

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AYRTON ALVES ARANHA JUNIOR

EFEITO DO USO DE DIETA ENRIQUECIDA COM ARGININA POR RATAS LACTANTES, DESNUTRIDAS NA GESTAÇÃO, SOBRE A CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL DOS FILHOTES: PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL POR MEIO DE TENSIOMETRIA, MORFOMETRIA DO COLÁGENO E EXPRESSÃO DE  $\alpha$ -SMA, MMP-2, 9 E 13

CURITIBA

2013

AYRTON ALVES ARANHA JUNIOR

EFEITO DO USO DE DIETA ENRIQUECIDA COM ARGININA POR RATAS LACTANTES, DESNUTRIDAS NA GESTAÇÃO, SOBRE A CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL DOS FILHOTES: PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL POR MEIO DE TENSIOMETRIA, MORFOMETRIA DO COLÁGENO E EXPRESSÃO DE  $\alpha$ -SMA, MMP-2, 9 E 13

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2013

A Deus, pela minha família.

A meus pais, Juçara e Ayrton, por tudo.

À Paula, pelo amor, amizade, paciência e por me fazer ser melhor do que realmente sou.

À Rafaella e Manuella, por darem sentido a tudo que fiz, faço ou venha a fazer.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, pelo exemplo e por todo o conhecimento transmitido, não somente durante o desenvolvimento dessa tese, mas durante toda a minha formação como Cirurgião.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pela ajuda imprescindível ao desenvolvimento desse estudo e ao Hospital Angelina Caron pela disponibilização de estrutura e material para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio Ernesto da Silveira, pela amizade e estímulo à formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Daniel Fernandes, responsável pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela disponibilidade, amizade e orientação.

Às funcionárias Marilene Terezinha Barbosa e Maria da Luz Pereira da Silva, do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por toda a ajuda desinteressada, sem a qual seria impossível o desenvolvimento desse projeto.

Aos acadêmicos: Rafaela Galli, Karin Barszcz, Ricardo Possagno, Even Mol, Luiz Felipe Garbuio pela amizade, por dedicarem as férias ao desenvolvimento desse projeto e por serem um estímulo à docência.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná: Marina Luise Viola de Azevedo, Seigo Nagawara e Ana Paula Camargo pela ajuda indispensável na avaliação histológica e imunohistoquímica desse estudo. À Prof. Dra. Lucia de Noronha pelo incentivo e orientação.

À Regina Sass, secretária do Programa de Pós-Graduação, por toda a ajuda.

À CAPES e a UFPR, pela oportunidade.



*“Emancipate yourselves from mental slavery*

*None but ourselves can free our minds”*

Robert Nesta Marley

## RESUMO

**Introdução:** Nutrição adequada é essencial para o processo de cicatrização, podendo este ser implementado com o uso de dieta com imunonutrientes. Carências nutricionais na infância podem se estabelecer desde a vida intrauterina, comprometendo o desenvolvimento e a capacidade cicatricial. **Objetivo:** avaliar os efeitos do uso de dieta enriquecida com arginina por ratas lactantes, desnutridas durante a gestação, sobre o crescimento, dosagem sérica de albumina e cicatrização de filhotes operados após o desmame. **Método:** Ratas Wistar prenhas foram divididas inicialmente em dois grupos durante a gestação: controle (dieta *ad libitum*) e desnutridas (60% da dieta controle). Após o parto foi mantido o controle gestação e lactação (CN) e as ratas desnutridas durante a gestação foram divididas em três grupos de acordo com a dieta: *ad libitum* + Impact® (DI), *ad libitum* + Nutren® (DN) e 60% do controle (DD). Os filhotes foram submetidos a laparotomia transversa após o desmame, sendo sacrificados no sétimo e vigésimo primeiro dias de pós-operatório. Os parâmetros avaliados foram: medidas antropométricas, dosagem sérica de albumina, força tênsil, morfometria do colágeno e expressão de actina muscular lisa e das metaloproteinases 2, 9 e 13 na ferida cirúrgica. A avaliação estatística foi realizada pelos testes ANOVA, Tukey, t-Student e Fisher. **Resultados:** O uso de dieta enriquecida com arginina pelas ratas durante a lactação foi capaz de recuperar peso (CN=29,21±2,86g; DI=36,08±5,38g; p=0,0009) e comprimento de corpo (CN=9,87±0,32cm; DI=10,91±0,73cm; p=0,0008) dos filhotes, levando os valores de significativamente menores que o controle no nascimento a maiores no desmame. Os valores de albumina sérica permaneceram significativamente menores que o controle no sétimo (CN=4,55±0,21 g/dL; DI=3,75±0,11g/dL; p=0,001) e vigésimo-primeiro (CN=4,025±0,15 g/dL; 3,54±0,05 g/dL; p=0,015) dias de pós-operatório. No sétimo pós-operatório, a força máxima (CN=0,8190±0,1413 kgf; DI=0,9108±0,1378 kgf; p=0,675) e a concentração total de colágeno (CN=4562,78±1901,88; DI=3189,34±1761,02; p=0,3297) na ferida, bem como a porcentagem de colágeno tipo I (maduro) (CN=47,04±15,43; DI=46,76±14,54; p=0,999) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle normonutrido durante a gestação. A análise imunoistoquímica demonstrou expressão significativamente maior de metaloproteinase 13 no grupo suplementado com Impact® em relação ao controle no sétimo pós-operatório. **Conclusão:** O uso de dieta enriquecida com arginina por ratas lactantes melhorou significativamente os parâmetros antropométricos e de avaliação cicatricial dos filhotes operados no desmame.

Palavras-chave: Desnutrição intrauterina. Imunonutrição. Cicatrização. Tensiometria. Morfometria do Colágeno. Imunoistoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Adequate nutrition is essential for the healing process, it can be implemented with the use of a immunonutrients enriched diet. Nutritional deficiencies in childhood can be established since intrauterine life, compromising the development and the healing capacity. **Aim:** to evaluate the effects of use of a arginine enriched diet by nursing mothers, malnourished during pregnancy, on growing and healing of pups operated after weaning. **Method:** Pregnant Wistar rats were initially divided into two groups during gestation: control (*ad libitum* diet) and malnourished (60% of control diet). After term was maintained a gestation and lactation control (CN) and the malnourished mothers were divided into three groups according to the diet: *ad libitum* + Impact® (DI), *ad libitum* + Nutren® (DN) and 60% of controls (DD). The pups were submitted to a transverse laparotomy after weaning and were sacrificed at seventh and twenty-first postoperative days. The evaluated parameters were: anthropometric values, dosage of serum albumin, tensile strength, morphometry of collagen and expression of smooth-muscle actin and metalloproteinases 2, 9 and 13 in the surgical wound. Statistical analysis was performed by ANOVA, Tukey, t-Student and Fisher tests. **Results:** The use of immunomodulation diet by rats during gestation was associated with recovery of pups weight (CN=29,21±2,86g; DI=36,08±5,38g; p=0,0009) and body length (CN=9,87±0,32cm; DI=10,91±0,73cm; p=0,0008), taking values from significantly lower than controls at birth to higher at weaning. On the seventh postoperative day, maximum strength (CN=0,8190±0,1413Kgf; DI=0,9108±0,1378Kgf; p=0,675), total collagen deposition (CN=4562,78±1901,88; DI=3189,34±1761,02; p=0,3297) as well as the percentage of type I (mature) collagen (CN=47,04±15,43; DI=46,76±14,54; p=0,999) did not presented significant differences in relation to nourished gestational control. Immunohistochemical analysis showed significantly higher expression of metalloproteinase 13 in the group supplemented with Impact® in relation to controls in the seventh postoperative day. **Conclusion:** The use of a diet enriched with arginine by malnourished nursing mothers improved significantly the anthropometric and wound evaluation parameters of pups operated at weaning.

Keywords: Intrauterine malnutrition. Immunonutrition. Healing. Tensiometry. Collagen morphometry. Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	FASES DA CICATRIZAÇÃO.....	26
FIGURA 2 –	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	28
FIGURA 3 –	PESAGEM INDIVIDUAL DOS FILHOTES.....	54
FIGURA 4 –	GAVAGEM.....	55
FIGURA 5 –	ANESTESIA E PREPARO DOS FILHOTES PARA CIRURGIA.	58
FIGURA 6 –	ABERTURA DA PAREDE ABDOMINAL POR PLANOS.....	58
FIGURA 7 –	FECHAMENTO DA PAREDE ABDOMINAL POR PLANOS.....	59
FIGURA 8 –	PREPARO DA PEÇA PARA AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA E HISTOLÓGICA.....	62
FIGURA 9 –	AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA DO CORPO DE PROVA.....	63
FIGURA 10 –	RESULTADO DA AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA.....	63
FIGURA 11 –	<i>TISSUE MICROARRAYS</i> (TMA) PARA AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	66
FIGURA 12 –	PESO DAS RATAS NA PREENHEZ.....	71
FIGURA 13 –	CURVAS DE GANHO DE PESO DAS RATAS DURANTE A GESTAÇÃO.....	72
FIGURA 14 –	CONSUMO DE RAÇÃO PELAS RATAS DURANTE A LACTAÇÃO.....	73
FIGURA 15 –	CURVAS DE GANHO DE PESO DAS RATAS DURANTE A LACTAÇÃO.....	74
FIGURA 16 –	CURVAS DE GANHO DE PESO DOS SUBGRUPOS DURANTE A LACTAÇÃO.....	75
FIGURA 17 –	PESO DOS FILHOTES NO NASCIMENTO.....	77
FIGURA 18 –	CURVAS DE GANHO DE PESO DOS FILHOTES DURANTE A LACTAÇÃO.....	78
FIGURA 19 –	PESO DOS FILHOTES NO DESMAME.....	80
FIGURA 20 –	PESO DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º DIA DE PÓS- OPERATÓRIO.....	83
FIGURA 21 –	DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO.....	85
FIGURA 22 –	AVALIAÇÃO DA FORÇA MÁXIMA APLICADA À FERIDA CIRÚRGICA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º PÓS- OPERATÓRIO.....	87
FIGURA 23 –	AVALIAÇÃO DA TENSÃO MÁXIMA SUPOSTADA POR ÁREA DA FERIDA CIRÚRGICA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º PÓS-OPERATÓRIO.....	89
FIGURA 24 –	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE COLÁGENO NA FERIDA CIRÚRGICA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º PÓS- OPERATÓRIO.....	91
FIGURA 25 –	PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I (MADURO) NA FERIDA CIRÚRGICA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7º PÓS-OPERATÓRIO.....	93
FIGURA 26 –	MORFOMETRIA DO COLÁGENO.....	94
FIGURA 27 –	IMUNOISTOQUÍMICA: RESULTADOS.....	95

FIGURA 28 – EXPRESSÃO DE ACTINA MUSCULAR LISA ( $\alpha$ -SMA) NA FERIDA OPERATÓRIA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7° PÓS-OPERATÓRIO.....	97
FIGURA 29 – EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 2 (MMP-2) NA FERIDA OPERATÓRIA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 21° PÓS-OPERATÓRIO.....	99
FIGURA 30 – EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 9 (MMP-9) NA FERIDA OPERATÓRIA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 21° PÓS-OPERATÓRIO.....	101
FIGURA 31 – EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 13 (MMP-13) NA FERIDA OPERATÓRIA DOS FILHOTES SACRIFICADOS NO 7° PÓS-OPERATÓRIO.....	103

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 –	COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®).....	51
QUADRO 2 –	COMPOSIÇÃO DAS DIETAS UTILIZADAS NA SUPLEMENTAÇÃO.....	56
QUADRO 3 –	ANTICORPOS E PROTOCOLOS DE REAÇÃO UTILIZADOS..	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	SUBDIVISÃO DOS GRUPOS APÓS O NASCIMENTO.....	53
TABELA 2 –	COMPARAÇÃO DO PESO E IDADE DAS RATAS NA PREENHEZ.....	70
TABELA 3 –	DIFERENÇA DE PESO ENTRE OS GRUPOS DURANTE A GESTAÇÃO.....	72
TABELA 4 –	VALORES DE PESO E ALBUMINA SÉRICA DAS RATAS NO DESMAME.....	76
TABELA 5 –	AVALIAÇÃO PÔNDERO-ESTATURAL DOS FILHOTES NO DESMAME.....	79
TABELA 6 –	DISTRIBUIÇÃO DOS ÓBITOS DOS FILHOTES.....	81
TABELA 7 –	DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE PESO DOS FILHOTES...	82
TABELA 8 –	DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA DOS FILHOTES.....	84
TABELA 9 –	AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA DA CICATRIZ – FORÇA MÁXIMA.....	86
TABELA 10 –	AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA DA CICATRIZ – TENSÃO MÁXIMA.....	88
TABELA 11 –	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE COLÁGENO NA CICATRIZ.....	90
TABELA 12 –	PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I (MADURO) NA CICATRIZ.....	92
TABELA 13 –	EXPRESSÃO DE ACTINA MUSCULAR LISA ( $\alpha$ -SMA) NA CICATRIZ.....	96
TABELA 14 –	EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 2 (MMP-2) NA CICATRIZ.....	98
TABELA 15 –	EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 9 (MMP-9) NA CICATRIZ.....	100
TABELA 16 –	EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE 13 (MMP-13) NA CICATRIZ.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	–	Ácido Ribonucleico
$\alpha$ -SMA	–	Actina Muscular-Lisa
ATP	–	Adenosina Trifosfato
ANOVA	–	Análise da Variância
cm	–	Centímetro
COX-2	–	Cicloxigenase-2
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA/BIO	–	Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas
DM	–	Diabetes Mellitus
DALY	–	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>
EP	–	Erro Padrão
PDGF	–	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
EGF	–	Fator de Crescimento Epidérmico
TGF- $\alpha$	–	Fator de Crescimento Transformador Alfa
TGF- $\beta$	–	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF	–	Fator de Necrose Tumoral
TNF- $\alpha$	–	Fator de Necrose Tumoral Alfa
g	–	Grama
g/dL	–	Grama por decilitro
°C	–	Graus Celsius
HE	–	Hematoxilina-Eosina
IMC	–	Índice de Massa Corporal
IMaC	–	Índice de Maturação do Colágeno
IL	–	Interleucina
kcal	–	Kilocaloria
kcal/g	–	Kilocaloria por Grama
kg/m <sup>2</sup>	–	Kilograma por metro quadrado



kgf	–	Kilograma-força
kgf/cm <sup>2</sup>	–	Kilograma-força por centímetro quadrado
LPS	–	Lipopolissacarídeo
MMP	–	Metaloproteinases da Matriz Extracelular
mcg	–	Micrograma
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
μm <sup>2</sup>	–	Micrômetro quadrado
mg	–	Miligrama
mg/kg	–	Miligrama por kilograma
ml	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
NADPH	–	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato-Oxidase
ω-3	–	Ômega-3
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
NO	–	Óxido Nítrico
NOS	–	Óxido Nítrico Sintetase
RCIU	–	Retardo do Crescimento Intrauterino
SNC	–	Sistema Nervoso Central
TMA	–	<i>Tissue Microarrays</i>
UEPG	–	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

- © - Copyright
- ® - Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	DESNUTRIÇÃO MATERNO-INFANTIL.....	19
2.2	ALEITAMENTO MATERNO.....	21
2.3	DESNUTRIÇÃO INTRAUTERINA.....	22
2.4	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	25
2.4.1	Fases da Cicatrização.....	27
2.4.1.1	Fase Inflamatória.....	27
2.4.1.2	Fase Proliferativa.....	29
2.4.1.3	Fase de Remodelamento.....	30
2.4.2	Avaliação da Cicatrização.....	31
2.4.2.1	Tensiometria.....	32
2.4.2.2	Histologia e Morfometria do Colágeno.....	32
2.4.2.3	Imunoistoquímica.....	34
2.5	NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO.....	36
2.5.1	Componentes Nutricionais e Cicatrização.....	37
2.5.2	Imunonutrição e Cicatrização.....	42
2.6	SUPLEMENTAÇÃO MATERNA.....	46
2.6.1	Ciclo Arginina-Prolina entre Mãe e Recém-Nascido.....	47
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b> .....	50
3.1	DELINEAMENTO E AMBIENTE EXPERIMENTAL.....	50
3.2	ACASALAMENTO E DETECÇÃO DE PREENHEZ.....	51
3.3	PERÍODO GESTACIONAL.....	52
3.4	PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	52
3.5	DESMAME E SACRIFÍCIO DAS RATAS.....	57
3.6	CIRURGIA DOS FILHOTES.....	57
3.7	SACRIFÍCIO DOS FILHOTES.....	60
3.8	PREPARO DAS PEÇAS PARA AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA E HISTOLÓGICA.....	61
3.9	AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA.....	61
3.10	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA – ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO COLÁGENO.....	64
3.11	IMUNOISTOQUÍMICA.....	65
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	70
4.1	AVALIAÇÃO DAS RATAS: ACASALAMENTO, GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	70
4.2	AVALIAÇÃO PÔNDERO-ESTATURAL DOS FILHOTES: NASCIMENTO, LACTAÇÃO E DESMAME.....	76
4.3	AVALIAÇÃO DOS ÓBITOS DOS FILHOTES.....	80
4.4	AVALIAÇÃO PONDERAL E DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA DOS FILHOTES NO SACRIFÍCIO.....	81
4.5	AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO.....	86
4.5.1	Avaliação Tensiométrica.....	86

4.5.2	Morfometria do Colágeno.....	90
4.5.3	Imunohistoquímica.....	95
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	104
5.1	O MODELO EXPERIMENTAL.....	104
5.2	VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA.....	106
5.3	AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO.....	109
5.4	PERPECTIVAS.....	113
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	114
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115
	<b>OBRAS CONSULTADAS</b> .....	136
	<b>ANEXOS</b> .....	137

## 1 INTRODUÇÃO

A desnutrição é responsável por cerca de 2,2 milhões de mortes de crianças menores que 5 anos de idade anualmente em todo o mundo. Estima-se que pelo menos um terço desses óbitos pudessem ser evitados com medidas como estímulo ao aleitamento materno e suplementação alimentar (LUTTER, 2012).

Atualmente já se reconhece o fato de as carências nutricionais infantis iniciarem antes do nascimento, estando cada vez mais evidente a necessidade de preocupação a desnutrição intrauterina. Há evidências de que 62% das variações no peso ao nascimento sejam decorrentes do ambiente intrauterino, em especial do aporte nutricional, restando 20% à genética materna e 18% à paterna (GUILLOTEAU, 2009).

Além de aumentar de forma significativa a incidência de prematuridade, baixo peso ao nascimento e mortalidade perinatal (BERKO, 2009), a desnutrição intrauterina compromete o desenvolvimento de diversos órgãos, como pâncreas (REUSENS, 2011; THEYS, 2011), adrenal (LABORIE, 2011) e rins (MESQUITA, 2010; SILVA, 2011).

Devido à estreita relação entre o estado nutricional e o processo de cicatrização (SHEPHERD, 2003; WILLIAMS, 2012), este também pode ser comprometido pela desnutrição pré-natal (COELHO-LEMOS, 2004). O aumento progressivo do número de cirurgias realizadas no período neonatal, especialmente decorrentes de complicações relacionadas à prematuridade (DOWNARD, 2012; EICHER, 2012) justifica uma preocupação cada vez maior com o processo de cicatrização dos recém-nascidos.

Apesar do uso de imunonutrição, especialmente com arginina, ter demonstrado melhora significativa na capacidade cicatricial tanto em estudos

experimentais quanto clínicos (BRAGA, 2005; RAYNAUD-SIMON, 2010), nenhum estudo avaliou os efeitos da suplementação materna com dieta com imunonutrientes durante a lactação, sobre a cicatrização da prole desnutrida durante o período gestacional.

## 1.1 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo geral avaliar os efeitos do uso de dieta enriquecida com arginina por ratas lactantes, desnutridas durante a gestação, sobre o crescimento e a cicatrização da parede abdominal dos filhotes operados após o desmame. De forma específica, pretende comparar:

- Parâmetros antropométricos dos filhotes ao nascimento, durante a lactação e após o desmame
- Dosagem sérica de albumina dos filhotes no sacrifício
- Resistência à tração da ferida cirúrgica, avaliando força e tensão máximas
- Morfometria do colágeno na cicatriz cirúrgica
- Expressão de actina muscular lisa ( $\alpha$ -SMA), metaloproteinases 2, 9 e 13 na ferida operatória, por meio de avaliação imunoistoquímica

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DESNUTRIÇÃO MATERNO-INFANTIL

Atualmente os estudos, bem como as intervenções sobre a desnutrição na infância, tem demonstrado estreita relação desta com o estado nutricional das mulheres em idade fértil e gestantes. A utilização do termo “*1000 day window of opportunity*” referindo-se ao período gestacional e os dois primeiros anos de vida, demonstra claramente a interdependência entre os dois períodos quando se discute carência nutricional infantil (LUTTER, 2012).

A importância do tema é percebida muito mais claramente quando atentamos ao fato de que três dos oito objetivos do milênio estão envolvidos no assunto (BRYCE, 2008), sendo eles:

- o primeiro: acabar com a fome e a miséria
- o quarto: reduzir a mortalidade infantil
- o quinto: melhorar a saúde das gestantes

Os estudos sobre desnutrição infantil utilizam diferentes critérios para avaliar e classificar as crianças, sendo os três mais utilizados: *underweight* ou baixo peso (baixo peso para a idade), *wasting* ou desnutrição aguda (baixo peso para altura) e *stunting* ou desnutrição crônica (baixa altura para idade) (ONIS, 2003; SARNI, 2009).

Além desses, a presença de baixo peso ao nascimento também é considerada, sendo caracterizada como peso inferior a 2.500 gramas em um recém-nascido com idade superior a 37 semanas de gestação (BLACK, 2008). As mulheres em idade fértil e gestantes são classificadas de acordo com o Índice de Massa

Corporal (IMC), tomando-se como referência para desnutrição os valores inferiores a 18,5 kg/m<sup>2</sup> (BHUTTA, 2008; MUTHAYYA, 2009).

Estima-se que os efeitos de desnutrição crônica, desnutrição aguda grave e retardo do crescimento intrauterino sejam responsáveis anualmente por 2,2 milhões de mortes de crianças com idade inferior a cinco anos em todo o mundo (SHRIMPTON, 2012; LUTTER, 2012). Dados ainda mais alarmante apontam que no ano de 2011, em torno de 6,9 milhões de crianças menores de 5 anos tenham morrido em todo o mundo, sendo um número significativo dessas mortes relacionadas à maior suscetibilidade à doença causada por desnutrição (BHUTTA, 2012). Esses fatores também seriam responsáveis por 21% dos *disability-adjusted life years (DALY)* ou anos de vida ajustados por incapacidade, parâmetro que permite avaliar a gravidade de doenças incapacitantes, não-letais (MONTEIRO, 2004; BLACK, 2013).

A desnutrição gestacional acomete cerca de 10 a 19% das mulheres na maioria dos países, chegando a valores de extremos de 40% em alguns estados da Índia (BRYCE, 2008; FALL, 2009). Furlan, no Rio Grande do Sul – Brasil, detectou 27,7% de desnutrição no início da gestação (FURLAN, 2003). O estado nutricional da gestante tem influência não somente sobre o feto em desenvolvimento, mas também no tipo de parto. Carências nutricionais maternas estão relacionadas com maior número de indicações de cesariana por desproporção cefalopélvica (SHAPIRA, 2008).

No que se refere à desnutrição infantil, 20% das crianças menores que 5 anos de idade em países em desenvolvimento apresentam baixo peso para a idade, sendo que na Ásia central os índices chegam a 33%. A desnutrição crônica acomete 32% das crianças na mesma faixa etária, sendo que na mesma região da Ásia, 74 milhões de crianças apresentam o agravo. Em 40 países considerados de risco



extremo, a desnutrição crônica atinge cerca de 40% das crianças com idade inferior a 5 anos (AHMED, 2012).

De forma global a desnutrição aguda afeta 10% da população menor que 5 anos, ou seja, 55 milhões de crianças. Em torno de 3 a 5% das crianças nessa faixa etária apresentam desnutrição grave, requerendo intervenção nutricional imediata sob risco de vida, o que representa 19 milhões de crianças (BHUTTA, 2013).

O número de recém-nascidos a termo apresentando baixo peso, ou seja, inferior a 2.500 gramas, também está aumentado no caso de gestantes desnutridas. Quando avaliados dados de países em desenvolvimento, em 2010 cerca de 32,4 milhões de recém-nascidos apresentaram baixo peso, representando cerca de 27% dos nascimentos. Muito embora o baixo peso ao nascimento não represente causa direta de morte no período neonatal, ele aumenta de forma significativa as asfixias e infecções perinatais, responsáveis por cerca de 60% dos óbitos nessa faixa etária (BLACK, 2013).

## 2.2 ALEITAMENTO MATERNO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o aleitamento materno seja iniciado até uma hora após o nascimento, seja exclusivo até 6 meses de vida e continuado até os 2 anos de idade. O aleitamento com início até 24 horas de vida está relacionado com redução de 45% de todas as mortes relacionadas com infecção no período neonatal (BHUTTA, 2013).

Estima-se que cerca de 13% do total de mortes de crianças abaixo de 5 anos de idade pudessem ser evitadas por meio do incentivo ao aleitamento materno (AHMED, 2012). Apesar desses dados, em média apenas 36% das crianças em

todo o mundo são amamentadas exclusivamente até os seis meses de vida (ALLEN, 2012).

Redução significativa no número de infecções gastrointestinais e respiratórias está relacionada ao aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de vida (IP, 2007; KRAMER, 2012). O não-aleitamento está relacionado a aumento de 47% na mortalidade associada a diarreia em crianças de 6 a 11 meses e aumento de 157% na incidência da doença, em crianças de 12 a 23 meses de idade (BUTTA, 2012).

As vantagens da amamentação vão além da redução do número de infecções. As crianças alimentadas ao seio exclusivamente, apresentam velocidade de ganho de peso menor a partir do quarto mês de vida, a qual está relacionada a menor risco de sobrepeso e obesidade na infância (ODDY, 2006; RZEHAKE, 2009).

Existe evidência na literatura relacionando o uso exclusivo de leite materno com efeito protetivo contra doença inflamatória intestinal (KLEMENT, 2004), doença celíaca (IVARSSON, 2013) e Diabetes Mellitus (DM) dos tipos I e II (COUPER, 2009; HORNELL, 2013). Com relação ao desenvolvimento neurológico, associa-se o aleitamento a aumento de três pontos no quociente de inteligência das crianças aos 7 anos de idade (ANDERSON, 1999; BLACK, 2013).

### 2.3 DESNUTRIÇÃO INTRAUTERINA

A partir dos estudos publicados por Barker, Hales e colaboradores no início da década de noventa, muito mais atenção passou a ser dada à nutrição do feto e aos recém-nascidos com baixo peso. Este grupo de pesquisadores afirmou haver relação entre a desnutrição prenatal e a incidência de doença cardiovascular e intolerância à glicose na vida adulta (HALES, 1991; FALL, 1992, BARKER, 1993a).

Hales e colaboradores demonstraram aumento na incidência de intolerância à glicose e DM tipo II, após 64 anos de idade, em pacientes que haviam apresentado baixo peso ao nascimento e ao final do primeiro ano de vida. Os autores propuseram que além do fator genético, o ambiente de privação nutricional intrauterina poderia ser responsável por alterar o desenvolvimento das células pancreáticas e, conseqüentemente, a produção de insulina, conhecida como *thrifty phenotype hypothesis* (HALES, 1991; HALES, 1992).

Menor tolerância à glicose, bem como níveis menores de insulina e pró-insulina foram detectados mais significativamente em pacientes com baixo peso ao nascer (ROBINSON, 1992). Hipercolesterolemia na vida adulta também foi relacionada de forma significativa ao antecedente de desnutrição pré-natal (BARKER, 1993b).

Ravelli e colaboradores, avaliando adultos nascidos de mães submetidas a desnutrição gestacional grave no período de 1944 a 1945, durante o período conhecido como *Dutch famine*, demonstraram menor tolerância à glicose, bem como tendência à obesidade na idade adulta (RAVELLI, 1998).

Os mecanismos pelos quais a desnutrição gestacional pode levar ao desenvolvimento de intolerância à glicose, hipertensão e outras doenças cardiovasculares são certamente multifatoriais e ainda atualmente não foram completamente elucidados (LEACH, 2011; TARRY-ADKINS, 2011).

Além do potencial desenvolvimento a longo prazo de hipertensão arterial, intolerância à glicose e aumento do risco de doenças cardiocirculatórias, inúmeros estudos experimentais demonstraram diferentes efeitos deletérios da desnutrição intrauterina e perinatal para os recém-nascidos e adultos jovens.

Ratos com dois meses de vida, desnutridos durante o período pré-natal, quando submetidos a dois modelos experimentais de inflamação aguda, apresentaram redução significativa da resposta quando avaliados por meio de

leucometria além de dosagem de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) (BARRETO, 2012).

Também utilizando modelo experimental de desnutrição pré-natal e durante a lactação, foram avaliados número e função de linfócitos T após 8 semanas de vida. Demonstrou-se redução no número total de linfócitos CD4 e CD8, bem como nos níveis de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 7 (IL-7) (BADR, 2011). A desnutrição intrauterina também reduziu a produção de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) pós-injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* na vida adulta (DESAI, 2009).

A desnutrição pré-natal causou redução de tamanho, resistência óssea, bem como retardo no desenvolvimento de estrutura óssea adequada em modelo experimental utilizando ratos (LANHAM, 2011).

O desenvolvimento da musculatura estriada foi avaliado utilizando o músculo tibial anterior aos 7, 14 e 28 dias de vida, em modelo experimental de ratos submetidos a dieta hipoprotéica pré-natal. O estudo demonstrou redução do peso muscular, bem como menor diâmetro das fibras na avaliação histológica (ALVES, 2008).

Ratos expostos a restrição proteico-energética no período pré-natal, quando avaliados após 8 semanas de vida, apresentaram maior sensibilidade aos efeitos deletérios de anti-inflamatórios inibidores da cicloxigenase 2 (COX-2) sobre os rins (SILVA, 2010).

A desnutrição intrauterina alterou o desenvolvimento pancreático, reduzindo a produção de insulina e a tolerância à glicose. Estudos experimentais demonstraram redução significativa na população de células  $\beta$ , bem como menor produção de insulina. Apesar de o mecanismo desse comprometimento não ser completamente entendido, acredita-se que ocorra através de alterações mitocondriais (REUSENS, 2011; THEYS, 2011).

Avaliando-se a glândula suprarrenal de ratos submetidos a desnutrição gestacional e durante a lactação, com 8 semanas de vida, percebeu-se redução no número e alteração na estrutura das células cromafins, bem como diminuição nos níveis de catecolaminas (LABORIE, 2011).

Com relação ao desenvolvimento do intestino delgado, em estudo experimental com ratos submetidos a restrição de 50% da dieta no período intrauterino, houve redução significativa no comprimento intestinal, além de alterações histológicas como menor altura e espessura das vilosidades, bem como diminuição da altura da mucosa e dos enterócitos (GURMINI, 2005).

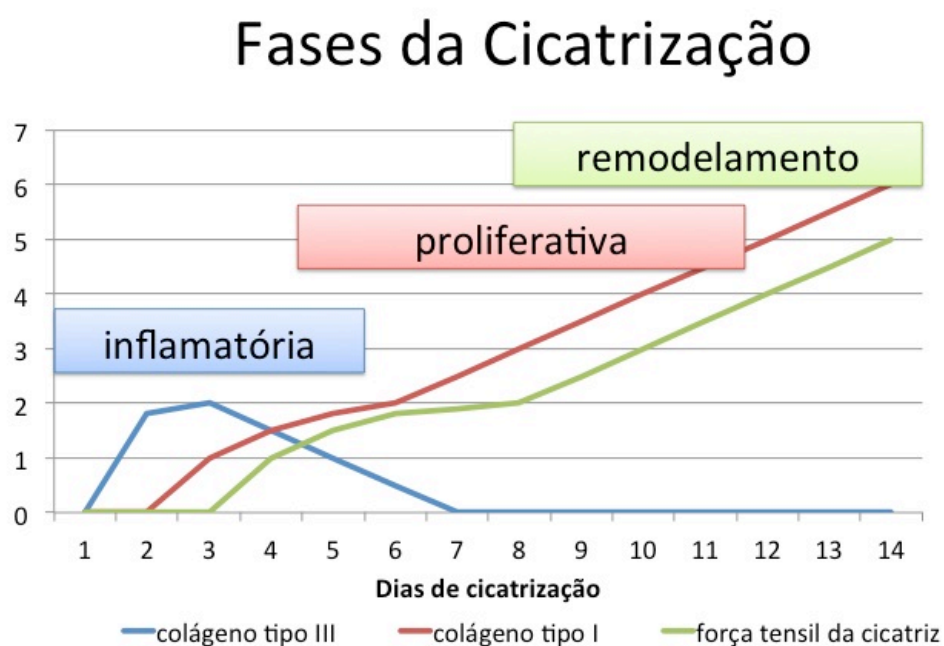
Estudos experimentais avaliando a repercussão da restrição nutricional pré-natal sobre o desenvolvimento neurológico demonstraram redução significativa dos reflexos no período pós-desmame (ZHANG, 2010), bem como aumento da ansiedade, redução da capacidade de aprendizado quando avaliados com 8 semanas de vida (REYES-CASTRO, 2012).

## 2.4 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A preocupação e o cuidado com as feridas representa uma preocupação documentada em papiros por médicos desde o Egito antigo, cerca de 1400 anos antes de Cristo. Desse período foram encontradas descrições do uso de emplastos de banha animal e mel para remoção de pele necrosada e pus de feridas (BROUGHTON, 2006b). Muito além de formar cicatrizes adequadas no sentido estético e funcional, o processo de cicatrização ajuda a manter a integridade da pele, mucosas e demais órgãos, sendo essencial à manutenção da homeostase dos indivíduos (SHAW, 2009).

O estudo da cicatrização, quer seja do processo em si, ou de suas alterações: deficiência ou excesso, tornou-se parte importante da pesquisa em cirurgia (GOLDBERG, 2012). A prevenção e o tratamento de úlceras crônicas, as deiscências de feridas cirúrgicas, as fístulas anastomóticas quer sejam digestivas ou urinárias, os resultados estéticos de cirurgias plásticas reparadoras são apenas alguns exemplos de diferentes áreas da cirurgia em que o processo cicatricial apresenta importância fundamental (BROUGHTON, 2006a).

FIGURA 1 – Fases da cicatrização



Adaptado de: Kumar, 2010.

Atualmente dividido de forma didática em três fases (FIGURA 1): inflamatória, proliferativa e de remodelamento, o processo de cicatrização representa uma série complexa de eventos e reações, além de interação entre células e mediadores (KUMAR, 2010a). Desde 1908, quando Ilya Metchnikoff descreveu a fagocitose e

propôs que o objetivo da inflamação era trazer células fagocitárias para combater as bactérias, diversos mediadores químicos e celulares vêm tendo seu papel desvendado na reparação tecidual (STEED, 2003).

#### 2.4.1 Fases da Cicatrização

##### 2.4.1.1 Fase Inflamatória

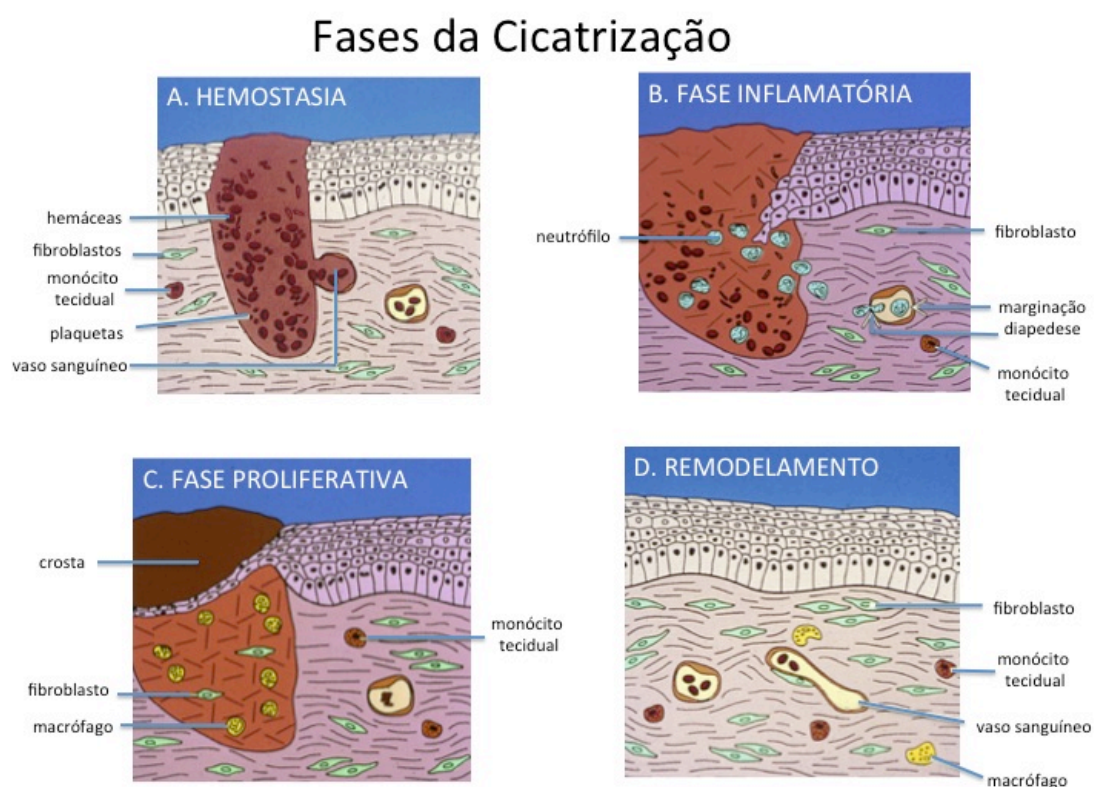
Primeira etapa da cicatrização, a fase inflamatória inicia imediatamente após a lesão e se estende por 4 a 6 dias. Apresenta duas respostas distintas, uma vascular e outra celular, estando envolvidos diferentes células e mediadores imunológicos (KUMAR, 2010b). O primeiro evento, desencadeado pela lesão tecidual, é a hemostasia (FIGURA 2A). Mediante a liberação de tromboxana A2 e prostaglandina A2 inicia-se a vasoconstrição, associada à agregação plaquetária, ativação da cascata da coagulação e formação da rede de fibrina (KUMAR, 2010a).

A participação das plaquetas é essencial, elas são as primeiras células presentes no local de lesão. Além de formar o coágulo, que serve de suporte para a migração celular local, secretam inúmeros mediadores responsáveis por ativação celular, quimiotaxia e ativação do sistema complemento. O principal desses mediadores, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é responsável por ativação e atração de macrófagos e fibroblastos (STEED, 2003).

A resposta celular se dá inicialmente por neutrófilos, primeiros responsáveis pela digestão de bactérias e de tecidos necróticos, através da liberação de enzimas, como proteases (FIGURA 2B). Os monócitos presentes em tecidos vizinhos, bem como na corrente sanguínea, são atraídos e ativados, principalmente pela liberação

de alguns mediadores como o o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e produtos da degradação bacteriana, formando a nova linha celular presente na ferida: os macrófagos (VAN GINDERACHTER, 2012).

FIGURA 2 – Representação gráfica do processo de cicatrização



A. Hemostasia; B. Fase Inflamatória; C. Fase Proliferativa; D. Fase de Remodelamento.

Adaptado de: Goldberg, 2012.

Esses representam células centrais do processo cicatricial, não só pelo fato de concluírem o desbridamento tecidual através da liberação de colagenases, bem como pela produção de interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF), responsáveis pela angiogênese, fibroplasia, síntese de colágeno e da matriz extracelular (MENDONÇA, 2009; GOLDBERG, 2012).



#### 2.4.1.2 Fase Proliferativa

A segunda fase do processo de cicatrização inicia-se no quarto dia e prolonga-se por cerca de duas semanas. Tem como fator central a grande proliferação de fibroblastos, bem como produção de colágeno. Caracteriza-se por quatro etapas fundamentais na cicatrização de uma ferida: epitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e deposição de colágeno (BROUGHTON, 2006b; KUMAR, 2010b).

O processo de epitelização depende da integridade da membrana basal. Estando ela mantida, as células normais migram superiormente, restaurando a epiderme em cerca de 3 dias. Caso ocorra lesão da membrana basal, as células posicionadas nos limites da ferida proliferam no sentido de estabelecer uma barreira de proteção. O estímulo para a proliferação epitelial advém principalmente do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), liberados por plaquetas e macrófagos (REINKE, 2012).

Estimulada principalmente pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a angiogênese caracteriza-se por intensa migração de células endoteliais e neoformação de capilares. Essa etapa é essencial para a adequada reparação da ferida, uma vez que para que ocorra a granulação efetiva, os nutrientes devem aportar o tecido em quantidades adequadas através de capilares bem formados. Isso não ocorrendo, as feridas podem não cicatrizar, originando as úlceras crônicas (BROUGHTON, 2006c).

A fase proliferativa é concluída com a formação do tecido de granulação. As células centrais dessa etapa são os fibroblastos (FIGURA 2C), ativados principalmente pelo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Aqueles situados em tecidos vizinhos migram para o sítio da lesão e, juntamente com aqueles já presentes na ferida, iniciam a síntese de

colágeno e algumas alterações fenotípicas capazes de transformá-los em miofibroblastos, para posterior contração da ferida (BAUM, 2005; GUO, 2010).

O tecido de granulação representa uma matriz provisória produzida especialmente pelos fibroblastos e composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina (GETHIN, 2012).

#### 2.4.1.3 Fase de Remodelamento

A última e clinicamente mais importante fase do processo cicatricial se inicia em torno do oitavo dia e perdura em torno de 1 ano (FIGURA 2D). Caracteriza-se pela deposição de colágeno na ferida, daí sua importância clínica: um defeito no processo pode conduzir a cicatriz com resistência reduzida. Por outro lado, proliferação excessiva pode determinar o aparecimento de cicatriz hipertrófica ou quelóide (BAUM, 2005; BROUGHTON, 2006c).

O colágeno inicialmente depositado na ferida é do tipo III, cuja produção se inicia por volta do terceiro dia, apresentando suas maiores concentrações por volta da primeira semana pós-lesão. Uma vez que esse tipo de colágeno representa apenas 20% do total da proteína na derme intacta, a partir do oitavo dia ele começa a ser degradado por ação de colagenases e substituído por colágeno do tipo I, o qual representa em torno de 80% desse total (BROUGHTON, 2006C; KUMAR, 2010b).

O colágeno tipo I apresenta distribuição de fibrilas mais alinhadas e de ligações cruzadas entre elas as mesmas, o que lhe confere a capacidade de aumento na resistência da ferida. Essa aumenta progressivamente, atingindo 3% da resistência inicial após uma semana, 30% após três semanas e 80% após três meses (BIELEFELD, 2013; YOUNG, 2011).

#### 2.4.2 Avaliação da Cicatrização

Embora existam diferenças histológicas e fisiológicas entre cicatrização humana e de animais experimentais, o principal modelo utilizado para avaliação do processo é o rato. A disponibilidade, facilidade no manuseio, comportamento dócil e os custos reduzidos são algumas das vantagens desse modelo experimental. Apesar das limitações na extrapolação dos achados para seres humanos, diversas questões éticas fazem com que grande parte dos estudos sobre cicatrização sejam realizados na espécie (DORSETT-MARTIN, 2004).

Outra vantagem importante da utilização de modelos experimentais é que esses permitem a retirada de tecido para avaliação laboratorial ou mecânica, possibilitando análise histológica, dosagens bioquímicas, determinação de marcadores, bem como avaliação biomecânica. Atualmente as linhagens de ratos mais amplamente utilizadas são *Sprague-Dawley* e *Wistar*, não havendo entretanto dados que demonstrem superioridade sobre outras linhagens no que se refere à avaliação da cicatrização (PAIVA, 2005; PÉREZ-CANO, 2012).

Em geral a grande maioria dos estudos utiliza ratos machos com peso médio de 250 a 300 gramas, sendo a incisão mediana longitudinal a padrão utilizada na avaliação da cicatrização da parede abdominal (BAUMANS, 2011). Coelho-Lemos, avaliando os efeitos da desnutrição intrauterina sobre a cicatrização da parede abdominal de filhotes operados após o desmame utilizou incisão transversa, por ser o acesso geralmente utilizada em cirurgia neonatal (COELHO-LEMOS, 2002).

No que se refere ao método utilizado na avaliação da cicatrização, não existe um método ideal. A tensiometria vem sendo considerada o *gold standard*, entretanto outros métodos compõem a avaliação, como histologia e densitometria do colágeno, imunistoquímica, dosagem de fatores de crescimento e hidroxiprolina (CAMPOS, 2008).

#### 2.4.2.1 Tensiometria

A partir dos estudos de Paget, em 1853, que descreveu o aumento progressivo da força tênsil com o decorrer do período pós-operatório, iniciou-se o uso da da tensiometria como forma de avaliação da cicatrização. A partir da terceira década do século XX, Howes desenvolveu um aparelho mecânico, padronizando os testes e tornando os experimentos reprodutíveis (HOWES, 1935).

A evolução dos tensiômetros passou por Farhat, responsável por desenvolver um aparato ainda mecânico capaz de determinar a força de ruptura de anastomoses (FARHAT, 1958). A transição para um dispositivo eletromecânico ocorreu com o estudo de Jonsson, o que conferiu mais precisão ao método (JONSSON, 1983).

Atualmente os aparelhos são capazes de realizar ensaios controlados por computador, expondo os corpos de prova a tração uniforme e constante. Estudos permitem avaliar os parâmetros de força máxima, força de ruptura e tensão máxima dos corpos de provas, os quais podem ser feridas cirúrgicas ou segmentos anastomóticos (VIZZOTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2003; GONÇALVES, 2005; ONO, 2009).

#### 2.4.2.2 Histologia e Morfometria do Colágeno

A histologia permite avaliar a cicatrização por meio de diferentes colorações, obtendo dados, alguns mais outros menos objetivos. A microscopia óptica com utilização da coloração com hematoxilina-eosina (HE) é questionada por apresentar avaliação subjetiva, entretanto desde que realizada por patologista experiente e

imparcial pode fornecer dados capazes de quantificar e comparar processos cicatriciais (CAMPOS, 2008).

A coloração HE possibilita avaliar vários indicadores como: exsudato neutrofilico, edema intersticial, necrose transmural, necrose da mucosa, congestão vascular, deposição de fibrina, infiltrado monomorfonuclear, proliferação fibroblástica, processo granulomatoso e fibrose intersticial (ONO, 2009).

Considerando a importância do colágeno no processo de cicatrização, não somente sua quantificação, mas também a diferenciação dos diferentes subtipos, são importantes para avaliar a evolução do processo. O método da polarização com *Picrosirius* utiliza como reagente o F3AB, um corante ácido birrefringente capaz de reagir com o colágeno, cujas moléculas ficam acoladas às fibrilas do colágeno. Esse método permite identificar cores diferentes baseado na intensidade de birrefringência dos diferentes tipos de colágeno. O tipo I mostra-se como fibras mais espessas, coradas de amarelo ou vermelho, já o tipo III apresenta fibras mais finas de coloração esverdeada (REPKA, 2009; GORDON, 2010).

A determinação da porcentagem de fibras de colágeno maduras e imaturas permite avaliação qualitativa do processo de cicatrização, podendo ser utilizada em diversos estudos de cicatrização, tanto de feridas quanto de anastomoses (TOLAZZI, 2007). A razão entre as porcentagens de colágeno maduro e imaturo foi proposta por Coelho-Lemos, com objetivo de facilitar a interpretação dos resultados, sendo chamada índice de maturação do colágeno (IMaC). Os valores acima de 1 representam predomínio de colágeno tipo I enquanto os valores menores, maior concentração de colágeno tipo III nas lâminas avaliadas (COELHO-LEMOS, 2002).

### 2.4.2.3 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica permite avaliar a cicatrização por meio da detecção de marcadores relacionados com às diferentes fases do processo. A técnica baseia-se na identificação de um antígeno tecidual que apresenta expressão aumentada durante a reparação da ferida, através da ligação desse a um anticorpo, mono ou policlonal, associado a um cromógeno, produzindo coloração visível e quantificável à microscopia óptica (ABRAHAMSOHN, 2008).

Diferentes etapas da cicatrização podem ter sua evolução caracterizada através da quantificação de determinados marcadores. Apesar de não ser específico, o antígeno Ki 67 pode ser utilizado para avaliar proliferação celular. Estudando os efeitos do ácido valpróico na cicatrização de feridas em dorso de ratos, Lee, em 2012, utilizou o Ki 67 para caracterizar a ação da medicação (LEE, 2012).

Angunawela, em 2011, também se utilizou da imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti-Ki 67 como parâmetro para avaliar a proliferação celular pós-resssecção cirúrgica em córnea de ratos (ANGUNAWELA, 2011).

A angiogênese representa outra etapa importante do processo de cicatrização passível de investigação imunohistoquímica. Diversos antígenos vem sendo utilizados para caracterizar aumento da angiogênese (TONNESEN, 2000). Brcic, em 2009, avaliando a ação do pentadecapeptídeo BPC 157, um fator de crescimento, sobre a angiogênese muscular e tendínea em ratos, utilizou-se do anticorpo anti-fator VIII (BRCIC, 2009). Sharma, avaliou a angiogênese tumoral do carcinoma de células escamosas também por meio do anticorpo anti-fator VIII (SHARMA, 2010). Bernhardt, estudando os efeitos da desnutrição sobre a anastomose colônica de ratos, se utilizou do anticorpo anti-fator VIII para avaliar angiogênese (BERNHARDT, 2008).

O anticorpo anti-actina muscular lisa ( $\alpha$ -SMA) também pode ser utilizado com o intuito de quantificar a angiogênese na ferida cirúrgica, uma vez que identifica a musculatura lisa da parede dos vasos neoformados. Boroujerdi, utilizou o anticorpo anti- $\alpha$ -SMA para avaliar a angiogênese pós-infarto cerebral em ratos (BOROUJERDI, 2012). Seo, estudando os efeitos do fator de crescimento fibroblástico-2 sobre a angiogênese cerebral também pós-infarto em ratos, amparou suas conclusões no uso do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA (SEO, 2013).

Outro grupo de marcadores utilizados na avaliação do processo de cicatrização é o das metaloproteinases da matriz extracelular (MMP). Descritas como enzimas capazes de degradar o colágeno, em 1962, atualmente já foram identificadas 28 MMPs que apresentam papel fundamental na remodelação da matriz extracelular, maturação do colágeno, angiogênese e, inclusive, na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2003; MCCAW, 2007).

O papel exato das metaloproteinases no processo da cicatrização vem sendo progressivamente esclarecido. Sabe-se atualmente que as enzimas envolvidas na reparação de feridas são MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12 e MMP-13 (HAHM, 2011). Utz, avaliando ferida de combatentes, percebeu associação entre níveis aumentados de MMP-2, MMP-7 e retardo no fechamento das feridas (UTZ, 2010).

A atividade das diferentes MMPs também parecem estar relacionadas com a maturação do colágeno, melhorando dessa forma a força tênsil das feridas, especialmente as MMP-2 e MMP-9 (HAMPEL, 2012; HAMPEL, 2013).

## 2.5 NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO

Muito embora a complexidade da relação entre o estado nutricional e o processo de cicatrização ainda não seja totalmente compreendida, sabe-se que pacientes que apresentam carências nutricionais podem apresentar dificuldades na resolução de feridas. Desde os primórdios da Medicina, Hipócrates já chamava atenção para o fato de que uma boa condição nutricional era essencial para uma saúde adequada (WILLIAMS, 2003).

Os estudos iniciais sobre resposta metabólica à doença, publicados por Coleman, Shaffer e DuBois no século XIX; bem como a investigação inicial da reação ao trauma, de Cuthbertson, já demonstravam a intensa correlação entre comprometimento sistêmico, equilíbrio hidroeletrolítico e balanço nitrogenado de pacientes e modelos experimentais (WILLIAMS, 2012).

Entretanto, foi através dos estudos de Ravlin, durante a década de 1930, que se estabeleceu a relação direta entre desnutrição proteica e maior incidência de deiscência em laparotomias, utilizando modelo experimental canino. A partir daí, durante todo o último século, foram investigadas a participação de diversos componentes nutricionais no processo de cicatrização (ARNOLD, 2006).

Levando-se em conta os números da desnutrição em pacientes admitidos em hospitais, quer seja para tratamento clínico ou cirúrgico, percebemos que o binômio nutrição-cicatrização deve ser muito considerado. Em 2001, Waitzberg e colaboradores, em um estudo multicêntrico, avaliaram 4000 pacientes internados e detectaram desnutrição em 48,1% desses (WAITZBERG, 2001). Correia e Campos, em 2003, publicaram os dados da prevalência de desnutrição hospitalar na América Latina. O trabalho avaliou 9348 pacientes internados e mostrou desnutrição em 50,2% deles, sendo essa grave em 11,2% dos casos (CORREIA E CAMPOS, 2003).



Ordoñez e colaboradores, em 2013, avaliando os pacientes internados para tratamento pelo Departamento de Clínica Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, detectaram não somente 45,7% de prevalência de desnutrição, mas também relação significativa desta com a mortalidade dos pacientes (ORDOÑEZ, 2013).

Veramendi-Espinoza e colaboradores, em 2013, considerando internamentos clínicos e cirúrgicos em um hospital universitário no Peru, detectaram 46,9% de desnutrição nas admissões (VERAMENDI-ESPINOZA, 2013). Gheorghe et al., em 2013, avaliando 3198 pacientes de uma unidade de Gastroenterologia tiveram como resultado 20,4% na prevalência de desnutrição na admissão (GHEORGHE, 2013). Considerando 300 pacientes cirúrgicos, Almeida et al., em 2013, aferiram desnutrição em 64% dos pacientes (ALMEIDA, 2013).

Com relação à população pediátrica, Moeeni e colaboradores detectaram desnutrição em 9,9% dos 162 pacientes admitidos para tratamento clínico (MOEENI, 2013), enquanto Villares et al., em estudo multicêntrico de 32 hospitais espanhóis, perceberam desnutrição moderada a grave em 7,8% dos 991 pacientes menores que 17 anos (VILLARES, 2013).

### 2.5.1 Componentes Nutricionais e Cicatrização

Apesar de ser erroneamente considerada apenas redução na ingestão alimentar, a desnutrição representa um desequilíbrio metabólico complexo, afetando de diferentes maneiras o sistema imune e conseqüentemente o processo cicatricial dos pacientes (GUO, 2010; SKIPPER, 2010).

Carências nutricionais podem comprometer a função dos linfócitos T, reduzir a capacidade fagocítica de macrófagos, diminuir a efetividade do sistema complemento e os níveis de anticorpos (GANTWERKER, 2012).

Os carboidratos representam, em conjunto com lipídeos, a principal fonte de energia para o organismo como um todo e conseqüentemente para o bom andamento da cicatrização. No caso específico das feridas, a maior parte da energia é dispendida no sentido da produção de colágeno. Pensando de forma matemática, uma ferida cirúrgica de 3 centímetros quadrados de área e espessura de 1 milímetro, apresenta aproximadamente 10 mg de colágeno no tecido de granulação. Sabendo que a síntese proteica necessita de 0,9 kcal/g de proteína a ser produzida pode-se calcular a demanda calórica da ferida (BURNS, 2003).

Muito embora os carboidratos sejam a principal fonte de energia do processo cicatricial, seu excesso, a hiperglicemia representa um dos fatores no retardo da cicatrização. O estado hiperglicêmico desencadeado pelo trauma e mediado pela gliconeogênese, bem como o Diabetes Mellitus (DM) podem comprometer a cicatrização de feridas (KAPOOR, 2005).

Os pacientes portadores de DM apresentam a dificuldade de cicatrização como uma característica marcante da doença. O mecanismo parece ser multifatorial, tendo como adjuvantes as alterações microvasculares e ateroscleróticas desencadeadas pela doença, além do fato da hiperglicemia dificultar o transporte do ácido ascórbico na membrana celular. A competição entre esse e a glicose pelo mesmo transportador transmembrana é responsável por reduzir a síntese de colágeno (ANDERSON, 2005; EDMONDS, 2007).

Com relação aos lipídeos, alguns ácidos graxos devem ser ofertados por meio da dieta, em especial o ácido linolênico e o aracdônico. Ambos são precursores de fosfolipídeos de membrana e prostaglandinas. Dessa forma sua carência pode prejudicar a cicatrização tanto através do comprometimento da replicação celular

quanto do metabolismo inflamatório (BIELEFELD, 2013). Carências lipídicas isoladas são raras na prática clínica, podendo acometer, entretanto, pacientes em nutrição parenteral total, se ofertada sem lipídeos (KAVALUKAS, 2011).

No que se refere à relação entre proteínas e cicatrização, ela vem sendo descrita desde os anos 30 do último século. Uma vez que o colágeno é o elemento central da cicatrização, fica claro que um déficit proteico afeta diretamente o processo (KAVITHA, 2008). Estudos experimentais com dieta hipoprotéica demonstraram redução da força tênsil e deposição de colágeno nas feridas, assim como aumento da incidência de infecção de ferida (MOLNAR, 1988; OTRANTO, 2009; COSTARELLI, 2009).

Muito embora o *kwashiorkor*, desnutrição proteica grave ainda seja descrita, em especial na prática clínica pediátrica, as deficiências protéicas exclusivas não são comuns (SARNI, 2009; MOEENI, 2013). A maior parte dos pacientes com carências nutricionais apresenta desnutrição proteico-energética, e nesse grupo foi documentada maior incidência de complicações relacionadas à ferida cirúrgica, menor deposição de colágeno e menor concentração de hidroxiprolina (MISTRY, 1994; SHAHIN, 2010).

Nas décadas de 40 e 50 do último século iniciou-se a investigação dos efeitos de aminoácidos administrados separadamente sobre a cicatrização de feridas. Em estudos iniciais, metionina e cisteína reverteram os efeitos da restrição proteica sobre a cicatrização de ratos, entretanto ensaios subsequentes não foram capazes de repetir os resultados (WILLIAMSON, 1955; WILLIAMS, 2012).

A glutamina também foi avaliada com relação à sua efetividade em implementar a cicatrização. Suas funções como precursor na síntese de nucleotídeos pelos fibroblastos e macrófagos, além de representar fonte de energia e mostrar-se essencial na proliferação dos linfócitos a colocaram em uma posição importante no processo inflamatório (ZETTERBERG, 1981).

Estudos experimentais demonstraram efeitos positivos do uso da glutamina na cicatrização. Costa e colaboradores, estudando os efeitos da suplementação oral com glutamina sobre anastomoses colônicas em ratos detectaram melhora da força de ruptura e maior porcentagem de colágeno maduro no terceiro e oitavo dias de pós-operatório (COSTA, 2003). Estudos clínicos também demonstraram efetividade da suplementação com glutamina, tanto em situações clínicas, quanto na melhora da evolução do processo de cicatrização de pacientes cirúrgicos (BLASS, 2012; ASRANI, 2013).

A partir da década de 70, a arginina passou a ser também estudada como fator adjuvante na cicatrização. O aminoácido normalmente sintetizado em quantidade adequada, passa a ser insuficiente em situações de stress, o que o torna semi-essencial (SEIFTER, 1978). Quando avaliada em estudos experimentais, a arginina apresentou resultados significativos na melhora da cicatrização e resposta imune (BARBUL, 1985; SHI, 2003; ARNOLD, 2006). Ono demonstrou melhora na força tênsil e maior concentração de colágeno em feridas cutâneas de ratos suplementados com arginina (ONO, 2009).

No que se refere às vitaminas, as duas envolvidas diretamente na cicatrização são A e C. O ácido ascórbico (vitamina C), tem envolvimento histórico na etiologia do escorbuto, que classicamente acometia os marinheiros no século XIX (BOURNE, 1944). Atualmente sua função no processo cicatricial está definida como cosubstrato necessário para as conversões prolina-hidroxiprolina e lisina-hidroxilisina, necessárias para a síntese do colágeno (KIVIRIKKO, 1990; WILLIAMS, 2003). Estudos experimentais não demonstraram que suplementação com vitamina C possa melhorar a cicatrização, entretanto sua carência está relacionada a um retardo na formação de tecido de granulação. A hipovitaminose C também aumenta a possibilidade de infecção de ferida, devido à dificuldade de encapsulamento do processo infeccioso e localização da infecção (STECHMILLER, 2010).

Desde a década de 60, existe descrição de benefícios da suplementação com vitamina A na cicatrização de pacientes, mesmo que não apresentem deficiência da mesma. Muito embora os mecanismos exatos através dos quais isso ocorra ainda não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que ela possui a capacidade de melhorar a ativação de macrófagos e estimular a síntese de colágeno (EHRlich, 1968). Diversos estudos demonstraram a efetividade da vitamina A na melhora do processo cicatricial, bem como na reversão dos efeitos adversos de corticosteroides, radioterapia, DM e ciclofosfamida no reparo das feridas (LEVENSON, 1984; WEINZWEIG, 1990; SEIFTER, 1991; MAGALHÃES, 2008; AKDOGAN, 2009).

Os elementos traços ou micronutrientes inorgânicos, apesar se apresentarem em concentrações mínimas no organismo são cofatores do metabolismo celular, participando de forma indireta do processo de cicatrização (THOMPSON, 2005). O magnésio, cofator de várias enzimas que participam da síntese proteica, auxilia na estabilidade da molécula de ATP, principal fonte de energia para a síntese de colágeno (ARNOLD, 2006; MACKAY, 2003).

O cobre tem papel importante no processo de cicatrização, funcionando como cofator da enzima lisil-oxidase, essencial à estabilização da molécula do colágeno. O zinco tem seu envolvimento na resolução de feridas destacado desde a década de 30 em modelos experimentais. Seu papel como cofator da DNA e RNA polimerases o coloca em posição central na síntese de DNA e proteica. A deficiência de zinco retarda a síntese de colágeno, reduzindo a força tênsil das feridas, sendo esse efeito reversível com a reposição do micronutriente (MEDLIN, 2012).

## 2.5.2 Imunonutrição e Cicatrização

Muito embora a relação entre condição nutricional e resposta imune, controle de infecção, recuperação pós-operatória ou pós-traumática, além da cicatrização venha sendo estudada desde o início do século passado, foi a partir do início da década de 90 que começou a ser estabelecido o conceito de imunonutrição (SUCHNER, 2000).

Os estudos pioneiros de Alexander e colaboradores sugeriram que o uso de dieta suplementada com elementos nutricionais capazes de estimular ou modular a resposta imune dos pacientes, reduzia a incidência de infecções de ferida e o tempo de internamento de pacientes vítimas de queimaduras (ALEXANDER, 1990; BRAGA, 2007; MIZOCK, 2011).

A partir daí, diversos estudos avaliaram os efeitos dos imunonutrientes, em particular arginina, ácidos graxos  $\omega$ -3 e nucleotídeos, em situações críticas como trauma, stress cirúrgico, sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, além do processo cicatricial (SENKAL, 1995; BRAGA, 2002, MATSUDA, 2006).

A arginina tem papel central no complexo mecanismo da imunomodulação e, em especial, na cicatrização (STECHMILLER, 2005). Sua ação vai desde melhorar o fluxo sanguíneo em órgãos intra-abdominais, passando por ativação do sistema imune, além de participação importante no processo de reparação de feridas (BASU, 2002; WITTE, 2003). Os efeitos da arginina advém não só de sua ação direta, mas também dos inúmeros compostos formados no seu catabolismo (WU, 1998; FLYNN, 2002).

Como ação direta, o aminoácido modula a resposta inflamatória, mediante sua ação sobre as células de Kupffer hepáticas, diminuindo a liberação da interleucina 6 (IL-6). No que se refere ao seu catabolismo, a arginina pode ser

degradada por duas vias, sendo ambas formadoras de produtos envolvidos na reparação tecidual (TONG, 2004).

Uma via importante do catabolismo da arginina passa pela ação das enzimas óxido nítrico sintetase (NOS), levando à formação do óxido nítrico (NO). Esse, além de ser tóxico para bactérias, tem importante função vasodilatadora. Nos quadros de hemorragia e redução de fluxo sanguíneo, em especial de órgãos intra-abdominais como fígado, melhora de forma considerável a perfusão tecidual (FRANK, 2002; MORRIS JR, 2007). O NO também toma parte no processo cicatricial, melhorando significativamente a angiogênese e formação do tecido de granulação (CURRAN, 2006; DEBATS, 2009).

Outra importante forma de degradação se dá mediante ação das enzimas arginases. A ação da arginase I leva à formação de ornitina, precursor da putrecina e das poliaminas, sendo essas fundamentais para a síntese de DNA e conseqüentemente para a replicação de todas as células envolvidas no processo inflamatório e cicatricial. Quando catabolizada pela arginase II, a via orienta a produção de prolina, essencial na formação do colágeno (SATRIANO, 2004; MORRIS JR, 2009).

Estudando a cicatrização de ratos diabéticos, Shi et al., em 2003, demonstraram a capacidade da arginina em reverter os efeitos deletérios da DM induzido por estreptozotocina na cicatrização de feridas. A avaliação foi realizada através de tensiometria e dosagem de hidroxiprolina no tecido celular subcutâneo (SHI, 2003).

Em estudo experimental de trauma e choque hemorrágico em ratos, tanto Wittmann quanto Shi, demonstraram que uso intraperitoneal de arginina pode reverter os efeitos do choque sobre a contagem de linfócitos, força tênsil e deposição de colágeno na ferida cirúrgica (WITTMANN, 2005; SHI, 2007).

Em estudo clínico avaliando tratamento de úlceras de pressão em pacientes normonutridos, a suplementação via oral com arginina acelerou de forma significativa o fechamento das úlceras, bem como reduziu o número de curativos necessários semanalmente (VAN ANHOLT, 2010).

O papel dos ácidos graxos  $\omega$ -3 é importante na modulação do estado inflamatório. O mecanismo inicial consiste em participar da composição da membrana de células envolvidas na cascata inflamatória e na cicatrização. Mediante redução da síntese de prostaglandina E2 e leucotrieno E4, além da inibição da expressão de alguns genes pró-inflamatórios, os ácidos graxos  $\omega$ -3 modulam o processo de resposta ao estresse (YAQOOB, 2010; BIANCHINI, 2012).

Braga et al., em 1999, estudaram o uso de dieta enriquecida com arginina e ácidos graxos  $\omega$ -3 em pacientes submetidos a ressecções gastrointestinais por câncer e demonstraram menor incidência de infecção, bem como redução do tempo de internamento em relação ao controle (BRAGA, 1999).

Em 1999, Heys e colaboradores conduziram uma metanálise de 11 estudos randomizados e controlados que avaliaram 1009 pacientes submetidos ao uso de dieta imunomoduladora. Os autores afirmaram que o uso da dieta enriquecida foi capaz de reduzir tempo de internamento e complicações infecciosas (HEYS, 1999).

Klek et al., em 2011, avaliaram pacientes desnutridos submetidos a ressecções gástricas e pancreáticas, comparando o uso de dieta enriquecida com arginina e ácidos graxos  $\omega$ -3. Os autores observaram diminuição significativa de complicações infecciosas e do tempo de internamento comparado ao uso de suplementação proteico-energética (KLEK, 2011).

Nakamura *et al.*, também estudando pacientes oncológicos cirúrgicos, detectaram efeitos anti-inflamatórios significativos nos pacientes suplementados com ácidos graxos  $\omega$ -3. Os autores encontraram valores significativamente menores para



tromboxana B2 e interleucina 8 (IL-8). Com relação a tempo de internamento e complicações pós-operatórias não houve diferença (NAKAMURA, 2005).

Farreras, utilizando dieta imunomoduladora com arginina e ácidos graxos  $\omega$ -3 em pacientes submetidos a ressecção gástrica por neoplasia detectou resultados significativamente melhores com relação à deposição de hidroxiprolina em cateter subcutâneo, bem como menor incidência de complicações relacionadas a cicatriz cirúrgica (FARRERAS, 2005).

Em uma metanálise de estudos sobre uso de dietas imunomoduladoras por pacientes cirúrgicos considerados de risco para complicações, Marik e Zaloga concluíram que seu uso traz benefícios para os pacientes, sendo normo ou malnutridos. Também perceberam que o uso sinérgico da arginina e de ácidos graxos  $\omega$ -3 melhora consideravelmente a evolução dos pacientes. Com relação ao período de início da imunomodulação o estudo não foi conclusivo, entretanto os autores sugeriram começar a terapia 5 dias antes da cirurgia (MARIK, 2010).

Alguns estudos não conseguiram demonstrar vantagem no uso de dieta imunomoduladora. Debats e colaboradores estudaram os efeitos da suplementação com arginina em pacientes submetidos a cirurgias reparadoras com uso de enxertos de pele. Os autores não detectaram diferença significativa no que se refere a reepitelização, angiogênese e contagem linfocitária (DEBATS, 2009).

Sultan e colaboradores, avaliando os efeitos do uso de dieta imunomoduladora com ácidos graxos  $\omega$ -3 em pacientes submetidos a ressecção esofagogástricas por neoplasia, não demonstraram diferença na incidência de complicações, infecção, uso de antibióticos ou tempo de internamento (SULTAN, 2012).

## 2.6 SUPLEMENTAÇÃO MATERNA

Os benefícios da suplementação materna com ácido fólico, além de vitaminas A e D são bastante descritos na literatura (PICCIANO, 2003). A participação do folato no desenvolvimento do tubo neural, por meio da sua participação na síntese de purinas e pirimidinas é determinante. A redução da incidência de defeitos do fechamento do tubo neural consequente da suplementação das gestantes com ácido fólico foi responsável inclusive por alterações na legislação sanitária de cerca de 72 países, tornando obrigatória a fortificação de cereais, farinhas e pães com ácido fólico (BERRY, 2010; CASTILLO-LANCELOTTI, 2013).

A vitamina A está envolvida diretamente no desenvolvimento da visão para cores e noturna. Além disso é essencial na formação do sistema imune, sobretudo no desenvolvimento da resposta imune associada à integridade das mucosas e eficiência dos mecanismos de defesa relacionados aos tratos digestivo e respiratório (ELMAFDA, 2012; SHERWIN, 2012). Seu papel na organogênese também é fundamental, sendo sua carência gestacional relacionada com malformações de membros e assimetrias corporais, além de defeitos cardíacos, circulatórios, neurológicos e urogenitais (KAM, 2012). Estima-se que cerca de 19 milhões de gestantes e 190 milhões de crianças apresentem deficiência da vitamina na África e Ásia, sendo sua suplementação uma questão de saúde pública (ELMAFDA, 2012).

A vitamina D, cujo envolvimento no metabolismo ósseo já é bastante conhecido, vem sendo apontada em estudos recentes como adjuvante no desenvolvimento de outros sistemas, estando sua carência envolvida na gênese de diversas doenças (BISCHOFF-FERRARI, 2011). Sua participação na diferenciação dos linfócitos T a coloca em posição importante na origem das doenças autoimunes (HEWISON, 2012). Sorensen e colaboradores relacionaram a deficiência gestacional

de vitamina D com risco duas vezes maior de desenvolvimento de DM tipo I na infância (SORENSEN, 2012).

Os ácidos graxos  $\omega$ -3 são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) do feto e estão naturalmente presentes no leite materno. Durante o terceiro trimestre da gestação, ocorre um rápido crescimento do SNC, aumentando dessa forma sua demanda. Estudos experimentais e observacionais concluíram que a suplementação com ácidos graxos  $\omega$ -3 durante a gestação e lactação tem efeitos positivos sobre o desenvolvimento e função do SNC durante a infância (MORSE, 2012).

A suplementação materna com arginina vem sendo estudada nos últimos 10 anos. Dois estudos clínicos iniciais demonstraram resultados positivos do uso gestacional de arginina revertendo quadros de retardo de crescimento intrauterino (RCIU) (SIEROSZERSKI, 2004; XIAO, 2005). Entretanto, em estudo mais recente Winer, em 2009, não conseguiu repetir os resultados favoráveis dos antecessores (WINER, 2009).

Estudos animais em ovinos e suínos sugerem que o mecanismo de melhora nos casos de RCIU seja através do aumento local de óxido nítrico na circulação uteroplacentária, promovendo vasodilatação e aumento o fluxo de nutrientes para o feto (WU, 2004).

#### 2.6.1 Ciclo Arginina –Prolina entre Mãe e Recém-Nascido

Mateo, baseado em estudo realizado em suínos, colocou a arginina como elemento central na produção de leite materno e ganho de peso dos lactentes. O autor afirmou que a menor disponibilidade do aminoácido leva à redução do volume de leite produzido pelas lactantes (MATEO, 2008).

Os mecanismos de aumento da produção de leite materno em decorrência da ação da arginina seriam:

1. Aumento do fluxo sanguíneo para a glândula mamária: conseqüentes à angiogênese e vasodilatação causadas pelo óxido nítrico, produzido pelo catabolismo do aminoácido (TROTTIER, 1997; WU, 2004).
2. Aumento da glândula mamária: doses suplementares de arginina estimulam a produção de prolactina e hormônio do crescimento pela glândula mamária, culminando no seu crescimento (KNOPF, 1965; DAVIS, 1972; PAU, 1982).

Em seu estudo, Mateo avaliou a suplementação de arginina por suínas lactantes e detectou aumento significativo no ganho de peso do lactentes (MATEO, 2008).

Em 2011, Wu afirmou que a arginina é utilizada na glândula mamária de suínos para produção de prolina, baseado na abundância da última e deficiência da primeira no leite materno da espécie (WU, 2011). No enterócito dos lactentes, a prolina derivada do leite materno é a principal fonte para a síntese de citrulina, intermediária na produção de arginina (DILLON, 1999).

Em seu estudo, Wu propôs o “ciclo arginina-prolina entre mãe e recém-nato” afirmando que muito mais pesquisa experimental necessita ser realizada para confirmar a hipótese. O autor coloca o ciclo como uma justificativa para o maior catabolismo da arginina na glândula mamária e sua posterior formação no enterócito do recém-nascido, destacando a participação do aminoácido na lactação:

1. A captação de prolina do sangue materno pela glândula mamária pode ser deficitária, o que estimularia a captação e catabolismo da arginina pela glândula.

2. A etapa intermediária do catabolismo da arginina produz NADPH e ribose-5-fosfato. O primeiro essencial para síntese de lipídeos e o segundo para síntese de purinas e proliferação celular. Kirchgessner, em 1991, sugeriu que a suplementação de arginina em suínas lactantes aumenta a concentração de lipídios no leite materno (KIRCHGESSNER, 1991).
3. As duas vias do catabolismo da arginina podem implementar a lactação: a primeira, através da óxido nítrico sintase (NOS), produzindo NO, causando vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo para a glândula mamária. A segunda, via arginases, levando à formação de poliaminas, essenciais na diferenciação e proliferação celular, tanto no tecido mamário, quanto posteriormente no intestino do recém-nascido.
4. A carência de atividade das arginases no intestino do recém-nascido, descrito em modelo experimental suíno, torna fisiologicamente melhor para os lactentes uma maior concentração de prolina e poliaminas, responsáveis por síntese proteica, formação de matriz extracelular, diferenciação e proliferação celular (BALL, 1986).

### 3 MÉTODO

#### 3.1 DELINEAMENTO E AMBIENTE EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do estudo foram observados os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências determinadas no “*Guide for Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council of Animal Care)*”. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) no dia 9 de agosto de 2011, conforme processo 23075.082514/2011-68 (ANEXO 1).

O experimento foi realizado no biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sendo utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), linhagem Wistar, em número de 15 machos e 60 fêmeas provenientes de criadouro próprio da UEPG. Os animais, com idade entre 121 e 140 dias de vida, foram mantidos em caixas padrão de polipropileno, em laboratório com temperatura constante ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e obedecendo ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas, sendo as luzes mantidas acesas das 7 às 19 horas.

Durante o período de aclimação, os animais foram transferidos do criadouro ao laboratório de experimentação 48 horas antes do início do estudo. Foram mantidos em caixas com cinco machos ou fêmeas, recebendo ração específica para ratos e camundongos de laboratório Nuvital<sup>®</sup> (Nuvilab Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil) (QUADRO 1) e água *ad libitum*.

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina)
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Etrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina
Micronutrientes: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto

QUADRO 1 – Composição básica da ração balanceada fornecida aos ratos (Nuvilab CR1®)

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil

### 3.2 ACASALAMENTO E DETECÇÃO DE PREENHIZ

O acasalamento foi realizado na proporção de um macho para três fêmeas, previamente identificadas, por caixa. Os machos foram mantidos nas caixas durante as duas últimas horas do período noturno (das 5 às 7 horas), sendo, em seguida, as fêmeas submetidas a lavado vaginal para detecção de espermatozóides.

Com uso de micropipeta, a abertura vaginal foi lavada com 35 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Em seguida, o esfregaço foi avaliado a fresco em microscopia óptica (aumento de 10 e 20 vezes). As fêmeas que apresentaram espermatozóides no lavado vaginal foram consideradas prenhas, em seguida pesadas e transferidas para caixas individuais. Esse foi considerado o primeiro dia do período gestacional. O processo de acasalamento foi repetido por três dias, sendo após esse período detectadas 30 ratas prenhas, que foram divididas

aleatoriamente em dois grupos iniciais: grupo I - *AD LIBITUM* – AL (15 ratas) e grupo II - DESNUTRIDAS - DNT (15 ratas).

### 3.3 PERÍODO GESTACIONAL

Durante o período gestacional de 21 dias, as ratas do grupo I receberam ração em quantidade superior ao consumo habitual (20 a 30 gramas/dia) (PAIVA, 2005). Tanto os volumes oferecidos quanto as sobras foram pesadas diariamente. Foi calculado diariamente o consumo médio do grupo I (AL) e fornecido às ratas do grupo II (DNT), 60% do consumo médio do grupo controle, conforme o modelo *pair-feeding*.

As ratas e os volumes de ração foram pesados diariamente em balança digital *Bel Engineering M1702*. Todos os dados foram anotados em formulário próprio e transferidos diariamente para planilha de *software Excel da Microsoft®*.

### 3.4 PERÍODO DE LACTAÇÃO

No dia do parto, ratas e filhotes não foram manipulados para reduzir os riscos de canibalismo e agressão aos filhotes. No segundo dia de vida os filhotes foram contados e pesados. Do grupo I (AL) foram separadas duas ratas, e o grupo II (DNT) foi subdividido em 3 subgrupos, de forma aleatória, mantendo-se porém uma distribuição uniforme no número de filhotes por subgrupo, conforme a Tabela 1.



TABELA 1 – Subdivisão dos grupos após o nascimento

Dieta Gestação	Dieta Lactação	Ratas (n)	Filhotes (n)
<i>Ad libitum</i> (AL)	<i>Ad libitum</i> (CN)	2	20
60% do controle  (DNT)	<i>Ad libitum</i> + Impact® (DI)	4	23
	<i>Ad libitum</i> + Nutren® (DN)	3	21
	60% do controle CN (DD)	3	30

Onde: AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle); DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Durante a lactação tanto as ratas quanto os filhotes foram pesados diariamente (FIGURA 3). Da mesma forma que no período gestacional, a quantidade de ração ofertada em cada gaiola foi controlada, seguindo o princípio de que o consumo durante o período de lactação pode aumentar em até 70% (PAIVA, 2005). O controle do consumo foi realizado mediante pesagem das sobras de ração nas gaiolas. Baseado no consumo médio do grupo controle (CN) foi calculada a oferta de ração do grupo II C (DD). Da mesma forma que na gestação, foi mantida uma oferta de 60% do consumo médio.

FIGURA 3 – Pesagem individual dos filhotes



Toda a manipulação dos animais foi realizada no período da manhã. As caixas foram transferidas individualmente para a sala de procedimento do biotério, evitando ao máximo o estresse de ratas e filhotes. As ratas foram cuidadosamente separadas dos filhotes e pesadas. Os filhotes foram pesados individualmente, durante o período de gavagem das ratas.

A gavagem foi realizada por dois pesquisadores, por meio de contenção das ratas pelo dorso e caixa torácica, além da estabilização da cabeça mantida com os dedos indicador e polegar imediatamente atrás da mandíbula. Utilizou-se uma sonda metálica de 8 centímetros com ponta arredondada, introduzida cuidadosamente através do esôfago até o estômago (BAUMANS, 2011) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Gavagem



O volume de suplementação adotado foi de 5 ml, baseado na capacidade gástrica máxima das ratas de 1 a 2 ml/100g (BAUMANS, 2011). As dietas utilizadas na suplementação foram Nutren1.0® e Impact®. O quadro 2 apresenta a composição das duas dietas utilizadas. Os suplementos administrados seguiram a seguinte distribuição, conforme os grupos:

- Grupos IIA - DI: Impact® - 5 ml
- Grupo IIB - DN: Nutren1.0® - 5 ml

Após a manipulação, ratas e filhotes foram novamente colocados na mesma gaiola e devolvidos à sala de origem. Todos os dados anotados em formulário próprio e transferidos diariamente para planilha de *software Excel da Microsoft®*.

<b>Nutrientes</b>	<b>Impact®</b>	<b>Nutren®</b>
Energia	1 kcal	1 kcal
Proteína	0,056 g	0,040 g
Arginina	0,012 g	-----
Lipídeos	0,028 g	0,038 g
Carboidratos	0,130 g	0,130 g
Fibras dietéticas	0 g	0 g
<b>Minerais</b>		
Sódio	1,92 mg	0,87 mg
Potássio	1,00 mg	1,24 mg
Cloro	1,60 mg	1,20 mg
Fósforo	0,80 mg	0,67 mg
Magnésio	0,23 mg	0,27 mg
<b>Oligoelementos</b>		
Ferro	0,012 mg	0,012 mg
Zinco	0,015 mg	0,014 mg
Cobre	1,800 mcg	1,400 mcg
Manganês	0,002 mg	0,002 mg
Flúor	0,002 mg	-----
Molibdênio	0,220 mcg	0,120 mcg
Selênio	0,210 mcg	0,039 mcg
Cromo	0,100 mcg	0,040 mcg
Iodo	0,150 mcg	0,100 mcg
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina A	1,000 mcg	1,200 mcg
Carotenóides	1,000 mcg	-----
Vitamina D	0,007 mcg	0,007 mcg
Vitamina E	0,030 mg	0,019 mg
Vitamina K	0,068 mcg	0,050 mcg
Tiamina	0,0016 mg	0,002 mg
Riboflavina B2	0,0022 mg	0,0024 mg
Niacina	0,022 mg	0,028 mg
Ácido pantotênico	0,011 mg	0,014 mg
Vitamina B6	0,0036 mg	0,0040 mg
Ácido fólico	0,360 mcg	0,540 mcg
Biotina	0,068 mcg	0,400 mcg
Vitamina C	0,600 mg	0,140 mg
Colina	0,320 mg	0,450 mg

QUADRO 2 – Composição das dietas utilizadas na suplementação por ml

FONTE: Nestlé®

### 3.5 DESMAME E SACRIFÍCIO DAS RATAS

Após o período de lactação de 21 dias, os filhotes foram separados das mães. As ratas foram sacrificadas com dose intraperitoneal da combinação: quetamina (200 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (PAIVA, 2005; HELLEBREKERS, 2011). Logo em seguida da confirmação do óbito, foi coletado 1 ml de sangue por punção intracardíaca, para dosagem sérica de albumina.

As amostras foram conservadas em refrigerador a temperatura inferior a 16°C e transferidas em até 24 horas ao laboratório Bionostic Análises Laboratorias, em Curitiba – Paraná. A dosagem de albumina foi realizada em equipamento MIURA 1 da Covalent® por teste fotométrico usando verde de bromocresol.

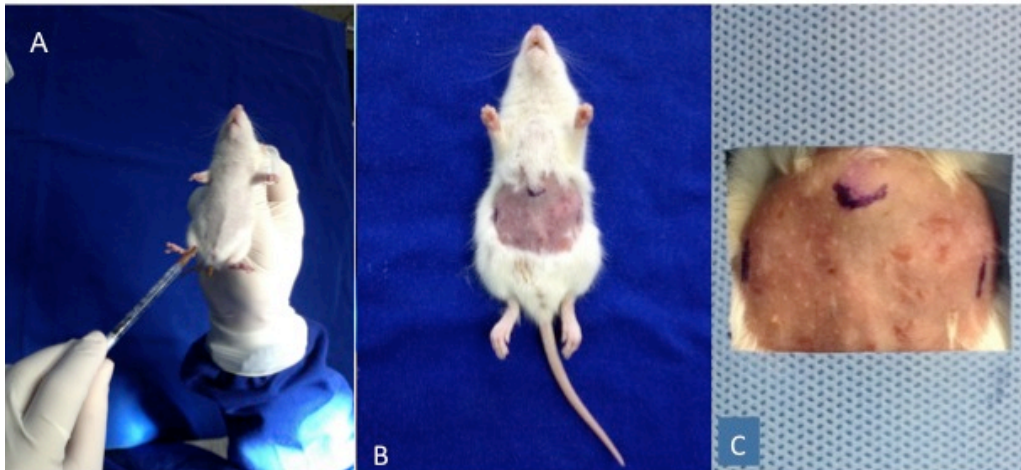
### 3.6 CIRURGIA DOS FILHOTES

Os animais foram pesados e, em seguida, submetidos a anestesia intraperitoneal, sem período de jejum prévio, com xilazina (5 mg/kg) e quetamina (50 mg/kg). As drogas foram diluídas em solução salina a 0,9% e misturadas na mesma seringa. Os animais foram contidos pelo tórax e dorso, e após antissepsia com solução alcoólica de clorexidina 0,5%, foi realizada injeção intraperitoneal do anestésico no quadrante inferior direito com agulha de 13 X 0,45 mm (PAIVA, 2005; HELLEBREKERS, 2011) (FIGURA 5A). Após o período de latência, os comprimentos de corpo e cauda foram aferidos e anotados em formulário próprio.

Após tricotomia o animal foi colocado em decúbito dorsal, com os membros estendidos e cauda fixados à mesa cirúrgica. A demarcação dos pontos referenciais

para a incisão cirúrgica foi realizada com caneta preta TEXTA 700® (FIGURAS 5B e 5C).

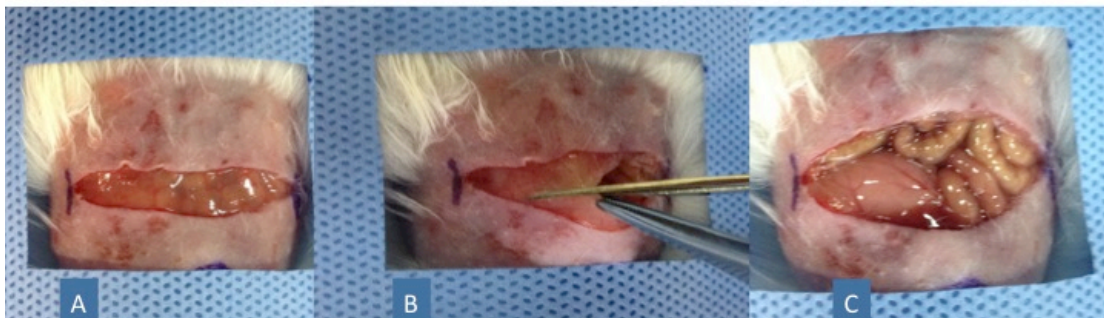
FIGURA 5 – Anestesia e preparo dos filhotes para cirurgia



A. Anestesia; B. Posicionamento; C. Demarcação da incisão

Foi realizada incisão transversa supraumbilical de 35 mm, cerca de 3 mm abaixo do rebordo costal (FIGURA 6A). Após cuidadosa liberação do plano cuticular do plano muscular com tesoura de iris (FIGURA 6B), procedeu-se a abertura do plano músculo-aponeurótico também com tesoura de iris (FIGURA 6C).

FIGURA 6 – Abertura da parede abdominal por planos

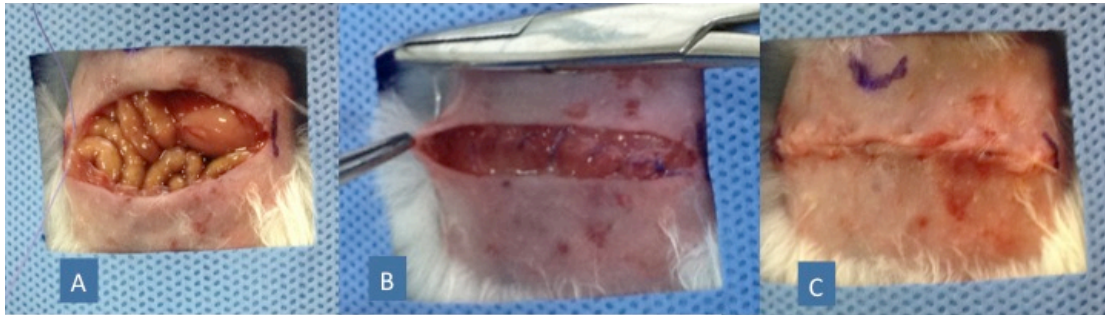


A. Incisão cutânea; B. Abertura do plano músculo-aponeurótico; C. Parede abdominal aberta



Em seguida, foi realizado o fechamento da parede em dois planos: músculo-aponeurótico com sutura contínua com fio de poligalactina 4.0 (FIGURAS 7A e 7B) e cuticular com sutura contínua com poligalactina 6.0 (FIGURA 7C).

FIGURA 7 – Fechamento da parede abdominal por planos



A. Início do fechamento do plano músculo-aponeurótico; B. Plano músculo-aponeurótico fechado; C. Plano cuticular fechado

Os animais foram mantidos sem curativo na ferida operatória, em gaiolas separadas durante o período de recuperação pós-anestésica. Em seguida, foram novamente transferidos às gaiolas originais, sendo mantidas as ninhadas juntas e com livre acesso a ração e água. Durante o período pós-operatório os animais foram avaliados diariamente, com observação da ferida quanto a aspectos de sangramento, infecção, deiscência e evisceração.

### 3.7 SACRIFÍCIO DOS FILHOTES

Os grupos de filhotes foram subdivididos aleatoriamente, sendo metade dos filhotes sacrificados no sétimo e o restante no vigésimo-primeiro dia de pós-operatório. Exceção foi feita ao grupo mantido desnutrido durante a gestação e lactação (DD), em que todos os filhotes foram sacrificados no sétimo dia de pós-operatório, devido ao grande número de óbitos ocorridos no peroperatório.

No dia do sacrifício, com a devida ciência e autorização da chefia do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (ANEXO 2), os animais foram transferidos ao Laboratório de Pesquisa Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O sacrifício foi realizado com injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina (15mg/kg) e quetamina (150mg/kg). Imediatamente após a detecção do óbito os animais foram pesados e foi coletado 1ml de sangue, por punção intracardíaca, para dosagem de albumina sérica. As amostras foram mantidas em refrigerador a uma temperatura inferior a 16°C por um período de no máximo 10 horas, sendo em seguida transferidas ao laboratório Bionostic Análises Laboratorias. Da mesma forma que para as ratas, a dosagem sérica de albumina também foi realizada em equipamento MIURA 1 da Covalent® por meio de teste fotométrico usando verde de bromocresol.



### 3.8 PREPARO DAS PEÇAS PARA AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA E HISTOLÓGICA

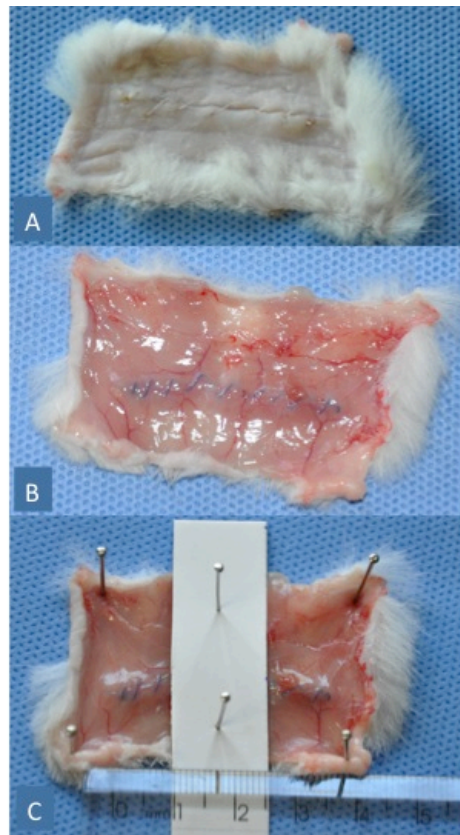
Imediatamente após o sacrifício, os animais foram posicionados em decúbito dorsal com os membros estendidos e cauda fixos à mesa cirúrgica. Foi ressecado segmento contendo os planos cuticular e músculo-aponeurótico da parede ântero-lateral do abdomen, estendendo-se da pube ao tórax e além dos limites da incisão cirúrgica lateralmente.

A peça cirúrgica ressecada foi posicionada em uma superfície lisa, sendo os quatro cantos fixados. Um segmento central de 15 mm de largura e de 30 mm de comprimento foi seccionado e levado imediatamente para avaliação tensiométrica (corpo de prova). O segmento lateral direito de 10 mm de largura e 10 mm de comprimento foi ressecado e colocado em frasco com formalina tamponada a 10% para posterior avaliação histológica. (FIGURA 8).

### 3.9 AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA

O teste tensiométrico foi realizado logo após o sacrifício de cada um dos animais e o preparo do corpo de prova. Esse foi mantido fixo em duas presilhas, uma superior e outra inferior, as quais foram mantidas separadas a uma distância padronizada de 20 mm. A cicatriz foi posicionada na metade da distância entre as duas presilhas. O aparelho comandou automaticamente todos os ensaios, sendo os resultados determinados por *software* específico de computador acoplado.

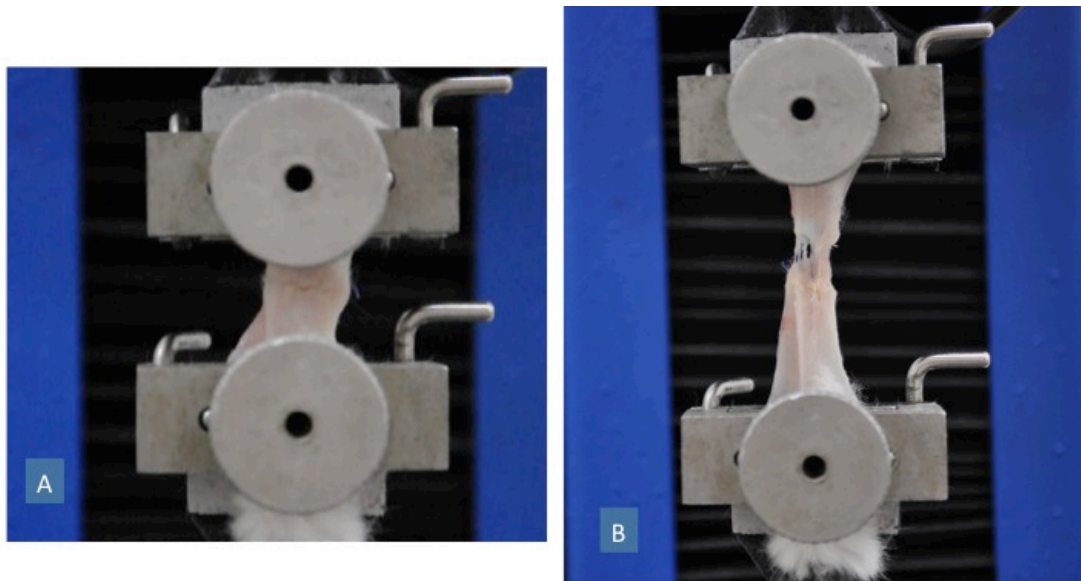
FIGURA 8 – Preparo da peça para avaliação tensiométrica e histológica



A. Face cuticular da ferida operatória; B. Face músculo-aponeurótica; C. Delimitação do segmento central de 15 mm de largura X 20 mm de comprimento para avaliação tensiométrica

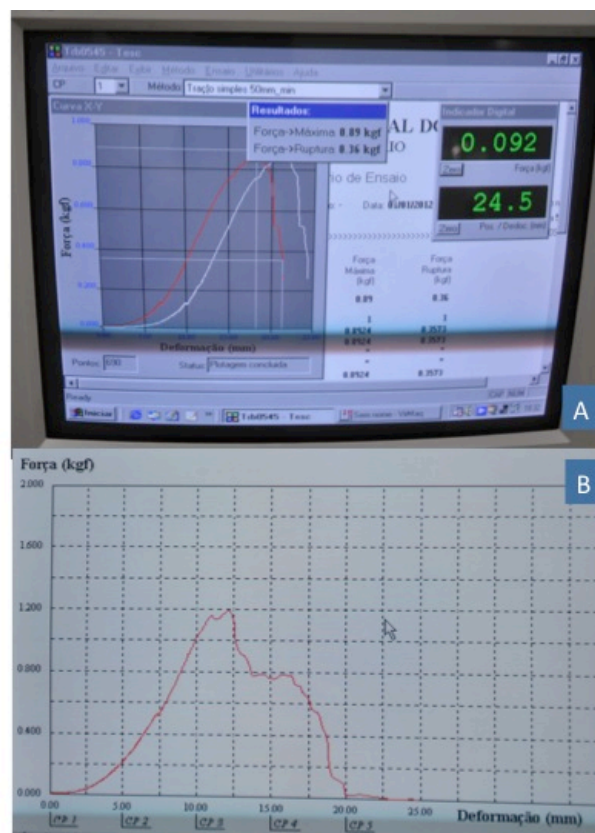
A velocidade de tração adotada foi de 50 mm/min, constante para todos os corpos de prova. O segmento de tecido testado foi padronizado em 15 mm de largura e 1 mm de espessura. O limite superior da força máxima foi padronizada em 4.500 kgf. O corpo de prova foi progressivamente estirado até a ruptura da linha de cicatrização (FIGURA 9), sendo obtidas duas variáveis: força máxima e tensão máxima. A força máxima representou a maior força suportada pelo corpo de prova até a perda de sua continuidade (medida em kgf) e a tensão máxima como o maior valor de força tolerada por unidade de secção (medida em kgf/cm<sup>2</sup>) (FIGURA 10).

FIGURA 9 – Avaliação tensiométrica do corpo de prova



A. Posicionamento do corpo de prova no início do teste; B. Momento de ruptura da ferida operatória

FIGURA 10 – Resultado da avaliação tensiométrica

A. Tela demonstrando o ensaio, bem os valores definidos pelo *software* de força e tensão; B. Detalhe do gráfico de força aplicada em relação ao estiramento do corpo de prova

### 3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA – ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO COLÁGENO

A avaliação histológica foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, constituindo de identificação e quantificação das fibras de colágeno totais, maduras (tipo I) e imaturas (tipo III).

Após a retirada dos fios de sutura, foram realizados cortes perpendiculares ao maior eixo da linha de sutura. O processamento do material incluiu desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. Em seguida foi realizada microtomia a 4  $\mu\text{m}$  de espessura, sendo os cortes submetidos a coloração de *picrosirius-red* F3BA.

Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia óptica, sendo utilizado microscópio da marca Olympus®, em aumento de 40 vezes, utilizando fonte de luz polarizada. As imagens foram, em seguida, capturadas através de câmera Sony® CCDÍRIS e transmitidas para um monitor colorido Trinitron Sony®, congeladas e digitalizadas através de placas Oculus TCX.

O *software* utilizado na análise das imagens, o *Image Pro-Plus* versão 4.5 para *Windows*, é capaz de identificar diferentes tipos de colágeno baseado em cores. Utilizando o sistema RBG (*Red, Blue, Green*), os valores vermelho e laranja foram considerados colágeno tipo I e o valor verde, colágeno tipo III. O colágeno total foi quantificado somando-se todas as estruturas de coloração vermelho, laranja ou verde, diferentes dos tons de preto do restante do tecido. Foram realizadas quatro fotos aleatórias de cada uma das amostras, sendo quantificado o colágeno total em cada uma delas. Em seguida foi calculada a média do colágeno total para cada amostra.

Para quantificação dos colágenos maduro e imaturo foram consideradas apenas as áreas coradas, definindo-se a porcentagem de fibras coradas em verde

(colágeno tipo III) e aquelas coradas em laranja e vermelho (colágeno tipo I). A soma das porcentagem dos dois tipos de colágeno em cada uma das amostras foi sempre igual a 100%. Da mesma forma que no colágeno total, foi calculada a média das porcentagens dos dois tipos de colágeno nas quatro imagens.

### 3.11 IMUNOISTOQUÍMICA

O estudo imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Inicialmente foram construídos os *Tissue Microarrays* (TMA) a partir dos blocos de parafina das feridas operatórias. Foram selecionadas as áreas com maior concentração de colágeno, sendo extraído um cilindro de 4 mm de diâmetro e depositado no bloco receptor (FIGURA 11).

Cada um dos grupos foi distribuído em um bloco receptor. As coordenadas de localização de cada um dos animais foi criteriosamente anotado em um mapa de coordenadas para evitar posteriores erros na leitura das lâminas.

Depois de depositados todos os cilindros, os quatro blocos receptores, agora TMA, foram colocados na estufa a 37° C durante 1 hora com a face de corte virada para baixo e sobre uma lâmina de vidro. A cada intervalo de uma hora os blocos foram pressionados para promover a homogeneização dos mesmos. Deste modo, os cilindros de tecido ficaram aderidos às paredes do bloco receptor e a superfície de corte ficou homogênea mediante contato com a lâmina.

Os TMAs foram resfriados a 10° C negativos durante 30 minutos e, em seguida, foi realizado corte histológico de 4µm de espessura com micrótomo *Reichert-Jung 2030 (Bicut, Germany)*. As lâminas utilizadas para imunoistoquímica foram eletricamente carregadas, marca *StarFrost Adesivas Poly-L-Lysine*, com maior

poder de adesão.

FIGURA 11 – *Tissue Microarrays* (TMA) para avaliação imunohistoquímica



No estudo imunohistoquímico foi utilizado o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais, de acordo com as especificações demonstradas no Quadro 3. A técnica utilizada seguiu o protocolo estabelecido e padronizado pelo setor de imunohistoquímica do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (ANEXO 3).

Anticorpo	Marca	Diluição
$\alpha$ -SMA	DAKO	1:400
MMP-2	SPRING	Pré-diluído
MMP-9	NOVOCASTRA	1:50
MMP-13	SPRING	Pré-diluído

QUADRO 3 – Anticorpos e protocolos de reação utilizados

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, com aparelho da marca Olympus®, em aumento de 40 vezes, utilizando fonte de luz polarizada. Em seguida, as imagens foram capturadas por meio de câmera Sony® CCDÍRIS e transmitidas para um monitor colorido Trinitron Sony®, congeladas e digitalizadas através de placas Oculus TCX.

Foram realizadas quatro fotografias aleatórias de cada uma das lâminas. Da mesma forma que para avaliação da morfometria do colágeno, foi utilizado o *software Image Pro-Plus* versão 4.5 para *Windows* para análise das imagens, sendo esse capaz de quantificar as áreas identificadas pelo cromógeno.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis comparadas foram:

- Ratas: idade, peso na prenhez, peso diário durante gestação e lactação, consumo de ração durante a lactação, dosagem sérica de albumina no sacrifício, óbitos e abortamentos.
- Filhotes
  - Parâmetros antropométricos: peso no nascimento, desmame e sacrifício; peso diário durante a lactação; comprimento de corpo e cauda no desmame.
  - Dosagem sérica de albumina no sacrifício.
  - Avaliação da cicatrização:
    - Tensiometria: força e tensão máximas da ferida.
    - Morfometria do colágeno: concentração total de colágeno, porcentagem de colágeno tipo I e tipo III na ferida operatória.
    - Avaliação imunoistoquímica: expressão de actina muscular lisa ( $\alpha$ -SMA), metaloproteinases 2, 9 e 13 na ferida operatória.

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão (EP). Para comparação das variáveis, quando comparados 3 ou 4 grupos simultaneamente, foi utilizada a análise da variância (ANOVA). Uma vez detectada diferença significativa na análise, foi aplicado o teste de Tukey para identificar os grupos que divergiram significativamente dos demais. O teste t de Student foi utilizado para comparar duas



médias de variáveis quantitativas. Quando comparadas frequências, foi usado o teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS RATAS: ACASALAMENTO, GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

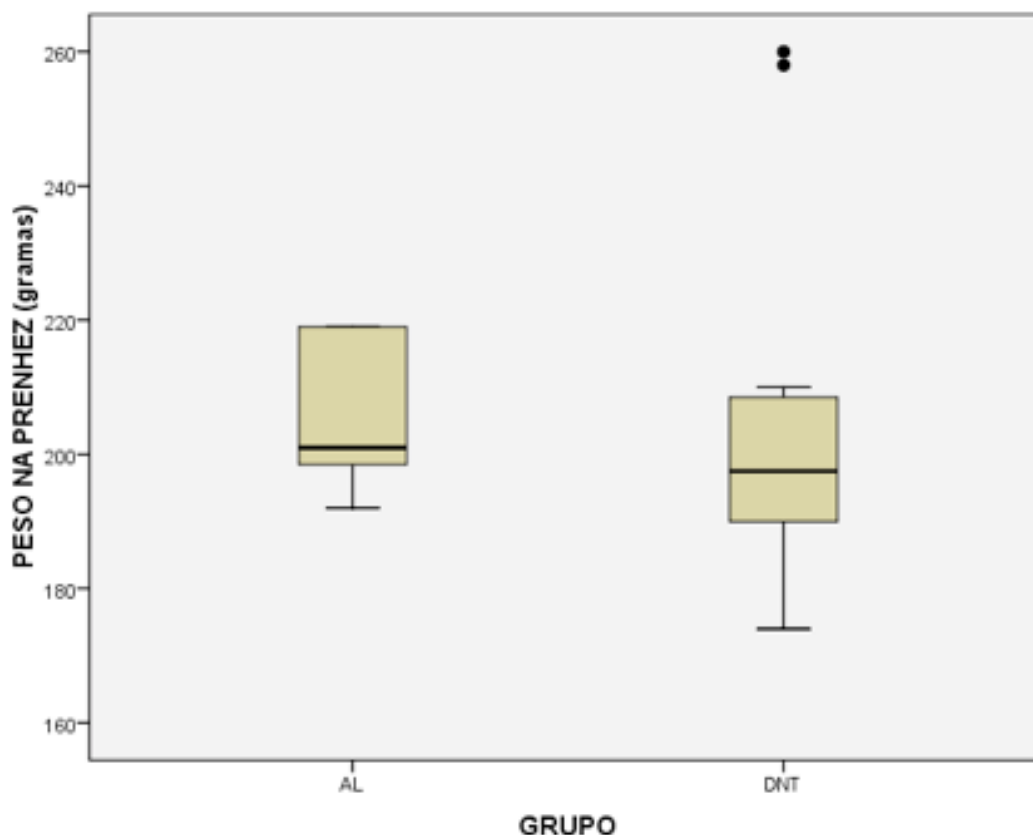
Em trinta das sessenta ratas incluídas no processo de acasalamento foram detectados espermatozóides no lavado vaginal, sendo 15 mantidas com dieta *ad libitum* (AL) durante a gestação e 15 mantidas com dieta restrita a 60% do controle (DNT). As idades ( $p=0,054$ ) e pesos ( $p=0,912$ ) das ratas dos dois grupos não demonstraram diferença significativa no momento da prenhez, conforme demonstram a Tabela 2 e a Figura 12. Do grupo AL, 7 ratas chegaram efetivamente ao termo e do grupo DNT, 10 ratas, não havendo diferença significativa entre os grupos. Não houve óbito de ratas durante o período de gestação ou lactação.

TABELA 2 – Comparação do peso e idade das ratas na prenhez

Grupo	Peso (gramas) Média $\pm$ EP	Valor de p	Idade (dias) Média $\pm$ EP	Valor de p
AL	206,71 $\pm$ 4,476	0,912	108,00 $\pm$ 5,831	0,054
DNT	205,50 $\pm$ 7,763		102,08 $\pm$ 6,097	

Análise realizada pelo teste t de Student. Diferença de peso e idade no momento da prenhez entre os grupos AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle) e DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos. Onde EP – erro padrão

FIGURA 12 – Peso das ratas na prenhez



Análise realizada pelo teste t de Student, com valor de  $p=0,912$ , não houve diferença entre os grupos. Onde: AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle); DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle

O ganho de peso das ratas do grupo controle (AL) foi constante durante toda a gestação, enquanto as ratas mantidas desnutridas (DNT) apresentaram perda de peso durante o período inicial, passando a ganhar peso somente na 3a. semana de gestação. A partir do quinto dia de gestação, o peso médio das ratas do grupo controle já se mostrava significativamente maior, persistindo assim até o parto, conforme mostram a Tabela 3 e a Figura 13.

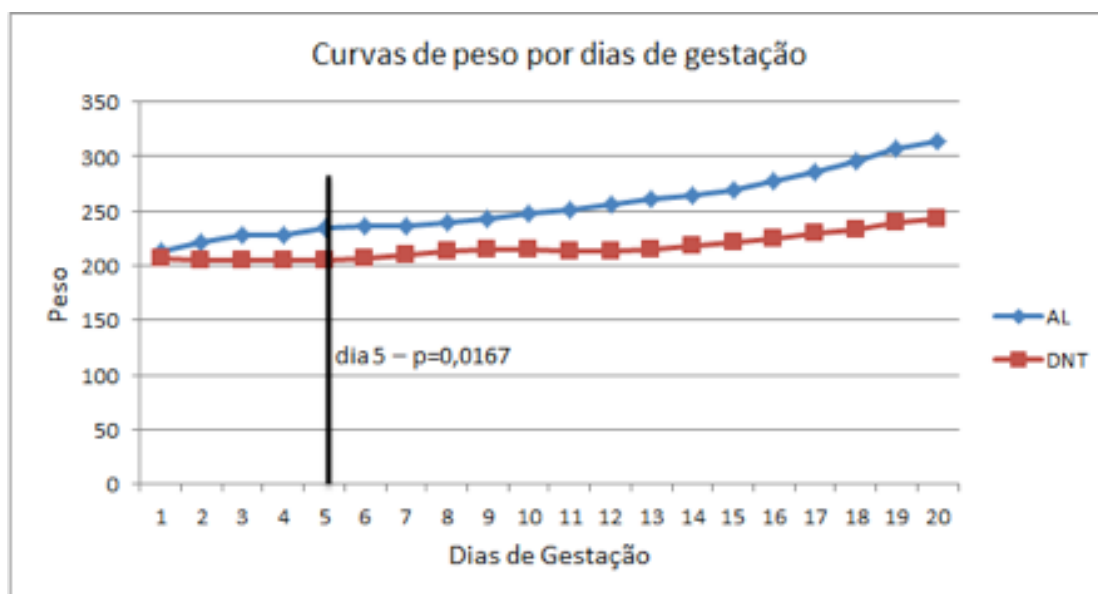
Em média, o número de filhotes das ratas do grupo controle (AL) foi  $9,57 \pm 0,68$  e do grupo desnutrido (DNT)  $7,58 \pm 0,94$ , não havendo diferença significativa entre os grupos ( $p=0,159$ ).

TABELA 3 – DIFERENÇA DE PESO ENTRE OS GRUPOS DURANTE A GESTAÇÃO

Dia de gestação	Diferença de peso	Valor de p
	Média ± EP	
1	7,06±10,47	0,5092
3	23,06±12,16	0,0750
5	29,17±10,99	0,0167
10	33,39±10,88	0,0070
14	46,73±10,63	0,0004
20	71,62±12,66	0,00004

Análise realizada pelo teste ANOVA. Diferença de peso entre os grupos AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle) e DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle. A partir do 5º. dia de gestação a diferença passa a ser significativa com valor de  $p=0,0167$ . Onde EP – desvio padrão

FIGURA 13 – Curvas de ganho de peso das ratas durante a gestação

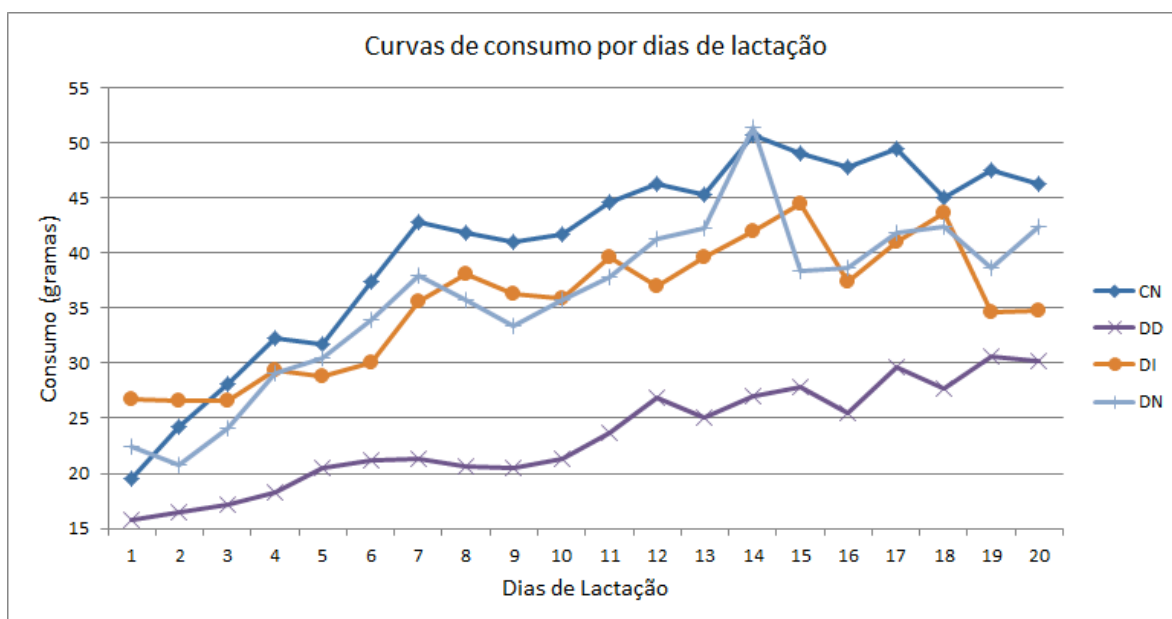


Avaliação pelo teste ANOVA. Onde: AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle); DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle. A partir do 5º. dia de gestação os pesos são significativamente diferentes com valor de  $p=0,0167$

Com relação ao consumo de ração durante o período de lactação, devido ao número reduzido de ratas por grupo, não foi possível avaliar significância estatística entre os mesmos. Entretanto, analisando as curvas apresentadas na Figura 14, notou-se:

- Aumento progressivo do consumo de ração durante a lactação.
- A curva de consumo de ração do grupo de ratas submetidas a dieta *ad libitum* durante a gestação (CN) manteve aumento uniforme durante a lactação, com redução discreta nos últimos dias da lactação.
- As curvas dos grupos suplementados durante a lactação (DI e DN) sugeriram um menor consumo de ração em relação ao controle (CN)

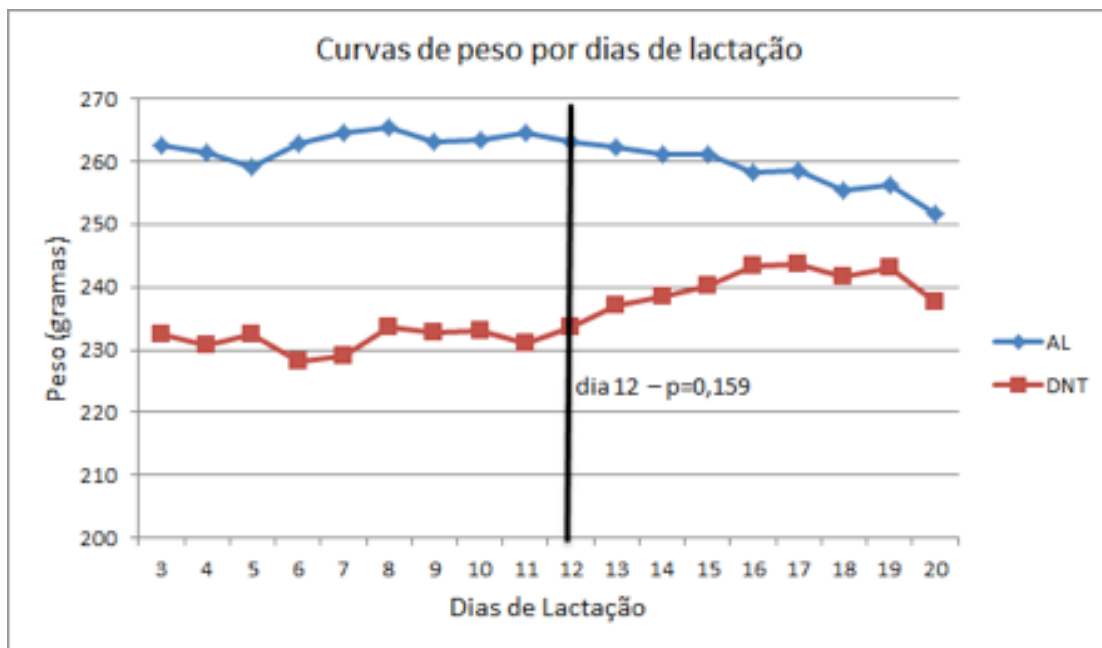
FIGURA 14 – Consumo de ração pelas ratas durante a lactação



Avaliação pelo teste ANOVA. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Com relação à evolução do peso das ratas durante a lactação (FIGURA 15), os grupos apresentaram comportamentos distintos: para as ratas desnutridas durante a gestação (DNT) e suplementadas durante a lactação, o ganho de peso foi progressivo desde o início dessa até o desmame. O grupo controle (AL), posteriormente CN, manteve peso médio constante durante a lactação, com redução na última semana do período. Quando comparadas as curvas de ganho de peso, excluído o grupo mantido desnutrido durante gestação e lactação (DD), a diferença estatística entre as curvas deixou de existir a partir do décimo segundo dia de lactação ( $p=0,159$ ).

FIGURA 15 – Curvas de ganho de peso das ratas durante a lactação

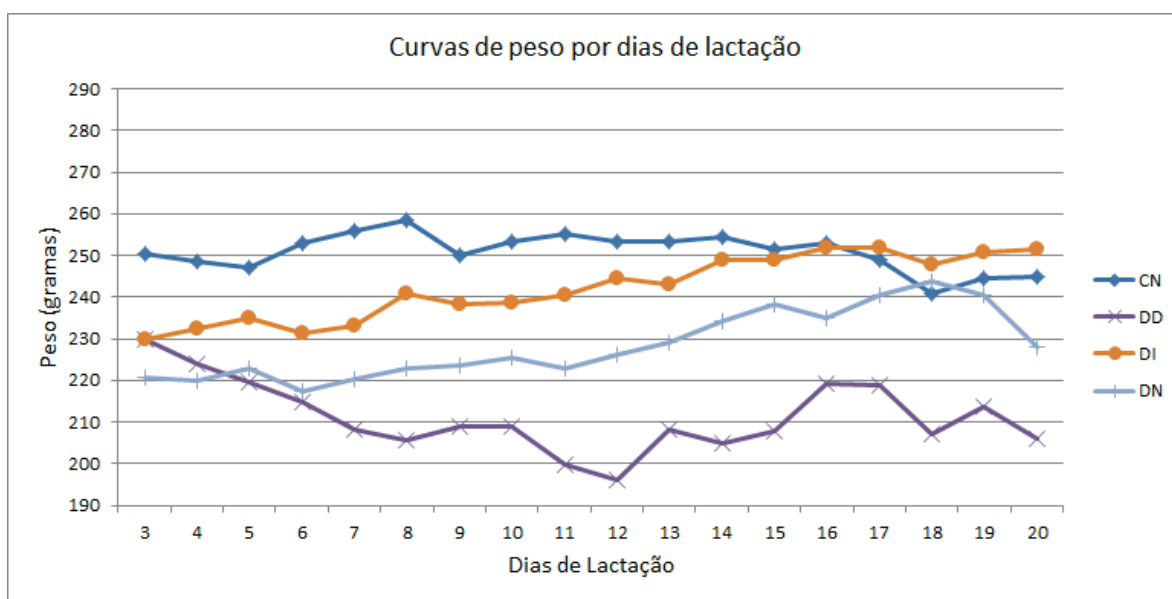


Avaliação pelo teste ANOVA. Os pesos das ratas desnutridas durante a gestação deixam de ser significativamente menores que o grupo controle a partir do 12º. dia de lactação com valor de  $p=0,159$ . Onde: AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle); DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle

Examinando separadamente as curvas de evolução do peso de cada um dos subgrupos grupos durante a lactação, não foi possível calcular significância estatística devido ao número reduzido de animais por grupo. Entretanto, percebeu-se claramente perda progressiva de peso do grupo mantido desnutrido durante a lactação (DD), com discreto ganho no final do período.

As curvas dos grupos de ratas mantidas desnutridas durante a gestação e suplementadas na lactação (DI e DN) demonstram tendência a aumento de peso mais expressiva que o grupo controle (CN), conforme mostra a Figura 16.

FIGURA 16 – Curvas de ganho de peso dos subgrupos durante a lactação



Avaliação pelo teste ANOVA. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Os valores médios de peso e albumina sérica das ratas no desmame são demonstrados na Tabela 4. Percebe-se claramente que o grupo DD apresenta valores menores que os demais, entretanto o número de animais em cada grupo não permite cálculo confiável de significância.

TABELA 4 – Valores de peso e albumina sérica das ratas no desmame

Grupo	Peso (gramas)	Albumina sérica (g/dL)
	Média ± EP	Média ± EP
CN	245±19,7	3,95±0,21
DI	251,5±4,0	4±0,54
DN	228±3	4,43±0,28
DD	206±14	4,2±0,69

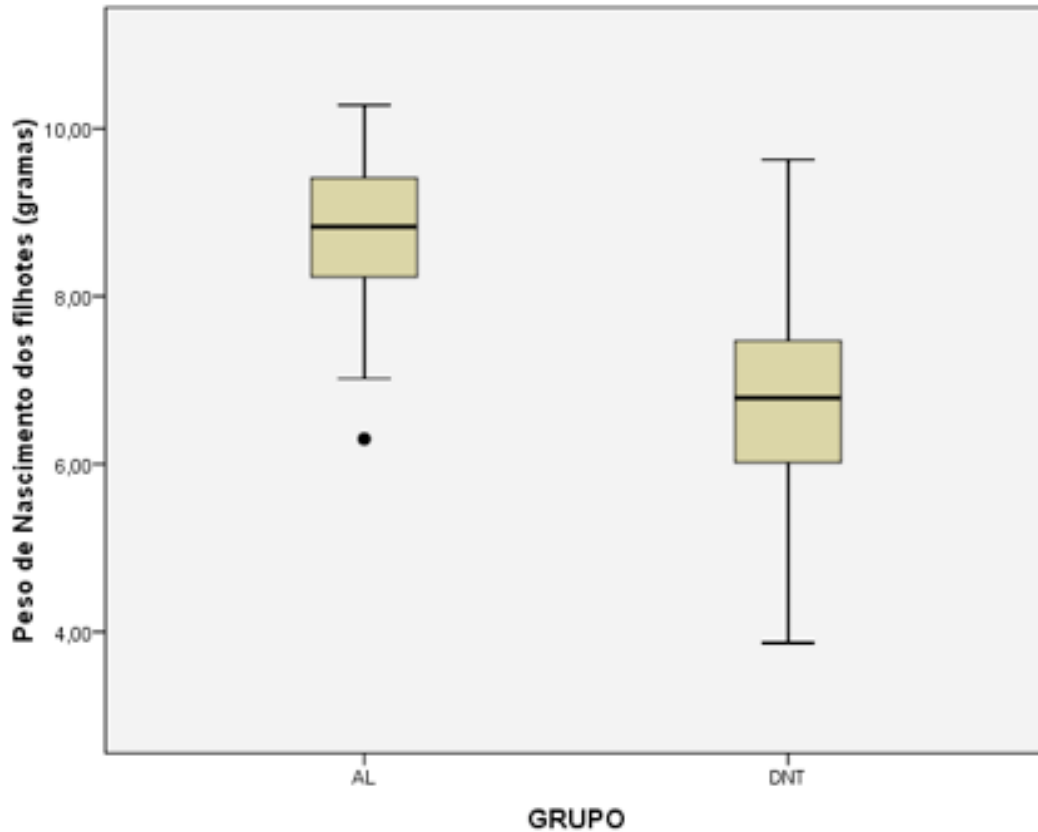
Onde: EP – erro padrão; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

#### 4.2 AVALIAÇÃO PÔNDERO-ESTATURAL DOS FILHOTES: NASCIMENTO, LACTAÇÃO E DESMAME

Avaliando o peso médio de nascimento, os filhotes do grupo de ratas mantidas desnutridas durante a gestação (DNT) apresentaram valor médio significativamente menor (6,80±0,13 g) do que aquele aferido nos filhotes do grupo controle (AL) (8,75±0,11 g) com valor de  $p < 0,001$  (FIGURA 17).



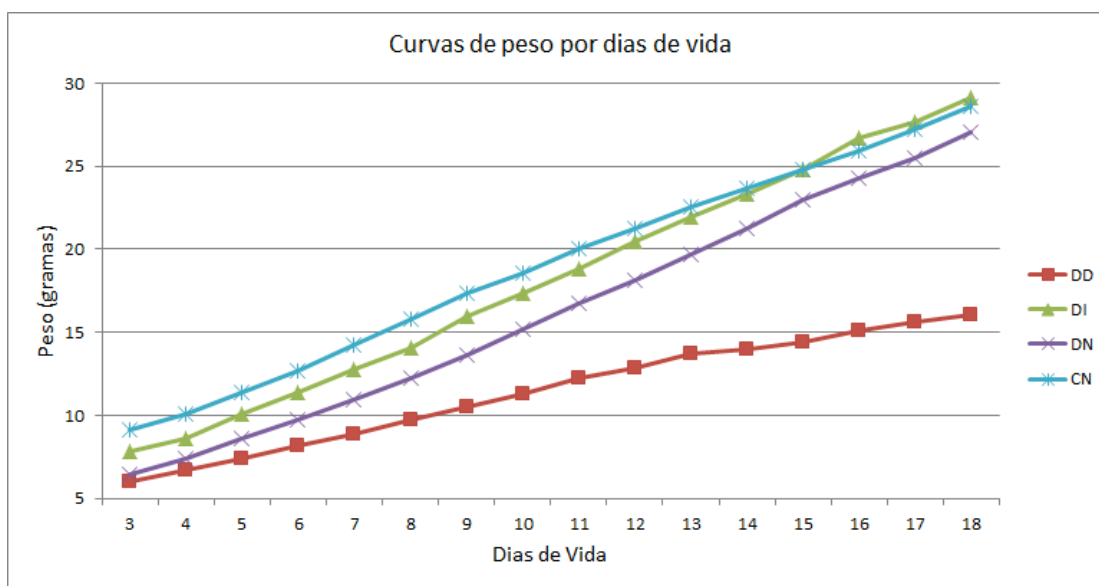
FIGURA 17 – Peso dos filhotes no nascimento



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey, com valor de  $p < 0,00001$ . Onde: AL - grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação (controle); DNT – grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle

Os filhotes de todos os grupos apresentaram ganho progressivo de peso durante a lactação, sendo esse mais lento no grupo mantido desnutrido durante a lactação (DD), conforme a Figura 18.

FIGURA 18 – Curvas de ganho de peso dos filhotes durante a lactação



Avaliação pelo teste ANOVA. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

O grupo desnutrido durante a lactação (DD) persistiu com peso significativamente menor que o controle no desmame. Os filhotes dos grupos desnutridos durante a gestação e suplementados na lactação, tanto com Impact® (DI) quanto com Nutren® (DN), apresentaram não só recuperação do peso, como demonstraram pesos significativamente maiores que o grupo controle. Não houve diferença significativa entre os dois grupos suplementados, com valor de  $p=0,96$  para comparação DI:DN. A Tabela 5 e a Figura 19 apresentam a comparação dos pesos dos filhotes no desmame.

Com relação aos valores de comprimento de corpo no desmame, conforme apresentados na tabela 5, o comportamento foi similar àquele do peso. Os filhotes de ratas mantidas desnutridas durante a lactação (DD) tiveram comprimento aferido de corpo significativamente menor que o controle no desmame. Os grupos suplementados na lactação (DI e DN) não só demonstraram recuperação, como

apresentaram valores significativamente maiores que os controles (CN) no desmame. Novamente não houve diferença estatística entre os dois diferentes tipos de suplementação (DI:DN –  $p=0,243$ ).

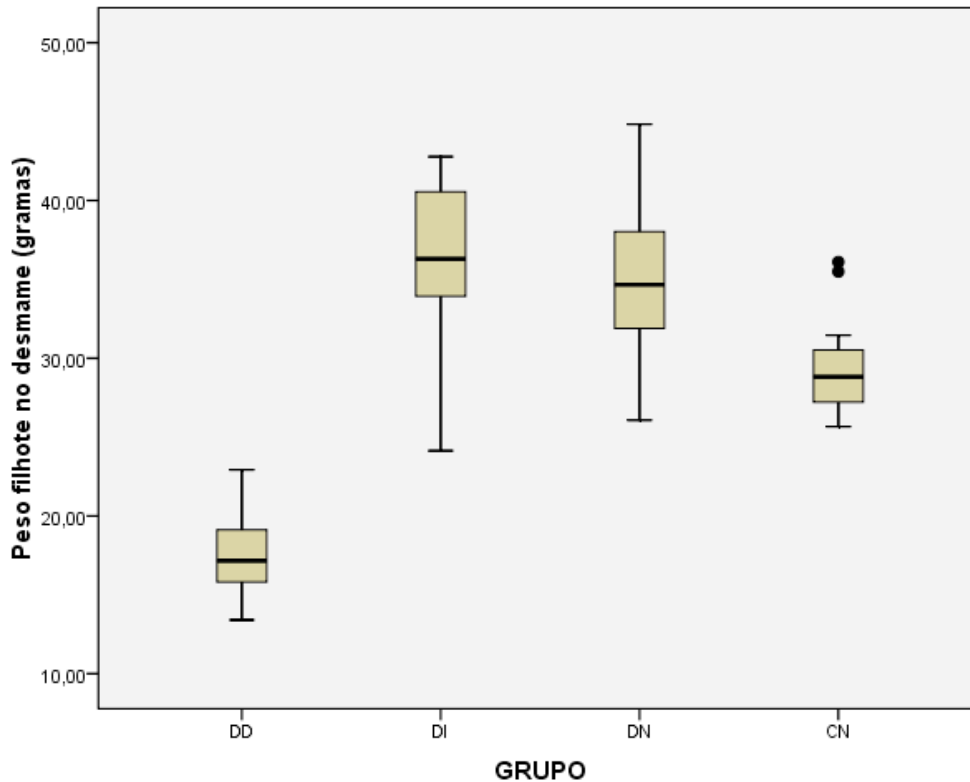
TABELA 5 – Avaliação pômdero-estatural dos filhotes no desmame

Grupo	Peso (gramas)		Comprimento do corpo (cm)		Comprimento da cauda (cm)	
	Média±EP	Valor de p	Média±EP	Valor de p	Média±EP	Valor de p
CN	29,21±0,64		9,87±0,07		6,72±0,07	
DI	36,08±1,12	0,0009	10,91±0,15	0,0008	7,01±0,12	0,745
DN	34,65±0,98	0,008	10,56±0,14	0,025	6,92±0,14	0,947
DD	17,47±0,44	0,0001	8,32±0,07	0,0006	5,32±0,07	0,0004

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: DP – desvio padrão; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Com relação ao comprimento de cauda, os grupos suplementados durante a lactação (DN e DI) apresentaram recuperação em relação ao controle (CN) no desmame. Não houve diferença significativa entre qualquer um dos grupos. O grupo desnutrido durante gestação e lactação (DD) apresentou valores significativamente menores que o controle (CN), conforme a tabela 5.

FIGURA 19 – Peso dos filhotes no desmame



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Os valores de peso médio dos grupos DI ( $p=0,0009$ ) e DN ( $p=0,008$ ) são significativamente maiores que o controle CN. O grupo DD apresentou valor significativamente menor que o controle ( $p=0,0001$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

#### 4.3 AVALIAÇÃO DOS ÓBITOS DOS FILHOTES

Conforme demonstra a Tabela 6, o grupo de filhotes de ratas desnutridas durante a gestação e lactação (DD) apresentou número significativamente maior de óbitos que os demais grupos com valor de  $p<0,001$ . A quase totalidade ocorreu no período pós-operatório, notadamente no primeiro dia. Entre os demais grupos não houve diferença significativa.

TABELA 6 – Distribuição dos óbitos dos filhotes

Grupo	Filhotes (n)	Óbitos na Lactação (n)	Óbitos Intraoperatórios (n)	Óbitos Pós-Operatórios (n)	Total de Óbitos (n)
CN	20	0	2	0	2
DI	23	0	0	0	0
DN	21	0	0	0	0
DD	30	0	1	22	23

Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

#### 4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL E DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA DOS FILHOTES NO SACRIFÍCIO

Comparando o peso dos filhotes, ainda no sétimo pós-operatório, o grupo mantido desnutrido durante a gestação e lactação (DD) apresentou valor significativamente menor que o controle. Os grupos suplementados (DI e DN) não demonstraram diferença significativa em relação ao controle (CN), independente da dieta utilizada, conforme mostra a Tabela 7 e a Figura 20.

Avaliando os pesos dos filhotes sacrificados no vigésimo primeiro pós-operatório, o grupo suplementado com Nutren® (DN) não apresentou diferença significativa em relação ao controle (CN). O grupo suplementado com Impact® (DI) demonstrou valor significativamente menor que o controle. Não houve filhotes do

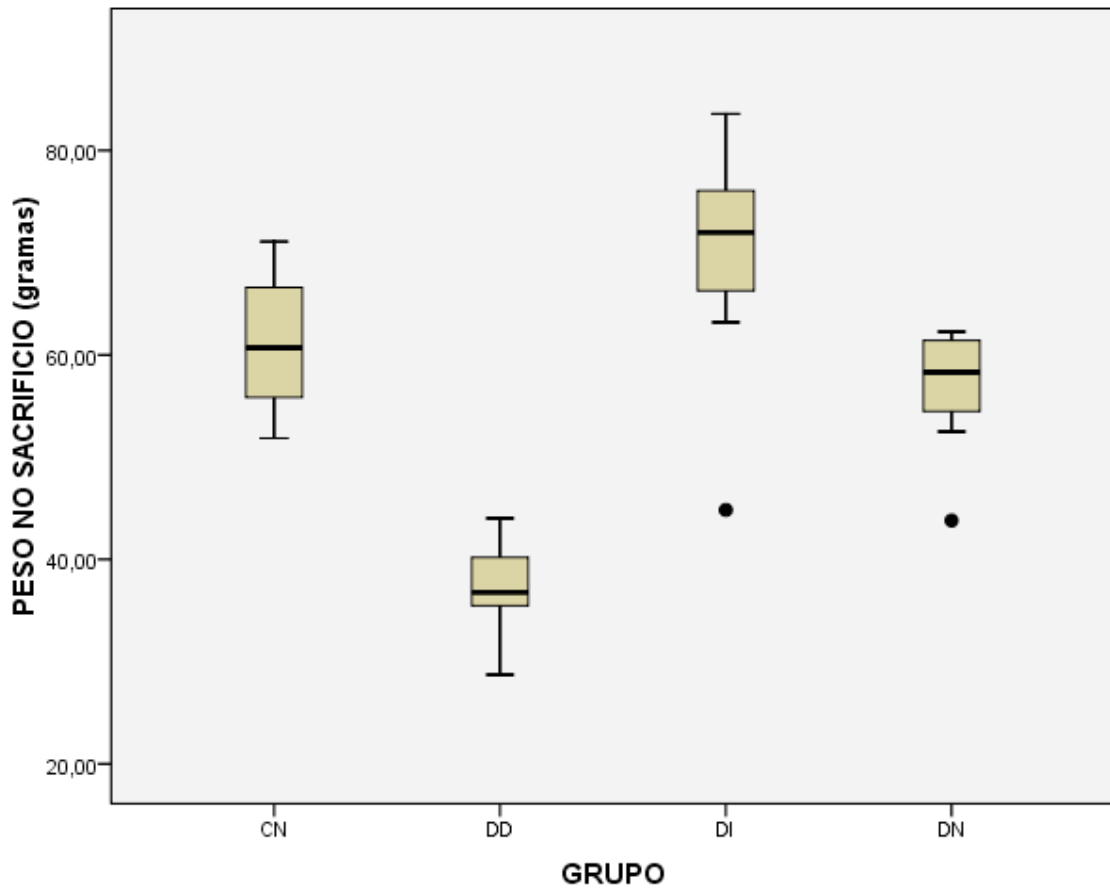
grupo desnutrido durante gestação e lactação (DD) devido à grande quantidade de óbitos no pós-operatório.

TABELA 7 – Distribuição dos valores de peso dos filhotes

Grupo	7° Pós-operatório			21° Pós-operatório		
	Total	Peso (gramas)	Valor de p	Total	Peso (gramas)	Valor de p
		Média±EP			Média±EP	
CN	10	60,88±1,98		8	128,29±4,64	
DI	12	70,24±2,83	0,116	11	104,36±3,89	0,0048
DN	10	57,01±1,83	0,935	11	118,69±4,48	0,6452
DD	7	37,26±1,87	0,0006			

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 20 – Peso dos filhotes sacrificados no 7º dia de pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. O grupo DD apresentou valor significativamente menor que o controle ( $p=0,0006$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Com relação à dosagem sérica de albumina, todos os grupos desnutridos durante o período gestacional apresentaram valores significativamente menores que o controle (CN) no sétimo pós-operatório, independentemente do tipo de suplementação utilizada durante o período de lactação. No vigésimo primeiro pós-operatório, o grupo suplementado com Impact® (DI) apresentou valor significativamente menor que o controle (CN), enquanto o grupo suplementado com Nutren® (DN) não (TABELA 8 e FIGURA 21).

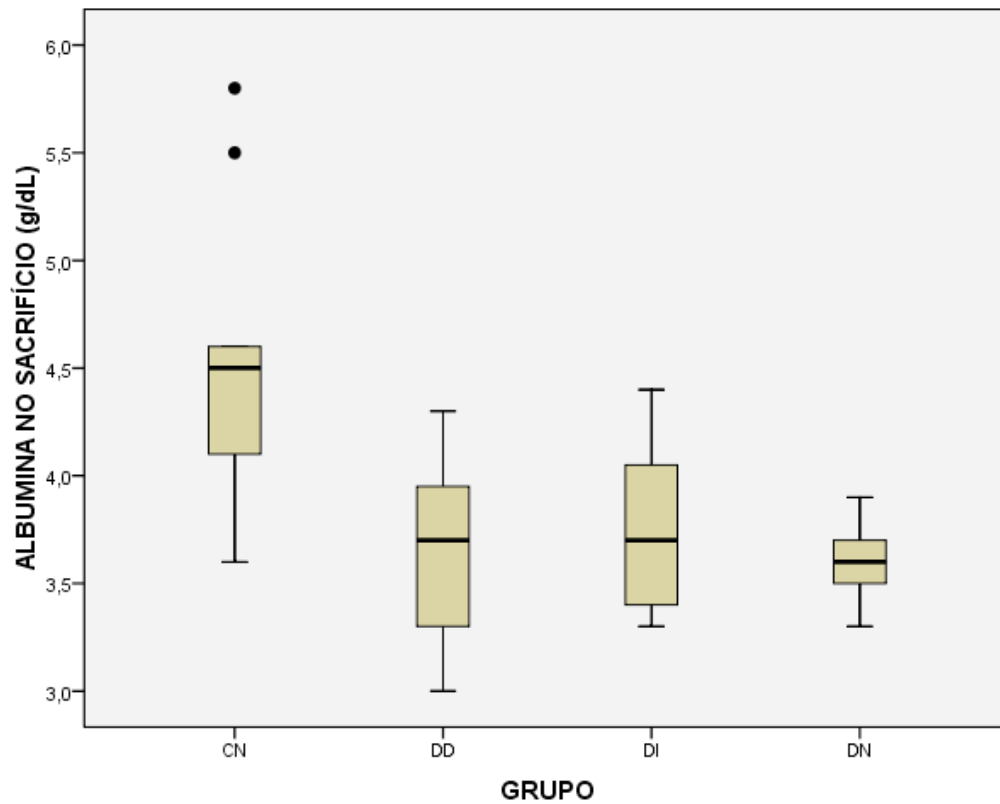
TABELA 8 – Distribuição dos valores de dosagem sérica de albumina dos filhotes

Grupo	Total	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório		
		Albumina (g/dL)	Valor de p	Total	Albumina (g/dL)	Valor de p
		Média±EP		Média±EP		
CN	10	4,55±0,21		8	4,025±0,15	
DI	12	3,75±0,11	0,001	11	3,54±0,05	0,015
DN	10	3,62±0,05	0,0008	11	3,86±0,07	0,857
DD	7	3,64±0,17	0,0009			

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação



FIGURA 21 – Dosagem sérica de albumina dos filhotes sacrificados no 7º dia de pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Os valores de albumina sérica dos grupos DI ( $p=0,001$ ), DN ( $p=0,0008$ ) e DD ( $p=0,0009$ ) foram significativamente menores que o controle CN. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

## 4.5 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO

### 4.5.1 Avaliação Tensiométrica

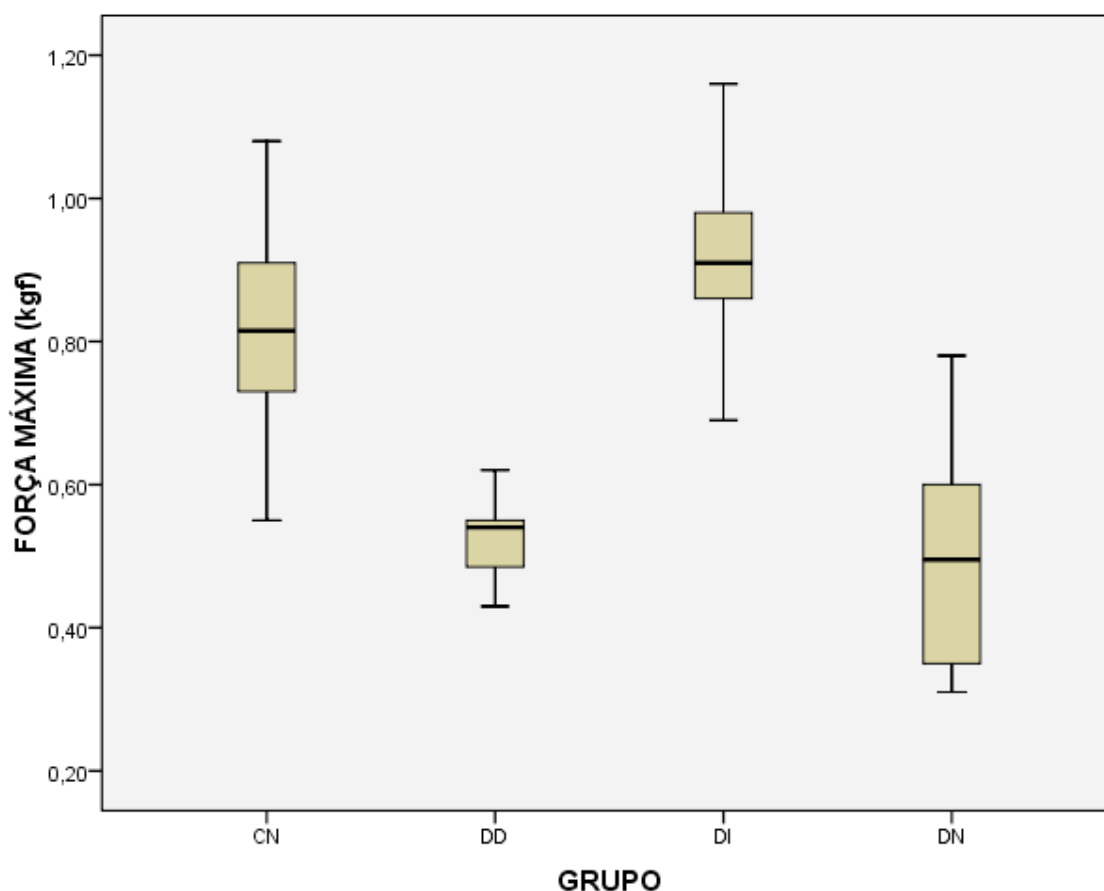
No que se refere à força máxima aplicada à ferida antes da ruptura, no 7º pós-operatório, o grupo suplementado com Impact® (DI), não apresentou diferença significativa em relação ao controle (CN). Os grupos desnutrido durante a gestação e lactação (DD), bem como suplementado com Nutren® (DN) apresentaram valores de força máxima significativamente menores que o controle. No vigésimo-primeiro pós-operatório não houve diferença significativa entre os grupos (TABELA 9 e FIGURA 22).

TABELA 9 – Avaliação tensiométrica da cicatriz – Força Máxima

Grupo	7º Pós-operatório			21º Pós-operatório		
	Total	Força máxima (kgf)	Valor de p	Total	Força máxima (kgf)	Valor de p
	Média±EP			Média±EP		
CN	10	0,8190±0,045		8	1,7113±0,07	0,129
DI	12	0,9108±0,039	0,675	11	1,5418±0,09	
DN	10	0,4930±0,047	0,001	11	1,8709±0,09	
DD	7	0,5229±0,024	0,0008			

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 22 – Avaliação da força máxima aplicada à ferida cirúrgica dos filhotes sacrificados no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Os valores de força máxima dos grupos DN ( $p=0,001$ ), DD ( $p=0,0008$ ) foram significativamente menores que o controle CN. Onde: Kgf – kilograma-força; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

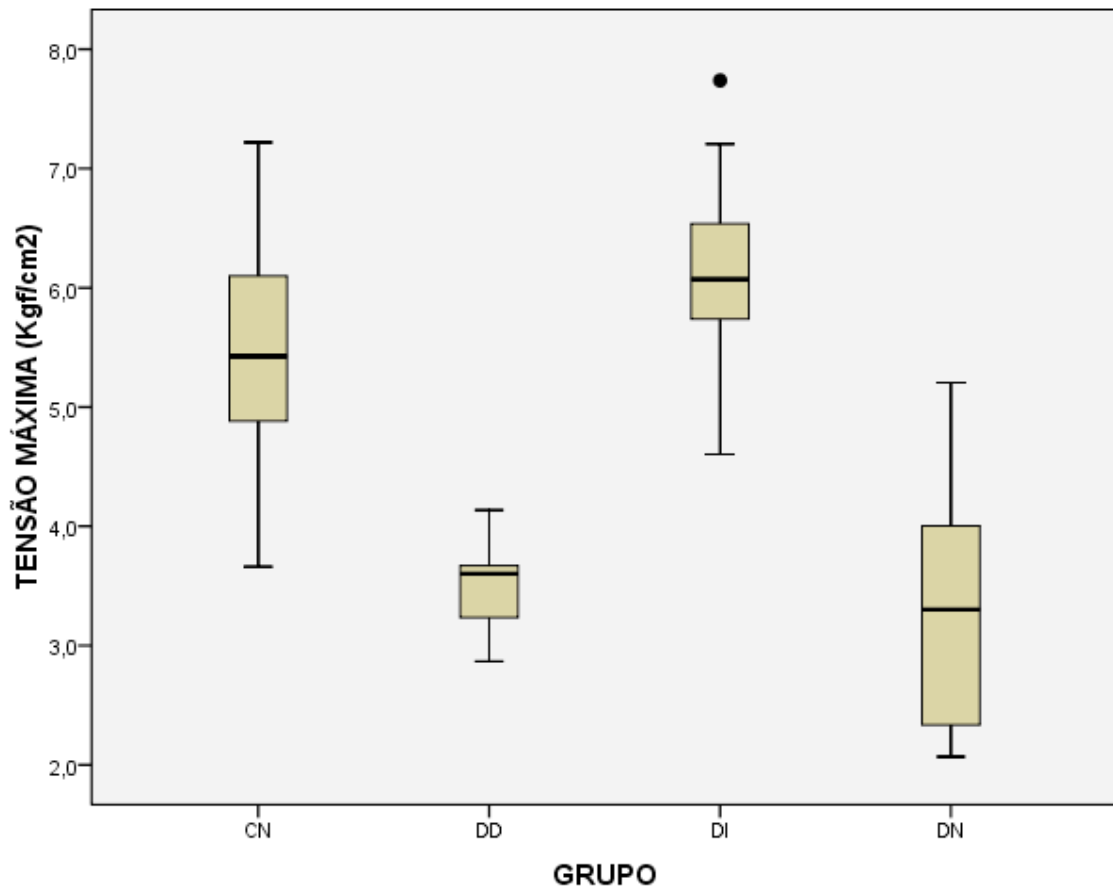
Quando se comparou a tensão máxima suportada, no 7º pós-operatório, da mesma forma, os grupos mantido desnutrido durante a lactação (DD) e suplementado com Nutren® (DN), apresentaram resultados significativamente menores que o controle (NC). O grupo suplementado com Impact® (DI), não demonstrou diferença significativa em relação ao controle. No vigésimo-primeiro pós-operatório, não houve diferença entre os grupos (TABELA 10 e FIGURA 23).

TABELA 10 – Avaliação tensiométrica da cicatriz – Tensão Máxima

Grupo	7° Pós-operatório			21° Pós-operatório		
	Total	Tensão máxima (kgf/cm <sup>2</sup> )	Valor de p	Total	Tensão máxima (kgf/cm <sup>2</sup> )	Valor de p
		Média±EP			Média±EP	
CN	10	5,4638±0,301		8	11,4107±0,48	0,13
DI	12	6,0763±0,265	0,677	11	10,2856±0,63	
DN	10	3,2889±0,314	0,001	11	12,4810±0,60	
DD	7	3,4880±0,159	0,0008			

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 23 – Avaliação da tensão máxima suportada por área da ferida cirúrgica dos filhotes sacrificados no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Os valores de tensão máxima dos grupos DN ( $p=0,001$ ), DD ( $p=0,0008$ ) foram significativamente menores que o controle CN. Onde:  $\text{kgf/cm}^2$  – quilograma-força por centímetro quadrado; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

#### 4.5.2 Morfometria do Colágeno

No sétimo pós-operatório, quando comparados os valores de deposição de colágeno na ferida operatória, considerando a concentração total de colágeno, o grupo desnutrido durante a gestação e lactação (DD) apresentou quantidade significativamente menor em relação ao controle (CN). Com relação aos grupos suplementados com Nutren® (DN) e Impact® (DI), não houve diferença significativa em relação ao controle ou entre si (TABELA 11 e FIGURA 24).

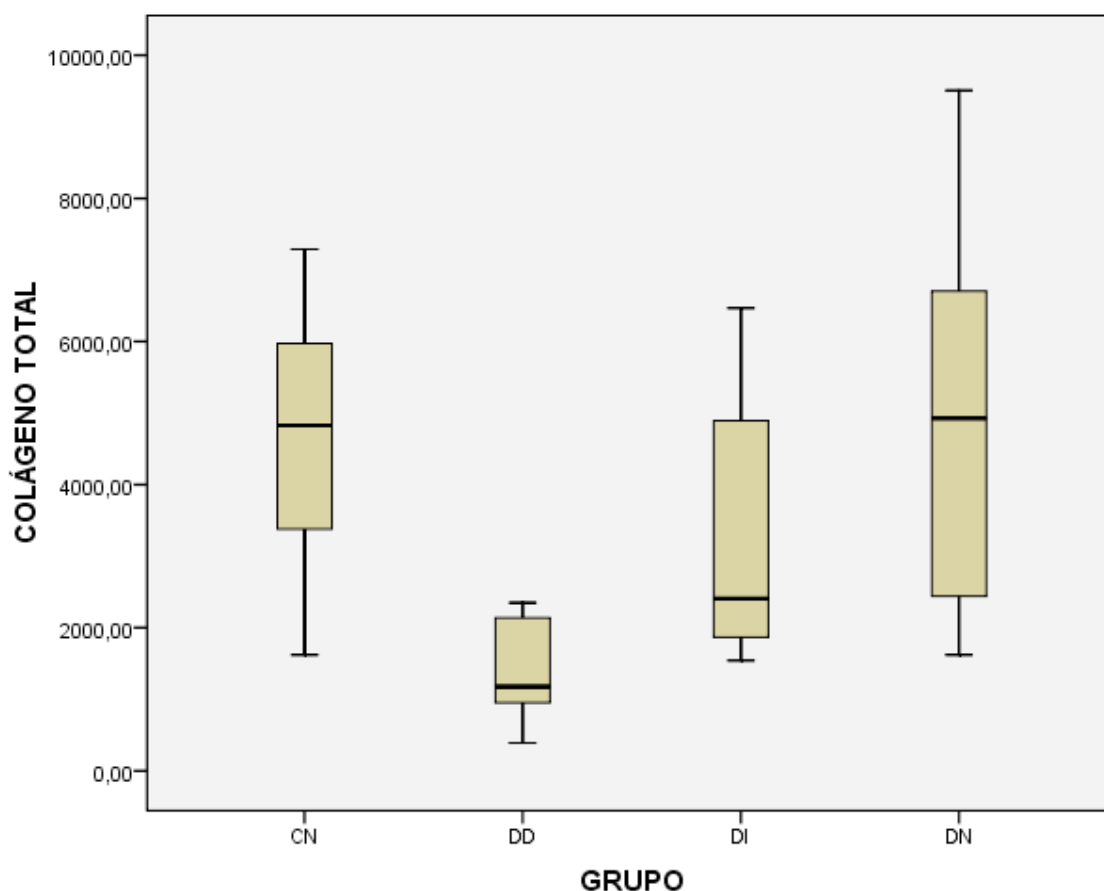
Quando avaliados no vigésimo-primeiro pós-operatório, grupo controle (CN) apresentou valor significativamente maior que os grupos suplementados com Impact® (DI) e Nutren® (DN). Não houve diferença entre os grupos suplementados.

TABELA 11 – Concentração total de colágeno na cicatriz

Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	Colágeno total $\mu\text{m}^2$	Valor de p	Colágeno total $\mu\text{m}^2$	Valor de p
	Média $\pm$ EP		Média $\pm$ EP	
CN	4562,78 $\pm$ 601,43		10023,76 $\pm$ 724,47	
DI	3189,34 $\pm$ 508,36	0,3297	4559,62 $\pm$ 817,62	0,00009
DN	4849,43 $\pm$ 785,33	0,9995	6290,51 $\pm$ 740,86	0,004
DD	1441,89 $\pm$ 292,97	0,0013		

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 24 – Concentração total de colágeno na ferida cirúrgica dos filhotes sacrificados no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. O valor de concentração total de colágeno nas feridas do grupo DD ( $p=0,0013$ ) foi significativamente menor que o controle CN. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

Quando se avaliou as porcentagens de colágeno tipo I (maduro) nas feridas no sétimo pós-operatório, o grupo suplementado com Impact® (DI) apresentou valores maiores do tipo I em relação aos grupos desnutrido (DD) e suplementado com Nutren® (DN), sendo esses mais próximos ao controle (CN), entretanto não houve diferença significativa entre os grupos. Da mesma maneira, no vigésimo-primeiro pós-operatório, os grupos não diferiram, conforme a Tabela 12 e a Figura 25.

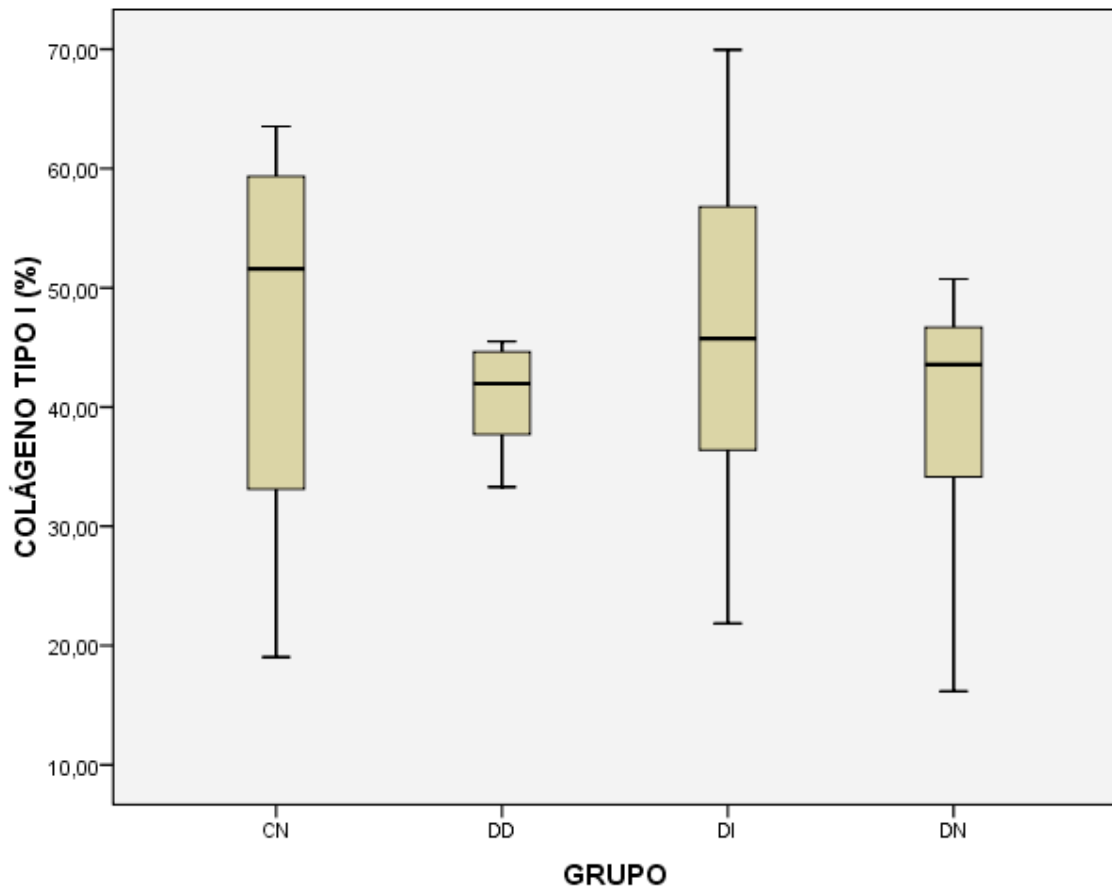
TABELA 12 – Porcentagem de colágeno tipo I (maduro) na cicatriz

Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	Colágeno tipo I (%)	Valor de p	Colágeno tipo I (%)	Valor de p
	Média±EP		Média±EP	
CN	47,04±4,88		48,94±4,91	
DI	46,76±4,20	0,999	50,37±5,21	0,076
DN	38,41±3,97	0,6777	39,84±4,82	
DD	40,78±1,76	0,9373		

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação



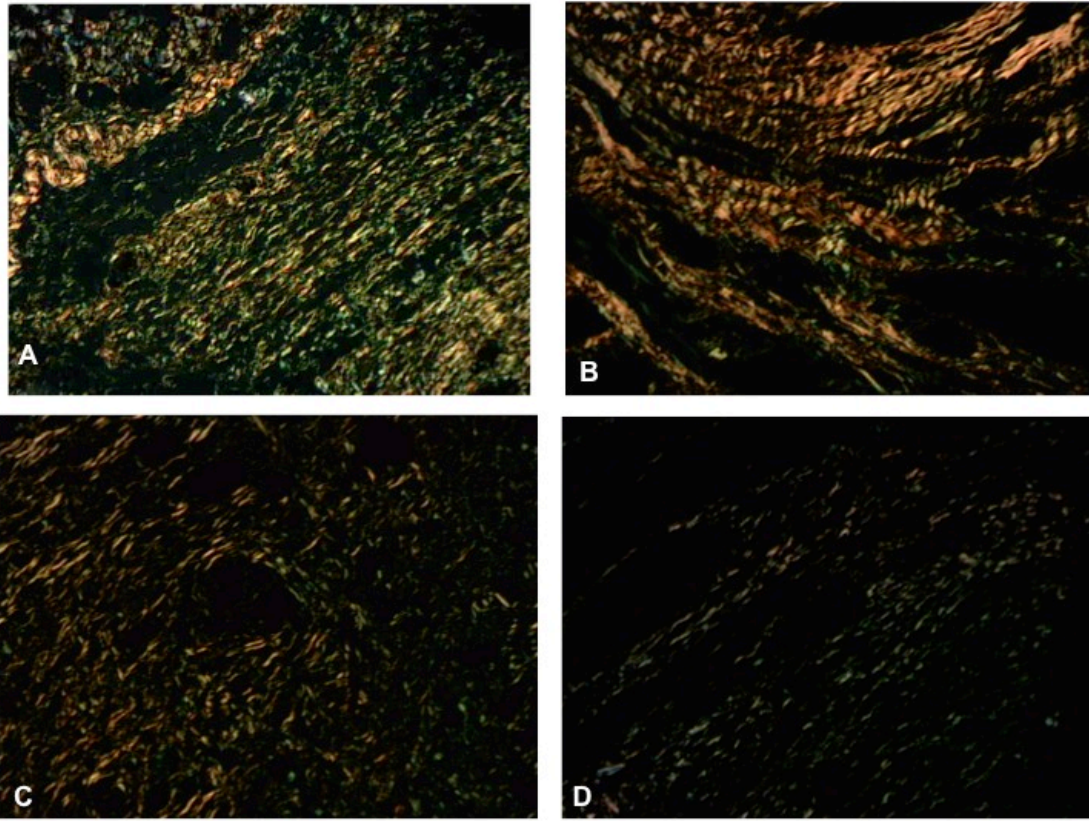
FIGURA 25 – Porcentagem de colágeno tipo I (maduro) na ferida cirúrgica dos filhotes sacrificados no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Não houve diferença significativa entre os grupos. Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

A Figura 26 apresenta exemplos do resultado obtido na avaliação da concentração de colágeno na cicatriz cirúrgica.

FIGURA 26 – Morfometria do colágeno

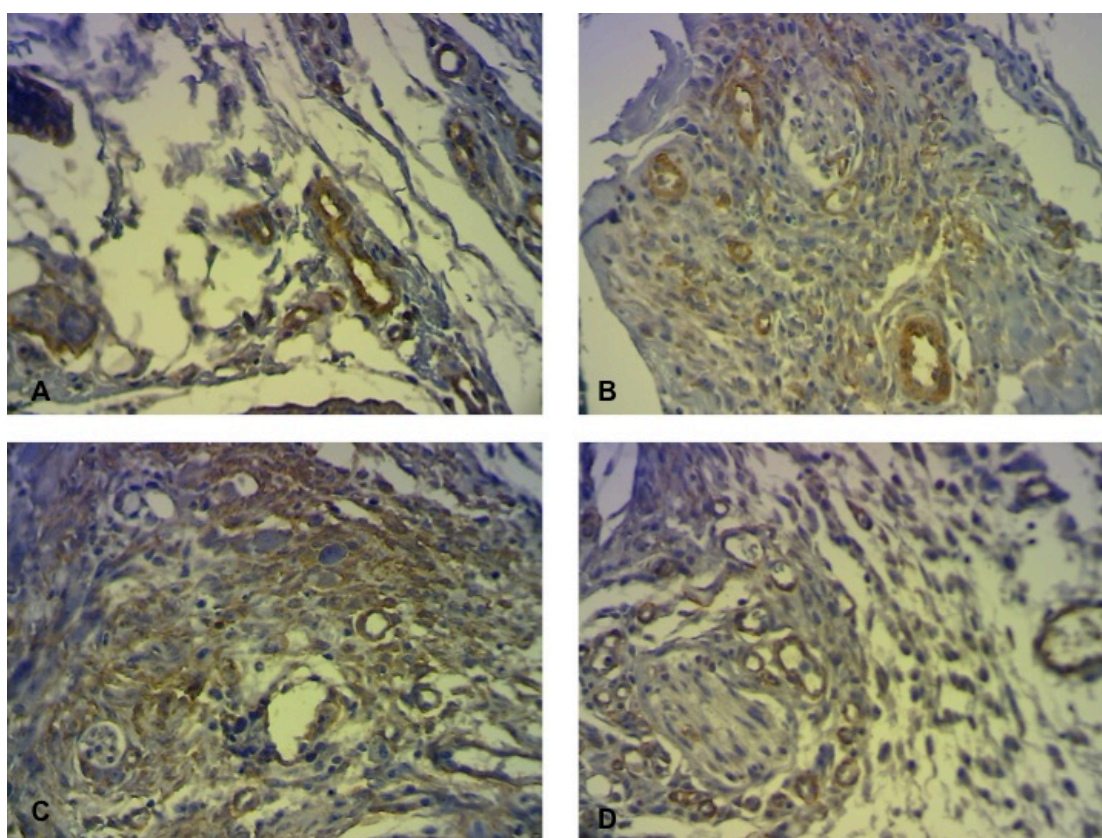


A. Cicatriz cirúrgica com alta concentração de colágeno, especialmente tipo III (imaturo); B. Cicatriz com alta concentração de colágeno, principalmente tipo I (maduro); C. Cicatriz com moderada concentração de colágeno, distribuição uniforme entre os tipos I e III; D. Cicatriz com baixa concentração de colágeno, predomínio do tipo III (imaturo)

### 4.5.3 Imunoistoquímica

A Figura 27 ilustra a avaliação imunoistoquímica da expressão do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA em amostras dos 4 grupos avaliados.

FIGURA 27 – Imunoistoquímica: resultados



Comparação da expressão do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA nos diferentes grupos, ilustrando a possibilidade de avaliação da angiogênese. A. Grupo CN; B Grupo DI; C. Grupo DN; D. Grupo DD

A avaliação da expressão de anti- $\alpha$ -SMA nas feridas dos filhotes, o grupo DI não apresentou valores significativamente diferentes do controle independente do dia de sacrifício. Para os demais filhotes sacrificados no sétimo pós-operatório, os grupos DN e DD tiveram valores significativamente maiores que o controle (CN),

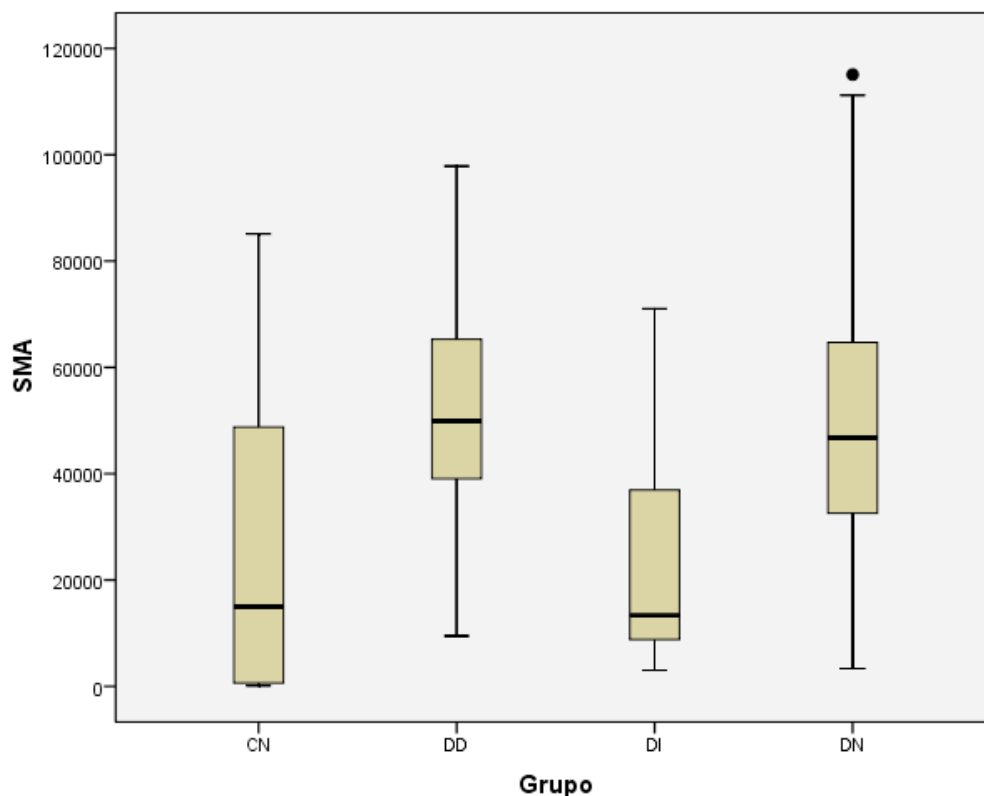
sendo que o grupo DN manteve essa diferença significativa no vigésimo-primeiro pós-operatório (TABELA 13 e FIGURA 28).

TABELA 13 – Expressão de actina muscular lisa ( $\alpha$ -sma) na cicatriz

Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	$\alpha$ -SMA ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p	$\alpha$ -SMA ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p
	Média $\pm$ EP		Média $\pm$ EP	
CN	26456,49 $\pm$ 5228,67		10089,93 $\pm$ 1772,90	
DI	23412,44 $\pm$ 3159,06	0,9582	13808,88 $\pm$ 2716,01	0,5114
DN	51530,30 $\pm$ 5678,48	0,0017	24689,81 $\pm$ 1609,09	0,0006
DD	54271,84 $\pm$ 5362,04	0,0018		

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 28 - Expressão de actina muscular lisa ( $\alpha$ -sma) na ferida operatória dos filhotes sacrificados no no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Os grupos DN ( $p=0,0017$ ) e DD ( $p=0,0018$ ) apresentaram valores significativamente maiores que o controle (CN). Ambos os grupos apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo DI, com DN ( $p=0,0001$ ) e DD ( $p=0,0002$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

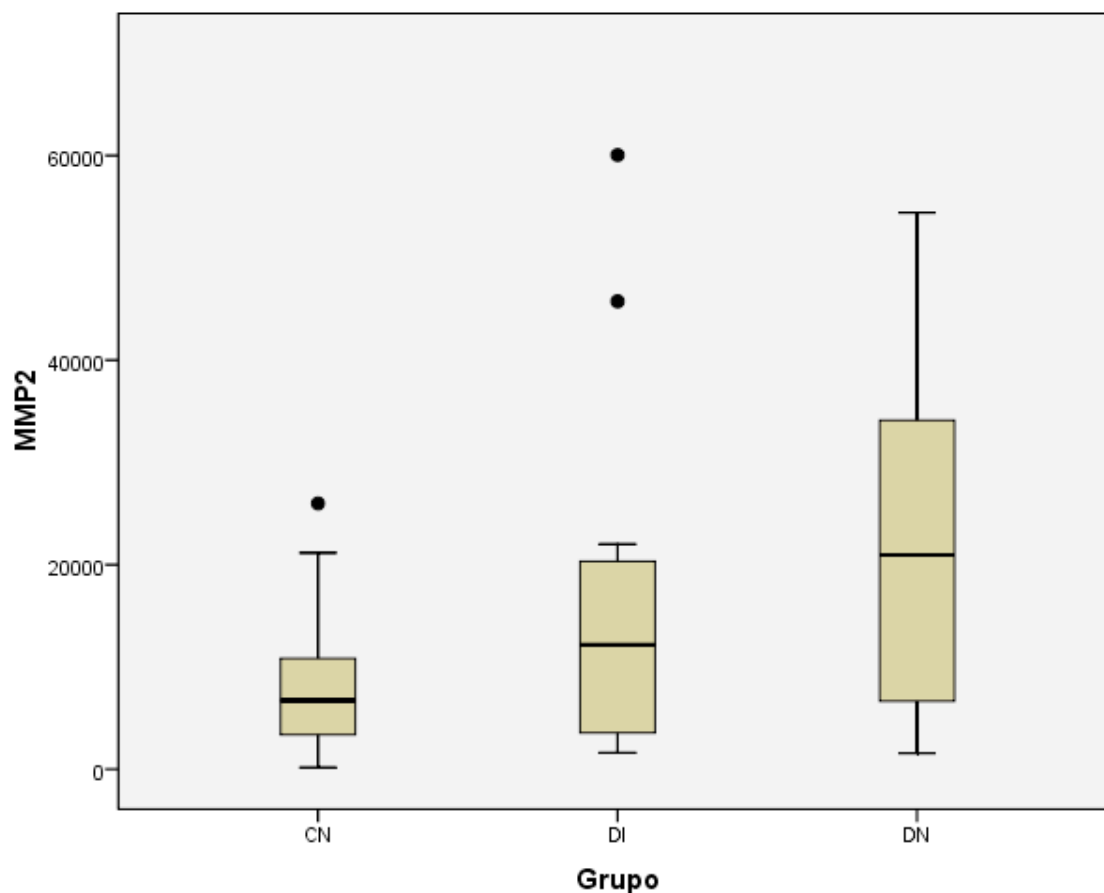
Quando comparados os valores de expressão de MMP-2, não houve diferença entre os grupos no sétimo pós-operatório. O grupo DN apresentou valores significativamente maiores em relação ao controle no vigésimo-primeiro pós-operatório, conforme ilustra a Tabela 14 e a Figura 29.

TABELA 14 – Expressão de metaloproteinase 2 (MMP-2) na cicatriz

Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	MMP-2 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p	MMP-2 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p
	Média $\pm$ EP		Média $\pm$ EP	
CN	14032,15 $\pm$ 2068,57		8258,08 $\pm$ 1740,12	
DI	9553,00 $\pm$ 1490,16	0,229	16902,53 $\pm$ 5309,11	0,26
DN	17446,93 $\pm$ 4860,66		21967,76 $\pm$ 4933,06	0,04
DD	12936,99 $\pm$ 2370,07			

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 29 - Expressão de metaloproteinase 2 (MMP-2) na ferida operatória dos filhotes sacrificados no 21° pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. O grupo DN apresentou valor significativamente maior em relação ao controle ( $p=0,04$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação

Avaliando a expressão de MMP-9 nas feridas no sétimo pós-operatório não foi aferida diferença significativa dos grupos DI, DN ou DD em relação ao controle conforme mostra a Tabela 15. Na comparação entre os grupos desnutridos durante a gestação, os filhotes suplementados com Impact® apresentaram valores significativamente menores do que aqueles desnutridos durante a lactação (DI:DD –  $p=0,0003$ ) e do que aqueles suplementados com Nutren® (DI:DN –  $p=0,029$ ).

TABELA 15 – Expressão de metaloproteinase 9 (MMP-9) na cicatriz

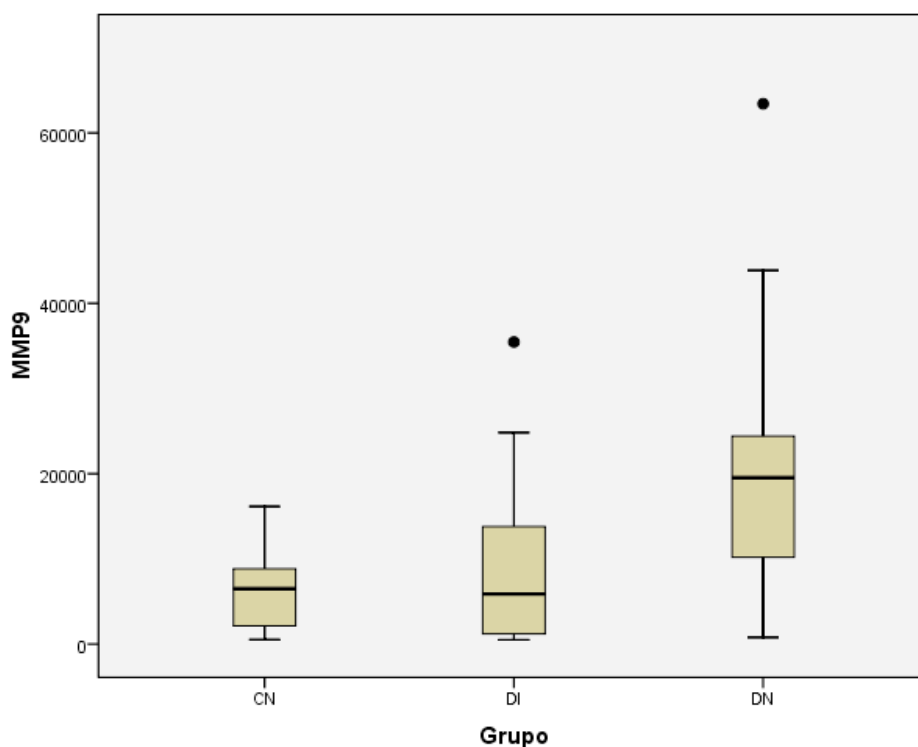
Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	MMP-9 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p	MMP-9 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p
	Média $\pm$ EP		Média $\pm$ EP	
CN	15851,63 $\pm$ 4175,65		6886,91 $\pm$ 1667,93	
DI	5573,56 $\pm$ 1030,17	0,244	9153,52 $\pm$ 2742,38	0,887
DN	20846,08 $\pm$ 3223,88	0,812	19007,88 $\pm$ 2587,31	0,021
DD	31139,40 $\pm$ 8404,78	0,078		

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

No vigésimo-primeiro pós-operatório, o grupo suplementado com Nutren® apresentou valores significativamente maiores em relação ao controle e ao grupo DI, conforme a Figura 30.



FIGURA 30 - Expressão de metaloproteinase 9 (MMP-9) na ferida operatória dos filhotes sacrificados no 21º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. O grupo DN apresentou valores significativamente maiores em relação ao controle CN ( $p=0,02$ ) e DI ( $p=0,03$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação

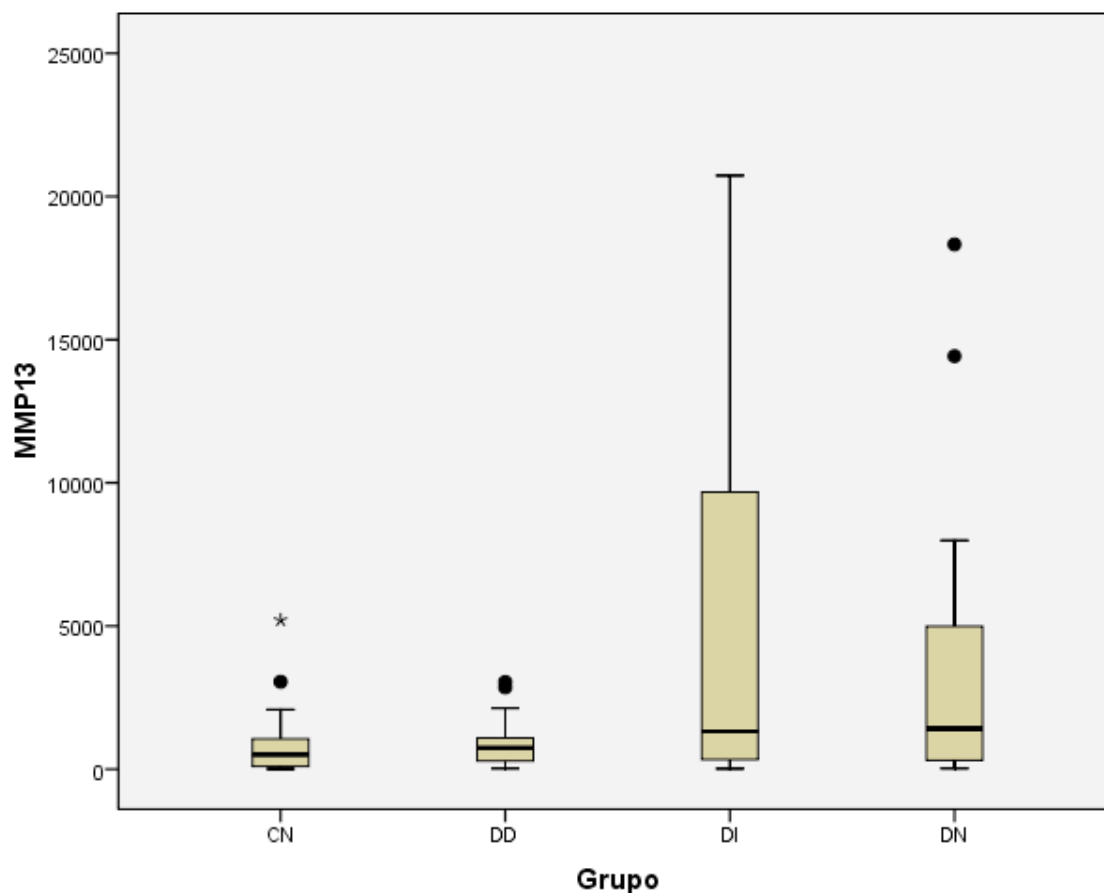
Na avaliação da expressão da MMP-13 nas feridas dos filhotes sacrificados no sétimo pós-operatório, o grupo DI apresentou valor significativamente maior que o controle (CN) e do que o grupo mantido desnutrido durante a lactação (DD), sem diferença em relação ao grupo DN (DI:DN –  $p=0,32$ ), conforme a Tabela 16 e a Figura 31. No vigésimo-primeiro pós-operatório, não houve diferença significativa entre os grupos.

TABELA 16 – Expressão de metaloproteinase 13 (MMP-13) na cicatriz

Grupo	7° Pós-operatório		21° Pós-operatório	
	MMP-13 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p	MMP-13 ( $\mu\text{m}^2$ )	Valor de p
	Média $\pm$ EP		Média $\pm$ EP	
CN	770,33 $\pm$ 149,64		2273,19 $\pm$ 859,32	
DI	4946,75 $\pm$ 36,21	0,008	4368,92 $\pm$ 1586,75	0,44
DN	3281,31 $\pm$ 854,20	0,06	2560,11 $\pm$ 891,13	
DD	888,97 $\pm$ 154,93	0,919		

Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. Onde: EP – erro padrão; M – sexo masculino; F – sexo feminino; CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

FIGURA 31 - Expressão de metaloproteinase 13 (MMP -13) na ferida operatória dos filhotes sacrificados no 7º pós-operatório



Análise realizada pelos testes ANOVA e Tukey. O grupo DI ( $p=0,008$ ) demonstrou valor significativamente maior que o controle (CN). Houve diferença significativa entre os grupos DI e DD ( $p=0,008$ ). Onde: CN – grupo submetido a dieta *ad libitum* durante a gestação e lactação; DI - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Impact® durante a lactação; DN - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e dieta *ad libitum* + suplementação com Nutren® durante a lactação; DD - grupo submetido a 60% da dieta do grupo controle durante a gestação e lactação

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 O MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental escolhido para desenvolvimento do presente estudo necessitou adequação às diferentes questões envolvidas no mesmo. Com relação à desnutrição intrauterina e retardo do crescimento intrauterino, Hawkins, em 2000 e Gatford, em 2008, utilizaram o modelo ovino com restrição de dieta. O modelo suíno foi utilizado por Mateo, em 2008, que além de restrição de dieta durante a gestação, propôs a suplementação com arginina durante a lactação, realizada através da suplementação da ração dos animais.

Diversos estudos anteriores descreveram a utilização do modelo experimental de desnutrição intrauterina utilizando ratos, pela facilidade no manejo, associada a custos reduzidos (COELHO-LEMONS, 2004; GURMINI, 2005). A desnutrição intrauterina pode ser induzida por restrição proteica: em geral os animais são alimentados com rações com teor proteico de 6 a 8%, recebendo os controles 20% de teor de proteínas na formulação da ração (ALVES, 2008; BARRETO, 2012).

O modelo *pair-feeding* adota a mesma composição de dieta para ambos os grupos, recebendo o controle dieta *ad libitum* e o grupo desnutrido no máximo 70% da quantidade média consumida pelo controle (GONÇALVES, 2009; BADR, 2011; LABORIE, 2011). O presente estudo adotou esse modelo por ser o mais extrapolável à prática clínica. Normalmente as mães desenvolvem desnutrição antes ou durante a gestação por falta de acesso a quantidade suficiente de alimentos, intolerância alimentar ou doenças relacionadas à absorção.

Com relação à suplementação materna com arginina durante a lactação, os estudos realizados até o momento foram em modelos experimentais suínos

(MATEO, 2008, WU, 2004). Os modelos experimentais utilizando arginina com intuito de melhora na condição do filhote foram realizados durante a gestação, objetivando estudar os efeitos do aminoácido na reversão do retardo de crescimento intrauterino (SIEROSZERSKI, 2004; XIAO, 2005). Aparentemente, esse foi o primeiro estudo experimental em roedores abordando a suplementação materna com arginina durante a lactação.

Uma vez que o estudo pretendia induzir desnutrição desde o início da gestação, a detecção da prenhez foi de suma importância. Optou-se pela realização de lavado vaginal imediatamente após o período de acasalamento (ARAÚJO, 2005; BOTELHO, 2009) ao invés de detecção de *plug* vaginal (COELHO-LEMOS, 2002; MORAES JUNIOR, 2008), pela possibilidade de perda do tampão vaginal entre a cópula e a avaliação pelo pesquisador.

Com relação à condução da gestação ao termo, apenas 59,35% das ratas tidas como prenhas deram luz a filhotes vivos. A desnutrição gestacional foi apontada como causa de interrupção de gestação (DESAI, 2011), entretanto no presente estudo não houve diferença entre os grupos com relação ao percentual de gestações não levadas ao termo.

No que se refere à efetividade do modelo de desnutrição intrauterino, estudos anteriores descreveram modelos com restrição no aporte de dieta variando de 50% (COELHO-LEMOS, 2002) a 70% (LUKASZEWSKI, 2011) do volume oferecido ao controle. A opção desse trabalho foi manter o grupo desnutrido com 60% da ingestão do controle, evitando restrição mais extrema conseguiu-se sucesso no desenvolvimento de desnutrição intrauterina, bem como em manter um grupo de ratas desnutridas durante a lactação, sem canibalismo, chegando quase a totalidade dos filhotes ao desmame.

Com relação à dose de arginina utilizada, valores distintos foram descritos na literatura, variando de 300 mg/kg/dia a 1 g/kg/dia (SHI, 2007; WITTMANN, 2004;

ONO, 2009). No presente estudo, a dose fornecida foi de 300 mg/kg/dia, equilibrando a dose de arginina presente na dieta, com a capacidade gástrica das ratas, evitando o risco de regurgitação e, eventual broncoaspiração.

## 5.2 VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E DOSAGEM SÉRICA DE ALBUMINA

Examinando a evolução de peso das ratas, os achados do estudo corroboram dados anteriores os quais afirmaram que em modelos de desnutrição intrauterina, as ratas apresentam redução no peso durante a primeira e segunda semanas de gestação (FLORIAN, 2011; GUEDES, 2013). No estudo atual, as ratas normonutridas apresentaram aumento progressivo de peso até o parto, enquanto que as desnutridas evoluíram com perda de peso na primeira semana, mantiveram peso relativamente constante durante a segunda semana e passaram a apresentar ganho de peso na última semana da gestação. Estudos anteriores também demonstraram evolução similar, sendo o ganho de peso no final da gestação atribuído ao ganho de peso dos conceptos e da placenta (LABORIE, 2011; THEYS, 2011).

Com relação à avaliação do peso dos filhotes ao nascimento, diversos autores descreveram redução significativa de peso dos filhotes de mães desnutridas em relação aos controles, sendo inclusive a restrição de dieta um modelo de retardo de crescimento intrauterino (BARRETO, 2012; LANHAM, 2011). O presente estudo, em consonância com os anteriores, demonstrou peso de nascimento significativamente menor para os filhotes do grupo desnutrido.

No que se refere à evolução de peso dos filhotes durante a lactação, os estudos envolvendo desnutrição materna durante o período demonstraram valores significativamente menores de peso dos filhotes em relação ao controle (ANDRADE,

2012; HUBER, 2013; SILVA, 2013). No estudo atual, esse grupo apresentou ganho progressivo de peso, chegando entretanto ao desmame ainda com diferença significativa em relação ao controle.

Quando discute os modelos de recuperação de peso com dieta *ad libitum* durante a lactação, a literatura mostra resultados conflitantes: Gurmini, em 2005 e Barreto, em 2012 não conseguiram demonstrar recuperação do peso no grupo desnutrido durante a gestação após o desmame. Por outro lado, Coelho-Lemos apresentou resultados satisfatórios, com recuperação do peso do grupo desnutrido na gestação a partir do 14º dia de vida (COELHO-LEMOS, 2002).

O estudo de Coelho-Lemos, associado aos dados do grupo mantido desnutrido também durante a lactação no presente estudo, somam-se para chamar atenção à condição nutricional das lactantes. Os dados confirmam que o estado nutricional adequado da mãe é essencial para o desenvolvimento do lactente.

Os estudos realizados com intuito de avaliar os efeitos da dieta imunomoduladora durante a lactação, muito embora não tenham se utilizado de animais desnutridos durante a lactação demonstraram efeitos positivos relacionados à suplementação com arginina no modelo suíno. Tanto WU, em 2004, quanto Mateo, em 2008 apresentaram valores de ganho de peso significativamente maiores que o controle (WU, 2004; MATEO, 2008). No presente estudo, os grupos suplementados tanto com dieta imunomoduladora (Impact®) quanto com dieta hipercalórica/hiperproteica (Nutren®) apresentaram evolução satisfatória de peso durante a lactação, demonstrando valores significativamente maiores que o controle no desmame.

O comprimento de corpo e cauda não foram parâmetros extensamente avaliados pela literatura. Moraes Jr, em 2008, detectou retardo do crescimento de corpo e cauda de filhotes influenciado pelo uso de nicotina durante gestação e lactação (MORAES JR., 2008). Coelho-Lemos aferiu diferença significativa no

comprimento de corpo dos filhotes de ratas desnutridas durante a gestação, havendo recuperação da medida no desmame, após uso de dieta *ad libitum* durante a lactação (COELHO-LEMOS, 2002).

No estudo atual, da mesma forma que ocorreu com o peso, os filhotes de ratas suplementadas com dieta imunomoduladora e com dieta hipercalórica/hiperproteica, também apresentavam comprimento de corpo significativamente maior que os controles normonutridos no desmame.

A evolução de peso e comprimento de corpo dos filhotes durante o desmame reforça a hipótese de Mateo de que a arginina possa realmente aumentar o volume de leite materno produzido, disponibilizando maior aporte proteico-calórico ao lactente e permitindo maior desenvolvimento durante a lactação (MATEO, 2008). O mecanismo proposto pelo autor explica a melhor evolução do grupo suplementado. A maior concentração de arginina materna seria responsável por vasodilatação e hipertrofia na glândula mamária, aumento o volume de leite produzido.

Quando aferidos os pesos no momento do sacrifício no sétimo pós-operatório, apenas o grupo mantido desnutrido durante a lactação apresentava valor médio significativamente menor que o controle. A compensação no peso partir do desmame, trazendo os grupos a valores sem diferença significativa estaria provavelmente associado a dieta *ad libitum* dos filhotes. De forma contrária ao esperado, uma vez que no desmame apresentavam peso significativamente maior que o controle e no sétimo pós-operatório valor não divergente, os filhotes suplementados com Impact® sacrificados no vigésimo-primeiro pós-operatório demonstraram peso significativamente menor que o controle.

Avaliando os valores de dosagem sérica de albumina, o presente estudo detectou que no sétimo pós-operatório todos os filhotes desnutridos durante a gestação, independente da suplementação utilizada, ainda apresentavam valores significativamente menores que o controle normonutrido na gestação. Esses



resultados diferem dos apresentados por Coelho-Lemos que não detectou diferença em relação aos controles para os filhotes recuperados durante a lactação. Entretanto foi compatível com outros estudos que demonstraram valores menores ainda após a recuperação pela amamentação (FIRMANSYAH, 1989).

No 21º pós-operatório, os dois grupos que apresentavam peso significativamente menor que o controle, o desnutrido durante a lactação e suplementado com Impact®, ainda apresentavam dosagem média de albumina menor em relação ao controle. Os valores dos filhotes desnutridos são compatíveis com dados anteriores (ANDRADE, 2012; CORRÊA, 2013), entretanto conforme o achado de peso, o valor do grupo suplementado com Impact® contraria o esperado por dados do desmame e sétimo pós-operatório.

A dosagem sérica de albumina no presente estudo demonstrou-se parâmetro fidedigno na avaliação da desnutrição crônica. Mesmo os grupos que haviam recuperado o peso até o sétimo pós-operatório ainda apresentavam albumina significativamente menor que o controle, demonstrando carência nutricional. O grupo suplementado com Impact® que apresentou peso menor que o controle no vigésimo-primeiro pós-operatório também demonstrou albumina menor que o controle.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO

Diversos estudos, tanto experimentais como clínicos, apontam uma correlação importante entre a condição nutricional e a cicatrização (ARNOLD, 2006; EDMONDS, 2007). Da mesma forma que a literatura amplamente relaciona o uso de imunonutrientes, especialmente com arginina, com melhora da capacidade de recuperação de feridas e redução das complicações relacionadas a anastomoses

(COSTA, 2002; FARRERAS, 2005; DEBATS, 2009). Por outro lado, estudos específicos estudando os efeitos da desnutrição intrauterina sobre a cicatrização no período neonatal são escassos.

No que se refere à força tênsil da ferida, o estudo atual demonstrou que o grupo desnutrido durante a gestação e lactação apresentou força e tensão máximas significativamente menores que o controle no sétimo pós-operatório, não tendo sido avaliado no vigésimo-primeiro pela grande mortalidade do grupo no período pós-operatório imediato. Da mesma forma que a concentração total de colágeno na ferida se mostrou significativamente menor que o controle no grupo desnutrido durante gestação e lactação.

Law, em 1990, avaliando cicatrização da parede abdominal de ratos desnutridos também detectou redução da força tênsil em relação ao controle. Karahasanoglu, em 1998, avaliando anastomose colônica demonstrou redução da força máxima e na concentração de colágeno na anastomose de ratos desnutridos.

No presente estudo, o uso da dieta enriquecida com arginina mostrou resultado positivo quando avaliados os parâmetros força e tensão máxima no sétimo pós-operatório. O grupo Impact® apresentou valores sem diferença significativa em relação ao controle, enquanto que o grupo suplementado com dieta hipercalórica/hiperproteica, bem como o grupo desnutrido durante a lactação mostraram valores significativamente menores. Essa evolução corrobora os achados da literatura que tem apresentado resultados promissores relacionados à suplementação com arginina quando avaliados parâmetros mecânicos de feridas cirúrgicas (ONO, 2009).

O colágeno é o principal responsável pela resistência da ferida, dessa forma tem sido demonstrado que uma maior concentração da proteína na cicatriz leva a maiores valores de força tênsil (CAMPOS, 2008; PLOUGH, 2013). Trabalhos anteriores apresentaram melhora significativa da concentração de colágeno em

feridas de pacientes que utilizaram dieta enriquecida com arginina (WITTMANN, 2005; RAYNAUD-SIMON, 2012) . O estudo atual detectou que os grupos desnutridos durante a gestação e suplementados na lactação chegaram a valores de colágeno próximos ao controle normonutrido já no sétimo pós-operatório, sem entretanto haver diferença significativa relacionada a suplementação com arginina.

A evolução da cicatriz está relacionada com substituição progressiva do colágeno tipo III (imaturo) pelo tipo I (maduro), entre o sexto e o vigésimo-primeiro dias de cicatrização, estando essa maturação relacionada ao aumento da resistência da ferida (SHI, 2003; WITTE, 2003). O presente estudo não aferiu diferença significativa entre as porcentagens de colágenos tipo I e tipo III nas feridas dos grupos desnutridos e posteriormente recuperados e suplementados em relação ao controle, corroborando a idéia de que a recuperação nutricional durante a lactação levou os índices de maturação de colágeno a níveis semelhantes ao controle normonutrido (COELHO-LEMOS, 2004).

Com relação à evolução do parâmetros tensionais e de morfometria do colágeno, o presente estudo corroborou a idéia de Mateo do “ciclo arginina-prolina entre a mãe e o recém-nascido”utilizando o modelo experimental com ratos. Os resultados demonstraram ação efetiva no grupo suplementado com dieta imunomoduladora no que se refere à força tênsil da ferida cirúrgica. Os valores de concentração total de colágeno na ferida não apresentaram diferença significativa, assim como a maturação do colágeno, entretanto os valores maiores de colágeno maduro, apesar de não apresentarem diferença significativa, poderiam justificar a melhora dos critérios tensionais das feridas no grupo que fez uso de arginina.

No que se refere à avaliação imunoistoquímica da cicatrização, o presente estudo apresentou resultados conflitantes. Estudos anteriores relacionaram maior expressão tecidual de actina muscular lisa a melhora na angiogênese, bem como maior concentração de miofibroblastos e, conseqüentemente melhora da força tênsil

(BOROUJERDI, 2012; SEO, 2013). No estudo atual os grupos com valores tensionais de ferida operatória mais expressivos demonstraram números significativamente menores.

Com relação à participação das metaloproteinases no processo de cicatrização, a literatura ainda não definiu exatamente o momento de atuação de cada uma delas. Tem-se claro que as enzimas participam de forma ativa no remodelamento da matriz extracelular, sem entretanto existir um consenso do momento e forma específica de participação de cada uma delas no processo agudo de cicatrização, e menos ainda no que se refere à influência do estado nutricional e uso de imunonutrição no processo (UTZ, 2010; HAHM, 2011; HAMPEL, 2012).

No estudo atual, os resultados obtidos com a expressão tecidual de MMP-2 não permitiram relacionar a metaloproteinase com a cicatrização e condição nutricional. Na avaliação da MMP-9, o presente estudo aferiu valores significativamente menores nos grupos com melhores parâmetros tensionais de ferida no sétimo pós-operatório, o que pode sugerir uma relação negativa da expressão enzimática com a evolução da ferida.

A metaloproteinase 13 foi a única que demonstrou valores significativamente maiores no grupo suplementado com arginina no sétimo dia de evolução do processo de cicatrização, sendo que com três semanas pós-operatórias os valores, apesar de ainda maiores, já não apresentavam diferença significativa. Esses achados sugerem relação entre a maior expressão da metaloproteinase e a melhor evolução das feridas.

#### 5.4 PERPECTIVAS

O presente estudo abordou algumas questões importantes e promissoras com relação a futuras investigações e aplicação clínica. A questão da cicatrização no período neonatal carece ainda de estudos experimentais, uma vez que aumenta cada vez mais o número de pacientes prematuros extremos que sobrevivem e necessitam algum tipo de intervenção cirúrgica.

Os resultados relacionados com o ganho de peso e crescimento dos filhotes, bem como os parâmetros de avaliação de cicatrização corroboraram a idéia de um envolvimento da arginina na produção de leite materno, além de sugerir uma maior disponibilidade do aminoácido para o recém-nascido, conforme o princípio sugerido por Mateo. O estudo mostrou a perspectiva de suplementação nutricional materna, particularmente com uso de imunonutrientes, na melhora da condição nutricional e cicatrização do recém-nascido, sem necessidade de comprometimento do aleitamento materno exclusivo.

## 6 CONCLUSÕES

Com relação aos efeitos do uso de dieta enriquecida com arginina durante a lactação, por desnutridas durante a gestação, sobre o crescimento e cicatrização da parede abdominal dos filhotes o presente estudo permite concluir que a suplementação foi capaz de:

- proporcionar recuperação de peso e comprimento dos filhotes no desmame
- levar os valores de força tênsil da ferida aos níveis do controle normonutrido no sétimo pós-operatório
- manter os níveis de concentração total, bem como de maturação do colágeno na ferida nos níveis do controle a partir do sétimo pós-operatório
- manter a expressão tecidual de  $\alpha$ -SMA, MMP-2 e MMP-9 nos níveis do controle no sétimo e vigésimo-primeiro pós-operatório, além de levar o nível de MMP-13 a um valor significativamente maior que o do controle no sétimo pós-operatório.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. A. Histologia e seus métodos de estudo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1-22.

AHMED, T.; HOSSAIN, M.; SANIN, K. I. Global burden of maternal and child undernutrition and micronutrient deficiencies. **Ann Nutr Metab**, v. 61, s. 1, p. 8-17, 2012.

AKDOGAN, O. et al. Activation of vocal fold healing with topical vitamin A in rabbits. **Acta Otolaryngol**, v. 129, n. 2, p. 220-4, 2009.

ALEXANDER, J. W.; PECK, M. D. Future prospects for adjunctive therapy: pharmacologic and nutritional approaches to immune system modulation. **Crit Care Med**, v. 18, s. 2, p. S159-64, 1990.

ALLEN, L. H. Global dietary patterns and diets in childhood: implications for health outcomes. **Ann Nutr Metab**, v. 61, s. 1, p. 29-37, 2012.

ALMEIDA, AL I. et al. Length of stay in surgical patients: nutritional predictive parameters revisited. **Br J Nutr**, v. 109, n. 2, p. 322-8, 2013.

ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; DAL PAI, V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 3, p. 264-71, 2008.

ANDERSON, B. Nutrition and wound healing: the necessity of assessment. **Br J Nurs**, v. 14, n. 19, s. 30, p. S30-8, 2005.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; REMLEY, D. T. Breastfeeding and cognitive development: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, V. 70, n. 4, p. 525-35, 1999.

ANDRADE, F. M. et al. Desnutrição materna durante a lactação em ratos Wistar: efeitos sobre as fibras elásticas da matriz extracelular na traquéia dos filhotes. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 5, p. 588-94, 2012.

ANGUNAWELA, R. I. et al. A mouse model of lamellar intrastromal femtosecond laser keratotomy: ultra-structural, inflammatory, and wound healing responses. **Mol Vis**, v. 17, p. 3005-12, 2011.

ARAÚJO, S. L. **Ratos Wistar expostos aos inseticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós em testes reprodutivos de curta e longa duração**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.

ARNOLD, M.; BARBUL, A. Nutrition and wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 7, s. 1, p. 42S-58S, 2006.

ASRANI, V. et al. Glutamine supplementation in acute pancreatitis. A meta-analysis of randomized controlled trials. **Pancreatology**, v. 13, n. 5, p. 468-74, 2013.

BADR, G.; MOHANY, M. Maternal perinatal undernutrition attenuates t-cell function in adult male rat offspring. **Cell Physiol Biochem**, v. 27, n. 3-4, p. 381-90, 2011.

BALL, R. O.; ATKINSON, J. L.; BAYLEY, H. S. Proline as an essential amino acid for the young pig. **Br J Nutr**, v. 55, n. 3, p. 659-68, 1986.

BARKER, D. J. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n. 3, p. 225-8, 1993.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1524-7, 1993.

BARRETO, R. R. et al. Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. **Eur J Pharm Sci**, v. 46, n. 1-2, p. 56-63, 2012.



BASU, H. N.; LIEPA, G. U. Arginine: a clinical perspective. **Nutr Clin Pract**, v. 17, n. 4, p. 218-25, 2002.

BAUMANS, V.; PEKOW, C. A. Common Nonsurgical Techniques and Procedures. In: HAU, J.; SCHAPIRO, S. J. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Volume I: Essential Principles and Practices. 3. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 401-45.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol Surg**, v. 31, n. 6, p. 674-86, 2005.

BERKO, P.; JOUBERT, K. The effect of intrauterine development and nutritional status on perinatal mortality. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 22, n. 7, p. 552-9, 2009.

BERNHARDT, J. A. **Influência da desnutrição na cicatrização da anastomose colônica em ratos toxêmicos**. 98 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.

BERRY, R. J. et al. Fortification of flour with folic acid. **Food Nutr Bull**, v. 31, s. 1, p. S22-35, 2010.

BHUTTA, Z. A. et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. **Lancet**, v. 371, n. 9610, p. 417-40, 2008.

BHUTTA, Z. A.; SALAM, R. A. Global nutrition epidemiology and trends. **Ann Nutr Metab**, v. 61, s. 1, p. 19-27, 2012.

BHUTTA, Z. A. et al. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 452-77, 2013.

BIANCHINI, C. et al. Immunonutrition in head and neck cancer: have a look before surgery! **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 269, n. 1, p. 5-8, 2012.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 2059-81, 2013.

BISCHOFF-FERRARI, H. A. Vitamin D: role in pregnancy and early childhood. **Ann Nutr Metab**, v. 59, n. 1, p. 17-21, 2011.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, n. 9608, 243-60, 2008.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet**, v. 382, n. 9890, 427-51, 2013.

BLASS, S. C. et al. Time to wound closure in trauma patients with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: a PRCT. **Clin Nutr**, v. 31, n. 4, p. 469-75, 2012.

BOROUJERDI, A. et al. Chronic cerebral hypoxia promotes arteriogenic remodeling events that can be identified by reduced endoglin (CD105) expression and a switch in  $\beta 1$  integrins. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 9, p. 1820-30, 2012.

BOTELHO, G. G. K. **Efeitos reprodutivos e endócrinos do di(2-etilexil)ftalato (DEHP) isolado e associado a antioxidantes em ratos Wistar**. 119 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

BOURNE, G. H. Records in the older literature of tissue changes in scurvy. **Proc R Soc Med**, v. 37, n. 9, p. 512-6, 1944.

BRAGA, M. et al. Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery: results of a randomized double-blind phase 3 trial. **Arch Surg**, v. 134, n. 4, p. 428-33, 1999.

BRAGA, M. et al. Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. **Surgery**, v. 132, n. 5, p. 805-14, 2002.

BRAGA, M.; GIANOTTI, L. Preoperative immunonutrition: cost-benefit analysis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 29, n. 1, s. 1, p. 57-61, 2005.

BRAGA, M. Immunonutrition: from laboratory to clinical practice. **Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 368-70, 2007.

BRCIC, L. et al. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, s. 7, p. 191-6, 2009.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, s. 7, p. 1eS-32e, 2006.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, s. 7, p. 6S-11S, 2006.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, s. 7, p. 12S-43S, 2006.

BRYCE, J. et al. Maternal and child undernutrition: effective action at national level. **Lancet**, v. 371, v. 9611, p. 510-26, 2008.

BURNS, J. L.; MANCOLL, J. S.; PHILLIPS, L. G. Impairments to wound healing. **Clin Plast Surg**, v. 30, n. 1, p. 47-56, 2003.

CAMPOS, A. C. L.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 3, p. 281-8, 2008.

CARTER, A. Animal Models of Female Reproduction and Fetal Growth and Development. In: HAU, J.; SCHAPIRO, S. J. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Volume II: Animal Models. 3. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2011, p. 237-54.

CASTILLO-LANCELOTTI, C.; TUR, J. A.; UAUY, R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. **Public Health Nutr**, v. 16, n. 5, p. 901-11, 2013.

COELHO-LEMOS, I. C. **Influência da desnutrição intrauterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. 87 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2002.

COELHO-LEMOS, I. C. et al. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, n. 4, p. 241-5, 2004.

CORRÊA, C. L. et al. Renal parenchyma developmental plasticity in mice infected with *Schistosoma mansoni*, whose mothers were malnourished during lactation. **Exp Parasitol**, v. 134, n. 3, p. 368-73, 2013.

CORREIA, M. I.; CAMPOS, A. C. L. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: The multicenter ELAN Study. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 823-5, 2003.

COSTA, M. A. R. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 27, n. 3, p. 182-5, 2003.

COSTARELLI, V.; EMERY, P. W. The effect of protein malnutrition on the capacity for protein synthesis during wound healing. **J Nutr Health Aging**, v. 13, n. 5, p. 409-12, 2009.

COUPER, J. J. et al. Weight gain in early life predicts risk of islet autoimmunity in children with a first-degree relative with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 94-9, 2009.

CURRAN, J. N. et al. Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. **Wound Repair Regen**, v. 14, n. 4, p. 376-86, 2006.

DAVIS, S. L. Plasma levels of prolactin, growth hormone and insulin in sheep following the infusion of arginine, leucine and phenylalanine. **Endocrinology**, v. 91, n. 2, p. 549-55, 1972.

DEBATS, I. B. J. G. et al. Role of arginine in superficial wound healing in man. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 3-4, p. 175-83, 2009.

DEBATS, I. B. J. G. et al. Oral arginine supplementation and the effect on skin graft donor sites: a randomized clinical pilot study. **J Burn Care Res**, v. 30, n. 3, p. 417-26, 2009.

DESAI, M. et al. Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 22, n. 7, p. 571-5, 2009.

DESAI, M.; ROSS, M. G. Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. **Semin Reprod Med**, v. 29, n. 3, p. 237-45, 2011.

DILLON, E. L.; KNABE, D. A.; WU, G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5, p. 1079-86, 1999.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 6, p. 591-9, 2004.

DOWNARD, C. D. et al. Treatment of necrotizing enterocolitis: an American Pediatric Surgical Association Outcomes and Clinical Trials Committee systematic review. **J Pediatric Surg**, v. 47, n. 11, p. 2111-22, 2012.

EDMONDS, J. Nutrition and wound healing: putting theory into practice. **Br J Community Nurs**, v. 12, n. 12, p. S31-4, 2007.

EICHER, C. et al. Surgical management of extremely low birth weight infants with neonatal bowel perforation: a single-center experience and a review of the literature. **Neonatology**, v. 101, p.285-92, 2012.

ELMADFA, I.; MEYER, A. L. Vitamins for the first 1000 days: preparing for life. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 82, n. 5, p. 342-47, 2012.

FALL, C. Maternal nutrition: effects on health in the next generation. **Indian J Med Res**, v. 130, n. 5, p. 593-9, 2009.

FALL, C. H. et al. Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease. **BMJ**, v. 304, n. 6830, p. 801-5, 1992.

FARHAT, S. M. et al. Effects of mechlorethamine hydrochloride (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds. **AMA Arch Surg**, v. 76, n. 5, p. 751-3, 1958.

FARRERAS, N. et al. Effect of early postoperative enteral immunonutrition on wound healing in patients undergoing surgery for gastric cancer. **Clin Nutr**, v. 24, n. 1, p. 55-65, 2005.

FIRMANSYAH, A. et al. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 50, n. 2, p. 261-8, 1989.

FLORIAN, M. L.; NUNES, M. L. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. **Nutr Neurosci**, v. 14, n. 4, p. 151-8, 2011.

FLYNN, N. E. et al. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 9, p. 427-38, 2002.

FRANK, S. et al. Nitric oxide drives skin repair: novel function of an established mediator. **Kidney Int**, v. 61, n. 3, p. 882-8, 2002.

FURLAN, J. P. et al. A influência do estado nutricional da adolescente grávida sobre o tipo de parto e peso do recém-nascido. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 25, n. 9, p. 625-30, 2003.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin Plast Surg**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012.

GETHIN, G. Understanding the inflammatory process in wound healing. **Br J Community Nurs**, s. 17-8, p. S20-22, 2012.

GHEORGHE, C. et al. Nutritional risk screening and prevalence of malnutrition on admission to gastroenterology departments: a multicentric study. **Chirurgia (Bucur)**, v. 108, n. 4, p. 535-41, 2013.

GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN, R. F. Wound healing primer. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 165-78, 2012.

GONÇALVES, C. G. **Cicatrização de anastomose colônica e nutrição pré-operatória em ratos desnutridos: estudo tensiométrico e de deposição de colágeno**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2005.

GONÇALVES, C. G. et al. Influence of preoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 1, p. 83-9, 2009.

GUEDES, R. C. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutr Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 142-6, 2013.

GUILLOTEAU, P. et al. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, s. 3, p. 17-35, 2009.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **J Dent Res**, v. 89, n. 3, p. 219-29, 2010.

GURMINI, J. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 4, p. 271-8, 2005.

HAHM, G.; GLASER, J. J.; ELSTER, E. A. Biomarkers to predict wound healing: the future of complex war wound management. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, s. 1, p. 21S-26S, 2011.

HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, v. 303, n. 6809, p. 1019-22, 1991.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.

HAMPEL, U. et al. Relaxin 2 is functional at the ocular surface and promotes corneal wound healing. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 12, p. 7780-90, 2012.

HAMPEL, U. et al. Insulin-like factor 3 promotes wound healing at the ocular surface. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 2034-45, 2013.

HELLEBREKERS, L. J.; HEDENQVIST, P. Laboratory Animal Analgesia, Anesthesia and Euthanasia. In: HAU, J.; SCHAPIRO, S. J. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Volume I: Essential Principles and Practices. 3. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2011, p. 485-534.

HEWISON, M. An update on vitam D and human immunity. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 76, n. 3, p. 315-25, 2012.

HEYS, S. D. et al. Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Ann Surg**, v. 229, n. 4, p. 467-77, 1999.

HORNELL, A. et al. Breastfeeding, introduction of other foods and effects on health: a systematic literature review for the 5<sup>th</sup> Nordic Nutrition Recommendations. **Food Nutr Res**, v. 57, p. 1-27, 2013.

HOWES, E. L.; HARVEY, S. C. The clinical significance of experimental studies in wound healing. **Ann Surg**, v. 102, n. 5, p. 941-6, 1935.

HUBER, R. C. et al. Behaviour of postnatally growth-impaired mice during malnutrition and after partial weight recovery. **Nutr Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 125-34, 2013.

IP, S. et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. **Evid Rep Technol Assess**, v. 153, p. 1-186, 2007.

IVARSSON, A. et al. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. **Pediatrics**, v. 131, n. 3, p. e687-94, 2013.



JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **Am J Surg**, v. 145, n. 6, p. 800-3, 1983.

KAM, R. K. et al. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. **Cell Biosci**, v. 2, n. 1, p. 11-24, 2012.

KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: abnormalities and future therapeutic targets. **Curr Anesth Crit Care**, v. 16, n. 2, p. 88-93, 2005.

KARAHASANOGLU, T. et al. Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br J Surg**, v. 85, n. 7, p. 931-3, 1998.

KAVALUKAS, S. L.; BARBUL, A. Nutrition and wound healing: an update. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, s. 1, p. 38S-43S, 2011.

KAVITHA, O.; THAMPAN, R. V. Factors influencing collagen biosynthesis. **J Cell Biochem**, v. 104, n. 4, p. 1150-60, 2008.

KIRCHGESSNER, V. M.; RADER, G.; ROTH-MAIER, D. A. Influence of an oral arginine supplementation on lactation performance of sows. **J Anim Physiol**, v. 66, p. 38-44, 1991.

KIVIRIKKO, K. I. et al. Molecular biology of prolyl 4-hydroxylase. **Ann N Y Acad Sci**, v. 580, p. 132-42, 1990.

KLEK, S. et al. The immunomodulating enteral nutrition in malnourished surgical patients – a prospective, randomized, double-blind clinical trial. **Clin Nutr**, v. 30, n. 3, p. 282-8, 2011.

KLEMENT, E. et al. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 5, p. 1342-52, 2004.

KNOFF, R. F. et al. Plasma growth hormone response to intravenous administration of amino acids. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 25, p. 1140-4, 1965.

KRAMER, M. S.; KAKUMA, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 15, n. 8, 2012.

KUMAR, V. et al. Inflamação aguda e crônica. In:\_\_\_\_\_. **Robbins & Cotran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Tradução 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2010, p. 43-77.

KUMAR, V. et al. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In:\_\_\_\_\_. **Robbins & Cotran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Tradução 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2010, p. 79-110.

LABORIE, C. et al. Maternal perinatal undernutrition has long-term consequences on morphology, function and gene expression of the adrenal medulla in the adult male rat. **J Neuroendocrinol**, v. 23, n. 8, p. 711-24, 2011.

LANHAM, S. A. et al. Animal models of maternal nutrition and altered offspring bone structure – bone development across the lifecourse. **Eur Cell Mater**, v. 24, n. 22, p. 321-32, 2011.

LAW, N. W.; ELLIS, H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Surgery**, v. 107, n. 4, p. 449-54, 1990.

LEACH, L.; MANN, G. E. Consequences of fetal programming for cardiovascular disease in adulthood. **Microcirculation**, v. 18, n. 4, p. 253-5, 2011.

LEE, S. H. et al. Valproic acid induces cutaneous wound healing *in vivo* and enhances keratinocyte motility. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48791, 2012.

LEVENSON, S. M. et al. Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing. **Ann Surg**, v. 200, n. 4, p. 494-512, 1984.

LUKASZEWSKI, M. A. et al. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 3, p. E548-59, 2011.

LUTTER, C.; LUTTER, R. Fetal and early childhood undernutrition, mortality, and lifelong health. **Science**, v. 337, p. 1495-9, 2012.

MACKAY, D.; MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing. **Altern Med Rev**, v. 8, n. 4, p. 359-77, 2003.

MAGALHÃES, M. S. et al. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamin A and E on wound healing in rats. **Acta Cir Bras**, v. 23, n. 3, 262-9, 2008.

MARIK, P. E.; ZALOGA, G. P. Immunonutrition in high-risk surgical patients: a systematic review and analysis of the literature. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 34, n. 4, p. 378-86, 2010.

MATEO, R. D. et al. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. **J Anim Sci**, v. 86, n. 4, 827-35, 2008.

MATSUDA, A. et al. Preoperative oral immune-enhancing nutritional supplementation corrects TH1/TH2 imbalance in patients undergoing elective surgery for colorectal cancer. **Dis Colon Rectum**, v. 49, n. 4, p. 507-16, 2006.

MCCAW, A. P.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 221-33, 2007.

MEDLIN, S. Nutrition for wound healing. **Br J Nurs**, v. 21, n. 12, s. 1, p. S11-15, 2012.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MESQUITA, F. F. et al. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 11, p. 1010-8, 2010.

MISTRY, D. et al. Quantitative analysis of collagen accumulation during protein malnutrition. **J Ped Surg**, v. 29, n.7, p. 863-5, 1994.

MIZOCK, B. A.; SRIRAM, K. Perioperative immunonutrition. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 1, p. 1-3, 2011.

MOEENI, V.; WALLS, T.; DAY, A. S. Nutritional status and nutrition risk screening in hospitalized children in New Zealand. **Acta Paediatr**, v. 102, n. 9, p. e419-23, 2013.

MOLNAR, J. A. et al. Synthesis and degradation of collagens in skin of healthy and protein-malnourished rats *in vivo*, studied by O<sub>2</sub> labelling. **Biochem J**, v. 250, n. 1, p. 71-6, 1988.

MONTEIRO, M. F. G. A carga da doença associada com algumas causas de internação hospitalar realizada pelo SUS. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2004.

MORAES JUNIOR, H. **Medidas morfométricas em filhotes de ratas Wistar que receberam nicotina durante a gestação e amamentação**. 180 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.

MORRIS JR, S. M. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **J Nutr**, v. 137, n. 6, s. 2, p. 1602S-9S, 2007.

MORRIS JR, S. M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. **B J Pharmacol**, v. 157, n. 6, p. 922-30, 2009.

MORSE, N. L. Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 799-840, 2012.

MUTHAYYA, S. Maternal nutrition & low birth weight – what is really important? **Indian J Med Res**, v. 130, n. 5, p. 600-8, 2009.

NAKAMURA, K. et al. Influence of preoperative administration of  $\omega$ -3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 639-49, 2005.

ODDY, W. H. et al. Breastfeeding influences on growth and health at one year of age. **Breastfeed Rev**, v. 14, n. 1, p. 15-23, 2006.

ONIS, M.; BLOSSNER, M. The World Health Organization global database on child growth and malnutrition: methodology and applications. **Int J Epidemiol**, v. 32, n. 4, p. 518-26, 2003.

ONO, M. C. K. **Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2009.

ORDOÑEZ, A. M. et al. Nutritional status influences the length of stay and clinical outcomes in patients hospitalized in internal medicine wards. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 4, p. 1313-20, 2013.

OTRANTO, M. et al. Male and female rats with severe protein restriction present delayed wound healing. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1023-31, 2009.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz. 2005.

PAU, M. Y.; MILNER, J. A. Effect of arginine deficiency on mammary gland development in the rat. **J Nutr**, v. 112, n. 10, p. 1827-33, 1982.

PÉREZ-CANO, F. J. et al. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

PICCIANO, M. F. Pregnancy and lactation: physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements. **J Nutr**, v. 133, n. 6, p. 1997S-2002S, 2003.

PLOUG, T. et al. Influence of adalimumab treatment on anastomotic strength, degree of inflammation, and collagen formation: an experimental study on the small intestine of rabbits. **Inflamm Bowel Dis**, v. 19, n. 2, p. 254-8, 2013.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-7, 1998.

RAYNAUD-SIMON, A. et al. Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 10, p. 1053-61, 2012.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

REUSENS, B. et al. Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny. **Am J Clin Nutr**, v. 94, s. 1, p. 1824S-9S, 2011.

REYES-CASTRO, L. A. et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, n. 1, p. 39-45, 2012.

ROBINSON, S. et al. The relation of fetal growth to plasma glucose in young men. **Diabetologia**, v. 35, n. 5, p. 444-6, 1992.

RZEHAJ, P. et al. Period-specific growth, overweight and modification by breastfeeding in the GINI and LISA birth cohorts up to age 6 years. **Eur J Epidemiol**, v. 24, n. 8, p. 449-67, 2009.

SARNI, R. O. S. et al. Anthropometric evaluation, risk factors for malnutrition, and nutritional therapy for children in teaching hospitals in Brazil. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 3, p. 223-8, 2009.

SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. **Amino Acids**, v. 26, n. 4, p. 321-9, 2004.

SEIFTER, E. et al. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery**, v. 84, n. 2, p. 224-30, 1978.

SEIFTER, E. et al. Impaired wound healing in streptozotocin diabetes. Prevention by supplemental vitamin A. **Ann Surg**, v. 194, n. 1, p. 42-50, 1991.

SENKAL, M. et al. Modulation of postoperative immune response by enteral nutrition with a diet enriched with arginine, RNA, and omega-3-fatty acids in patients with upper gastrointestinal cancer. **Eur J Surg**, v. 161, n. 2, p. 115-22, 1995.

SEO, J. H. et al. Fibroblast growth factor-2 induced by enriched environment enhances angiogenesis and motor function in chronic hypoxic-ischemic brain injury. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e74405, 2013.

SHAHIN, E. S. M. et al. The relationship between malnutrition parameters and pressure ulcers in hospitals and nursing homes. **Nutrition**, v. 26, n. 9, p. 886-9, 2010.

SHARMA, B. et al. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Indian J Dent Res**, v. 21, n. 2, p. 260-5, 2010.

SHERWIN, J. C. et al. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 4, p. 205-14, 2012.

SHAPIRA, N. Prenatal undernutrition: a critical window of opportunity for mother and child. **Womens Health**, v. 4, n. 6, p. 639-56, 2008.

SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. 18, p. 3209-13, 2009.

SHEPHERD, A. A. Nutrition for optimum wound healing. **Nurs Stand**, v. 18, n. 6, p. 55-8, 2003.

SHI, H. P. et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. **Wound Repair Regen**, v. 11, n. 3, p. 198-203, 2003.

SHI, H. P. et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock. **Wound Repair Regen**, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2007.

SHRIMPSON, R. Global policy and programme guidance on maternal nutrition: what exists, the mechanisms for providing it, and how to improve them? **Paediatr Perinat Epidemiol**, 2012, v. 26, s. 1, p. 315-25, 2012.

SIEROSZEWSKI, P.; SUZIN, J.; KAROWICZ-BILINSKA, A. Ultrasound evaluation of intrauterine growth restriction therapy by a nitric oxide donor (L-arginine). **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 15, n. 6, p. 363-6, 2004.

SILVA, L. A. et al. Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidney. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 108, n. 2, p. 115-21, 2011.

SKIPPER, A. Challenges in nutrition, pressure ulcers, and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v. 25, n. 1, p. 13-5, 2010.

SORENSEN, I. M. et al. Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 175-8, 2012.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**, v. 200, n. 4, p. 448-64, 2003.

STECHMILLER, J. K.; CHILDRESS, B.; COWAN, L. Arginine supplementation and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v. 20, n. 1, p. 52-61, 2005. STEED, D. L. Wound-healing trajectories. **Surg Clin North Am**, v. 83, n. 3, p. 547-55, 2003.

STECHMILLER, J. K. et al. Understanding the role of nutrition and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v. 25, n. 1, p. 61-8, 2010.

SUCHNER, U.; KUHN, K. S.; FURST, P. The scientific basis of immunonutrition. **Proc Nutr Soc**, v. 59, n. 4, p. 553-63, 2000.

SULTAN, J. et al. Randomized clinical trials of omega-3 fatty acid-supplemented enteral nutrition versus standart enteral nutrition in patients undergoing oesophagogastric cancer surgery. **B J Surg**, v. 99, n. 3, p. 346-55, 2012.

TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. **Am J Clin Nutr**, v. 94, s. 6, p. 1765S-71S, 2011.



THEYS, N. et al. Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 10, p. 985-94, 2011.

THOMPSON, C.; FUHRMAN, P. Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. **Nutr Clin Pract**, v. 20, n. 3, p.331-47, 2005.

TOLAZZI, A. R. D. **Efeito do inibidor de leucotrieno monteclaste na cicatrização cutânea em ratos: avaliação tensiométrica, da contração cicatricial e da deposição de colágeno**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2007.

TONG, B. C.; BARBUL, A. Cellular and physiological effects of arginine. **Mini Rev Med Chem**, v. 4, n. 8, p. 823-32, 2004.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 5, n. 1, p. 40-6, 2000.

TROTIER, N. L.; SHIPLEY, C. F.; EASTER, R. A. Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactating sow. **J Anim Sci**, v. 75, n. 5, p. 1266-78, 1997.

UTZ, E. R. et al. Metalloproteinases expression is associated with traumatic wound failure. **J Surg Res**, v. 159, n. 2, p. 633-9, 2010.

VAN ANHOLT, R. D. et al. Specific nutritional support accelerates pressure ulcer healing and reduces wound care intensity in non-malnourished patients. **Nutrition**, v. 26, n. 9, p. 867-72, 2010.

VAN GINDERACHTER, J. A. The wound healing chronicles. **Blood**, v. 120, n. 3, p. 499-500, 2012.

VERAMENDI-ESPINOZA, L. E. et al. Prevalence and associated factors of hospital malnutrition in a general hospital: Peru 2012. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 4, p. 1236-43, 2013.

VILLARES, J. M. M. et al. Nutrition status on pediatric admissions in Spanish: DHOSPE study. **Nutr Hosp**, v. 28, n. 3, p. 709-18, 2013.

VIZZOTTO JUNIOR, A. O. **Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos testada pela força de resistência a tração.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2001.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 573-80, 2001.

WEINZWEIG, J. et al. Supplemental vitamin A prevents the tumor-induced defect in wound healing. **Ann Surg**, v. 211, n. 3, p. 269-76, 1990.

WILLIAMS, J. Z.; BARBUL, A. Nutrition and wound healing. **Surg Clin N Am**, v. 83, n. 3, p. 571-96, 2003

WILLIAMS, J. Z.; BARBUL, A. Nutrition and wound healing. **Crit Care Nurs Clin N Am**, v. 24, n. 2, p. 179-200, 2012.

WILLIAMSON, M. B.; FROMM H. J. The incorporation of sulfur amino acids into the proteins of regeneration wound tissue. **J Biol Chem**, v. 212, n. 2, p. 705-12, 1955.

WINER, N. et al. L-arginine treatment for severe vascular fetal intrauterine growth restriction: a randomized double-blind controlled trial. **Clin Nutr**, v. 28, n. 3, p. 243-8, 2009.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Arginine physiology and its implication for wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 11, n. 6, p. 419-23, 2003.

WITTMANN, F. et al. L-arginine improves wound healing after trauma-hemorrhage by increasing collagen synthesis. **J Trauma**, v. 59, n. 1, p. 162-8, 2005.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, n. 1, p. 1-17, 1998.

WU, G. et al. Maternal nutrition and fetal development. **J Nutr**, v. 134, n. 9, p. 2169-72, 2004.

WU, G. et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1053-63, 2011.

XIAO, X. M.; LI, L. P. L-arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 88, n. 1, p. 15-8, 2005.

YAQOOB, P. Mechanisms underlying the immunomodulatory effects of n-3 PUFA. **Proc Nutr Soc**, v. 69, n. 3, p. 311-5, 2010.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 471-536, 2011.

ZETTERBERG, A.; ENGSTROM, W. Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts. **J Cell Physiol**, v. 108, n. 3, p. 365-73, 1981.

ZHANG, Y. et al. Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn Wistar rats. **Brain Res Bull**, v. 83, n. 1-2, p. 1-8, 2010.

**OBRAS CONSULTADAS**

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística. Princípios e Aplicações**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2003.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 6. Ed. Duxbury, MA: Thompson Brooks/Cole, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. SISTEMA DE BIBLIOTECAS. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

## ANEXO 1



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 554

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão 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)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

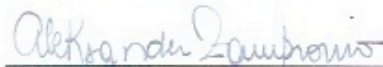
PROCESSO: 23075.082514/2011-68

APROVADO: 09/08/2011 – R.O. 07/2011

**TÍTULO:** Influência do uso de dieta imunomoduladora por ratas na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico, morfometria do colágeno e dosagem sérica de hidroxiprolina

**AUTORES:** Ayrton Alves Aranha Junior, Antonio Carlos L. Campos

DEPARTAMENTO: Clínica Cirúrgica (Setor de Ciências da Saúde – UFPR)

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador do CEUA

**ANEXO 2**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**DECLARAÇÃO**

Os ratos Wistar (*Mus musculus*) em posse do Professor Ayrton Alves Aranha Junior são provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa e serão transportados até a Universidade Federal do Paraná para realização de experimentos científicos.

Estes animais serão utilizados única e exclusivamente para pesquisa, e todos os procedimentos realizados fazem parte de um projeto, devidamente cadastrado nesta Universidade, e desenvolvidos em parceria com a Universidade Federal do Paraná.

Cabe salientar também que os procedimentos a serem realizados com estes animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, estando desta forma em conformidade com a lei n. 11794, de 8 de outubro de 2008.

Prof. Dr. Daniel Fernandes  
Administrador do Biotério da UEPG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Setor de Ciências Biológicas e Saúde  
Biotério

*Prof. Daniel Fernandes*  
Administrador

Ponta Grossa, 13 de Dezembro de 2011

### ANEXO 3



**PUCPR**

Protocolo Imunohistoquímica LPE PUCPR

#### Kit Advance (Dako®)

1.0 – Controles: 1.1 – Humano: sempre usar (prova a eficiência do anticorpo) 1.2 – Específico do animal (prova reatividade do material) 1.3 – Negativo: sempre usar (possível reação inespecífica: não recebe

anticorpo)

2.0 – Secagem das lâminas overnight: 37o C

3.0 – Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 min); álcool etílico absoluto (3x 1 min); álcool etílico 80% (1x 1 min)

4.0 - Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.

5.0 – Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retriver (Dako®) à cuba de banho-maria à 99o C por 40 min. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.

6.0 – Lavar em água destilada, e riscar lâmina por lâmina com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®), delimitando a área do corte. Até pingar as alíquotas deixar em tampão TBS tris pH 7.3, evitando a secagem do corte.

7.0 – Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida à geladeira overnight.

8.0 – Lavar as lâminas em tampão TBS tris pH 7.3 e deixar no tampão por 15 min.

9.0 – Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako®) e deixar por 30 min.

10.0 – Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako®) e deixar por 30 min.

11.0 – Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.

12.0 – Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 min. Lavar em água da torneira e deixar por 5 min.

13.0 – Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 min.) 13.0 – Diafanizar com xilol (3 x 5 min).  
Montar

