para determinação do colágeno em sua quantidade e qualidade, com o colágeno tipo III (imaturo) corando-se de forma esverdeada e o colágeno tipo I (maduro) de forma alaranjado-avermelhada (Figuras 15 e 16). Após análise da ferida e fotografia da área de maior relevância (analisada por patologista experiente, em todas as amostras) com microscópio de luz polarizada, as fotos foram analisadas pelo *software* ImageProPlus (Mídia Cibernética, São Paulo, SP), onde foi possível avaliar o percentual das fibras coradas em alaranjado-avermelhado, as coradas em esverdeados e a sua proporção em relação à outra. Em cada análise, foi considerada somente as áreas ocupadas por fibras colágenas (tipos I e III), desconsiderando outras tonalidades e espaços escuros entre as fibras, com a soma das porcentagens totalizando 100% em cada análise.

Figura 15 – Predominância de colágeno tipo I (maduro, avermelhado).

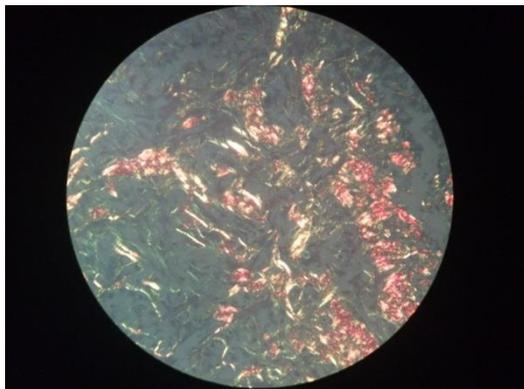


Figura 16 – Predominância de colágeno tipo III (imaturo, esverdeado).



A avaliação imunoistoquímica foi realizada em cada lâmina individualmente conforme descrição do laboratório de análise, com o seguinte método: “microtomia a 4 μ m, sendo os cortes obtidos dispostos em lâminas previamente sinalizadas; estes e os controle positivos, após desparafinização são submetidos ao método imunoistoquímico , pela técnica de detecção pelo sistema ADVANCETMHRP, com painel de anticorpos monoclonais e/ou policlonais , revelados através da diaminobenzidina (DAB). Realizada montagem definitiva em bálsamo sintético e lamínula de 24x 50mm.”

Avaliou-se a quantidade de miofibroblastos na ferida por meio de imunoistoquímica, com o marcador de células de músculo liso, alfa actina de músculo liso – SMA (Figura 17). A quantidade de vasos neoformados, angiogênese foi avaliada por meio de marcador de *stem cells* hematopoiéticas, o imunomarcador CD34 (Figura 18). Nas lâminas de imunoistoquímica o

“positivo” mostra-se em marrom, contra o fundo em hematoxilina-eosina, “negativo”.

Figura 17 – Exemplo de lâmina com imunomarcador para SMA – “positivo” corado em marrom.

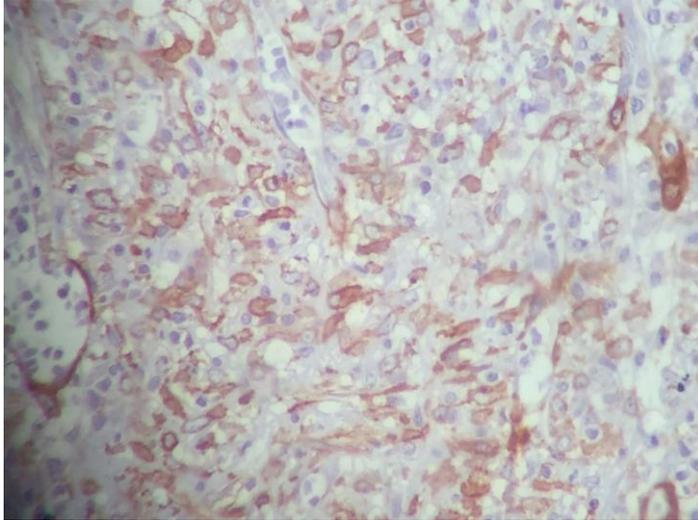
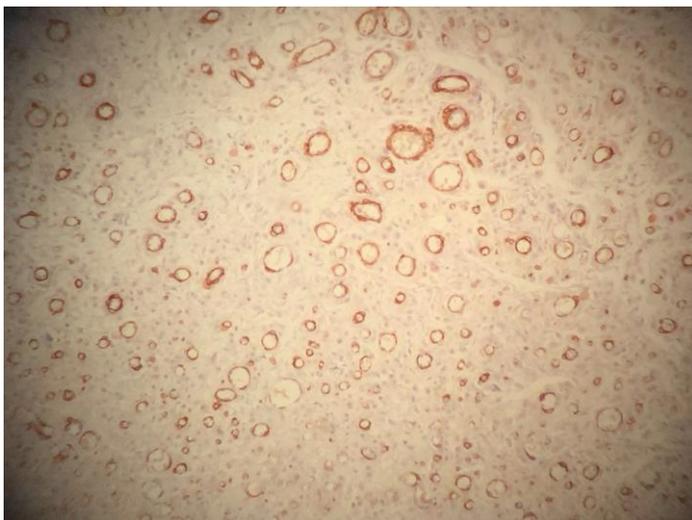


Figura 18 – Exemplo de lâmina com imunomarcador CD34 – “positivo” corado em marrom.



As lâminas foram lidas com determinação da quantidade do imunomarcador, conforme sua presença, em cruzes, de uma a três, de acordo com sua intensidade.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os pesos dos ratos foram avaliados ao longo do tempo para cada um dos quatro grupos a partir de análises de variância (ANOVAs) para dados pareados com testes *a posteriori* de Tukey (ZAR, 2009). Além disso, foram testadas as diferenças entre os pesos dos animais entre grupos distintos usando ANOVAs com testes *a posteriori* de Tukey (ZAR, 2009).

Inicialmente o tamanho das feridas nos quatro grupos estudados (Cper, Cpré, Eper e Epré) foi descrito segundo suas médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximo.

O tamanho das feridas foi analisado em duas etapas distintas. Primeiro se avaliou se dentro de cada um dos quatro grupos havia diferença significativas entre os diferentes tempos; desta forma, foi possível avaliar se, para cada grupo, houve diminuição do tamanho da ferida ao longo do tempo. Para tanto foram usadas ANOVAs para dados pareados com testes *a posteriori* de Tukey (ZAR, 2009).

Em um segundo momento foram avaliadas as diferenças entre os tamanhos em cada etapa do processo (tamanho inicial – 1 dia; 1 a 3 dias; 3 a 5 dias; 5 a 7 dias; e, por fim, inicial a 7 dias) entre os grupos, para avaliar se um grupo teve velocidade de contração diferente dos outros. Para estas análises também foram usadas ANOVAs com testes *a posteriori* de Tukey (ZAR, 2009).

As análises de força máxima e força de ruptura foram efetuadas com ANOVAs e testes *a posteriori* de Tukey; assim como as análises da proporção entre colágeno I e III. (ZAR, 2009).

Foram desenvolvidas análises de correlação de Pearson com o intuito de verificar associação entre a velocidade de contração (dada pela diferença de tamanho do POI-7PO) e as forças máxima e de ruptura.

As análises de diferenças entre os quatro grupos estudados em relação ao miofibroblasto (alfa-actina) e angiogênese (CD34) foram efetuadas com testes de Friedman e testes *a posteriori* de Dunn (ZAR, 2009).

Foram desenvolvidas análises de correlação de Spearman com o intuito de verificar associação entre o miofibroblasto e a velocidade de contração (dada pela diferença de tamanho do POI-7PO) e as forças máxima e de ruptura, assim como entre a angiogênese e a velocidade de contração e as forças máxima e de ruptura (ZAR, 2009).

Os valores de “r” são os valores de força e sentido da correlação (ascendente – sinal positivo; correlação descendente – sinal negativo) e a intensidade da correlação (dado pelo valor em módulo: $r = 0$ ausência de correlação; $0 < r \leq 0,25$ correlação fraca; $0,25 < r \leq 0,5$ correlação moderada fraca; $0,5 < r \leq 0,75$ correlação moderada forte; $0,75 < r < 1$ correlação forte; $r = 1$ correlação perfeita).

Todos os dados passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk, desta forma foram usadas análises paramétricas em todos os casos.

As análises de diferenças entre os quatro grupos estudados em relação ao percentual de colágeno tanto para o colágeno I como para o III foram efetuadas com testes de Kruskal-Wallis e testes *a posteriori* de Dunn (ZAR, 2009).

As análises estatísticas foram efetuadas com o pacote estatístico GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc. – La Jolla, USA) e foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

Dos 60 animais submetidos a estudo, 6 foram à óbito: 3 do grupo controle (2 Cper e 1 Cpre) e 3 do grupo experimento (2 Eper e 1 Epre). Todos os óbitos ocorreram no dia do procedimento cirúrgico devido à complicações anestésicas. Nenhum óbito foi registrado nos dias seguintes. Não foram observados sinais de infecção de ferida operatória em nenhum dos animais, assim como não houve sinais de deiscência das suturas.

4.1. PESO

Não houve variação significativa de peso corporal entre os animais ao longo do experimento.

Ao analisar os pesos dos animais nos diferentes grupos, foi possível observar que houve diferença significativa entre o peso dos animais em diferentes tempos. No entanto não houve diferença significativa do peso dos animais, para um mesmo tempo, entre um grupo e outro (Tabela 3).

Essa variação foi mínima e ocorreu de forma semelhante em todos os grupos. Ou seja, não houve variação de peso dos animais de um mesmo grupo durante todo o experimento. Não houve sinais de desnutrição.

Tabela 3 – Valores de média e desvio padrão (em gramas) dos pesos de 54 ratos. Valores de p associados às análises de variância intra e intergrupos. Letras distintas representam diferenças significativas do teste *a posteriori* de Tukey.

Grupo	Tempo				p (intragrupos)
	CX	3PO	5PO	7PO	
Cper (n=13)	204,9 ± 11,7 ^{AB}	202,1 ± 11,2 ^A	210,1 ± 12,2 ^B	208,9 ± 9,9 ^B	0,001*
Cpre (n=14)	201,6 ± 11,8 ^A	205,2 ± 10,7 ^{AB}	208,6 ± 10,6 ^B	209,3 ± 12,5 ^B	<0,001*
Eper (n=13)	203,2 ± 13,1 ^A	207,3 ± 12,8 ^A	210,6 ± 12,6 ^B	208,0 ± 12,9 ^{AB}	0,014*
Epre (n=14)	210,7 ± 11,7 ^{AC}	204,2 ± 10,8 ^B	208,7 ± 10,1 ^A	212,3 ± 11,7 ^C	<0,001*
p (intergrupos)	0,224	0,702	0,956	0,713	

4.2. CONTRAÇÃO

Observou-se a ocorrência de variação significativa do tamanho da ferida, ao longo do tempo, para todos os grupos estudados (Tabela 4). De forma geral, houve primeiro um aumento e depois uma diminuição gradual dos tamanhos.

Tabela 4 – Valores de média e desvio padrão (em mm²) dos tamanhos das feridas dos 54 animais separados em 4 grupos, e em 5 tempos distintos. Valores de p associados às análises de variância intragrupos (dentro de um mesmo grupo para tempos diferentes). Letras distintas representam diferenças significativas do teste *a posteriori* de Tukey

Grupo	POI	1PO	3PO	5PO	7PO	p
Cper (n=13)	8,7 ± 1,8 ^A	9,1 ± 2,3 ^{AB}	7,5 ± 2,0 ^C	6,1 ± 1,6 ^D	4,2 ± 1,2 ^E	< 0,001*
Cpre (n=14)	10,4 ± 3,0 ^A	12,5 ± 2,5 ^B	9,7 ± 4,3 ^{BC}	6,6 ± 3,0 ^D	4,5 ± 2,2 ^E	< 0,001*
Eper (n=13)	10,7 ± 1,7 ^A	10,4 ± 2,3 ^{AB}	9,0 ± 2,2 ^C	7,1 ± 1,7 ^D	4,8 ± 1,5 ^E	< 0,001*
Epre (n=14)	11,5 ± 1,5 ^A	10,7 ± 2,4 ^{AB}	8,4 ± 2,2 ^C	6,4 ± 1,7 ^D	4,3 ± 1,5 ^E	< 0,001*

* p < 0,05

Ao analisar a diferença entre os tamanhos da ferida entre os grupos (para um mesmo tempo, entre grupos diferentes), constataram-se diferenças significativas, com diminuição do tamanho das feridas, em quase todos os tempos, com exceção do 5^o e 7^o dia (Tabela 5).

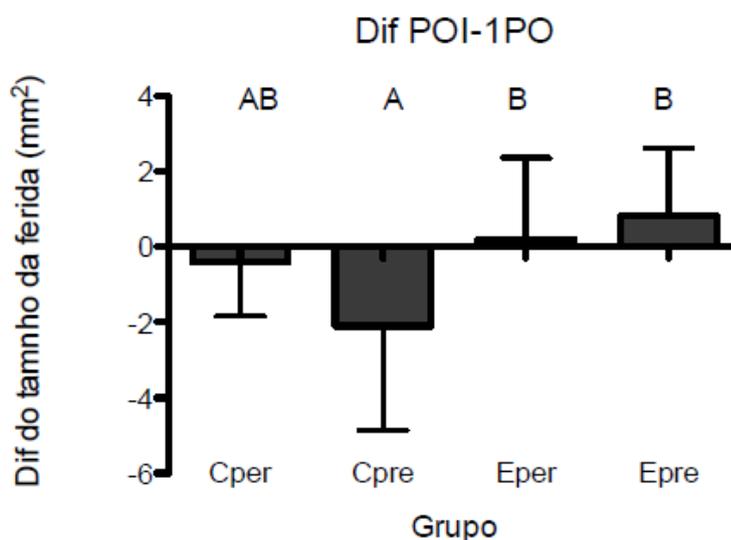
Tabela 5 – Valores de média e desvio padrão (em mm²) das diferenças entre os tamanhos das feridas dos 54 animais separados em 4 grupos, e em 5 tempos distintos. Valores de p associados às análises de variância intergrupos (entre os grupos, para uma mesma variação de tempo). Letras distintas representam diferenças significativas do teste *a posteriori* de Tukey

Tempo	Cper (n=13)	Cpre (n=14)	Eper (n=13)	Epre (n=14)	P
Diferença: POI -1 dia	-0,4 ± 1,4 ^{AB}	-2,1 ± 2,8 ^A	0,2 ± 2,2 ^B	0,8 ± 1,8 ^B	0,004*
Diferença: 1 dia- 3 dias	1,6 ± 1,1 ^A	2,8 ± 1,2 ^B	1,5 ± 1,4 ^A	2,3 ± 1,1 ^{AB}	0,017*
Diferença: 3 dias - 5 dias	1,4 ± 0,8 ^A	3,1 ± 1,7 ^B	1,9 ± 1,1 ^A	2,0 ± 1,0 ^{AB}	0,004*
Diferença: 5 dias - 7 dias	1,8 ± 1,0	2,1 ± 1,2	2,3 ± 0,9	2,1 ± 1,1	0,792
Diferença: POI -7 dias	4,5 ± 1,5 ^A	6,0 ± 1,9 ^{AB}	5,8 ± 1,7 ^{AB}	7,1 ± 1,5 ^B	0,002*

p < 0,05

No tempo 0 (POI) até o 1º dia (1PO), houve diminuição do ferimento para o grupo experimento, enquanto no grupo controle houve aumento do tamanho da ferida (Figura 19).

Figura 19 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm²) entre o POI e 1PO. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas no teste *a posteriori* de Tukey (p= 0,004).



Tanto entre o 1º e 3º dia (Dif 1PO-3PO), como entre o 3º e 5º dia (Dif 3PO-5PO) o grupo Cpre apresentou-se com melhores resultados (maior contração da ferida) do que os grupos Cper e Eper, com diferença estatisticamente significativa (Figuras 20 e 21). O grupo Epre teve sua contração estatisticamente semelhante a todos os outros.

Entre o 5º e 7º dia não houve diferença entre os grupos.

Figura 20 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm²) entre o 1PO e 3PO. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas no teste *a posteriori* de Tukey ($p=0,017$).

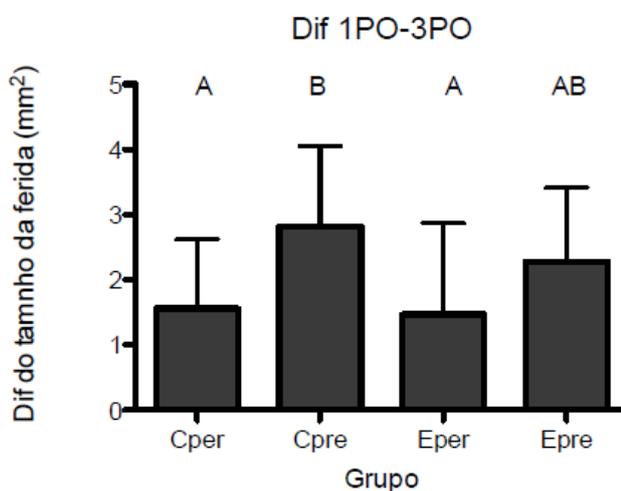
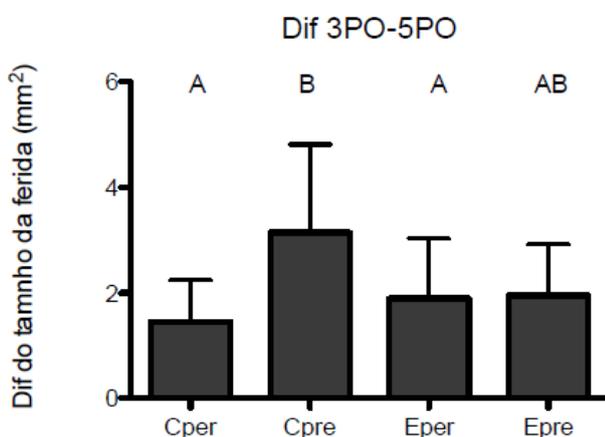


Figura 21 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm²) entre o 3PO e 5PO. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas no teste *a posteriori* de Tukey ($p=0,004$).



Em uma perspectiva mais geral, considerando todo o tempo do experimento (Dif POI – 7PO), é possível observar que o grupo experimento (Epre) foi significativamente melhor (maior contração da ferida) do que o grupo controle (Cper - menor contração da ferida) (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Valores de médias e desvios padrões das diferenças do tamanho da ferida (em mm²) entre o POI e 7PO. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas no teste *a posteriori* de Tukey ($p=0,002$).

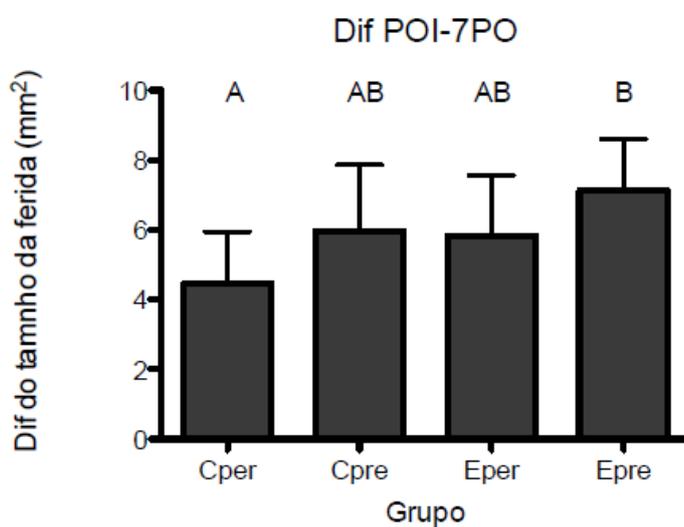
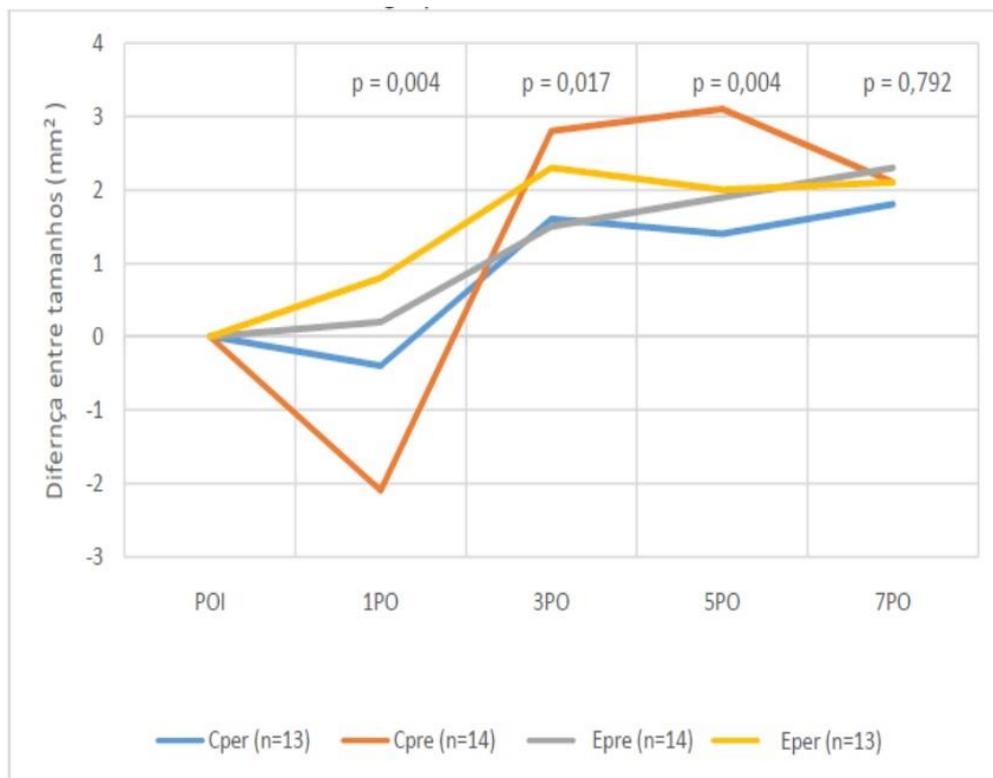


Figura 23 – Progressão da contração das feridas com as médias dos valores de cada grupo (sem o desvio padrão) com manutenção dos piores resultados (menor contração) para o grupo Cper. Melhores resultados (maior contração) nos grupos Eper, Epre e Cpre. Os valores de p se referem as diferenças entre os grupos (ANOVA), para um mesmo tempo.



4.3. TRAÇÃO

No estudo tensiométrico, não foi possível determinar a força de ruptura de duas amostras do grupo controle, por problemas técnicos, sendo estas excluídas dos dados que fizeram parte da análise estatística.

As análises de força não mostraram diferenças significativas entre os grupos, nem para a força máxima e nem para a força de ruptura (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de média e desvio padrão (em Kgf) das forças máxima e de ruptura dos 52 animais. Valores de p associados às análises de variância.

Força	Cper (n=12)	Cpre (n=13)	Eper (n=13)	Epre (n=14)	p
Máxima	0,93 ± 1,00	0,67 ± 0,18	0,69 ± 0,22	0,68 ± 0,25	0,553
Ruptura*	0,59 ± 0,56	0,48 ± 0,17	0,50 ± 0,22	0,48 ± 0,23	0,884

As análises de correlação não mostraram valores significativos entre as forças máxima e de ruptura e a velocidade de contração (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores das correlações entre a velocidade de contração (diferença entre o tamanho POI e 7PO) e forças máxima e de ruptura. Nenhum valor apresentou significância estatística na correlação de Pearson.

Força	Cper	Cpre	Eper	Epre	Geral
Máxima	-0,26	0,04	-0,18	0,09	-0,18
Ruptura	0,02	-0,17	-0,42	0,22	-0,13

A força máxima e a de ruptura não apresentaram diferenças entre os grupos e não tiveram correlações significativas com nenhuma das outras variáveis estudadas.

4.4. IMUNOISTOQUÍMICA

As análises das quantidades (intensidades) de miofibroblasto e a angiogênese não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de mediana (valores mínimo e máximo) do miofibroblasto e angiogênese dos 54 animais separados em 4 grupos distintos. Valores de p associados ao teste de Friedman.

Variável	Cper (n=13)	Cpré (n=14)	Eper (n=13)	Epré (n=14)	p
Miofibroblasto (Alfa-actina)	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	0,872
Angiogênese (CD34)	2 (1-3)	2 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-2)	0,440

As análises de correlação entre as variáveis estudadas mostraram os seguintes achados:

- Relação forte ($r=0,85$) entre miofibroblastos e a força de ruptura. Quanto maior presença de miofibroblastos, maior força de ruptura para o grupo experimento (Epre – $p=0,011$);

- Relação forte ($r=0,80$) entre CD34 e a força de ruptura. Quanto maior presença de CD34, maior força de ruptura para o grupo controle (Cpre – $p=0,03$) (Tabela 9, figuras 24 e 25).

Tabela 9 – Correlações de Spearman entre variáveis de interesse separadas nos 4 grupos distintos. Valores significativos ($p<0,05$) estão representados com asterisco.

Correlação	Cper	Cpré	Eper	Epré
Miofibroblasto X Força máxima	0,25	-0,18	-0,05	-0,07
Miofibroblasto X Força de ruptura	0,19	0,36	-0,51	0,85*
Miofibroblasto X Contração (POI-7PO)	-0,09	0,00	0,34	0,02
CD34 X Força máxima	-0,43	0,52	0,31	-0,17
CD34 X Força de ruptura	-0,29	0,80*	0,56	0,00
CD34 X Contração (POI-7PO)	0,18	-0,11	-0,41	-0,17

Figura 24 – Relação entre miofibroblasto e força de ruptura para o grupo Epre.

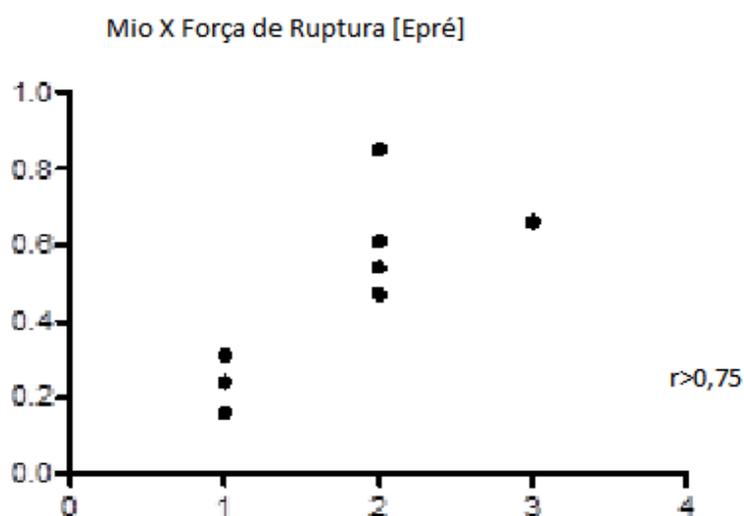
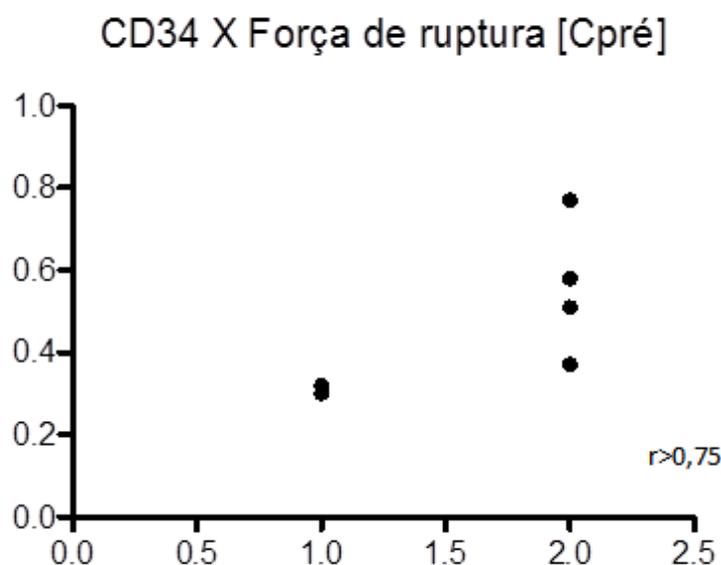


Figura 25 – Relação entre CD34 e força de ruptura para o grupo Cpre.



4.5. COLÁGENO

As análises de diferenças entre o percentual de colágeno tanto para o colágeno tipo I (maduro) quanto para o colágeno tipo III (imaturo) mostraram que:

- Para o colágeno I os valores são, em média, menores no grupo experimento do que no grupo controle;
- Para o colágeno III os valores são, em média, maiores no grupo experimento do que no grupo controle;
- Não há diferença entre os grupos “per” e “pré” e sim somente entre os grupos experimento e controle (Tabela 10, figuras 26 e 27).

Tabela 10 – Valores de média desvio padrão do percentual de colágeno para colágeno tipos I e III nos 54 animais separados em 4 grupos distintos. Valores de p associados ao teste de Friedman. Letras distintas representam diferenças significativas do teste *a posteriori* de Dunn

Variável	Cper (n=13)	Cpré (n=14)	Eper (n=13)	Epré (n=13)	p
Colágeno I	24,4 ± 2,5 ^A	30,9 ± 4,5 ^A	10,2 ± 3,0 ^B	14,4 ± 1,7 ^B	<0,001*
Colágeno III	12,1 ± 3,3 ^A	17,2 ± 6,1 ^A	29,9 ± 5,9 ^B	25,9 ± 3,2 ^B	<0,001*

* p < 0,05

Figura 26 – Percentual significativamente menor de colágeno tipo I (maduro) nas feridas dos grupos experimento (Eper e Epre) em relação às feridas do grupo controle (Cper e Cpre). Cada ponto do gráfico representa um animal ($p < 0,001$).

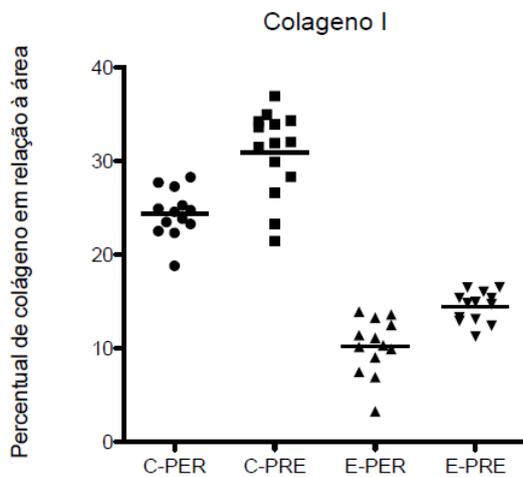
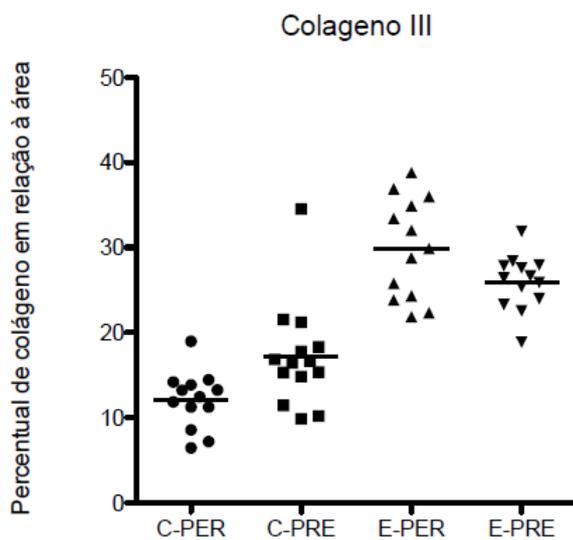


Figura 27 – Percentual significativamente maior de colágeno tipo III (imaturo) nas feridas dos grupos experimento (Eper e Epre) em relação às feridas dos grupos controle (Cper e Cpre). Cada ponto do gráfico representa um animal ($p < 0,001$).



5. DISCUSSÃO

5.1 IMUNONUTRIÇÃO E O ÔMEGA-3

A imunonutrição, e sua influência na cicatrização são alvo de interesse e controvérsia. Enquanto a falta de alguns nutrientes comprovadamente prejudica a cicatrização, a suplementação nutricional com nutrientes imunomoduladores não parece trazer melhora consistente da mesma (CHOW e BARBUL, 2014).

Existe concordância de que um ambiente nutricional “ideal” pode ajudar a cicatrização, porém existe muito debate em torno da natureza desse ambiente e como ele pode ser criado. Além disso, muito da pesquisa de como a nutrição afeta a cicatrização é extrapolada de outros estudos cujo foco é em outros desfechos, como ventilação, infecção e mortalidade (CHOW e BARBUL, 2014). Existem poucos estudos experimentais que avaliem a influência de componentes da imunonutrição sobre a cicatrização. Ainda menos que avaliem a influência sobre a cicatrização cutânea.

No presente estudo investigou-se a influência do uso do ácido graxo ômega-3 (componente da imunonutrição) sobre a cicatrização cutânea em um modelo experimental.

Apesar de comumente conhecidos por seu papel no armazenamento energético e composição estrutural de membranas, os AGPI, como AA, EPA e DHA, são metabolicamente transformados em uma gama de potentes moléculas sinalizadoras, com papel na regulação de processos celulares tais como inflamação e coagulação sanguínea (DOBSON, BARROW, KRALOVEC e ADCOCK, 2013). Estudos como o de Campos (2012) têm demonstrado que os componentes lipídicos da dieta apresentam importância na resposta imunológica.

O consumo aumentado de AGPI de cadeia longa n3, como EPA e DHA, resulta em proporções aumentadas desses ácidos graxos nos fosfolípidos das células inflamatórias. A incorporação do EPA e DHA nessas células é dose dependente e por competição. Por deixar menos substrato disponível para produção de eicosanoides, por competição com o ácido araquidônico, a

suplementação com óleo de peixe leva a menor produção de prostaglandina E2, tromboxano B2, leucotrieno B4, ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico e leucotrieno E4 pelas células inflamatórias (CALDER, 2002; CALDER, 2006).

A maior parte dos metabólitos derivados de n6 são pró-inflamatórios (à exceção das lipoxinas) e os derivados de n3 tendem a ativar menos a resposta inflamatória. As prostaglandinas produzidas do EPA, por exemplo, são pró-inflamatórias, porém com potencial muito menor do que as produzidas a partir do AA (DOBSON, BARROW, KRALOVEC e ADCOCK, 2013).

EPA também pode ser utilizado como substrato para duas enzimas na cadeia de produção dos eicosanoides, dando origem a mediadores que têm menor potência inflamatória do que aqueles gerados a partir do ácido araquidônico (CALDER, 2006). A redução na produção de mediadores derivados do AA que se segue ao consumo de óleo de peixe levou à ideia de que ele teria menor ação inflamatória do que os outros AGPI (CALDER, 2002; MICHAELI, BERGER, REVELLY, TAPPY e CHIOLÉRO, 2007).

Os n3 demonstraram outros efeitos anti-inflamatórios que não somente os dependentes da alteração na produção de eicosanoides, como diminuição na quimiotaxia de leucócitos, diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias e diminuição na expressão de moléculas de adesão (CALDER, 2002).

Como os AGPI n3 exercem modulação da resposta inflamatória, não há comprovação de que não causam efeitos deletérios à cicatrização, por reduzir a resposta inflamatória necessária ao andamento do processo cicatricial. A maioria dos estudos existentes extrai conclusões de outros desfechos que não a cicatrização cutânea ou apresenta modelo de desnutrição, onde o n3 já tem papel comprovado na recuperação nutricional (TORRINHAS, 2013; VIZZOTTO, 2015).

5.2 MÉTODO

Utilizou-se como modelo experimental nesse estudo, ratas. Existe a descrição de que os androgênios são responsáveis por imunodepressão e que os esteroides femininos previnem essa supressão da resposta imune causada pelos androgênios, nos modelos experimentais, influenciando o curso da doença no trauma severo ou sepse (MAYER *et al.*, 2003). Não foi avaliada a influência dos androgênios no presente estudo, porém o grupo foi composto homogeneamente de animais do mesmo sexo, estando todos sob a mesma influência hormonal.

Sabe-se que a cicatrização nos ratos é diferente da humana, pois ocorre principalmente por contração (PEREZ e DAVIS, 2008). Alguns estudos sugerem o uso de talas ao redor das feridas criadas, para tentar diminuir a discrepância e estudar outros fatores da cicatrização sem a interferência da contração exagerada. Não foi vista a necessidade da realização de tais procedimentos complementares, pois o estudo da contração da ferida em sua evolução foi um dos focos de experimento.

A emulsão lipídica contendo n3 foi administrada em dose de 100mg/kg de peso (solução manipulada de óleo de peixe, concentração 20mg/ml com proporção EPA e DHA de 80:20). Esse dado correlaciona-se positivamente aos achados na literatura, onde, em estudo de Hall (2006), viu-se que a resposta máxima de concentração plasmática de DHA ocorreu com cerca de 175mg/kg de peso de n3 (HALL, PICTON, SKINNER, JEWELL e WANDER, 2006).

No presente estudo foi utilizado como lipídeo de controle o óleo de soja. Este é predominantemente n6 e poderia ter implicação no aumento da resposta inflamatória, prejudicando o controle.

Calder (2006), em sua revisão, comenta diversos estudos onde a sugestão é de que o consumo moderado de ácido araquidônico (derivado n6) resulta na maior incorporação desse ácido nas células envolvidas com a inflamação, aumentando a produção de eicosanoides inflamatórios. Porém não há descrição, nesses estudos, de alteração na produção de citocinas inflamatórias, geração de superóxido ou aumento das moléculas de adesão. Os lipídeos contidos nas emulsões utilizadas em suporte nutricional

tradicionalmente são baseados em óleo de soja, que é rico em ácido linoleico $n6$, precursor do ácido araquidônico, que é incorporado aos fosfolípidos de membrana celular e pode gerar aumento na produção de eicosanoides, conforme previamente discutido. Isso poderia contribuir para um estado onde os processos fisiológicos tornar-se-iam desregulados. Alguns estudos demonstram que as emulsões ricas em $n6$ podem trazer malefício como piora da função imune. Outros estudos demonstram que não há diferença, sendo ainda esse um assunto controverso (CALDER e DECKELBAUM, 1999; CALDER, 2002).

A descrição inicial de miofibroblastos no tecido de granulação foi baseada em características estruturais, sendo a mais típica delas a presença de agrupados de microfilamentos longitudinais com corpos densos difusos.

Os miofibroblastos foram então identificados em diversos tecidos patológicos, assim como em tecidos normais, onde pareciam exercer atividade contrátil. A alfa actina de músculo liso é presente em praticamente todas as células musculares lisas, no entanto é expressa em diferentes proporções comparadas com outras isoformas da actina, de acordo com o órgão e com a situação (fisiológica ou patológica).

Estudo de Darby (1990) analisou aspectos do citoesqueleto dos fibroblastos do tecido de granulação de feridas em ratos em diversos intervalos de tempo, onde se viu que os miofibroblastos derivam dos fibroblastos locais, que temporariamente desenvolvem algumas características de músculo liso, que desaparecem logo que a ferida é totalmente epitelizada. A positividade dos fibroblastos para alfa actina aparece no 6º dia e torna-se claramente visível no 8º dia. A contração da ferida ocorre de forma linear após o 4º dia, o que sugere que a contração não é inteiramente dependente do miofibroblasto, ocorrendo, ao menos em sua fase inicial, governada pelas forças de tração (DARBY, SKALLI e GABBIANI, 1990). Esse fato correlaciona-se com os achados do presente, onde se veem miofibroblastos marcados nos espécimes e há importantes taxas de contração, mesmo nas fases precoces da cicatrização. Em estudo futuro pode-se mensurar os miofibroblastos durante todo o processo de cicatrização e correlacionar de forma mais pormenorizada esses dados.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Peso

Os resultados apresentados sugerem que, apesar de existirem diferenças de peso ao longo da semana para todos os animais, esta variação se dá de forma similar entre os diferentes grupos, sem evidência de desnutrição no presente estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos experimento e controle, o que é esperado, uma vez que foram utilizadas fórmulas isocalóricas e isovolumétricas.

O n3 tem importante papel na recuperação nutricional após desnutrição, tanto em humanos (TORRINHAS, 2013) como no modelo experimental em ratos, conforme visto nos estudos de VIZZOTTO (2015).

Quando não há desnutrição, diminui-se o viés do benefício já estabelecido da terapia nutricional pré-operatória (GONÇALVES *et.al.*, 2009). Assim, nos ratos sem desnutrição, parece não haver influência no peso, tanto com suplementação com n3, tanto pré como peroperatória. O mesmo foi visto em estudo de CASTILHO (2015). Esse achado foi similar ao achado com outras dietas especializadas, tanto em humanos (GIANOTTI, 2002) como em ratos (ONO, 2014).

5.3.2 Contração

A contração das feridas ocorreu em todos os ratos.

No primeiro momento de avaliação (1PO), houve contração da ferida nos grupos de experimento, enquanto nos grupos controle houve aumento da mesma. Esse achado difere de estudos com metodologia semelhante, como o de ONO *et.al.* (2014).

Inicialmente, do primeiro ao quinto dia (1PO-3PO e 3PO-5PO) houve menor contração no grupo experimento e maior contração do grupo controle. Esse resultado, no entanto, não se manteve.

Houve maior taxa de contração (diminuição mais acentuada da ferida) entre a data da cirurgia e a data da eutanásia (POI-7PO), no grupo que

recebeu suplementação com n3 no pré-operatório, em relação ao grupo controle que recebeu n6 no pré e pós-operatório.

A contração tem por objetivo diminuição da área e posterior fechamento da ferida. O miofibroblasto é o responsável pela contração da ferida. Nesse estudo foi realizada imunistoquímica para avaliação da quantidade de miofibroblasto, por meio da *alfa-actina* de músculo liso, porém não houve correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de miofibroblasto e a contração da ferida. Não houve diferença estatística entre a quantidade de miofibroblasto entre o grupo experimento e o controle.

Estudo de Ono *et al.* (2014) que avaliou a influência de dieta imunomoduladora (Impact®) sobre a contração da ferida cutânea em ratos demonstrou maior contração no grupo suplementado, a partir do 3º dia de pós-operatório, sem diferença entre o grupo que foi suplementado pré e peroperatoriamente. A dieta Impact® possui, em média, 3,06g de n3 por litro, além de outros nutrientes como arginina, vitaminas e minerais (NESTLÉ, 2015). Assim como em outros estudos, e conforme discutido previamente, somente poder-se-ia extrapolar o fato de que o n3 teria influência nesse resultado. Na Impact® existem outros nutrientes, como a arginina, que têm influência benéfica na cicatrização (ONO, MATIAS e CAMPOS, 2014). Segundo Kavalukas e Barbul (2011), arginina parece não influenciar positivamente a reepitelização das feridas cutâneas, porém, por meios ainda não completamente elucidados, aumenta a deposição de colágeno e proteínas nas mesmas (KAVALUKAS e BARBUL, 2011).

No presente estudo, o grupo experimento teve fechamento mais rápido da ferida, porém sem diferença na quantidade de miofibroblastos, assim como nos outros parâmetros estudados (força, angiogênese e colágeno).

5.3.3 Tração e colágeno

Não houve diferença estatística entre a força tênsil das cicatrizes do grupo experimento e controle, tanto para força máxima como para força de ruptura, apesar de diferenças significativas em relação à qualidade do colágeno entre os grupos, que serão discutidas a seguir.

Estudo de CASTILHO (2015), com suplementação com n3 *versus* n9 em anastomoses colônicas em ratos sem desnutrição apresentou resultados semelhantes. Já VIZZOTTO (2015), com suplementação no rato desnutrido, observou diferenças, com atenuação do efeito da desnutrição na força tênsil da anastomose no grupo suplementado com n3. ONO *et al.* (2014), demonstraram achados de melhora da força de cicatrizes cutâneas em ratos que receberam a dieta Impact®.

No presente estudo acharam-se quantidades médias menores de colágeno tipo I (maduro) no grupo experimento do que no grupo controle. Já para o colágeno tipo III (imaturo) são encontrados maiores valores médios no grupo experimento, suplementado com n3. Não há diferença estatística entre os grupos “pré” e “per”. Esse achado sugere que a suplementação enteral no n3 pode retardar a deposição do colágeno maduro na ferida cutânea em ratos.

A síntese do colágeno tem seu pico ao redor do 7º dia após a lesão, com posterior equilíbrio entre síntese e degradação após o 14º dia. Com o passar do processo de cicatrização há maturação do colágeno e predominância de colágeno tipo I (maduro) (SEN e ROY, 2013). No presente estudo foi feita avaliação do colágeno da ferida na data da eutanásia (8º dia após procedimento) observando-se os achados comentados acima. Em estudo de Albina, Gladden e Walsh (1993), com modelo de ferida dorsal em ratos e nutrição com dieta enriquecida com óleo de peixe *versus* óleo de milho, no momento 10 dias após suplementação, as feridas tiveram a mesma resistência tênsil. Após 30 dias, as feridas dos ratos suplementados com n3 foram significativamente mais fracas, porém ambas apresentaram a mesma quantidade e qualidade de colágeno. Os autores acreditam que o n3 interferiu na fibroplasia e/ou na maturação do colágeno durante a cicatrização. No presente estudo viu-se maturação do colágeno retardada no grupo suplementado com n3. Não houve diferença na força tênsil entre os grupos, porém a avaliação foi feita com animais que receberam no máximo 14 dias de suplementação.

Em ratos tratados com dexametasona e suplementados com solução parenteral de n3 não houve alteração nos níveis de hidroxiprolina das feridas (GERCEK *et.al.*, 2007). Porém a resposta cicatricial é tão alterada pelo uso do

corticoide que não se pode descartar que o ômega-3 possa ter efeito deletério sobre a cicatrização. Sendo assim, autores como Kavalukas e Barbul (2011) recomendam a suspensão de suplementos orais de ômega-3 previamente a realização de cirurgias plásticas, por acreditarem que ele é deletério à cicatrização. Quanto tempo antes do procedimento ele deve ser suspenso para que se elimine seu efeito ainda não é conhecido (KAVALUKAS e BARBUL, 2011).

Alterações no conteúdo de ácidos graxos e a composição do meio produzem mudanças substanciais nas membranas celulares, resultando em alteração da sinalização celular e metabolismo (RUTHIG e MECKLING-GILL, 1999). Os ácidos graxos n3 e n6, apesar de isocalóricos, induzem respostas amplamente diferentes no sistema imune. O uso do n3 poderia então ser maléfico à cicatrização, uma vez que o monócito é o grande maestro de sua evolução (MAYER *et al.*, 2003).

Os ácidos graxos n3 exibem propriedades de inibição da produção de eicosanoides e outros mediadores, como fator ativador de plaquetas, IL1 e TNF α . A redução no TNF α após longo tempo de ingestão de óleo de peixe já é descrita há tempos, porém o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não foi elucidado. O enriquecimento da membrana celular com n3 tem efeito inibitório na atividade fosfolipolítica, levando a regulação negativa de segundos-mensageiros, fluxo de cálcio e ativação de cinases. Sob influência de infusão de n3, existe a geração de eicosanoides derivados de EPA, como leucotrieno B5 e tromboxano A3, que têm capacidade inflamatória muito menor comparados aos derivados do ácido araquidônico (leucotrieno B4 e tromboxano A2). Arnold e Barbul (2006) descreveram que animais com dieta rica nesse ácido graxo (n3) apresentaram cicatrizes mais fracas por menor qualidade, *cross-linking* e orientação espacial de fibrilas de colágeno. O benefício real do n3 pode estar em sua modulação imune mais do que na sua influência na cicatrização. O n3 pode levar a resolução mais rápida da inflamação. Apesar do papel certo do n3 na modulação da inflamação, ainda não se sabe a sua real influência sobre a cicatrização (CHOW e BARBUL, 2014).

Essa afirmação é condizente aos achados do colágeno do presente curso, uma vez que houve diferença significativa em relação à qualidade do colágeno, com o grupo suplementado com n3 apresentando maior quantidade de colágeno imaturo. Houve atraso na maturação do colágeno no grupo suplementado com esse lipídeo. Não foi observada diferença significativa em relação à força tênsil da cicatriz.

5.3.4 Imunoistoquímica

As análises de miofibroblastos e angiogênese não mostraram diferenças significativas entre os grupos.

Ao correlacionar as variáveis estudadas, achou-se significância estatística nas seguintes relações:

- Maior força de ruptura com maior número de fibroblastos no grupo experimento;
- Maior força de ruptura com maior número de vasos/angiogênese (CD34) no grupo controle.

Não houve correlação entre as variáveis imunoistoquímicas e a contração das feridas. Esse fato seria o esperado, uma vez que houve maior contração no grupo experimento e esta é principalmente comandada pelo miofibroblasto.

Estudo de Farahpour e Mavaddati (2012) com uso tópico de óleo de flor estrela (*borage extract*), rico em ALA e ácido gama linolênico, em feridas cutâneas em ratos não desnutridos, demonstrou concentração normal de células inflamatórias no 3º dia após o uso. Já no 14º e 21º dias após o uso, o grupo que utilizou o extrato teve número de células inflamatórias, angiogênese e fibroplasia menores que o grupo controle, sem no entanto, afetar a contração da ferida, que foi similar entre os grupos. No presente estudo a angiogênese não foi significativamente diferente no grupo em uso de n3.

Coelho *et al.* (2012), assim como Marques *et al.* (2004) obtiveram cicatrização satisfatória de modelos equino e ovino com o uso tópico de óleo de girassol, rico em ácido oleico e linoleico (65%). No segundo, houve maior contração das feridas e maior desenvolvimento de tecido de granulação nas

feridas tratadas topicamente com óleo de girassol *versus* feridas tratadas com emoliente simples (petrolato). Eles acreditam na capacidade pró-inflamatória do ácido linoleico, com maior migração de granulócitos e macrófagos, assim como sua ação sobre o tecido de granulação e estímulo a fatores de crescimento. O ácido linoleico poderia estimular a cicatrização por estímulo a fase inflamatória.

Oliveira (2013) demonstrou menor expressão de COX e maior expressão de VEGF em feridas cutâneas de ratos tratadas com óleo de semente de abóbora (*Curcubita pepo*), que tem em sua composição 55% de ômega-6 e 23% de ômega-9. Existe discussão sobre a proporção desses AGPI, que agiriam de forma benéfica, estimulando a cicatrização, modulando as fases inflamatórias. No estudo de Oliveira (2013) foi utilizado o ácido graxo de forma tópica e não como suplementação nutricional. No presente estudo foi utilizado somente n3 isolado e como suplementação nutricional, sendo necessários mais estudos experimentais com foco em cicatrização cutânea com diferentes proporções de n3:n6 para real avaliação dos benefícios.

Há a necessidade de novos estudos com avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão para avaliação mais profunda da modulação inflamatória relacionada à suplementação de óleo de peixe e de soja neste modelo experimental.

Investigações futuras devem procurar identificar qual é a população ideal, tempo e composição ideal de dieta imunomoduladora para otimização da cicatrização (CHOW e BARBUL, 2014).

6. CONCLUSÕES

Na presente pesquisa, ratas eutróficas foram suplementadas com lipídeos n3 ou n6. O tipo de AGPI suplementado não se associou a alterações no peso, força tênsil da cicatriz, quantidade de miofibroblastos e neoangiogênese, no período estudado.

A suplementação enteral com n3 no período pré-operatório, em ratas eutróficas, associou-se a maior taxa de contração de ferida excisional em relação às ratas suplementadas pré e peri operatoricamente com n6. Não houve relação, neste estudo, entre a contração das feridas e as quantidades presentes de miofibroblastos e CD34.

Houve atraso na maturação do colágeno, com o grupo suplementado com n3 apresentando valores médios de colágeno tipo III (imaturo) superiores ao grupo controle. A força tênsil não teve diferença independente do lipídeo suplementado e não apresentou relação com o colágeno, durante o período incluído nesse estudo.

REFERÊNCIAS

ALBINA J.E.; GLADDEN P.; WALSH WR. Detrimental effects of an omega-3 fatty acid-enriched diet on wound healing. **Journal of parenteral and enteral nutrition**. Thousand Oaks, n. 17, p. 519-521, nov./dez. 1993.

ARNOLD M.; BARBUL A. Nutrition and Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v. 117, n. 7S, p. 42S-58S, abr. 2006.

BARBUL A. Immune aspects of wound repair. **Clinis in Plastic Surgery**, Maryland Heights, v. 17, n. 3, p. 433-442, jul. 1990.

BJERVE K. S. n-3 Fatty Acid Deficiency In Man. **Journal Of Internal Medicine Supplement**. v. 225, n. S731, 1989.

BROUGHTON G. II.; JANIS J. E.; ATTINGER C. E. Wound Healing: An Overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v.117, n.7S, p.1e-S-32e-S, jun. 2006.

CALDER P. C.; DECKELBAUM R. J. Dietary lipids: more than just a source of calories. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, London, v.2, n. 2, p. 105–107, mar. 1999.

CALDER P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 433-446, abr. 2003.

CASTILHO T. J. C. de. **Efeito do ácido graxo ômega-3 na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo tensiométrico, densitometria e histologia do colágeno.** 88 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CHOW O.;BARBUL A. Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration. **Advances In Wound Care**, v. 3, n. 1, p. 46-48, 2014.

COELHO, C.S. et al. Uso do óleo de semente de girassol (*Helianthus annuus* L) no tratamento de lesões cutâneas no metatarso de um equino: relato de caso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n.1, p.125-129, 2012.

DAVIDSON J. M. Experimental animal wound models. **Wounds**, Malvern, v. 13, n. 6, p. 9-23, nov./dez. 2001.

DOBSON E. P.; BARROW C. J.; KRALOVEC J. A.; ADCOCK J. L. Controlled formation of mono- and dihydroxy-resolvins from EPA and DHA using soybean 15-lipoxygenase. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n.5, p. 1439-1477, mai. 2013.

DORSETT-MARTIN W. A; WYSOCKI A. B. Rat Models of Skin Wound Healing. In: CONN P. M (Ed.). **Sourcebook of Models for Biomedical Research**. Totowa: Humana Press Inc., 2008. P. 631-638.

DUNN L. et al. Murine model of wound healing. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 28, n. 75, p. e50265, mai. 2013.

ESCÁMEZ M. J. et al. An In Vivo Model of Wound Healing in Genetically Modified Skin-Humanized Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, Chapel Hill, v. 123, n. 6, 1182–1191, dez. 2004.

FARAHPOUR M.R.; MAVADDATI A.H. Effects of borage extract in rat skin wound healing model, histopathological study. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 5, p. 651-656, fev. 2012.

FERREIRA A. M.; SOUZA B. M. V. DE.; RIGOTTI M. A.; LOUREIRO M. D. R. UTILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA NACIONAL. **REVISTA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA USP**. SÃO PAULO, N. 46, P. 752-60, JUL. 2012.

FERREIRA C.M; D'ASSUMPÇÃO E.A. Cicatrizes Hipertróficas e Quelóides. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 21, n.1, p.40-48, jan/fev/mar. 2006.

FUTAMURA A., et al. Experimental Research on Stimulation of Wound Healing by n-3 Fatty Acids. **Wounds**, Malvern, v. 25, n. 7, p. 186-192, jul. 2013.

GERCEK A., et al. Effects of parenteral fish-oil emulsion (Omeganven) on cutaneous wound healing in rats treated with dexamethasone. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 31, n. 3, p.161-166, 2007.

GIANOTTI L. et.al. 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, 2002.

GONÇALVES C. G. et.al. Influence of preoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 83-89, 2009.

GOTTRUP F.; AGREN M. S.; KARLSMARK T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. **Wound Repair and Regeneration**, Malden, v. 8, n. 2, p. 83-96, mar./abr. 2000.

GRAPHPAD PRISM versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com

HANKENSON K. D. et al. Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 223, n. 1, p. 88-95, jan.2000.

JANIS J. E.; HARRISON B. Wound Healing: Part I. Basic Science. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v.133, n.2, p.199e-207e, fev. 2014.

KAVALUKAS S. L.; BARBUL A. Nutrition and Wound Healing: An Update. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v. 127, n. 1S, p. 38S-43S, 2011

LU Y.; TIAN H.; HONG S. Novel 14,21-dihydroxy-docosahexaenoic acids:structures, formation pathways, and enhancement of wound healing. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5, p. 923-932, mai. 2010.

MAGALHÃES, M.S.F., et al. Efeito da combinação de triglicerídeos de cadeia média, ácido linoléico, lecitina de soja e vitaminas A e E na cicatrização de ferida em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.23, n.3, p. 262-269, 2008.

MANUAL DE NORMALIZAÇÃO DE DOCUMENTOS Científicos: de acordo com as normas da ABNT – Universidade Federal do Paraná, sistema de bibliotecas – elaboração. Curitiba, 2015.

MARIANE C. B.; FABIANA M. M. S. de.; ROSA W. T.; MARIA I. T. D. C.; CRISTINA C. D. L. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos?. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 54, n. 6, p. 459-466, 2014.

MARIK P. E.; FLEMMER M. Immunonutrition in the surgical patient. **Minerva Anestesiologica**, Torino, v. 78, n. 3, p. 336-340, mar. 2012.

MARQUES S.R. et al. Efeitos da aplicação tópica de óleo de semente de girassol em feridas cutâneas, em carneiros. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 3, jun. 2004.

MCCUSKER M. M.; GRANT-KELS J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. 440-451, jul. 2010.

MCDANIEL J. C.; BELURY M.; AHIJEVYCH K.; BLAKELY W. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Malden, v. 16, n. 3, p. 337-345, mai./jun. 2008.

MCDANIEL J.C.; MASSEY K.; NICOLAOU A. Fish oil supplementation alters levels of lipid mediators of inflammation in microenvironment of acute human wounds. **Wound Repair and Regeneration**, Malden, v. 19, n. 2, p. 189-200, mar./abr. 2011.

MOGFORD J. E.; MUSTOE T. A. Experimental models of wound healing. In: FALANGA V. (Ed.). **Cutaneous wound healing**, London: Martin Dunitz, 2001. p. 109-122.

OLIVEIRA M. L. M. de. **Modulação da Resposta Imune- Inflamatória e Cicatricial em Modelos Experimentais Promovida pelo Óleo Essencial de Lippia sidoides Charn., Rico em Timolol e, Pelo Óleo Fixo de Curcubita pepo L., Rico em Ácidos Graxos Insaturados ω -6 E ω -9.** 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

ONO M. C. C. et.al. Influence of immunonutritional supplementation on skin wound healing in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 29, n. 3, p. 431-437, 2012.

ONO M. C. C.; MATIAS J. E. F.; CAMPOS A. C. L. Imunonutrição e cicatrização. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 43, n.1, p.84-89, jan-mar 2014.

PAREKH N. R.; STEIGER E. Percentage of weight loss as a predictor of surgical risk: from the time of Hiram Studley to today. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 19, n. 5, p. 471-476, 2004.

PEREZ R.; DAVIS S. C. Relevance of Animal Models for Wound Healing. **Wounds**, Malvern, v. 20, n. 1, jan. 2008.

ROHRICH R. Current Concepts in Wound Healing: Update 2011. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v.127, n. 1S, p.1S-2S, jan. 2011.

SILVA T. M. da. **Depressão na doença de Parkinson: possibilidades terapêuticas dos ácidos graxos polinsaturados da família Omega-3.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

TARDELI H. C.; SOUTO C. Cicatrização da Pele. In: MÉLEGA J.M.; VITERBO F. e MENDES F.H. (Ed.) **Mélega. Cirurgia Plástica – Os Princípios e Atualidade.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

THEILLA M, et al. Impact of a Nutritional Formula Enriched in Fish Oil and Micronutrients on Pressure Ulcers in Critical Care Patients. **American Journal of Critical Care**, Aliso Viejo, v. 21, n. 4, p. 102-109, 2012.

TOLAZZI A. R. D. et al. Influence of Leukotriene Inhibitor Montelukast on Wound Contraction and Cutaneous Healing Process in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, Hanover, v. 33, n. 1, p. 84-89, jan. 2009.

TORRINHAS R. S. M. M. de. **Efeito da infusão pré-operatória de emulsão lipídica parenteral de óleo de peixe sobre a resposta imunológica pós-operatória e a evolução clínica imediata de pacientes com câncer gastrintestinal.** 125 f. Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TORRINHAS R. S.; RODRIGUES L. S.; WAITZBERG D. L. Ácidos Graxos e Ômega-3 em Cirurgia. In: CAMPOS A. C. L. (Ed.). **Tratado de Nutrição e Metabolismo em Cirurgia.** Rio de Janeiro: Rubio, 2012.

ZAR J. H. 2009. **Biostatistical Analysis**. 5ed. Prentice Hall. 950p

ZHENG Y. et al. Application of perioperative immunonutrition for gastrointestinal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v. 16, n. 1S, p. 253-257, 2007.

MICHAELI B.; BERGER M. M.; REVELLY J. P.; TAPPY L.; CHIOLERO R. Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers. **Clinical Nutrition**, n. 26, p.70-77, 2007.

VIZZOTTO A. O.; CAMPOS A. C. L.; MELLO E. V. S.; CASTILHO T. J. Influência da suplementação pré-operatória com ácido graxo ômega-3 na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos desnutridos que receberam paclitaxel. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, n. 42, v. 2, p. 116-124, 2015.

SEN C. K; ROY S. Wound Healing. In: NELIGAN P.C. (Ed.) **Plastic surgery - Volume I –Principles**. Elsevier: 2013.