

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Filipe Carlos Caron

**EFEITOS DA ARGININA NA REPARAÇÃO
CICATRICIAL NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS
WISTAR.**

Curitiba
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Filipe Carlos Caron

**EFEITOS DA ARGININA NA REPARAÇÃO
CICATRICIAL NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS
WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Professor Dr. Jorge R. Ribas Timi

Coordenador: Professor Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Curitiba
2016

B293Caron, Filipe Carlos

Efeitos da arginina na reparação cicatricial na parede abdominal de ratos wistar/

Filipe Carlos Caron. – Curitiba, 2016.

XXf.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr.Jorge R. Ribas Timi

Dissertação(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica

Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do

Paraná.

1. Arginina. 2. Cicatrização.3. Hidroxiprolina. I. Timi, Jorge R. Ribas. II. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. II. Título.

NLMC: WO 100




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

Ata do julgamento da 428ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Filipe Carlos Caron** com o trabalho intitulado: "EFEITOS DA ARGININA NA REPARAÇÃO CICATRICIAL NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS Wistar".
Área de Concentração: Nutrição e Cicatrização em Cirurgia; **Linha de Pesquisa:** Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos, tendo como orientador o Professor Doutor **Jorge Rufino Ribas Timi**.

Às sete horas e trinta minutos do dia oito de julho de dois mil e dezesseis, no auditório do Serviço de Clínica Cirúrgica - sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes professores doutores: João Carlos Domingues Repka, João Eduardo Leal Nicoluzzi e Alexandre Coutinho T. de Freitas, sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente os principais tópicos de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a banca examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente assinada pelos membros da Banca.


João Carlos Domingues Repka


João Eduardo Leal Nicoluzzi


Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas



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

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno: **Filipe Carlos Caron**

Titulo da Dissertação: "EFEITOS DA ARGININA NA REPARAÇÃO
CICATRICIAL NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS WISTAR".

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
João Carlos Domingues Repka	A	10
João Eduardo Leal Nicoluzzi	A	10
Alexandre Coutinho T. de Freitas	A	10

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: A Equivalência: 10

Curitiba, 08 de julho de 2016.

MEMBROS	ASSINATURA
João Carlos Domingues Repka	
João Eduardo Leal Nicoluzzi	
Alexandre Coutinho T. de Freitas	

**Tudo aquilo que o homem ignora, não
existe para ele.
Por isso o universo de cada um, se resume
ao tamanho de seu saber.
Albert Einstein**

**Dedico este trabalho a minha família. A
minha amorosa e amada esposa Claudia
pelo incentivo e apoio na realização deste
projeto. Sem você seria impossível. A
minha filha Clara por me fazer enxergar o
que realmente é importante. É para ser
digno de seu amor que tento ser melhor a
cada dia.**

AGRADECIMENTOS

“Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os meus agradecimentos a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste estudo”.

- Ao curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias pelo estímulo e pela acolhida como aluno regular do programa de Mestrado em Clínica Cirúrgica;
- Ao Hospital Angelina Caron, pela viabilização das condições para execução deste estudo;
- Ao Professor Doutor Jorge R. Ribas Timi, pela orientação acadêmica na elaboração deste trabalho, pelo apoio, amizade e por ser um exemplo a ser seguido na área da Cirurgia Vasculuar;
- Ao Professor Doutor João Carlos Domingues Repka, por ser um exemplo de pesquisador, professor e estudioso que, de forma altruísta, me motivou e me guiou nas diversas etapas deste estudo, desde a idéia inicial deste projeto, com dicas e orientações que possibilitaram a concretização deste trabalho.
- Aos médicos patologistas Dr. Antônio Pádua Gomes da Silva, Dr^a. Lucia de Noronha, Dr^a. Daniele Sakazaki e Dr^a. Tereza Cavalcanti, pelo valioso e impecável trabalho realizado na confecção e leitura histológica e imunohistoquímica das amostras da parede abdominal dos ratos.
- Aos amigos e colegas de profissão e equipe Dr. Walter Jr. Boim Araújo, Dr. Alan Knolseisen Cambrussi e Dr^a. Viviane Gomes Milgioransa, pelo convívio, amizade e pela colaboração na execução e elaboração deste projeto, me substituindo em tarefas profissionais quando foi necessário me ausentar para cumprir com obrigações relacionadas a este estudo;
- Ao Dr. Carlos José Franco de Souza, pelo incentivo a pesquisa, pelos ensinamentos e orientação na realização das cirurgias nos ratos

- Aos colegas de profissão e de residência Dr. Carlos Eduardo da Silva, Dr. Marcio Barreto, Dr^a. Luana Parminondi Rocha, pela auxílio nos procedimentos cirúrgicos deste estudo.
- Aos residentes e ex-residentes do serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Instituto da Circulação, pelo convívio e estímulo da manutenção da procura incessante pela busca do conhecimento.
- Aos pacientes, que muito nos estimulam, motivando a busca por contínua evolução científica e profissional.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a cicatrização de feridas é um processo dinâmico que envolve vários fenômenos biológicos e bioquímicos os quais podem ser minimizados em condições patológicas ou melhorados pela oferta de fatores de crescimento ou de condições de crescimento teciduais. O óxido nítrico como o produto da reação de óxido-redução da arginina (ARG) estimula a proliferação dos angioblastos, células precursoras do endotélio. Conseqüentemente ocorre formação de novos vasos sanguíneos no tecido e possivelmente coopera para a melhora do processo cicatricial. **OBJETIVO:** avaliar os efeitos da arginina na cicatrização da parede abdominal em ratos Wistar. **MÉTODO:** utilizaram-se vinte ratos Wistar, submetidos à laparotomia-laparorráfia e separados em dois grupos. No grupo arginina receberam tratamento diário, por cinco dias, com ARG (300mg/kg/dia) via intraperitoneal. No grupo controle foram tratados diariamente com solução tampão fosfatos em dose equivalentes ao peso, pela mesma via do grupo arginina. No sétimo dia pós-operatório coletaram-se amostras de sangue e a cicatriz da parede abdominal de ambos os grupos. Avaliaram-se o nível sérico de nitratos e nitritos, a evolução cicatricial pelas dosagens de hidroxiprolina tecidual, formação de tecido de granulação, determinação da porcentagem de colágeno maduro e imaturo, densidade de miofibroblastos e angiogênese. Empregaram-se os testes de ANOVA e T-Student com $p \leq 0,05$ para as comparações entre os grupos. **RESULTADOS:** entre os grupos controle e tratado por arginina, não ocorreram diferenças significantes nas dosagens de nitratos e nitritos ($p=0,9903$), hidroxiprolina tecidual ($p=0,1315$) e na densidade de miofibroblastos ($p=0,0511$). O grupo arginina apresentou maior densidade microvascular ($p=0,0008$), maior porcentagem de colágeno tipo I ($p=0,0064$) e melhora na formação do tecido de granulação com melhores índices de proliferação angiofibroblástica ($p=0,0007$) e reepitelização das bordas ($0,0074$). **CONCLUSÃO:** na avaliação cicatricial da parede abdominal de ratos Wistar sob tratamento com arginina por sete dias não houve alteração do nível sérico de nitratos e nitritos, da deposição de colágeno total e da densidade de miofibroblastos. Verificaram-se aumento da maturação de colágeno do tipo I, da densidade microvascular e melhora na formação do tecido de granulação cicatricial pelas melhores reepitelização de bordas e proliferação angiofibroblástica.

Descritores: arginina, cicatrização, hidroxiprolina, angiogênese, CD34, miofibroblastos, colágeno tipo I, picro-sirius, anti actina alfa, nitratos e nitritos, ratos Wistar, parede abdominal.

ABSTRACT

INTRODUCTION: wound healing is a dynamic process involving several biological and biochemical phenomena which can be minimized in pathological conditions or improved if a correct supply of growth factors or proper tissue growing conditions are in course. Nitric oxide as the product of the arginine (ARG) reduction reaction stimulates the proliferation of angioblasts, endothelial cell precursors. Consequently there is formation of new blood vessels in the reparation tissue that, probably, improves the healing process. **OBJECTIVE:** to evaluate the effects of arginine on the abdominal wall healing process in rats. **METHOD:** the study was approved by the Ethics Committee for Animal Research according to the 012/11 HAC protocol. Twenty Wistar rats underwent laparotomy-laparorrhaphy and were separated into two groups. In the arginine group 10 rats received daily treatment for five days, with ARG (300mg / kg / day) intraperitoneally. In the control group the other 10 rats were treated daily with phosphate buffer solution at a dose equivalent to the weight, by the same administration way of the arginine group. On the seventh postoperative day blood samples and the surgical wound of the abdominal wall were collected in both groups. Serum levels of nitrates and nitrites, the scar evolution by measurements of tissue hydroxyproline, granulation tissue formation, the percentage of mature and immature collagen, myofibroblast density and angiogenesis were evaluated. ANOVA and T-Student tests with $p \leq 0.05$ were employed for comparisons between groups. **RESULTS:** there were no significant differences in dosages of nitrates and nitrites ($p=0,9903$), tissue hydroxyproline ($p=0,1315$) and myofibroblast density ($p=0,0511$) between the groups. The arginine group had a higher microvascular density ($p=0,0008$), higher percentage of type I collagen ($p=0,0064$) and improve in the granulation tissue formation with better angiofibroblastic proliferation index ($p=0,0007$) and better edges re-epithelialization of the wound ($0,0074$). **CONCLUSION:** wound healing evaluation in the abdominal wall of Wistar rats under treatment with arginine, there were no changes in serum levels of nitrates and nitrites, the total collagen deposition and myofibroblasts density. There were increase of type I collagen maturation, microvascular density and improved granulation tissue formation by better edges reepitelization and angiofibroblastic proliferation.

Keywords: arginine, wound healing, hydroxyproline, angiogenesis, CD34, myofibroblasts, collagen type I, Sirius red, anti actin alpha, nitrates and nitrites, Wistar rats, abdominal wall.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FASES DA CICATRIZAÇÃO	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ARGININA	30
FIGURA 3 - SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO A PARTIR DA ARGININA	30
FIGURA 4 - AMBIENTE CIRÚRGICO DEMONSTRANDO A MONTAGEM DA MESA CIRÚRGICA	35
FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, NO DETALHE "A" A LAPAROTOMIA MEDIANA COM ABERTURA DA PELE E TECIDO MUSCULAR E ACESSO À CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE "B" A FERIDA CIRÚRGICA SUTURADA EM DOIS PLANOS: MÚSCULO-APONEURÓTICO E CUTÂNEO	36
FIGURA 6 - DEMONSTRATIVO DA TÉCNICA DE INOCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA A 20% OU DA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATOS PH 7,4 POR VIA INTRAPERITONEAL COM OS RATOS SEDADOS.	37
FIGURA 7 - DEMONSTRATIVO DA TÉCNICA DE PUNÇÃO CARDÍACA E COLETA DE SANGUE EM RATOS SEDADOS.....	38
FIGURA 8 - DEMONSTRATIVO DA COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR. NO DETALHE "A", A FERIDA RESSECADA E SEPARADA EM DOIS FRAGMENTOS. NO DETALHE "B" A AMOSTRA DESTINADA PARA A DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA E NO DETALHE "C" A AMOSTRA COLETADA PARA A AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	39
FIGURA 9 - PRANCHA DE LÂMINAS "A" E "B": QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III POR HISTOMETRIA COMPUTADORIZADA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE PICO-SIRIUS. "C": AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICIAL PELO MÉTODO DA IMUNOPEROXIDASE - TÉCNICA DA ESTREPTAVIDINA-BIOTINA COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD34. "D": AVALIAÇÃO DA DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS PELO MÉTODO DA IMUNOPEROXIDASE - TÉCNICA DA ESTREPTAVIDINA-BIOTINA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS	43

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DE TECIDO) ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	46
GRÁFICO 2 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS DOS TIPOS I E III ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	47
GRÁFICO 3 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS GRADUAÇÕES DOS CRITÉRIOS DE FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	48
GRÁFICO 4 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DENSIDADES MICROVASCULARES ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	49
GRÁFICO 5 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DENSIDADES DE MIOFIBROBLASTOS ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	50
GRÁFICO 6 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS SÉRICOS ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS	51
GRÁFICO 7 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE NITRATO DE SÓDIO A 520 nm	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS	34
TABELA 2 -	CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA CONFORME DESCRIÇÃO DE STEVENS E LOWE (2002)	41
TABELA 3 -	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DE PESOS	76
TABELA 4 -	CÁLCULO DAS DOSES DOS ANESTÉSICOS	76
TABELA 5 -	RESULTADOS SEQUENCIAIS DAS DUPLICATAS (TESTE 1 E TESTE 2) E DAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE TECIDO	80
TABELA 6 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	80
TABELA 7 -	RESULTADOS DA AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III EM TRÊS DIFERENTES CAMPOS NAS AMOSTRAS DOS GRUPOS TRATADOS PELA ARGININA E CONTROLE	83
TABELA 8 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS DE COLÁGENO TIPO I E III NOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA	84
TABELA 9 -	RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOPATOLÓGICAS, EM TRIPLICATAS, DA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	85
TABELA 10 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA NA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO CONFORME OS CRITÉRIOS DE FORMAÇÃO DE CROSTA FIBINOLEUCOCITÁRIA, REEPITELIZAÇÃO DE BORDAS E PROLIFERAÇÃO ANGIOFIBROBLÁSTICA	86
TABELA 11 -	RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOMÉTRICAS, EM TRES CAMPOS MICROSCÓPICOS, DA AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICIAL	88
TABELA 12 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICIAL	88
TABELA 13 -	RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOMÉTRICAS, EM TRÊS CAMPOS MICROSCÓPICOS, DA AVALIAÇÃO DA DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS	90

TABELA 14 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS	90
TABELA 15 -	RESULTADOS DAS DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS SÉRICOS EM QUADRUPLICATAS	92
TABELA 16 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO ÀS DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS SÉRICOS.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

®	-	Marca registrada
CD34	-	Clone de diferenciação 34
CD31	-	Clone de diferenciação 31
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EGF	-	Fator de crescimento epidérmico
MHC	-	Complexo maior de histocompatibilidade
NDAPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
nmol/mg	-	Nanomol por miligrama
mg/kg	-	Miligrama por quilograma
ml	-	Mililitro
mg	-	Miligrama
g	-	Grama
kg	-	Quilograma
mg/kg	-	Miligrama por quilograma
cm	-	Centímetro
mm	-	Milímetro
ON	-	Óxido nítrico
°C	-	Graus centígrados
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RNA _m	-	Ácido ribonucleico mensageiro
TGF	-	Fator de crescimento transformador
TNF α	-	Fator de necrose tumoral alfa
ARG	-	Arginina
mg/kg/dia	-	Miligrama por quilograma por dia
PMN	-	Polimorfonucleares
PAF	-	Fator ativador plaquetario
IL	-	Interleucina
VEGF	-	Fator de crescimento vascular endotelial
FGF	-	Fator de crescimento de fibroblasto
Ca ⁺⁺	-	Cálcio
O ²	-	Oxigênio
S.A.	-	Sociedade anônima

CEPA	-	Comitê de ética em pesquisa em animais
HAC	-	Hospital e maternidade Angelina Caron
PBS	-	Solução tampão fosfatos
μg	-	Micrograma
nm	-	Nanômetro
μm	-	Micrômetro
HE	-	Hematoxilina- eosina
αSMA	-	?
$\mu\text{mol/L}$	-	Micromol por litro
$\mu\text{G/MG}$	-	Micrograma por miligrama
sm	-	Muscular lisa
HCl	-	Ácido clorídrico
KCl	-	Cloreto de potássio
EDTA	-	?
Rpm	-	Rotações por minuto
kD	-	Quilodalton?
μl	-	Microlitro?

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
	1.1 OBJETIVOS	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
	2.1 O PROCESSO DE REPARAÇÃO CICATRICIAL	21
	2.2 A ARGININA	29
3	MÉTODO	33
	3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
	3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	35
	3.3 TRATAMENTOS	37
	3.4 COLETA DE AMOSTRAS	38
	3.5. AVALIAÇÕES	39
	3.6.2 Dosagens de hidroxiprolina tecidual	39
	3.6.3 Avaliações microscópicas	40
	3.6.3.1 Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno dos tipos I e III	40
	3.6.3.2 Avaliação histopatológica da formação de tecido de granulação	41
	3.6.3.3 Avaliação da densidade microvascular	42
	3.6.3.4 Avaliação da densidade de miofibroblastos	42
	3.6.3.5 Dosagens de nitratos e nitritos	44
	3.7 Avaliações estatísticas	44
4	RESULTADOS	45
	4.1. DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL	46
	4.2 AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III	47
	4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	48
	4.4. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR	49
	4.5. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS	50
	4.6. DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS	51
5	DISCUSSÃO	52
	5.1 O MODELO EXPERIMENTAL	53
	5.2 A ARGININA	55
	5.3 A HIDROXIPROLINA TECIDUAL	56
	5.4 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENOS I E III	57
	5.5 FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	58
	5.6 DENSIDADE MICROVASCULAR	60
	5.7 DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS	61
	5.8 DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS	62
	5.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ANEXO	72
ANEXO 1 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	73
APÊNDICES	75
APÊNDICE 1 - ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS, PESAGENS E ANESTESIA DOS RATOS	76
APÊNDICE 2 - DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL (µg/mg)	77
APÊNDICE 3 - AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III	82
APÊNDICE 4 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	85
APÊNDICE 5 - AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR	87
APÊNDICE 6 - AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS	89
APÊNDICE 7 - DOSAGEM DE NITRATOS E NITRITOS	91

1 Introdução

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que envolve os fenômenos de homeostasia, inflamação, proliferação celular e remodelamento tecidual (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003). É considerada fundamental para o sucesso de qualquer intervenção cirúrgica e a falha neste processo pode levar a graves consequências. Hipócrates já havia estabelecido que “a cicatrização é uma questão de tempo, mas, algumas vezes, é uma questão de oportunidade”. Provavelmente se considerarmos atualmente a “oportunidade” mencionada por Hipócrates, deveremos incluir os novos produtos e procedimentos que facilitam o tratamento de diversas questões relacionadas à reparação tecidual, oriundos da dedicação crescente de pesquisadores, focados em desvendar os segredos da reparação tecidual, os quais propiciam a renovação de conhecimentos (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

Sabe-se que um volume significativo de recursos é destinado ao tratamento de complicações pós-operatórias causadas pelo retardo em algum dos fenômenos cicatriciais ou a não cicatrização, o que motiva grandes investimentos em pesquisas voltadas à melhor compreensão da fisiopatologia para que novos fatores que influenciam este processo sejam reconhecidos no meio médico como opções terapêuticas.

Nesse contexto, graças aos avanços em metabologia cirúrgica, nutrição e bioquímica, vive-se numa nova época em que se pretende interferir nos fenômenos e na síntese de substâncias que sejam capazes de melhorar ou abreviar o tempo do processo cicatricial, como o estudo experimental que demonstrou que a suplementação com arginina na dieta de ratos aumentava a força tênsil e a deposição de colágeno em tecido lesionado (CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007). A arginina (ARG), um aminoácido semi-essencial, desempenha papel fundamental no metabolismo de diversos componentes do organismo propiciando numerosos e peculiares efeitos farmacológicos (SEIFTER et al., 1978). É recrutada nas fases agudas e crônicas da cicatrização e comprovadamente precursora, entre outras moléculas, do óxido nítrico (ON) o qual coopera na angiogênese e no processo cicatricial como um todo. A angiogênese por sua vez é um fenômeno cicatricial da fase proliferativa que coopera para que células e fatores de crescimento possam dar

prosseguimento à fase da remodelação com a maturação de colágenos e aumento da força tênsil cicatricial (WITTE & BARBUL, 1997).

Assim sendo, a hipótese do presente estudo é investigar o efeito da administração intraperitoneal de ARG na cicatrização da parede abdominal de ratos Wistar, considerando como indicadores a síntese e maturação de colágeno, a formação de tecido de granulação, as densidades teciduais microvascular e de miofibroblastos.

1.1. Objetivos:

- Quantificar a deposição de colágeno total pela dosagem de hidroxiprolina tecidual;
- Quantificar a maturação de colágenos dos tipos I e III por histometria computadorizada;
- Avaliar a formação do tecido de granulação cicatricial por histopatologia;
- Avaliar a densidade cicatricial microvascular endotelial através do marcador anti-CD34;
- Avaliar a densidade cicatricial de miofibroblastos através do marcador anti-actina alfa;

2 Revisão da Literatura

2.1. O PROCESSO DE REPARAÇÃO CICATRICIAL

Em 1910, Carrel propôs uma organização didática do processo cicatricial em três fases para o seu melhor entendimento: a inflamatória, a proliferativa e a de remodelamento, as quais se sobrepõem. A fase inflamatória tem início no momento da lesão tecidual e se estende até o quarto dia, seguida pela fase proliferativa, a partir do terceiro até o décimo quarto dia. A última fase, a de remodelamento, se inicia a partir do sétimo dia e tem um período prolongado podendo durar meses ou anos. Outros autores descreveram a cicatrização em outras fases, as quais podem ser consideradas como desdobramentos das fases descritas por Carrel (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

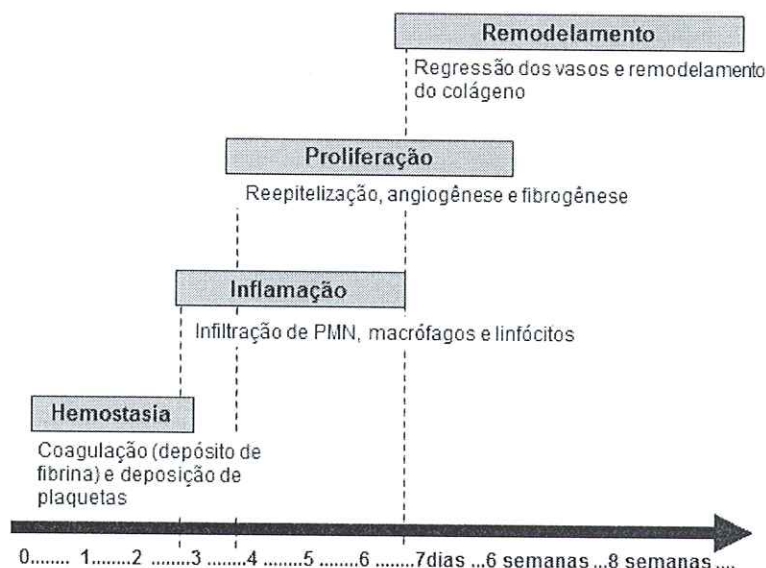


FIGURA 1 – FASES DA CICATRIZAÇÃO (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

Como citado anteriormente, há muito tempo já se sabe que estas fases não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo dos tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e também com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento, responsáveis pela

recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

A primeira fase da cicatrização, a inflamatória, dura em média três dias e é caracterizada por vasoconstrição e hemostasia transitórias, seguidas por vasodilatação e extravasamento de plasma, plaquetas e leucócitos que formarão um exsudato inflamatório. Este exsudato leva a agregação plaquetária e conseqüentemente o tamponamento da lesão, pela ativação da via intrínseca da coagulação. Outro processo que ocorre nesta fase é a ativação e recrutamento de neutrófilos e macrófagos, que liberam fatores angiogênicos e fagocitam resíduos teciduais, macromoléculas e possíveis agentes infecciosos. Há também a liberação de mediadores químicos tais como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator ativador plaquetário (PAF), da fibronectina e da serotonina. Todo esse processo leva a formação local de fibrina, que dá sustentabilidade para neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

Após uma lesão tecidual ocorre ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes. Os eventos iniciais do processo de reparo estão, nos primeiros momentos, voltados para o tamponamento desses vasos. Quase concomitante ao estímulo lesivo, e devido à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ação de mediadores oriundos da degranulação de mastócitos, ocorre vasoconstrição como primeira resposta. A lesão do endotélio (ruptura, fissura ou erosão) dispara uma seqüência de eventos, iniciando-se com a deposição de plaquetas, prosseguindo com sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas. O resultado dessa seqüência é a formação de trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial. Esse trombo rico em plaquetas (trombo branco) é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Logo após, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se então o trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo. A adesão inicial das plaquetas à superfície

lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o TGF β , o PDGF e quimiocinas formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células (tanto da circulação como das regiões adjacentes) envolvidas com a instalação da resposta inflamatória. Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microrganismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados. Ao final de um dia após a lesão eles constituirão 50% das células migradas ao local (FOXMAN, CAMPBELL & BUTCCHER, 1997; ENGELHARD et al., 1998).

As próximas células que surgem na região, do segundo ao quinto dia, são os macrófagos derivados de monócitos. Eles são responsáveis pelo elemento mais crítico na indução do processo de reparo, pois além de fagocitar microrganismos, os macrófagos os processam nos fagossomas, apresentam seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares. Desta forma, a fagocitose destas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo. Além disso, é a célula mais eficiente na eliminação de fragmentos teciduais. Ainda, por influência de ligantes a seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações do complemento e fatores de coagulação) e enzimas relacionadas ao reparo (tais como collagenases, matriz de metaloproteases). (NEWMAN, HENSON & HENSON, 1992; RICHES, 1996; DI PIETRO, 1995).

Na fase proliferativa da cicatrização, que segue a fase inflamatória, o aumento da permeabilidade vascular decorrente da inflamação e ação de prostaglandinas, leva a formação de um infiltrado celular, rico em macrófagos e fibroblastos. A partir do quarto dia do início do processo cicatricial o ambiente começa a ser invadido por novo estroma,

gerando o tecido de granulação. Esse tecido consiste na combinação de elementos celulares, incluindo os fibroblastos, células inflamatórias e destaca-se a angiogênese com a formação de novos capilares, diminuindo perda de líquidos pela ferida e criando uma barreira contra infecções. Simultaneamente os fibroblastos iniciam a síntese de proteínas como o colágeno. Nesta etapa, os mediadores envolvidos são as interleucinas 1 e 6 (IL1 e IL6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator beta de transformação do crescimento celular (TGF- β). (WITTE & BARBUL, 1997; GIAQUINTO & MOTA, 2005).

Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro. Isto se dá pela matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização ou angiogênese da região. Além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura, a indução da angiogênese é, em parte, creditada à baixa tensão de oxigênio característica que ocorre no centro de uma ferida (KNIGHTON, SILVER & HUNT, 1981).

A deposição de colágeno pelos fibroblastos, a deposição de fibrina e fibronectina durante a hemostasia, na fase proliferativa determinam a resistência tênsil da cicatriz. Além desses elementos, depositam-se também os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras proteínas, como as proteínas ácidas ricas em cisteína (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

O colágeno é uma proteína estrutural encontrada em grandes quantidades em todos os animais. Nos seres humanos, representa um terço do total de proteínas, sendo três quartos do peso seco da pele composto por ele. É o componente mais abundante na matriz

extracelular. Existem descritos vinte e oito tipos diferentes de colágenos, que são composto por pelo menos 46 diferentes cadeias polipeptídicas identificadas nos vertebrados (VEIT et al., 2006).

O colágeno é organizado em fibras insolúveis de grande resistência, compostas por três cadeias polipeptídicas, torcidas sobre si mesmas, formado uma tripla hélice. Cada uma delas possui uma seqüência repetida de três resíduos de amino ácidos que são a prolina, a hidroxiprolina e a glicina. O que mantém as fitas unidas são pontes de hidrogênio entre os resíduos de prolina e hidroxiprolina, que estabilizam essas cadeias, sendo que a hidroxiprolina compõe 14% do colágeno (KIVIRIKKO & RISTELLI, 1976). Sabendo-se disso, quantificar a hidroxiprolina tecidual permite a análise da evolução cicatricial, já que a hidroxiprolina não deriva da ingestão alimentar, mas da hidrólise da prolina e o colágeno é a única proteína do organismo animal que contém hidroxiprolina em quantidade significativa (STTETEN, 1949).

Como é possível, através de processo bioquímico, determinar a taxa de hidroxiprolina em tecido normal ou em tecido decorrente de processo cicatricial, pode-se obter, por essas medidas, uma avaliação quantitativa da qualidade do reparo. Considera-se que o decréscimo da concentração da hidroxiprolina evidencia o catabolismo do colágeno e sua dosagem é utilizada como índice de evolução da cicatrização (DIETZ et al., 1995).

Além da deposição de colágeno, outro fenômeno que ocorre na fase proliferativa da cicatrização é a angiogênese. É importante diferenciar angiogênese e vasculogênese, dois fenômenos que geram novos vasos sanguíneos a partir de diferentes estímulos iniciais. Define-se vasculogênese como a formação de novos vasos sanguíneos em local onde esses não existiam. Sua formação deve-se ao estímulo e proliferação dos angioblastos (células precursoras do endotélio), originários do mesoderma esplâncnico (YOSHIDA, 2005). Já a angiogênese ou neovascularização é um termo de origem grega (anggeion = vaso, gênese = formação) e é definida como brotamento de novos vasos a partir de células endoteliais de um vaso pré-existente, sendo o processo desenvolvido em duas fases: de brotamento e de maturação (YOSHIDA, 2005).

Com a fibroplasia se inicia a formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia) que está suportado por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. É edemaciado e caracteriza-se pela presença de espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, que são extremamente exudativos e sangram com facilidade. A olho nú, a superfície deste tecido parece conter muitos grânulos. Na verdade são as extremidades rombas de vasos neoformados que se organizam perpendicularmente em direção à superfície e possuem uma coloração vermelha escura. A neovascularização é essencial neste estágio já que permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY & DUDLEY, 1988; GUIDUGLI-NETO, 1992).

Com o estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais de capilares não lesados nas margens da ferida secretam colagenase e ativador do plasminogênio. Essas duas substâncias causam aberturas na membrana basal, o que permite a migração das células endoteliais através da parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão. Na região externa do vaso, passam por diferenciação e adquirem a capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que se acopla ao capilar de onde eram originárias para restabelecer o fluxo sanguíneo (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).

As principais etapas da angiogênese, incluem a vasodilatação, que ocorre em resposta ao estímulo gerado pelo óxido nítrico e leva ao aumento da permeabilidade dos vasos preexistentes, induzidos pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Em seguida acontece a degradação proteolítica da membrana basal do vaso original pelas metaloproteinases da matriz extracelular e o rompimento do contato célula-célula entre as células endoteliais, pelo ativador do plasminogênio. Posteriormente as células endoteliais migram em direção ao estímulo angiogênico, seguida pela proliferação e maturação das células endoteliais e das células migratórias. Por fim, a inibição do crescimento e remodelagem em tubos capilares e o recrutamento de células periendothelias (pericitos e células musculares lisas vasculares) estabilizam o novo vaso sanguíneo (CARMELIE, 2005;

ADAMS & ALITALO, 2007; KERBEL, 2008).

A angiogênese é controlada através de uma série de reguladores que podem ativar ou inibir esse fenômeno. Os principais ativadores são conhecidos como fatores de angiogênese estimuladores de crescimento, ou fatores pró-angiogênicos (VEGF e o fator de crescimento de fibroblasto – FGF) e os inativadores são os fatores inibidores da angiogênese (angiostatina, endostatina e trombospondina-1), que na homeostase estão em equilíbrio perfeito. Normalmente a angiogênese encontra-se inibida devido a maior produção de inibidores. Em muitas doenças graves esse equilíbrio é perdido gerando um descontrole no processo angiogênico. Estes inibidores agem impedindo estímulos mitógenos ao endotélio, inibindo a migração de células endoteliais, reduzindo a proliferação vascular e contribuindo para a apoptose dessas células (FOLKMAN, 1995).

Para estimar a densidade microvascular tecidual e a angiogênese, diversos marcadores podem ser utilizados, um deles é o anticorpo anti-CD34. Este anticorpo liga-se ao receptor CD34, que é uma proteína glicosilada transmembrana presente em células precursoras hematopoiéticas imaturas e acredita-se que esteja envolvida na migração celular durante a angiogênese (KUZU et al., 1992; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Durante a fixação dos fibroblastos e sua transformação para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos. Em um processo inicialmente descrito por Gabbiani e colaboradores em 1970, os fibroblastos destas regiões marginais começam a exibir características funcionais similares às células musculares lisas. Majno e Joris em 1996 relataram que os miofibroblastos são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos. Estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão. Auxilia também no processo de contração da ferida, pois o ressecamento da sua crosta superficial durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderido (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

Com os processos descritos anteriormente, por volta do décimo dia após a lesão tecidual, inicia-se a terceira fase da cicatrização, a fase do remodelamento. Nesta fase, concomitantemente à deposição e maturação do colágeno, ocorre o ganho progressivo de força tênsil, que pode ir aumentando até por dois anos após o início do processo cicatricial. Para o remodelamento, que gera resistência da cicatriz, não apenas a quantidade absoluta do colágeno é importante, mas também a forma de disposição de suas fibras, que são rearranjadas ao longo do tempo. Nas cicatrizes recentes o colágeno do tipo III prevalece em relação ao colágeno do tipo I. Já com o passar do tempo, nas fases mais tardias da cicatrização, o colágeno tipo I se tornará predominante (DIETZ et al., 2005).

Por volta do décimo dia o tecido de granulação vai sendo enriquecido com fibras de colágeno e começa a apresentar aparência de massa fibrótica. (CLARK & HENSON, 1993).

É consenso atualmente, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada após o término da maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente durando meses ou às vezes anos. Apesar de todos estes processos, uma cicatriz cutânea completamente madura possui cerca de 70% da resistência da pele normal. A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras se organizam. Quanto maior o número de ligações covalentes transversais, maior a resistência da cicatriz. Quando secretado na forma de tropocolágeno, as ligações transversais das fibras se dão por pontes de hidrogênio que com o processo de amadurecimento da fibra, são oxidadas até aldeídos. Estes, após a oxidação, se ligam covalentemente com outros grupos aldeídos ou com lisinas não oxidadas, o que aumenta a resistência da fibra. (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

Em 1985, Clark descreveu que o processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória. Essas fibras são subseqüentemente digeridas pela colagenase, ressintetizadas e rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes entre moléculas de tropocolágeno. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e

religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito (CLARK, 1985).

Dos 28 tipos de colágenos identificados em mamíferos, quatro são mais conhecidos. Eles se diferenciam pela composição química, pelo modo que suas moléculas se ligam, pela sua função e pelas doenças causadas por sua má-formação ou por sua produção insuficiente ou em excesso (SHOULDERS & RAINES, 2009). Em tecidos normais (que não tecidos de cicatrização), predomina o colágeno tipo I, constituindo 80 a 90% do colágeno tecidual total. Os 10 a 20% restantes são do tipo III (GIAQUINTO & MOTA, 2005). O colágeno tipo I possui fibrilas estriadas agrupadas na forma de fibras colágenas maiores e têm como função principal a resistência ao estiramento. Já o colágeno tipo III é composto por fibras reticulares e encontra-se em maiores concentrações em tecidos de recém-nascidos, bem como no período inicial da cicatrização. A principal função colágeno tipo III é dar sustentação a órgãos e tecidos (DIEGELMANN & EVANS, 2000).

2.2. A ARGININA

A arginina, ou ácido L-amino-5-guanidino-valérico, é um aminoácido fundamental para diversos eventos fundamentais para a vida e manutenção da homeostase nos mamíferos. Dentre eles pode-se citar a liberação de vários hormônios, a síntese de colágeno na cicatrização de feridas, atividade antitumoral e respostas imunes de várias células. Nos últimos anos, vários estudos demonstraram esse papel fundamental da ARG (EFRON & BARBUL, 2000; ZALOGA et al., 2004).

É um aminoácido codificado pelo código genético, sendo um dos componentes das proteínas dos seres vivos. A ARG é sintetizada a partir da citrulina pela ação sequencial das enzimas argininosuccinato-sintetase e argininosuccinato-liase, no eixo intestinal-renal. Possui quatro átomos de nitrogênio por molécula e devido a essa característica estrutural (figura 2) é o principal carreador de nitrogênio em humanos e animais, apresentando

importante função na síntese proteica e no metabolismo intermediário de nitrogênio por participar do ciclo da uréia. É precursora da síntese de moléculas com grande importância biológica como ornitina, poliaminas, ON, creatina, agmatina, glutamina e prolina, dentre outras (WILMORE, 2004.)

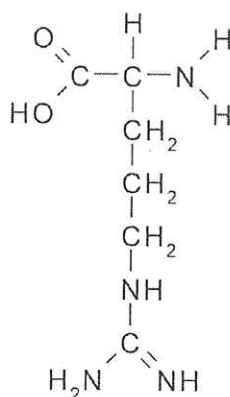


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ARGININA (EFRON & BARBUL, 2000).

Normalmente é considerada não essencial para adultos e crianças, devido à capacidade do organismo em sintetizá-la (HARDY et al., 2006). Porém, sabe-se que em situações clínicas específicas como trauma e sepse principalmente, ocorre aumento do consumo. Esse excede a capacidade de produção corporal levando à depleção da arginina, que nestes casos é ainda agravada pela reduzida ingestão do nutriente em doentes graves.

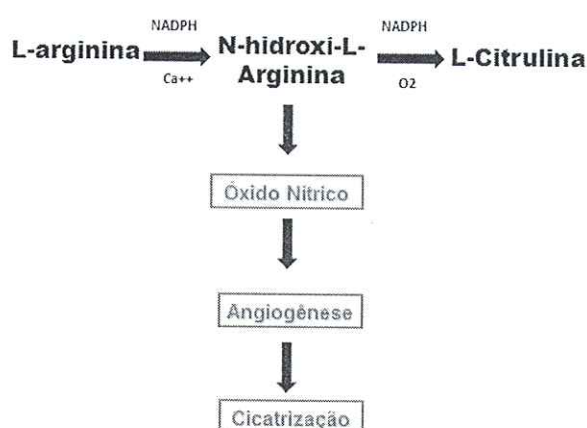


FIGURA 3 – SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO A PARTIR DA ARGININA (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Desta forma, a denominação mais adequada é aminoácido condicionalmente

essencial (PAN, et al., 2004).

Os níveis plasmáticos de arginina são mantidos a partir de fontes exógena (dieta) e endógena (degradação proteica corporal e síntese endógena pela citrulina). A síntese endógena de arginina varia de acordo com o estado nutricional e estágio de desenvolvimento (WU & MORRIS, 1998). Em adultos, não ocorre entrada de quantidades substanciais de arginina dietética na circulação sistêmica, pois 40% da arginina ingerida é degradada pelo intestino delgado na primeira etapa do metabolismo. A arginina também é sintetizada no tecido hepático a partir do ciclo da uréia, porém devido à alta atividade da enzima arginase, a arginina produzida será rapidamente hidrolisada em uréia e ornitina, não havendo, portanto, síntese líquida do aminoácido (WU et al., 2009; FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A outra via de utilização da arginina é o eixo intestino-rins. A arginina produzida da degradação de proteínas corporais é transformada no epitélio intestinal em citrulina, sintetizada a partir do glutamato, glutamina e ornitina em processo que é dependente das enzimas ornitina-aminotransferase e ornitina-transcarbamilase (HALLEMEECH, LAMERS & DEUTZ, 2002; TAPIERO et al., 2002). A citrulina circulante, proveniente dos enterócitos é então captada pelos rins e convertida em arginina em processo mediado pelas enzimas argininosuccinato-sintase e argininosuccinato-liase que contribui para aproximadamente 10% do fluxo plasmático de arginina. Desta forma, a síntese endógena de arginina em adultos envolve principalmente o eixo intestino-rins (CRENN & CYNOBER, 2010; EVANS et al., 2004).

A arginina, quando metabolizada à citrulina, promove a formação de compostos nitrogenados como óxido nítrico, nitritos e nitratos. Grande parte da importância biológica da arginina está atribuída ao ON (POPOVIC, ZEH & OCHOA, 2007). Este óxido é um potente regulador vasoativo e principal fator de relaxamento derivado do endotélio. Ao promover a vasodilatação eleva o fluxo sanguíneo nos tecidos lesados (SAMEL et al., 2003). Além disso, o ON possui importante papel na resposta imunológica, sendo produzido por células que

atuam na resposta inata como os monócitos, macrófagos, micróglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos, por isso, durante a inflamação, age mediando mecanismos de citotoxicidade e defesa não específica do hospedeiro. No entanto, o ON parece exercer dupla função no organismo, os efeitos benéficos ou destrutivos, dependem da quantidade em que é produzido (BODGAN, 2001). A quantificação da produção de ON é difícil, já que este é rapidamente oxidado pela oxihemoglobina a nitrato e nitrito o que contribui para a meia-vida no sangue ser muito curta. Assim sendo, normalmente é medido indiretamente a partir da concentração dos metabólitos nitratos e nitritos no plasma ou nas células (LUIKING et al., 2009). A sua função varia de acordo com a célula que o origina. Assim sendo, nos fibroblastos, promove a síntese de colágeno, nas células endoteliais estimula a angiogênese e em macrófagos é citostático para as bactérias (WITTE & BARBUL, 2002).

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizaram-se 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades entre 180 a 210 dias e pesos de $408,4 \pm 40,1$ gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, mantidos durante o experimento nas dependências da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Após o recebimento, os animais foram submetidos à triagem através de inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sinais de diarreia e lesões cutâneas. Foram mantidos em sala específica para manutenção de animais de laboratório a qual dispõem de exaustão forçada de ar, temperatura controlada entre 19 a 23°C e ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas. Os ratos foram separados em dois grupos com pesos estatisticamente similares ($p=0,2452$ – tabela 3) e colocados no máximo quatro ratos em cada caixa de polipropileno com sepilho (substituídas a cada 24 horas), recebiam ração específica para a espécie (Nuvilab - Quimitia S.A.®) e água *ad libitum*. Permaneceram nessas condições por sete dias de observação que antecederam os experimentos e também durante os mesmos, que foram executados em um único ciclo de atividades.

Observaram-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-2000) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) do Hospital e Maternidade Angelina Caron, conforme protocolo nº 012/11 CEPA/HAC (anexo 1). Os ratos foram separados em grupos conforme descrito na tabela 1:

TABELA 1: DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS:

Grupos	n	Procedimentos
Controle	10	Grupo composto por ratos submetidos à laparotomia mediana, tratamento por cinco dias com solução fisiológica por via intraperitoneal, mantidos até o sétimo dia e coleta de amostras da parede abdominal contendo a cicatriz operatória.
Arginina	10	Grupo composto por ratos submetidos à laparotomia mediana, tratamento por cinco dias com solução de arginina (300mg/kg/dia), por via intraperitoneal, mantidos até o sétimo dia e coleta de amostras da parede abdominal contendo a cicatriz operatória.

Legenda: n - número de ratos em cada grupo.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram executados em ambiente exclusivo para cirurgias experimentais, devidamente sanitizado e climatizado. Conforme demonstrado na figura 4, a mesa cirúrgica era montada com proteção esterilizada bem como os instrumentos e os acessórios e os procedimentos executados em condições de esterilidade.

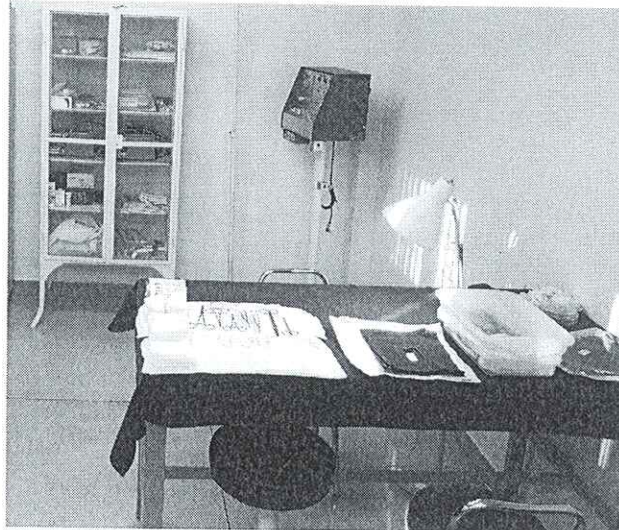


FIGURA 4 - AMBIENTE CIRÚRGICO DEMONSTRANDO A MONTAGEM DA MESA CIRÚRGICA
REFERÊNCIA: AUTOR

Para a indução anestésica os ratos foram submetidos à sedação por inalação de Isoflurano (Isothane-Baxter[®]) em circuito fechado, pesados em balança analítica (Coleman[®] modelo SK280251) sendo os pesos registrados em protocolo específico (apêndice 1 - tabela 3). A seguir, a partir dos pesos individuais eram calculadas as doses dos anestésicos cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia[®]) na dose de 100mg/kg, associada a 10mg/kg de cloridrato de xilasina (Xilazin-Syntec[®]), conforme demonstrado na tabela 4.

Foram utilizadas duas seringas descartáveis de 1ml (BD-Plastiplak[®]) e agulhas hipodérmicas (BD-Plastiplak[®]) para cada rato, sendo cada um dos anestésicos inoculados separados por via intra-muscular em ambas as panturrilhas posteriores.

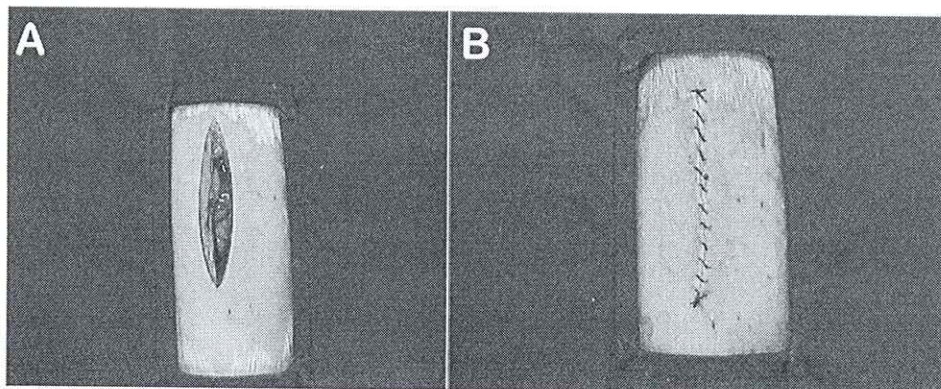


FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, NO DETALHE A" LAPAROTOMIA MEDIANA COM ABERTURA DA PELE E TECIDO MUSCULAR E ACESSO À CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE B" A FERIDA CIRÚRGICA SUTURADA EM DOIS PLANOS: MÚSCULO-APONEURÓTICO E CUTÂNEO. REFERÊNCIA: AUTOR

Após confirmação da indução anestésica, pela perda do reflexo interdigital, procediam-se: tricotomia ampla do abdômen, fixação em decúbito dorsal com fita adesiva na prancha cirúrgica, degermação da área tricotomizada com álcool-iodado e colocação de campos cirúrgicos fenestrados esterilizados. Por meio de laparotomia mediana de três centímetros de extensão, um único médico-cirurgião executava a abertura da pele e tecido muscular. A seguir era suturada a ferida cirúrgica em dois planos (músculo-aponeurócito e pele), com pontos contínuos utilizando fio Mononylon[®] (Ethicon) 3.0 (figura 5).

Após o fechamento, a ferida cirúrgica era limpa com solução fisiológica esterilizada (Eurofarma[®]) e novamente aplicado álcool-iodado. Administravam-se dipirona por via oral, na dose de 20mg/kg, 10ml de solução fisiológica por via subcutânea na região dorsal e os ratos eram mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica.

A seguir eram recolocados em caixas devidamente identificadas e durante as 24 horas seguintes eram mantidos com ração e água *ad libitum* até o sétimo dia de evolução pós-cirúrgica.

3.3 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram feitos por injeções intraperitoneais (IP) (figura 6) na dose de 300mg de arginina/kg/dia para o grupo arginina e dose equivalente de solução tampão fosfatos para o grupo controle (SHUKLA, RASIK & SHANKAR, 1999) sendo as inoculações executadas com os ratos sedados por inalação de isoflurano (Isothane-Baxter[®]), uma vez ao dia, por 5 dias. O início dos tratamento (primeira dose) foi no pós operatório imediato, com os ratos ainda sedados. Para o cálculo dos volumes a serem inoculados os ratos eram pesados e os volumes das doses obtidos através do seguinte cálculo:

$$\text{Volume (ml)} = \frac{300P}{200}$$

Onde:

- Volume (ml) = Volume da solução de L-Arginina a ser inoculado
- P = peso do rato (gramas)

Para o grupo arginina foi utilizada solução de L-Arginina (Merck[®] artigo K21051142) a 20% em solução tampão fosfatos pH 7,4, esterilizada por filtração em membranas de 20 μ (Millipore-SCWP304F0[®]), alíquotada em cinco frascos esterilizados e mantidos a 4 \pm 2°C.

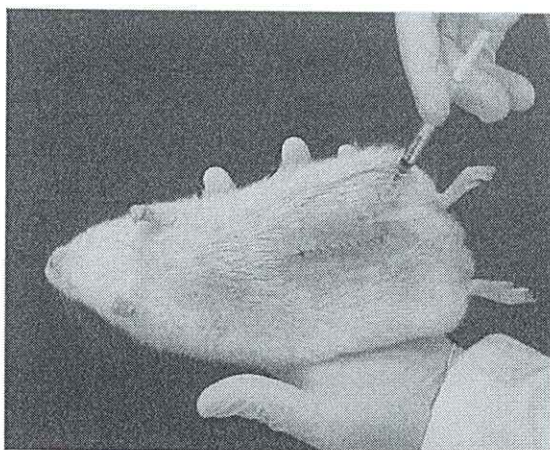


FIGURA 6 - DEMONSTRATIVO DA TÉCNICA DE INOCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE L-ARGININA A 20% OU DA SOLUÇÃO SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATOS PH 7,4 POR VIA INTRAPERITONEAL COM OS RATOS SEDADO.
REFERÊNCIA: AUTOR

Para o grupo controle foi utilizada solução tampão fosfatos pH 7,4. Esta solução foi administrada diariamente por via IP nos ratos do grupo controle, em doses equivalentes aos pesos. Foi utilizada solução tampão fosfatos pH 7,4, esterilizada por filtração em membranas MF (SCWP304F0 Millipore®), aliquotada em frascos esterilizados e mantidos a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS

No sétimo dia de evolução pós-operatória, os ratos foram pesados em balança analítica (Coleman® modelo SK280251), a seguir submetidos à sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália®) em circuito fechado, anestesiados por injeção intramuscular com cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia®) na dose de 100mg/kg e fixados em pranchetas cirúrgicas.

A seguir foi procedida punção cardíaca com a coleta de 8 a 10 ml de sangue, volume este correspondente à uma punção exanguinativa (figura 7) e indutora de parada cardíaco-respiratória.

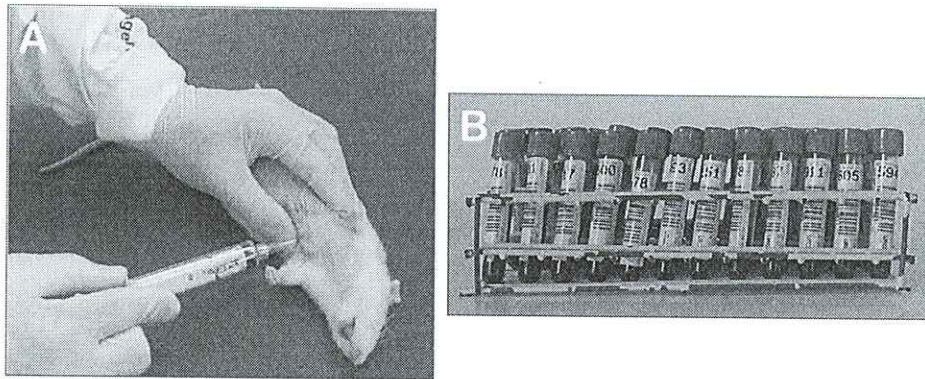


FIGURA 7 - DEMONSTRATIVO DA TÉCNICA DE PUNÇÃO CARDÍACA E COLETA DE SANGUE EM RATOS SEDADOS.
REFERÊNCIA: AUTOR

Ainda sob plano anestésico e com evidência de morte procedeu-se à ressecção da ferida operatória contendo camada músculo-aponeurótica e pele. As amostras coletadas foram estendidas em papel filtro, lavadas solução tampão fosfatos (PBS) pH 7,4 e separadas em dois fragmentos (figura 8).

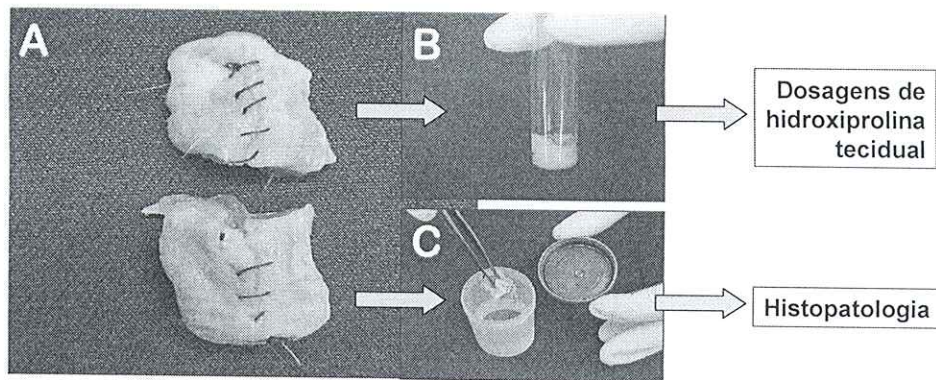


FIGURA 8 - DEMONSTRATIVO DA COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR. NO DETALHE "A", A FERIDA RESSECADA E SEPARADA EM DOIS FRAGMENTOS. NO DETALHE "B" A AMOSTRA DESTINADA PARA A DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA E NO DETALHE "C" A AMOSTRA COLETADA PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS
REFERÊNCIA: AUTOR

Um dos fragmentos era destinado para as dosagens de hidroxiprolina, pesados em balança analítica (Marte®), registrados os pesos e imersos em PBS pH 7,4 e mantido em freezer a -80°C até a oportunidade do processamento laboratorial (item 3.6.2). O outro fragmento era destinado para as avaliações histopatológicas, imerso em frasco identificado contendo formalina tamponada para ser submetido ao processamento histopatológico (item 3.6.3).

3.5. AVALIAÇÕES

3.6.2 Dosagens de hidroxiprolina tecidual

No apêndice 2 está disponibilizada a metodologia laboratorial detalhada para a dosagem de hidroxiprolina tecidual por método espectrofotocolorimétrico (DIETZ et al., 1995 e DIETZ et al., 2005).

Esse método avalia o conteúdo total de hidroxiprolina em amostras de tecido, o que representa uma medida quantitativa da deposição de colágeno total naquela amostra e é expressado em micrograma (μg) por miligrama (mg) de tecido úmido. Tem por princípio a oxidação da carboxi-pirrolidona e do pirrol teciduais pelo reativo de Ehrlich, gerando cor mensurável a 560 nm e proporcional ao conteúdo de hidroxiprolina.

As amostras foram avaliadas em duplicatas e para a obtenção dos resultados, as leituras espectrofotométricas a 560 nm foram tabuladas e submetidas à validação pela aplicação de critérios estatísticos. Se os valores das leituras não apresentassem diferença significativa ($p > 0,05$) então era calculada a média entre ambos. Os valores individuais das leituras em duplicatas e das dosagens de hidroxiprolina em $\mu\text{g}/\text{mg}$ para cada amostra estão disponibilizados na tabela 5.

3.6.3 Avaliações microscópicas

Para as avaliações microscópicas, as amostras foram fixadas em formalina tamponada, os fios de sutura foram retirados e então submetidas ao processamento histológico automatizado que consistia nas fases de desidratação, diafanização e emblocamento. A seguir eram então efetuadas secções perpendiculares ao maior eixo da sutura, em triplicatas, com micrótomo a 4 μm de espessura e fixados em lâminas para serem coradas conforme a avaliação a ser feita, seguindo os itens a seguir.

3.6.3.1 Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno dos tipos I e III

Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Picrosirius-Red-F3BA (JUNQUEIRA, COSSERMELLI & BRENTANI, 1978) e disponibilizada no apêndice 3. Eram analisados por meio de microscópio óptico em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens eram captadas por câmera fotográfica e transmitidas a um monitor colorido e digitalizadas.

Realizou-se a análise histométrica das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows para a identificação do tipo de colágeno, baseado em cores. As cores vermelho, amarelo e laranja correspondiam a colágeno tipo I, enquanto que os tons de verde correspondem ao colágeno tipo III (figura 9). O resultado foi expresso em área percentual de colágeno tipo I e tipo III em cada local do corte histológico.

Para a obtenção dos resultados, foram procedidas três leituras de campos diferentes em cada lâmina, as quais foram tabuladas e submetidas à validação pela aplicação de critérios estatísticos. Se os valores das três leituras não apresentassem diferença significativa ($p > 0,05$), então era calculada a média entre as mesmas. Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 7.

3.6.3.2 Avaliação histopatológica da formação de tecido de granulação

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) de Harris foram avaliados por três patologistas independentes sendo considerada em cada leitura a intensidade da reação inflamatória cicatricial mediante avaliação da formação de crosta fibrinoleucocitária pela observação de depósitos de fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida, proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese), da proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida. A esses achados foram atribuídos graus 0, 1 e 2 para a ausência de reação, reação em grau discreto e moderado respectivamente (STEVENS & LOWE, 2002), conforme demonstrado na tabela

2. Para a obtenção dos resultados, as leituras foram tabuladas e submetidas à validação pela aplicação de critérios estatísticos sendo que se os valores das diferentes leituras não apresentassem diferença significativa ($p > 0,05$) então esses resultados eram considerados válidos e era calculada a média das leituras daquele critério naquele grupo de ratos (tabela 4). Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 9.

TABELA 2 - CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA CONFORME DESCRIÇÃO DE STEVENS & LOWE (2002).

Critérios	Gradações		
	Ausente	Discreta	Moderada
Crosta fibrinoleucocitária	0	1	2
Reepitelização de bordas	0	1	2

Proliferação angiofibroblástica	0	1	2
---------------------------------	---	---	---

3.6.3.3 Avaliação da densidade microvascular

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 4 μ m de espessura estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos anticorpos anti-CD34. A marcação dos cortes histológicos com anticorpo anti-CD34, permite a quantificação da densidade microvascular cicatricial. O antígeno CD34 é uma proteína transmembrana encontrada na superfície de células endoteliais, que atua na ligação com receptores específicos de adesão celular. O CD34 é expresso difusamente nos microvasos cicatriciais e seus níveis de expressão podem se correlacionar à qualidade do processo cicatricial (MOLGAARD, SPURR & GREAVES, 1989).

Foi empregado o método da imunoperoxidase com o uso da técnica da estreptavidina-biotina, com controles positivo e negativo, seguindo a especificação do fabricante (Biotin anti-CD34 antibody clone QBEnd/10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:350 (HSU, RAINE & FANGER, 1981). As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo com padrão de reação nuclear, sendo que qualquer célula endotelial ou grupo de células endoteliais de coloração marrom, independentemente do tamanho, claramente separada de outros elementos imunocorados, eram considerados um microvaso (figura 9). A análise foi realizada por histometria computadorizada, conforme descrito no apêndice 5. Os resultados foram expressados em densidade tecidual de microvasos em uma área de 7.578,94 μ^2 , como média de três leituras em diferentes campos microscópicos.

3.6.3.4 Avaliação da densidade de miofibroblastos

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 3 μ m de espessura estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos anticorpos monoclonais anti- α -actina muscular lisa para a identificação de miofibroblastos. Foi empregado o método da imunoperoxidase (MCCAFFREY et al., 1997; LORENA et al., 2001), com o uso da técnica

da estreptavidina-biotina, com controles positivo e negativo, seguindo a especificação do fabricante (Biotin anti- α SMA antibody clone PJC10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:400. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, com padrão de reação nuclear (figura 9). A análise foi realizada por histometria computadorizada, conforme descrito no apêndice 6. Os resultados foram expressados em densidade tecidual de miofibroblastos em uma área de 7.812,26 μ^2 , como média de três leituras.

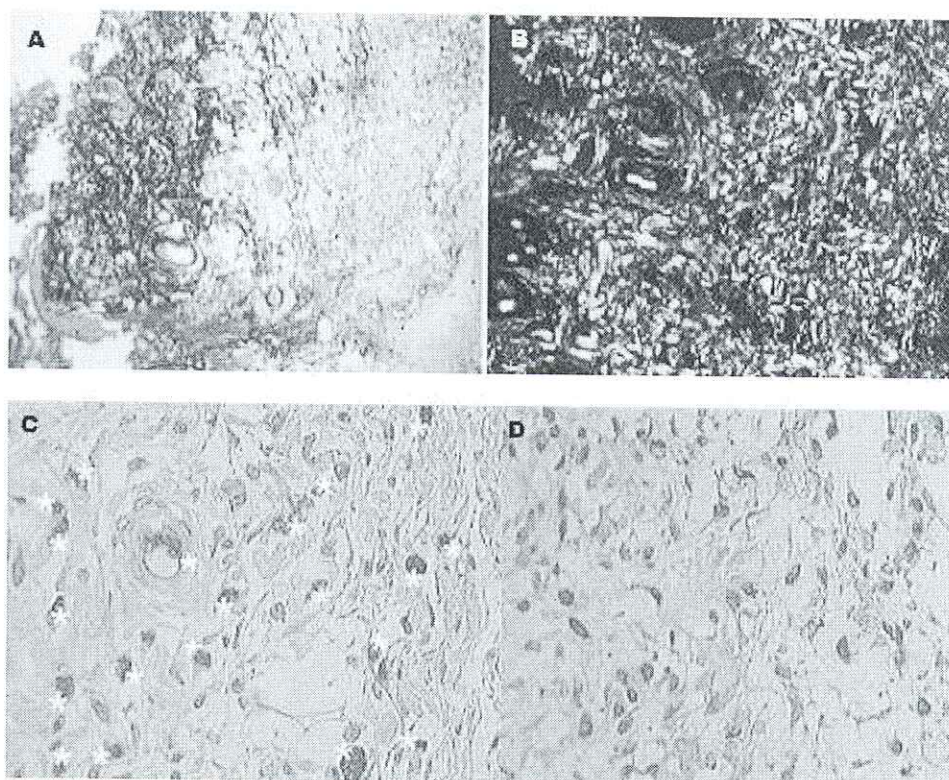


FIGURA 9 – PRANCHA DE LÂMINAS –

"A" E "B": QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III POR HISTOMETRIA COMPUTADORIZADA PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE Picro-sirius. NO DETALHE "A" MICROSCOPIA ÓTICA E NO DETALHE "B" APÓS POLARIZAÇÃO SENDO AS CORES VERMELHO, AMARELO E LARANJA CORRESPONDEM AO COLÁGENO TIPO I, ENQUANTO QUE OS TONS DE VERDE CORRESPONDEM AO COLÁGENO TIPO III.

"C": AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICIAL PELO MÉTODO DA IMUNOPEROXIDASE - TÉCNICA DA ESTREPTAVIDINA-BIOTINA COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD34. CONSIDERADAS POSITIVAS, COMO UM MICROVASO A REAÇÃO MARROM EM QUALQUER CÉLULA ENDOTELIAL OU GRUPO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS INDEPENDENTEMENTE DO TAMANHO, CLARAMENTE SEPARADA DE OUTROS ELEMENTOS IMUNOCORADOS.

"D": AVALIAÇÃO DA DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS PELO MÉTODO DA IMUNOPEROXIDASE - TÉCNICA DA ESTREPTAVIDINA-BIOTINA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS CONSIDERADAS POSITIVAS, COMO UM MIOFIBROBLASTO A REAÇÃO MARROM EM QUALQUER CÉLULA.

REFERÊNCIA: AUTOR

3.6.3.5 Dosagens de nitratos e nitritos

A dosagem de nitratos e nitritos foi feita em amostras de plasma obtido de sangue coletado por punção cardíaca. Foram avaliadas quatro alíquotas de uma mesma amostra (tetraplicatas) e empregou-se o reagente de Griess (sulfanilamida a 2%, N-1-naftil etilenodiamina a 0,2% e ácido ortofosfórico) para a dosagens. A mistura amostra/reagente de Griess foi incubada por cinco minutos a 37°C e seguida de leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 520nm (TATSCH et al., 2011).

Para validar as leituras óticas das repetições das mostras foi aplicado o teste estatístico de ANOVA considerando o critério de que se o valor de p for $>0,05$, não haverá diferenças entre as mesmas e poderá ser calculadas as médias entre as dosagens. Foi preparada simultaneamente ao teste, uma curva de calibração com padrão de nitritos nas concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200 $\mu\text{mol/L}$. Após a validação do método, as densidades óticas médias foram interpoladas por regressão linear na curva de calibração e assim obtidos os resultados em $\mu\text{mol/L}$, conforme descrição no apêndice 7.

3.6 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

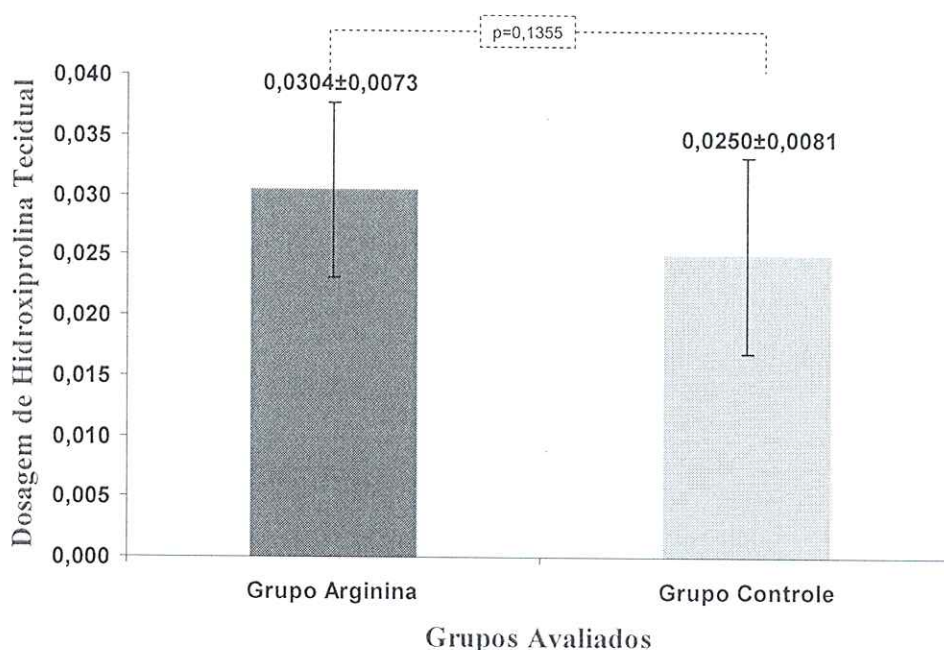
Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e empregaram-se os testes de ANOVA e T-Student com $p \leq 0,05$ para as comparações entre os grupos através do software *GraphPad InStat*.

4 Resultados

4.1. DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL

Na tabela 5 (apêndices) pode-se verificar que nas duplicatas das absorvâncias a 560nm não ocorreram diferenças significantes ($p=0,9433$), o que validou esses resultados para a obtenção das médias dessas dosagens (tabela 5). Na comparação entre as médias dos grupos arginina e controle obteve-se $p=0,1355$ (gráfico 1 e tabela 6).

GRÁFICO 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL ($\mu\text{G}/\text{MG}$ DE TECIDO) ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS



Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões das dosagens de hidroxiprolina nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 5), obteve-se o valor de $p = 0,1353$ considerado não significativo.

TABELA 6: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$):

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	0,0304±0,0073
Grupo Arginina	0,025±0,0081
p*	0,1353

Legenda: p= significância estatística

4.2 AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III

Conforme demonstrado na tabela 7 (apêndices), as avaliações histométricas das porcentagens de colágeno do tipo I, nas amostras do grupo arginina, em 3 campos microscópicos não apresentaram diferenças significantes ($p=0,2462$), assim como o grupo controle ($p=0,8604$). Para colágeno III, não houve diferença no grupo arginina ($p=0,6463$) e controle ($p=0,7814$), o que permitiu validar esses resultados e proceder as comparações entre as médias dos grupos. No gráfico 2 e na tabela 8 estão demonstradas as comparações entre as médias dos grupos controle e arginina para colágeno I com $p=0,0064$ com valores maiores para o grupo arginina e para esse grupo, valores menores para colágeno III com $p=0,0274$.

GRÁFICO 2: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS DOS TIPOS I E III ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS

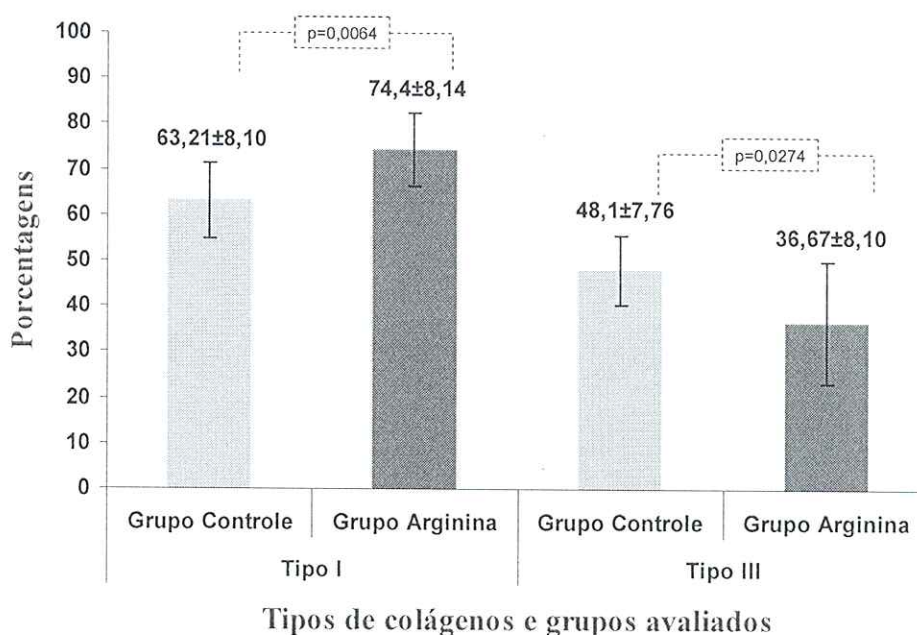


TABELA 8: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS DE COLÁGENO TIPO I E III NOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA

Grupos	Porcentagens de Colágenos	
	Tipo I	Tipo III
Grupo Controle	63,21±8,10	36,67±13,93
Grupo Arginina	74,40±8,14	48,71±7,76
p*	0,0064	0,0274

Legenda: MX±DP = Média ± desvio padrão; *p: significância estatística;

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO

Conforme demonstrado na tabela 9 (apêndices), as avaliações dos critérios histopatológicos da formação de tecido de granulação nas amostras do grupo arginina, em três leituras microscópicas, e no grupo controle, não apresentaram diferenças significantes para a reepitelização de bordas ($p=0,612$) e proliferação angiofibroblástica ($p=0,3811$) e no grupo arginina $p>0,099$ e $p=0,8783$ respectivamente, o que permitiu validar esses resultados e proceder as comparações entre as médias dos grupos. No gráfico 3 e na tabela 10 estão demonstradas as comparações entre as médias dos grupos controle e arginina para reepitelização de bordas ($p=0,074$) e proliferação angiofibroblástica com $p=0,0007$.

GRÁFICO 3: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS GRADUAÇÕES DOS CRITÉRIOS DE FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS

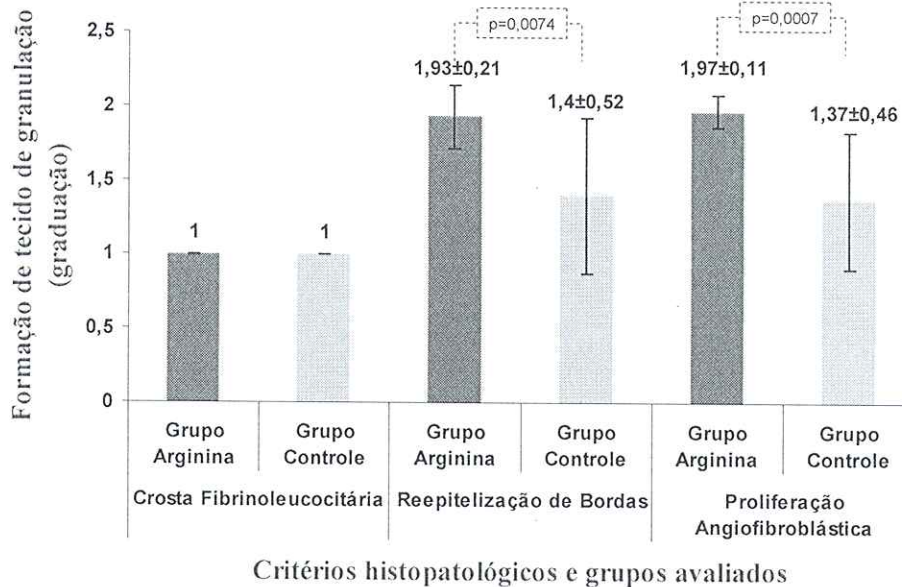


TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA NA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO CONFORME OS CRITÉRIOS DE FORMAÇÃO DE CROSTA FIBINOLEUCOCITÁRIA REEPITELIZAÇÃO DE BORDAS PROLIFERAÇÃO ANGIOFIBROBLÁSTICA:

Crosta Fibrinoleucocitária		Reepitelização de bordas		Proliferação angiofibroblástica	
Grupo Controle	Grupo Arginina	Grupo Controle	Grupo Arginina	Grupo Controle	Grupo Arginina
1	1	1,93±0,21	1,4±0,52	1,97±0,11	1,37±0,46
não se aplica avaliação estatística		p=0,0074		p=0,0007	

Legenda: p: significância estatística;

4.4. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MICROVASCULAR CICATRICIAL

Conforme demonstrado na tabela 11 (apêndices), as avaliações histométricas em três campos microscópicos das densidades microvasculares cicatriciais, nas amostras do grupo arginina apresentaram $p=0,1618$ e no grupo controle $p=0,8929$, o que permitiu validar esses resultados e proceder as comparações entre as médias dos grupos. No gráfico 4 e na tabela 12 estão demonstradas as comparações entre as médias dos grupos controle e arginina, para as avaliações histométricas das densidades microvasculares cicatriciais, com $p=0,0008$ com valores maiores para o grupo arginina.

GRÁFICO 4: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DENSIDADES MICROVASCULARES ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS

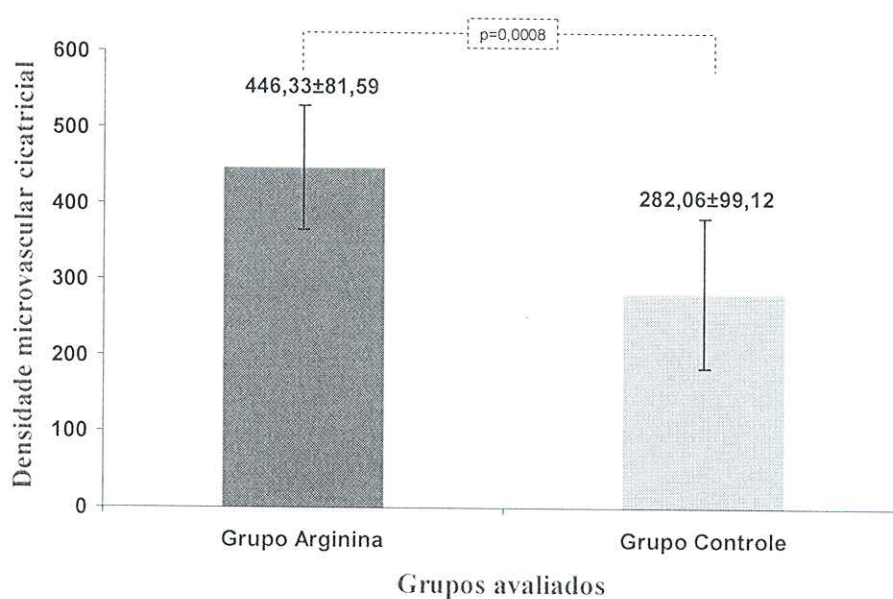


TABELA 12: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICIAL

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	282,06±99,12
Grupo Arginina	446,33±81,59
p*	0,0008

Legenda: p= significância estatística

4.5. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS

Conforme demonstrado na tabela 13 (apêndices), as leituras histométricas em três campos microscópicos das densidades teciduais de miofibroblastos, nas amostras do grupo arginina apresentaram $p=0,5517$ e no grupo controle $p=0,7768$, o que permitiu validar esses resultados e proceder as comparações entre as médias dos grupos. No gráfico 5 e na tabela 14 estão demonstradas as comparações entre as médias dos grupos controle e arginina, para as avaliações histométricas das densidades teciduais de miofibroblastos, com $p=0,0511$.

GRÁFICO 5: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DENSIDADES DE MIOFIBROBLASTOS ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS

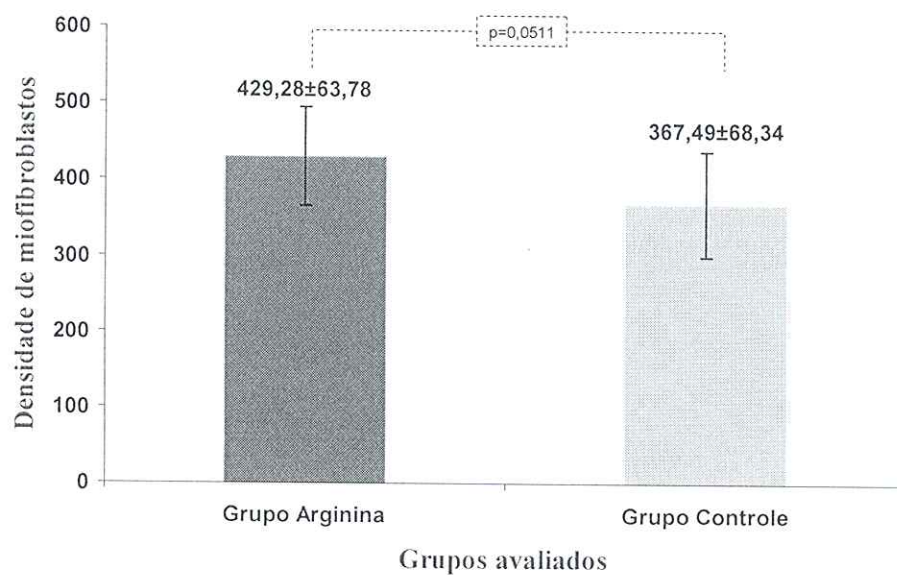


TABELA 12: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICAL

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	282,06 ± 99,12
Grupo Arginina	446,33 ± 81,59
p*	0,0008

Legenda: p= significância estatística

4.6. DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS

Conforme demonstrado na tabela 15 (apêndices), as dosagens de nitratos séricos em quatro testes das mesmas amostras do grupo arginina apresentaram $p=0,9941$ e no grupo controle $p=0,9269$, o que permitiu validar esses resultados e proceder as comparações entre as médias dos grupos. No gráfico 6 e na tabela 16 estão demonstradas as comparações entre as médias dos grupos controle e arginina, para as dosagens de nitratos séricos, com $p=0,9903$.

GRÁFICO 6: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS SÉRICOS ENTRE OS GRUPOS AVALIADOS

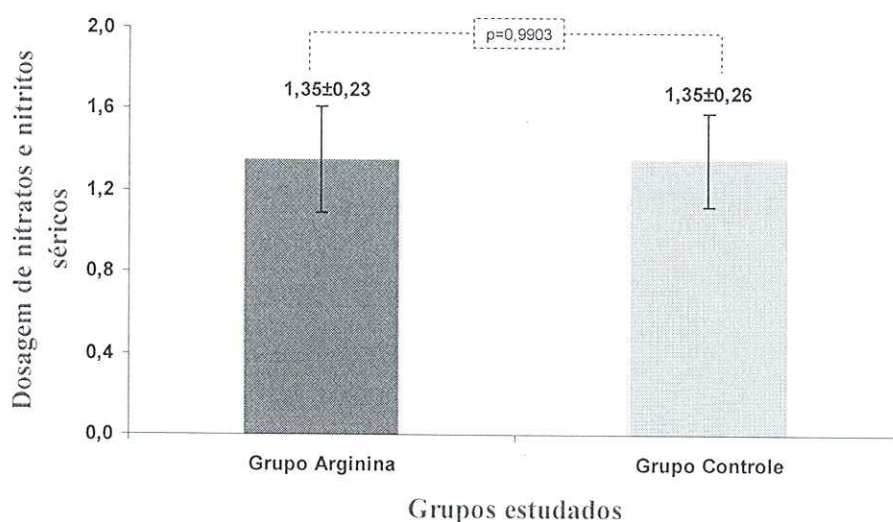


TABELA 16: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO ÀS DOSAGENS DE NITRATOS SÉRICOS

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	1,35±0,23
Grupo Arginina	1,35±0,26
p*	0,9903

Legenda: p= significância estatística

5.1 O MODELO EXPERIMENTAL

A escolha do rato para este estudo foi feita por ser animal de pequeno porte adaptado ao ambiente laboratorial, aquisição acessível e fácil manejo em alojamento múltiplo e alimentação específica para espécie, bem como ser possível padronização de variáveis como raça, idade e sexo (HERMANN, WOODWARD & PULASKI, 1964; LAW & ELLIS, 1990; JIBORN, AHONEN & ZEDERFELDT, 1980). No presente estudo foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, com idades entre 180 a 210 dias e pesos de $408,4 \pm 40,1$ gramas, separados em dois grupos e conforme descrito no apêndice 1, ao serem comparadas estatisticamente as médias e os desvios padrões entre os pesos dos grupos controle e arginina verificou-se $p = 0,2452$ o que demonstra a homogeneidade de ambos os grupos no início do experimento.

O experimento cirúrgico do presente estudo foi realizado em um único ciclo de atividades por uma equipe treinada para o propósito, sendo os procedimentos executados em condições de esterilidade.

Com o objetivo de cumprir preceitos éticos no manejo e execução do presente estudo em ratos, adotou-se o princípio de que “experimentos que possam causar dor ou angústia em animais desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas”. Desta forma, o procedimento anestésico foi executado em duas fases, sendo a primeira uma sedação inalatória com isoflurano para que os ratos fossem corretamente pesados em balança de precisão e também para que não sofressem o estresse e a dor da inoculação dos anestésicos, por possível contenção inadequada. Na segunda fase foram empregados o cloridrato de cetamina associado ao cloridrato de xilasina. Essa associação cetamina-xilasina, por via intramuscular ou intraperitoneal é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso prolongue o tempo cirúrgico (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

Um fator importante para a indução adequada de um plano anestésico é a pesagem correta de cada rato, para que recebam corretamente a proporção ao peso das

drogas anestésicas, sendo indispensável que o rato esteja pelo menos sedado para não se mobilizar durante a pesagem o que levaria a leitura errada do peso na balança. No presente estudo empregou-se balança eletrônica e os ratos estavam sedados no momento da pesagem. Conforme orientado pelo GUIDELINES ON ANESTHESIA AND ANALGESIA IN LABORATORY ANIMALS, o procedimento anestésico foi considerado adequado para o início do procedimento cirúrgico em média após quatro minutos da inoculação dos anestésicos.

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico executava-se tricotomia, degermação da área abdominal com álcool-iodado e colocação de campos cirúrgicos esterilizados. A seguir era executada, por um único médico-cirurgião, uma laparotomia mediana de cerca de três centímetros de extensão e a sutura da ferida cirúrgica em dois planos (músculo-aponeurócito e pele), com pontos contínuos utilizando fio Mononylon® (Ethicon) 3.0. Para a escolha do fio de sutura, considerou-se a sua possível interferência no processo de cicatrização ocasionando eventuais erros na análise dos resultados e optou-se pelo uso de fio monofilamentar inabsorvível o Mononylon® (Ethicon) 3.0, que sabidamente causa menor reação tecidual com pouca reação inflamatória pela presença do corpo estranho e, portanto, menor interferência no processo cicatricial (KORUDA & ROLANDELLI, 1990).

Após o fechamento, a ferida cirúrgica era limpa com solução fisiológica esterilizada e álcool-iodado. Para prevenir eventual dor pós-operatória administravam-se dipirona por via oral e solução fisiológica para reidratar e eram mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica. No transcurso do presente estudo, não se observaram mortes dos ratos nem infecção ou alterações macroscópicas nos sítios cirúrgicos.

Ao término do estudo, executaram-se as coletas de sangue para obtenção de sangue total e como um procedimento terminal, pela punção cardíaca realizada sob anestesia como anteriormente descrito e utilizando o cloridrato de cetamina na dose de 100mg/kg para assegurar o óbito pós-exsanguinação.

5.2 A ARGININA

Graças às descobertas em metabologia cirúrgica, bioquímica e nutrição, vive-se uma nova época na qual se pretende interferir na biologia molecular, influenciando na síntese de substâncias responsáveis pelo desenvolvimento dos fenômenos cicatriciais que respeitem o princípio de "interferência mínima", isto é, causar o mínimo de trauma químico aos tecidos danificados, para que o processo de cicatrização seja levado a termo sem modificar o curso natural (PENAFORTE et al., 2003).

É sabido que a cicatrização de feridas e a angiogênese são prejudicadas pela redução de ON dependente de óxido-nítrico sintase induzível, que também interfere na expressão de fatores de crescimentos (BELABED et al., 2006). Outro aspecto importante é que o ON endotelial é capaz de ativar a mobilização de derivados endoteliais de células progenitoras da medula óssea para o leito da ferida. Estas células desempenham função importante no processo de neovascularização (BONNEFOY et al, 1995).

Associando a importância reconhecida do ON na cicatrização e na angiogênese de feridas e os resultados de um modelo desafiante de estudo de cicatrização em ratos Zucker (diabéticos e obesos), com a evidência da melhora do processo cicatricial com o emprego fórmula hiperproteica enriquecida com arginina além de prolina (RAYNAUD-SIMON et al, 2012), foi estruturado o projeto do presente estudo que visou comparar os processos cicatriciais, na parede abdominal de ratos conforme parâmetros bioquímicos e histopatológicos, em vigência de tratamentos, por via IP, com solução arginina e solução tampão fosfatos como controle.

A escolha da via de administração da arginina no presente estudo baseou-se no fato de que quando L-arginina é injetada por via intraperitoneal apresenta tendência de aumento no teor de hidroxiprolina (CARTER et al., 1994) pois o ON desempenha um papel central na regulação da biossíntese de colágeno.

Os efeitos do tratamento com arginina na ferida cirúrgica, no presente estudo foram avaliados bioquimicamente pela determinação do teor de hidroxiprolina tecidual que representa a deposição total de colágeno e histologicamente pela quantificação de colágenos I e III, avaliação da formação de tecido de granulação, pela angiogênese e pela densidade tecidual de miofibroblastos.

5.3 A HIDROXIPROLINA TECIDUAL.

A avaliação da quantidade de colágeno total, indicado pela hidroxiprolina tecidual, permite uma análise valiosa, porém parcial do processo cicatricial, pois devem ser também considerados os diferentes tipos de colágeno, cuja diferença entre estes ocorre pela composição química e pela forma de associação entre suas moléculas, interferindo na resistência cicatricial. Concomitantemente à deposição e maturação do colágeno em uma cicatriz, ocorre o ganho progressivo de força tênsil até dois anos após (DIETZ et al., 2005).

A primeira etapa na biossíntese de hidroxiprolina é a hidroxilação da prolina pela enzima prolil-hidroxilase, que demanda ferro, O₂, ácido ascórbico e α -ceto-glutarato para sua ativação. A hidroxiprolina pode ser sintetizada a partir da L-arginina por duas vias metabólicas, a via da arginase e a via da ornitina-aminotransferase, as quais produzem a maior quantidade tecidual de prolina. No presente estudo, contrapondo-se aos resultados de Shukla e colaboradores (1999), não houve diferença significativa entre as médias de hidroxiprolina teciduais nos grupos arginina e controle, apesar de aumento numérico.

Os mecanismos da cicatrização ocorrem em seqüência de três fases, a fase inflamatória, a fase de proliferação ou de formação do tecido de granulação e a fase de remodelação ou de maturação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa, as quais migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida. No presente estudo não houve diferença significativa quanto à densidade cicatricial de miofibroblastos (posteriormente discutido) em ambos os

grupos o que permite inferir sobre a conseqüente similaridade de dosagem de hidroxiprolina tecidual (CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENOS I E III

Não apenas a taxa absoluta do colágeno, representada pelo conteúdo em hidroxiprolina, mas também a forma de disposição de suas fibras são responsáveis pela resistência tecidual. Até o presente já foram identificados 19 isoformas de colágeno sendo que o colágeno tipo I predomina e constitui 80 a 90% e os restantes 10 a 20% são do tipo III (GIAQUINTO & MOTA, 2005).

O colágeno tipo I é o mais frequente e predominante em ossos e tendões é considerado colágeno maduro. O tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, como vasos sangüíneos, derme e fáscia. Já o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo. O colágeno mais importante é do tipo I, que é responsável não apenas pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos em função das suas propriedades mecânicas (RAMACHANDRAN & MITRA, 1976), mas também por sua participação ativa na funcionalidade dos tecidos em função de sua interação com as células presentes na matriz extra-celular. Está presente em todos os vertebrados, e incluído na lista das maiores e mais complexas macromoléculas encontradas no reino animal, juntamente com outras macromoléculas formam a matriz extra-celular. No presente estudo, observou-se maior média na porcentagem de colágeno tipo I no grupo de ratos tratados pela arginina quando comparados ao grupo controle ($p=0,0064$).

O método empregado para a avaliação e diferenciação de tipos de colágeno, foi o da polarização com picrossirius que relata a porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração e permite avaliação quantitativa de fibras colágenas, sendo utilizado amplamente em estudos de cicatrização de anastomoses intestinais e outros tecidos (CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007).

Estudo da suplementação nutricional com arginina em seres humanos demonstrou melhora no processo cicatricial pelo aumento de hidroxiprolina e da resposta imunológica

pela ativação blastogênica de linfócitos circulantes. Os autores consideraram a hipótese de emprego da arginina na suplementação nutricional para pacientes críticos (BARBUL et. al, 1990). Contudo ainda permanece controverso o seu uso indiscriminado e sem supervisão na nutrição esportiva, pois foi relatado caso de pancreatite secundária à doses elevadas de arginina por via oral (SAKA et al., 2004).

Estudos experimentais em ratos foram executados com os objetivos de verificar os efeitos da arginina na cicatrização pós-operatória em intestinos e pele, em queimaduras, incorporação de material sintético na parede abdominal, com diferentes doses e vias de administração, como oral, subcutânea e intraperitoneal (CORRÊA-NETO et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2013 e SHUKLA et. al, 1999; CHEN et al., 1999; ARBOS et al., 2006).

Diferentemente dos demais estudos acima citados, os efeitos do uso de dieta enriquecida com arginina durante a lactação, por ratas desnutridas durante a gestação, sobre o crescimento e cicatrização da parede abdominal dos filhotes proporcionou recuperação ponderal, normalização da força tênsil da ferida cirúrgica e dos níveis de concentração total, bem como de maturação do colágeno (ARANHA JUNIOR, 2013).

O tratamento com arginina, com a mesma dose utilizada no presente estudo, administrada por via subcutânea demonstrou, no processo cicatricial de retalho cutâneo em ratos indução de angiogênese e aumento da deposição de colágeno total (GUIMARÃES et al., 2013).

No presente estudo, verificou-se aumento significativo (0,0064) da porcentagem de colágeno tipo I, no grupo tratado com arginina quando comparado ao grupo controle, o que pode ser explicado quando se avaliam os resultados da quantificação da densidade microvascular cicatricial a qual demonstrou aumento significativo também no grupo tratado pela arginina (0,0008).

5.5 FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO

Conforme anteriormente citado, os mecanismos da cicatrização ocorrem em seqüência de três fases, a fase inflamatória, a fase de proliferação ou de formação do tecido

de granulação ao sétimo dia com maior estímulo angiogênico e síntese de colágeno seguindo-se a terceira fase, de remodelação cicatricial pela deposição e maturação de colágeno e por consequência a maturação da cicatriz. O tecido de granulação que inclui uma coleção de elementos celulares, como os fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno. A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (KONSTANTINIDIS et al., 2007; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007).

O tecido de granulação no presente estudo foi avaliado por procedimento histológico através do método da hematoxilina-eosina de Harris considerando a intensidade da reação inflamatória cicatricial mediante avaliação da formação de crosta fibrinoleucocitária pela observação de depósitos de fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida, proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese), da proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida, sendo para cada critério atribuídos graus 0, 1 e 2 para a ausência de reação, reação em grau discreto e moderado respectivamente (STEVENS & LOWE, 2002).

Os achados do presente estudo podem ser explicados pelo fato de que a formação do tecido de granulação tem início com infiltração de macrófagos que produzem e liberam mediadores químicos os quais intensificam a migração e ativação de fibroblastos, como os resultados da avaliação da proliferação angiofibroblástica mais intensa no grupo tratado pela arginina. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro, o que permite inferir sobre os efeitos da arginina na melhor reepitelização das bordas no presente estudo. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos,

ou seja, é necessária a neovascularização da região (KNIGHTON, SILVER & HUNT, 1981; BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

5.6 DENSIDADE MICROVASCULAR

No presente estudo o grupo tratado pela arginina demonstrou densidade microvascular tecidual significativamente maior ($p=0,0008$) quantidade que o grupo controle. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que são reconhecidas duas vias de degradação direta da arginina. Uma delas mediada pela enzima arginase, que a transforma em ornitina e uréia, enquanto que pela outra via a arginina é catalisada pela enzima óxido nítrico-sintase e tem como produto o óxido nítrico. O ON é um potente ativador do “fator vasodilatador associado ao endotélio vascular” que é responsável pela angiogênese (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Pode-se citar também o fato de que o ON é uma molécula mensageira importante que está envolvida em diferentes respostas fisiológicas e patológicas durante cicatrização de feridas (SCHWENTKER et al., 2002; CHILDRESS & STECHMILLER, 2002). Os efeitos positivos do ON sobre a angiogênese têm sido extensamente estudados. A aplicação tópica de ON acelera a proliferação endotelial e de imigração fibroblástica, contudo a aplicação de inibidor de ONs inibe a angiogênese (CHILDRESS & STECHMILLER, 2002). Além disso, a deleção genética da ONs prejudica tanto a angiogênese quanto a cicatrização de feridas, e estimula o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MORBIDELLI et al., 1996).

O uso do anti-CD34 no presente estudo, com a finalidade de quantificar a angiogênese cicatricial foi devido à forte marcação laboratorial, pela facilidade do uso e por ser considerado um ótimo marcador de endotélio vascular, que sobrepuja os demais marcadores CD31 e o fator VIII. É um antígeno encontrado na superfície de células endoteliais, especialmente durante a angiogênese cuja expressão pode ser observada tanto em tecido normal quanto neoplásico (KUZU et al., 1992).

5.7 DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS

No presente estudo, as densidades teciduais de miofibroblastos não diferiram entre o grupo tratado com arginina e o grupo controle ($p=0,0511$) apesar de ter ocorrido diferença numérica. O método utilizado no presente estudo para a quantificação de miofibroblastos, por meio de imunistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm) é amplamente empregado para essa finalidade pois estudos comprovam a importância dos miofibroblastos no processo cicatricial e demonstram que existe relação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos (CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007). Estudo com a utilização de arginina para avaliar a cicatrização colônica em ratos e empregando a mesma forma imunistoquímica de avaliação, não demonstrou vantagens com o uso da arginina em relação à proliferação cicatricial de miofibroblastos (CORRÊA-NETO et al., 2009). Outro estudo experimental em ratos que investigou a densidade de miofibroblastos na cicatrização de feridas pelo mesmo método ora empregado concluiu que o metronidazol, aplicado de forma tópica nas feridas com cicatrização por segunda intenção, não interfere na contração da ferida e atrasa o aparecimento dos miofibroblastos (TRINDADE et al., 2010).

A importância dos miofibroblastos no processo cicatricial decorre também pelo fato de que o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno. Isto é devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos que são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos. Apesar de seu mecanismo contrátil estar ainda por ser esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão. Auxilia também no processo de contração da ferida o ressecamento da sua crosta superficial que durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderido (CORNELISSEN et al., 2000).

Destacam-se neste processo o efeito estimulatório das três isoformas TGF- β s como potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular além das

integrinas. Além dos efeitos sobre a proliferação de fibroblastos, da sua ação sobre os queratinócitos e a deposição de matriz extracelular, participam também da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (ROBERTS, 1996).

5.8 DOSAGENS DE NITRATOS E NITRITOS

O óxido nítrico é um radical livre de meia vida curta formado a partir do terminal guanidino da arginina. Este terminal guanidino aceita cinco elétrons em um processo de oxidação molecular exigindo oxigênio, resultando na formação de ON e citrulina (RIZK, WITTE & BARBUL, 2004).

O óxido nítrico é um metabólito que atravessa as membranas celulares com extrema facilidade, o que faz dele um mensageiro intra e intercelular. Tem uma vida curta (cerca de 3 a 9 segundos) e precisa ser produzido em grande quantidade ou por longo período de tempo para promover efeitos biológicos duradouros (NEILY et al., 1994). Devido a esse curto tempo de vida, a sua dosagem direta é impraticável. Considerando que a sua metabolização gera nitratos e nitritos, os quais são estáveis e permitem suas dosagens em fluidos biológicos, como líquido cefaloraquidiano, urina, fluidos cicatriciais e plasma essas determinações são consideradas indicadores do metabolismo da arginina. No entanto, tais medidas não representam a formação equimolar de ON, pois ocorre também formação não enzimática (RIZK, WITTE & BARBUL, 2004).

No presente estudo as dosagens de nitratos e nitritos séricos nos grupos tratados com arginina e controle não demonstraram diferenças significantes ($p=0,9903$). Independente da espécie o mecanismo de ação toxicológica do nitrito é semelhante. O nitrito oxida o Fe^{2+} da hemoglobina a Fe^{3+} transformando-a em metahemoglobina. A metahemoglobina não possui capacidade de transportar o O_2 causando anoxia tissular. Há relatos de morte dos animais com 80-90% da hemoglobina oxidada (GONZALEZ, 2006). Empregou-se a dosagem de nitratos e nitritos para avaliar se a dose administrada de arginina poderia alterar o nível sérico de nitratos e nitritos sendo, portanto um indicador de possível efeito tóxico se evidenciasse nível maior que o grupo controle.

5.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribui com algumas questões importantes e promissoras com relação à cicatrização e o uso da arginina. O processo cicatricial de qualquer tecido é uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que envolve, de forma harmoniosa, fenômenos bioquímicos e fisiológicos, a fim de garantir a reconstituição histológica e a restauração fisiológica do tecido lesionado.

A concepção deste estudo partiu da possibilidade de que o óxido nítrico, um catabólito da arginina com efeito angiogênico, pudesse melhorar a capacidade de síntese, deposição e maturação de colágeno, com consequente melhora da cicatrização. Observaram-se resultados promissores em relação à melhora da densidade microvascular tecidual, maturação de colágeno e do tecido de granulação, com perspectivas para futuros estudos em organismos com comprometimento cicatricial como aqueles em uso crônico de corticoterapia, imunossupressão pós-transplante, idosos e comprometimento vascular entre outros.

Atualmente a administração oral de arginina tem sido relacionada com a melhora do desempenho físico por provável diminuição da fadiga muscular, decorrente do efeito vasodilatador do óxido nítrico sobre os músculos esqueléticos. Também se busca formas terapêuticas que possam acelerar a angiogênese durante o reparo tecidual ou inibir esse processo nas mais variadas condições neoplásica (FOX, GASPARINI & HARRIS, 2001). A administração oral de arginina associada a programas de treinamentos com pesos potencializam os estímulos do exercício na musculatura esquelética, proporcionando o aumento de força e de massa muscular.

6 Conclusões

Na avaliação cicatricial da parede abdominal de ratos Wistar sob tratamento com arginina:

- Não ocorreu aumento na deposição de colágeno total indicado pela dosagem de hidroxiprolina tecidual;
- Verificou-se melhora na maturação de colágenos tipos I e III avaliada por histometria computadorizada;
- Observou-se melhora na formação do tecido de granulação cicatricial avaliada por histopatologia, com melhores índices de reepitelização de bordas e proliferação angiofibroblástica;
- Verificou-se aumento da densidade cicatricial microvascular endotelial, avaliada através do marcador anti-CD34;
- Não ocorreu aumento na densidade cicatricial de miofibroblastos, verificada através do marcador anti-actina alfa.

Referências

1. MANDELBAUM SH, DI SANTIS EP, MANDELBAUM MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol*, 78(4):393-410, 2003.
2. GIAQUINTO MGC, MOTA DSC. Cicatrização de feridas. In: MARQUES, R.M. Técnica operatória e cirurgia experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, 55-70, 2005.
3. CAMPOS ACL, BORGES-BRANCO A, GROTH AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 20(1):51-8, 2007.
4. SEIFTER E, RETTURA G, BARBUL A, LEVENSON SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery*, 84(2):224-230, 1978.
5. WITTE MB, BARBUL A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 77(3):509-28, 1997.
6. BALBINO CA, PEREIRA LM, CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1):27-51, 2005
7. FOXMAN EF, CAMPBELL JJ, BUTCCHER E. Multistep navigation and combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*, 139(5):1349-1360, 1997.
8. ENGELHARD E, TOKSOY A, GOOBELER M, DEBUS S, BRÜCKER EB, ILLITZER R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phasespecific infiltration of leucocyte subsets in human wound
9. NEWMAN SL, HENSON JE, HENSON PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*, 156(2):430-442, 1992.
10. RICHES DWH. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Springer, second edition, 143-168, 1996.
11. DI PIETRO LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*, 4(4):233-240, 1995.
12. KNIGHTON DR, SILVER I, HUNT TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*, 90(2):262-270, 1981.
13. VEIT G, KOBBE B, KEENE DR, PAULSSON M, KOCH M, WAGENER R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006; 281(6):3494-3504.
14. KIVIRIKKO KI, RISTELLI J. Biosynthesis of collagen and its alteration in pathological states: review article. *Med Biol*, 54(3):159-186, 1976.
15. STETTEN MR. Some aspects of the metabolism of hydroxyproline, studied with the aid of isotopic nitrogen. *J Biol Chem*, 181:31-37, 1949.
16. DIETZ UA, TORRES OJM, INSFRAN GM, NASSIF PAN, HIRT ALA, REPKA JCD, MALAFAIA O, CZECZKO NG. Estudo da taxa de hidroxiprolina tecidual nos diversos segmentos do canal alimentar do cão pela técnica fotocolorimétrica utilizando o reativo de Ehrlich. *Acta Cir Bras*, 10(3):128-134, 1995.
17. YOSHIDA WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros? *J Vasc Br*, 4(4):316-318, 2005.
18. ECKERSLEY JRT, DUDLEY HAF. Wound and wound healing. *British Medical Bulletin*, 44(2):423-36, 1988.
19. GUIDUGLI-NETO J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. *Rev Odontol Univ São Paulo*, 6(1/2):66-71, 1992.
20. RUDOLPH R, BALLANTYNE JR DL. Skin grafts. In: McCARTHY JG, MAY JR JW, LITTLER JW. *Plastic surgery*, Philadelphia: WB Saunders, v.1, 221-267. 1990.

21. CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070):932-936, 2005.
22. ADAMS RH, ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(6):464-78, 2007
23. KERBEL RS, BENEZRA R, LYDEN DC, HATTORI K, HEISSIG B, NOLAN DJ, MITTAL V, SHAKED Y, DIAS S, BERTOLINI F, RAFII S. Endothelial progenitor cells are cellular hubs essential for neoangiogenesis of certain aggressive adenocarcinomas and metastatic transition but not adenomas. *Proc Natl Acad Sci*, 105(34):54-55, 2008.
24. FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1(1):27-31, 1995.
25. KUZU I, BICKNELL R, HARRIS A, JONES M, GATTER KC, MASON DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol*, 45(2):143-148, 1992.
26. ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas (capítulo 11), Imunidade Inata (capítulo 12). In: _____ **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, Elsevier, 5ª edição, 267-301, 2004
27. GABBIANI G, RAYAN GB, MAJNO G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5):549-550, 1970.
28. DIETZ UA, CZECHKO NG, LEMOS R, ARAÚJO ACF, INÁCIO CM, SALLES JÚNIOR GS, CORREIA NETO MC, REPKA JCD, ZANELATO C, MALAFAIA O, DEBUS ES, THIEDE A. Terminolateral esophagojejunostomy after gastrectomy with the biofragmentable anastomosis ring in the dog model. *Zentralbl Chir*, 130(3):274-279, 2005.
29. CLARK, RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*, 306(1):42-48, 1993.
30. SHOULDERS MD, RAINES RT. Collagen Structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78:929-958, 2009.
31. DIEGELMANN RF, EVANS MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(1):283-289, 2004.
32. EFRON DT, BARBUL A. Arginine and immunonutrition: a reevaluation. *Nutrition*, 16(1):73-4, 2000.
33. ZALOGA GP, SIDDIQUI R, TERRY C, MARIK PE. Arginine: mediator or modulator of sepsis? *Nutr Clin Pract*, 19(3):201-215, 2004.
34. WILMORE, D. Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. *J Nutr*, 134(10):2863-2867, 2004.
35. HARDY I, ALANY R, RUSSELL B, HARDY G. Antimicrobial effects of arginine and nitrogen oxides and their potential role in sepsis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(3):225-232, 2006.
36. FLORA FILHO RF, ZILBERSTEIN B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Rev Assoc Med Bras*, 46(3):265-71, 2000.
37. PAN M, CHOUDRY HA, EPLER MJ, MENG QH, KARINCH A, LIN CM, SOUBA W. Arginine transport in catabolic disease states. *J Nutr*, 134(10 Suppl):2826-2829, 2004.
38. WU G, MORRIS SM. Arginine Metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 336(Pt1):1-17, 1998.
39. WU G, BAZER FW, DAVIS TA, KIM SW, LI P, RHOADS JM, SATEERFIELD MC, SMITH SB, SPENCER TE, YIN Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37(1):153-168, 2009.
40. HALLEMEECH MM, LAMERS WH, DEUTZ NEP. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin Nutr*, 21(4):273-279, 2002.

41. TAPIERO H, MATHÉ G, COUVREUR P, TEW KD. Arginine. *Biomed Pharmacother*, 56(9):439-445, 2002.
42. CRENN P, CYNOBER L. Effect of intestinal resections on arginine metabolism: practical implications for nutrition support. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(1):65-69, 2010.
43. EVANS RW, FERNSTROM JD, THOMPSON J, MORRIS SM, KULLER LH. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L- arginine. *J Nutr Biochem*, 15(9):534-539, 2004.
44. POPOVIC PJ, ZEH HJ, OCHOA JB. Arginine and immunity. *J Nutr*, 137(6Suppl2):1681S-1686S, 2007.
45. SAMEL S, KEESE M, LANING S, KLECZKA M, GRETZ N, HAFNER M, STURM J, POST S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock*, 19(4):378-382, 2003.
46. BODGAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10):907-916, 2001.
47. LUIKING YC, POEZE M, RAMSAY G, DEUTZ NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*, 89(1):142-152, 2009.
48. WITTE MB, BARBUL A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*, 183(4):406-12, 2002.
49. SHUKLA A, RASIK AM, SHANKAR R. Nitric oxide inhibits wounds collagen synthesis. *Mol Cell Biochem*; 200(1-2):27-33, 1999.
50. JUNQUEIRA LC, COSSERMELLI W, BRENTANI R. Differential staining of collagen type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*, 41(3):267-274, 1978.
51. STEVENS A, LOWE J. Respostas teciduais ao dano. In: _____ **Patologia**. São Paulo, Manole, segunda edição, 2000, p. 35-50.
52. MOLGAARD HV, SPURR NK, GREAVES MF. The hemopoietic stem cell antigen CD34 is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia*, 3(11):773-776, 1989.
53. HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4):577-80, 1981.
54. MCCAFFREY TA, DU B, CONSIGLI S, SZABO P, BRAY PJ, HARTNER L, WEKSLER BB, SANBORN TA, BERGMAN G, BUSH HL. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest*, 100(9):2182-2188, 1997.
55. LORENA D, UCHIO K, COSTA AM, DESMOLIERE A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*, 10(2):86-92, 2002.
56. TATSCH E, BOCHI GV, PEREIRA RS, KOBER H, OLIVEIRA JR, MORESCO RN. Influência dos anticoagulantes e da temperatura de armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito. *J Bras Patol Med Lab*, 47(2):147-150, 2011.
57. HERMANN JB, WOODWARD SC, PULASKI EJ. Healing of colonic anastomosis in the rat. *Surg Gynecol Obstet*, 119:269-275, 1964.
58. LAW NW, ELLIS H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats. *Surgery*, 107(4):449-454, 1990.
59. JIBORN H, AHONEN J, ZEDERFELDT B. Healing of experimental colonic anastomoses IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *Am J Surg*, 139(3):406-413, 1980.
60. SCHANAIDER A, SILVA PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras*, 19(4):441-447, 2004.

61. GUIDELINES ON ANESTHESIA AND ANALGESIA IN LABORATORY ANIMALS. University of South Florida provides the following guidelines for use by IACUC-certified faculty and staff.
<http://www.southalabama.edu/researchcompliance/pdf/anesthanalgesia.pdf>
62. KORUDA MJ, ROLANDELLI RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomosis. *J Surg Res* 1990; 48(5):504-515.
63. PENAFORTE LG, GUIMARÃES SB, FARIAS RF, ALVES GC, OLIVEIRA TR, VASCONCELOS PC, VASCONCELOS PL. Efeitos da L-arginina sobre as concentrações *in vivo* de metabólitos no sangue e em retalho miocutâneo contendo cicatriz cirúrgica, em ratos wistar. *Rev Soc Bras Cir Plast*, 18(3):55-66, 2003.
64. BONNEFOY M, COULON L, BIENVENU J, BOISSON RC, RYS L. Implication of cytokines in the aggravation of malnutrition and hypercatabolism in elderly patients with severe pressure sores. *Age Ageing*, 24(1):37-42, 1995.
65. RAYNAUD-SIMON A, BELABED L, LE NAOUR G, MARC J, CAPRON F, CYNOBER L, DARQUY S. Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303(10): R1053-R1061, 2012.
66. CARTER EA, DEROJAS-WALKER T, TAMIR S, TANNENBAUM SR, YU Y, TOMPKINS RG. Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury. *Biochem J*, 304(Pt 1):201-204, 1994.
67. RAMACHANDRAN GN, MITRA AK. An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *J Mol Biol*, 107(1):85-92, 1976.
68. BARBUL A, LAZAROU SA, EFRON DT, WASSERKRUG HL, EFRON G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in human. *Surgery*, 108(2):331-336, 1990.
69. SAKA M, TÜZÜN A, ATES Y, BAGCI S, KARAEREN N, DAGALP K. Acute pancreatitis possibly due to arginine use: a case report. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 15(1):56-58, 2004.
70. CORRÊA-NETO MP, CAMPOS ACL, BORGES-BRANCO A, MATIAS JEF. Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 22(1):7-14, 2009.
71. GUIMARÃES MVTN, MOREIRA GHG, ROCHA LP, NICOLUZZI JEL, FRANCO DE SOUZA CJF, REPKA JCD. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rats. *Rev Col Bras Cir*, 40(1):49-54, 2013.
72. CHEN J, WOLLMAN Y, CHERNICHOVSKY T, IAINA A, SOFER M, MATZKIN H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU Int*, 83(3):269-73, 1999.
73. ARBOS MA, FERRANDO JM, QUILES MT, VIDAL J, LÓPEZ-CANO M, GIL J, MANERO JM, PEÑA J, HUGUET P, SCHWARTZ-RIERA S, REVENTÓS J, ARMENGOL M. Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration. *Biomaterials*, 27(5):758-68, 2006.
74. ARANHA JUNIOR AA. 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 α -sma, mmp-2, 9 e 13. 140 F. Tese (Doutorado Em Clínica Cirúrgica) – Setor De Ciências Da Saúde, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2013

75. KONSTANTINIDIS H, SLAVAKIS A, BALLAS K, SIOGA AC, ECONOMOU LD, DEMERTZIDIS CI, PISSANIDOU TT, ATHANASIADOU ZS, SAKADAMIS AK. The effect of capecitabine on the healing of colonic anastomosis in rats. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(1):89-96.
76. MORRIS JR SM. Enzymes of arginine metabolism. *Nutr.* 134(10 Suppl):2743S-2747S, 2004.
77. SCHWENTKER A, VODOVOTZ Y, WELLER R, BILLIAR TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines ? *Nitric Oxide*, 7(1):1-10, 2002.
78. CHILDRESS BB, STECHMILLER JK. Role of nitric oxide in wound healing. *Biol Res Nurs*, 4(1):5-15, 2002.
79. MORBIDELLI L, CHANG CH, DOUGLAS JG, GRANGER HJ, LEDDA F, ZICHE ME. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*, 270:(1 Pt 2) H411-H415, 1996.
80. TRINDADE LCT, BIONDO-SIMÕES MLP, SAMPAIO CPP, FARIAS RE, PIERIN RJ, NETTO MC. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. *Rev Col Bras Cir*, 37(5):358-363, 2010.
81. CORNELISSEN AM, STOOP R, VON DEN HOFF HW, MALTHA JC, KUIJPERS-JAGTMAN AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. *J Oral Pathol Med*, 29(1):1-7, 2000.
82. ROBERTS AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24(2-3):111-119, 1998.
83. RIZK M, WITTE MB, BARBUL A. Nitric Oxide and Wound Healing. *World J Surg* 28(3)301-306, 2004.
84. NEILLY PJD, KIRK SJ, GARDINER KR, ROWLANDS BJ. The L-arginine/nitric oxide pathway biological properties and therapeutic applications. *The Ulster Medical Journal*, 63(2):193-200, 1994.
85. GONZALEZ FHD. Perfil bioquímico sanguíneo. Em: _____ Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, segunda edição, 313-355, 2006.
86. FOX SB, GASPARINI G, HARRIS AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*, 2(5):278-89, 2001.

Anexo

ANEXO 1

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO



HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON

Comissão de Ética em Pesquisa em Animais

Campina Grande do Sul, 21 de junho de 2011

Protocolo 012/11

De Comissão de Ética em Pesquisa em Animais
 Para Dr. Filipe Carlos Caron
 Assunto Parecer (referência projeto)

1. Título do projeto

- Efeitos da arginina na angiogênese e cicatrização de feridas cirúrgicas na musculatura abdominal de ratos Wistar

2. Relator

- Dr. Carlos José Franco de Souza

3. Animais a serem utilizados

- 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar

4. Avaliação dos procedimento (s) previsto (s) :

Procedimento(s)	Avaliação / sugestão(s)
Condições gerais do experimento	Satisfatória
Concepção ética do estudo	Satisfatória
Anestesia: Executada em duas etapas, a primeira, pré-anestesia inalatória com Isoflurano (Isothane-Baxter®). A segunda, a anestesia propriamente dita, com a associação xilazina (Calmium-Agner União®) 10 mg/Kg, associado a Ketamina (Ketamin- Cristália®) 100 mg/Kg por via intramuscular, nas panturrilhas.	Satisfatória
Procedimentos cirúrgicos: Após a indução anestésica os ratos serão submetidos à tricotomia ampla do abdômen e serão fixados em decúbito dorsal, degermados com álcool-iodado e colocados campos cirúrgicos fenestrados esterilizados. Procedida incisão abdominal mediana de cerca de cinco centímetros de extensão com fechamento por sutura contínua com fio Vycril® 3.0, Ethicon, em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo.	Satisfatório
Analgesia e Antibioticoterapia: Após as cirurgias receberão 25 mg de dipirona e 100 mg de ceftriaxona (Triaxin-Eurofarma®) por via intramuscular.	Satisfatório
Tratamentos: solução de Arginina por via intraperitoneal na dose de 300mg/kg/dia com agulhas não traumáticas e os ratos sob sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália®) em circuito fechado.	Satisfatório
Morte dos ratos e coleta de amostras: Ao sétimo dia do procedimento cirúrgico os animais serão submetidos à inalação com halotano (Tanohalo-Cristália®) para posterior punção intracardiaca e exanguinação. Após a evidência da morte dos ratos era procedida a ressecção da parede abdominal contendo a ferida cirúrgica.	Satisfatório



HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON
Comissão de Ética em Pesquisa em Animais

<p>Biossegurança: Serão respeitadas as normas de Biossegurança previstas para a manipulação de animais de laboratório. As carcaças serão removidas para o expurgo hospitalar e transportadas para o aterro sanitário de Curitiba.</p>	<p>Satisfatório Sugerimos envolver cada carcaça em sacos plásticos de lixo hospitalar e fechá-los de maneira hermética.</p>
<p>O autor se compromete a envolver neste experimento somente profissionais com experiência comprovada nesta metodologia e cumprir com rigor as normas de manejo ético dos animais.</p>	<p>Satisfatório</p>

Parecer Final :

Todos os procedimentos analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa foram considerados satisfatórios, sendo este protocolo autorizado para sua execução nas dependências do centro de experimentação animal deste hospital.

Dr. Carlos José Franco de Souza

APÊNDICE 1

ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS, PESAGENS E ANESTESIA DOS RATOS

TABELA 3: ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DE PESOS

Grupos	Ratos	Pesos (g)	MX±DP	p*
Controle	1	377,1	419,04±43,96	0,2452
	2	478,3		
	3	442,4		
	4	430,7		
	5	454,4		
	6	416,6		
	7	414,4		
	8	368,5		
	9	448,9		
	10	490,2		
Arginina	11	394,1	397,73±34,85	
	12	428,7		
	13	396,6		
	14	394,7		
	15	384,5		
	16	402,3		
	17	376,8		
	18	354,7		
	19	347,2		
	20	366,6		

Legenda: MX±DP = Média ± desvio padrão

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões entre as pesagens dos grupos controle e arginina (tabela 3) obteve-se o valor de $p = 0,2452$, considerado não significativo.

TABELA 4: CÁLCULO DAS DOSES DOS ANESTÉSICOS

Grupo Controle				Grupo Arginina			
Ratos	Peso	Dose de Ketamina (ml)	Dose de Xilasina (ml)	Ratos	Peso	Dose de Ketamina (ml)	Dose de Xilasina (ml)
1	377,1	0,75	0,19	11	394,1	0,79	0,20
2	347,2	0,69	0,17	12	428,7	0,86	0,21
3	442,4	0,88	0,22	13	396,6	0,79	0,20
4	430,7	0,86	0,22	14	394,7	0,79	0,20
5	454,4	0,91	0,23	15	384,5	0,77	0,19
6	416,6	0,83	0,21	16	402,3	0,80	0,20
7	414,4	0,83	0,21	17	376,8	0,75	0,19
8	368,5	0,74	0,18	18	354,7	0,71	0,18
9	448,9	0,90	0,22	19	478,3	0,96	0,24
10	490,2	0,98	0,25	20	366,6	0,73	0,18

APÊNDICE 2

DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

1. SOLUÇÕES E REATIVOS

- | | |
|--|--|
| Solução de Fenolftaleína | - Pesar 1 g, solubilizar em etanol, completar o volume para 100ml com etanol |
| Solução 12N de Hidróxido de Potássio | - Pesar 168,7g, solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água |
| Solução 10N de Hidróxido de Potássio | - Pesar 140,25g, solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água |
| Solução 1N de Hidróxido de Potássio | - Pesar 14,02g solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água |
| Solução 0,1N de Hidróxido de Potássio | - Pesar 1,402g solubilizar em água deionizada
- Completar o volume para 250ml com água |
| Solução 0,05N de Hidróxido de Potássio | - Pesar 0,701g solubilizar em água deionizada
- Completar o volume para 250ml com água |
| Solução 0,05N de Ácido Clorídrico | - Pipetar 0,76ml de solubilizar em água deionizada
- Completar o volume para 250ml com água |
| Solução 0,2M de Cloramina | - Pesar 1,41g solubilizar Éter monometílico do etilenoglicol
- Completar o volume para 25ml com Éter monometílico do etilenoglicol |
| Solução 3,6M de Tiosulfato de Sódio | - Pesar 89,3g solubilizar em água deionizada
- Completar o volume para 100ml com água |
| Solução Tampão Borato pH 8,7 | - Pesar 61,84g de ácido bórico
- Pesar 225g de Cloreto de Potássio
- Solubilizar em água deionizada
- Ajustar a pH8,7 com solução de KOH 10N e 1N
- Completar o volume para 800ml com água |

-
- | | |
|----------------------------------|--|
| Solução Padrão de Hidroxiprolina | - Pesar 36mg |
| | - Solubilizar em água |
| | - Completar o volume para 100ml com água |
| | - Aliquotar em frascos esterilizados |
| Reativo de Ehrlich | - Pesar 15g p-dimetilaminobenzaldeído |
| | - Preparar uma solução de N-propanol em ácido perclórico (2:1 v/v) qsp 100ml |
| | - Solubilizar o p-dimetilaminobenzaldeído na solução acima descrita. Reativo instável deve ser preparado imediatamente antes do uso. |

2. EQUIPAMENTOS

- | | |
|--|--------------------------|
| Agitador de tubos | - Phoenix – AT 56 |
| Agitador magnético com magneto de 7 cm | - Phoenix |
| Balança Analítica | - Mettler |
| Becker | - 500ml – Pyrex |
| Becker | - 250ml - Pyrex |
| Erlenmeyer | - 250ml - Pyrex |
| Erlenmeyer | - 500ml – Pyrex |
| Espectrofotômetro | - Espectromatic 710 Siel |
| Pipeta automática 1.000 μ l | - Gilson |
| Pipetas de 10ml 1/100 – sorológica | - Pyrex |
| Pipetas de 2ml 1/100 – sorológica | - Pyrex |
| Pipetas de 5ml 1/100 – sorológica | - Pyrex |
| Ponteiras de 1.000 μ l | - Gilson |
| Pró-pipetas | - Biomatic |
| Proveta 100ml | - Pyrex |
| Proveta 500ml | - Pyrex |
| Proveta 50ml | - Pyrex |

Tubos de ensaio com tampa de rosca	- 20x200mm Pyrex 9825
pH-metro	- Mettler
Banho-Maria fervente	- Fanen

3. MÉTODO

3.1. Preparação das amostras

- Após a ressecção, cada segmento de tecido muscular cicatricial a ser avaliado na dosagem de hidroxiprolina foi pesado e colocado em tubos de tampa de rosca e congelado a -80°C até a oportunidade da dosagem.

3.2. Dosagem

- Preparar os tubos de ensaio com tampa de rosca, com graduação marcada de 15ml para as soluções branca, padrão e amostras.
- Pesar as amostras em balança eletrônica Mettler® e colocar nos tubos de ensaio identificados.
- Preparar 3 controles positivos com 1ml de solução padrão de Hidroxiprolina e os controles negativos com 1ml de água deionizada.
- Pipetar, em capela com exaustão, 2ml de HCl concentrado em cada tubo.
- Fechar os tubos e levá-los à hidrólise ácida a 90°C durante 20 horas.
- Neutralizar pela adição de 1 gota de solução de fenolftaleína e ajustar o pH entre 8,2 a 9,8 pela adição de solução de KOH 0,1N e completar com água destilada até a marca de 15ml.
- Transferir alíquotas de 3ml dos hidrolizados neutralizados para outros tubos com tampas de rosca e saturar com KCl.
- Em seguida acrescentar a alanina, induzir o processo de oxidação pela cloramina T por 30 minutos e interromper com tiosulfato de sódio.
- Cumprir a etapa da oxidação, realizar novo aquecimento das amostras para a formação do pirrol o qual será extraído por 2ml de tolueno em cada tubo e finalmente a reação formadora de cor pela adição do reativo de Ehrlich.
- Medir a absorbância das soluções em espectrofotômetro
- A partir das leituras das absorbâncias de cada amostra proceder ao cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em microgramas (μg) por miligrama de tecido.

4. CÁLCULOS

$$- F1: \text{Hidroxirolina (mg)/ml} = \frac{Ax \times 0,036}{Ap}$$

Sendo:

Ax: absorvância do cromógeno da amostra tecidual

Ap: absorvância do cromógeno da solução padrão de trabalho de hidroxirolina

0,036: constante referente à concentração da solução padrão de trabalho de hidroxirolina de 36g/ml

- F2: Total de Tecido/ml = $\frac{\text{peso em gramas da amostra}}{2\text{ml (diluição inicial)}}$
- F3: $\mu\text{g de hidroxirolina/mg de tecido}$ = $\frac{\text{mg de hidroxirolina/ml}}{\text{mg de tecido/ml}}$

TABELA 5: RESULTADOS SEQÜENCIAIS DAS DUPLICATAS (TESTE 1 E TESTE 2) E DAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIROLINA EM $\mu\text{G/MG}$ DE TECIDO

Grupos	Peso (g)	Absorvância (λ) 560nm		Média T1/T2	F1 mg/ml	F2 tecido/ml	F3 $\mu\text{g/mg}$	MX \pm DP	p*
		Teste 1	Teste 2						
Controle	0,827	0,330	0,360	0,345	0,0114	0,4135	0,0276	0,0304 \pm 0,0073	0,1353
	0,557	0,260	0,250	0,255	0,0084	0,2785	0,0302		
	0,749	0,350	0,360	0,355	0,0117	0,3745	0,0313		
	0,544	0,240	0,220	0,23	0,0076	0,2720	0,0279		
	0,687	0,380	0,380	0,38	0,0126	0,3435	0,0365		
	0,813	0,345	0,330	0,337	0,0111	0,4065	0,0274		
	0,481	0,288	0,290	0,289	0,0095	0,2405	0,0397		
	0,753	0,422	0,410	0,416	0,0137	0,3765	0,0365		
	0,960	0,214	0,180	0,197	0,0065	0,4800	0,0136		
	0,862	0,425	0,450	0,437	0,0144	0,4310	0,0335		
Arginina	1,035	0,296	0,280	0,288	0,0095	0,5175	0,0184	0,025 \pm 0,0081	0,1353
	1,084	0,321	0,330	0,325	0,0108	0,5420	0,0198		
	1,126	0,420	0,390	0,405	0,0134	0,5630	0,0238		
	0,980	0,332	0,350	0,341	0,0113	0,4900	0,0230		
	0,765	0,441	0,440	0,440	0,0145	0,3825	0,0380		
	1,042	0,338	0,360	0,349	0,0115	0,5210	0,0221		
	0,578	0,344	0,340	0,342	0,0113	0,2890	0,0391		
	1,221	0,255	0,250	0,252	0,0083	0,6105	0,0137		
	0,720	0,310	0,310	0,310	0,0102	0,3600	0,0284		
0,743	0,270	0,270	0,270	0,0089	0,3715	0,0240			
Validação dos resultados		*p=0,9433							

Legenda: T1 e T2: duplicatas dos testes; F1 fórmula1; F2 fórmula 2 e F3 fórmula 3; *p: significância estatística;

MX \pm DP = Média \pm desvio padrão

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões entre as absorvâncias das dosagens de hidroxirolina (tabela 5) dos grupos controle e arginina obteve-se o valor de $p = 0,9433$, considerado não significativo.

TABELA 6: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DOSAGEM DE HIDROXIROLINA TECIDUAL ($\mu\text{g/mg}$):

Grupos	Média \pm Desvio Padrão
Grupo Controle	0,0304 \pm 0,0073
Grupo Arginina	0,025 \pm 0,0081
p*	0,1353

Legenda: p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões das dosagens de hidroxiprolina nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 5), obteve-se o valor de $p = 0,1353$ considerado não significante.

APÊNDICE 3

AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III

1. Com as lâminas coradas pelo método de Picro-Sirius, focalizá-las no microscópio, escolhendo-se três diferentes campos para cada leitura nas regiões direita, central e esquerda da lâmina.
2. Ajustar o aparelho no ícone *Calibration*, com objetiva regulada para uma dimensão 20 vezes maior.
3. Selecionar o ícone menu *Acquire* e submenu vídeo-digital *Capture*, acionando o modo *Preview* para capturar a imagem mais adequada e em seguida, clicar em *Snap*, em cujo arquivo as imagens são congeladas devidamente.
4. Calibrar o sistema orientando-se pela densidade ótica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, escolhendo-se o valor limite de melhor resolução (*threshold*).
5. Identificar cada imagem clicando no menu *File*, submenu *Save As* (salvar como), identificando-se cada animal e respectivo campo em arquivo específico para os registros do estudo.
6. Selecionar a cor vermelha e com o “conta-gotas”, clicar nas áreas do colágeno até o instante que se obteve, no pequeno quadrado da tela, a imagem em cor magenta uniforme.
7. Em seguida, clicar em *New* e na cor branca. Repetindo-se o processo citado anteriormente, selecionaram-se as cores rosa claro homogêneo, excluindo-se os vasos e clicar em *Close*.
8. Clicar no menu *Measure*, *Select Measurements*, selecionar a área e *Density (mean)* e depois no botão *OK*. Novo clique em *Count*, *View*, *Measurements Data*, *Statistics* e utilizando-se o *File*, DDE to Excel, transportaram-se os dados para o Excel, a fim de se proceder à análise estatística.
9. Utilizar o aplicativo *Image-Pro Plus* e analisar as porcentagens de colágeno maduro (tipo I) e do imaturo (tipo III). As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes tingiram-se com alaranjado e vermelho (tipo I), e as fibras mais finas e fracamente birrefringentes com amarelo e verde (tipo III).
10. Calcular a média das porcentagens em cada lâmina, e o valor do colágeno total correspondente à soma das áreas vermelhas e verdes.
11. Em seguida, clicar em *Count and Measure Objets*, *Count Size* e no *Select Colors*. Utilizando o ícone conta-gotas, color inicialmente com pincel 3X3 e depois com 1X1, recorrendo-se à coloração azul, os locais em que se observou coloração alaranjada e vermelha.

12. A seguir, selecionar *New*, *Class 2* e color em magenta o local que apresentava tanto a cor amarela, quanto a cor verde.
13. Os números representativos da área (em micra) e da porcentagem de colágeno tipo I e do tipo III deverão ser transferidos ao Excel para análise estatística.
14. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos serão comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se for obtido $p > 0,05$ será calculada a média aritmética de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 7: RESULTADOS DA AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III EM TRÊS DIFERENTES CAMPOS NAS AMOSTRAS DOS GRUPOS TRATADOS PELA ARGININA E CONTROLE

Grupos	Colágeno I				Colágeno III			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
Arginina	76,46	67,79	50,52	64,92	23,54	32,21	49,48	52,61
	78,57	73,16	77,97	76,57	21,43	26,84	22,03	35,15
	73,35	54,99	63,87	64,07	26,65	45,01	36,13	53,90
	74,86	74,28	71,97	73,70	25,14	25,72	26,30	38,58
	84,22	91,81	50,36	75,46	15,78	8,19	24,54	24,25
	61,93	75,65	72,82	70,13	38,07	24,35	29,87	46,14
	93,96	99,29	87,80	93,69	6,04	0,71	6,31	6,53
	78,37	76,78	73,86	76,34	21,63	23,22	23,66	34,26
	74,23	78,51	71,62	74,79	25,77	21,49	25,21	36,24
	78,29	69,32	75,47	74,36	21,71	30,68	25,64	39,02
MX±DP	Validação $p=0,2462$			74,40± 8,14	Validação $p=0,6463$			36,67± 13,83
Grupos	Colágeno I				Colágeno III			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
Controle	63,20	59,63	50,52	57,78	36,80	40,37	49,48	63,32
	56,23	61,02	54,18	57,14	43,77	38,98	45,82	64,29
	45,69	49,32	46,32	47,11	54,31	50,68	53,68	79,34
	65,32	63,21	62,17	63,57	34,68	36,79	37,83	54,65
	74,12	72,13	75,65	73,97	25,88	27,87	24,35	39,05
	63,20	66,32	69,32	66,28	36,80	33,68	30,68	50,58
	58,94	61,24	56,74	58,97	41,06	38,76	43,26	61,54
	66,21	69,45	65,14	66,93	33,79	30,55	34,86	49,60
	74,60	71,23	71,62	72,48	25,40	28,77	28,38	41,28
	63,87	69,32	70,36	67,85	36,13	30,68	29,64	48,23
MX±DP	Validação $p=0,8604$			63,21 8,10	Validação $p=0,7814$			55,19 12,15

Legenda: MX±DP = Média ± desvio padrão; *p: significância estatística;

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as leituras das porcentagem de colágeno intestinal dos tipos I e III, nos três campos microscópicos de cada amostra dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 6) obteve-se valores considerados não significantes.

TABELA 8: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS DE COLÁGENO TIPO I E III NOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA

Grupos	Porcentagens de Colágenos	
	Tipo I	Tipo III
Grupo Controle	63,21±8,10	36,67±13,93
Grupo Arginina	74,40±8,14	48,71±7,76
p*	0,0064	0,0274

Legenda: MX±DP = Média ± desvio padrão; *p: significância estatística;

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões entre as porcentagens de colágenos tipos I e III (tabela 8) dos grupos controle e arginina obteve-se os valores de $p = 0,0064$ e $p = 0,0274$ respectivamente, considerados significantes.

APÊNDICE 4

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO

TABELA 9: RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOPATOLÓGICAS, EM TRIPLICATAS, DA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO

Grupos	Crosta Fibrinoleucocitária			MX	Reepitelização de bordas			MX	Proliferação angiofibroblástica			MX
	L1	L2	L3		L1	L2	L3		L1	L2	L3	
Grupo Controle	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	1	1	1,33	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1,67
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
MX± DP	não se aplica avaliação estatística			1	Validação p=0,612			1,93	Validação p=0,3811			1,97
				0				0,21				0,11
Ratos	Crosta Fibrinoleucocitária			MX	Reepitelização de bordas			MX	Proliferação angiofibroblástica			MX
	L1	L2	L3		L1	L2	L3		L1	L2	L3	
Grupo Arginina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1,33
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1,33
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1,0
MX± DP	não se aplica avaliação estatística			1	Validação p>0,099			1,4	Validação p=0,8783			1,37
				0				0,52				0,46

Legenda: MX±DP = Média ± desvio padrão; L1, L2, L3= triplicatas das leituras microscópicas executadas; p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre os escores, conforme os critérios adotados nas três leituras microscópicas das amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 9), obteve-se valores considerados não significantes.

TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS CONTROLE E ARGININA NA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO CONFORME OS CRITÉRIOS DE FORMAÇÃO DE CROSTA FIBINOLEUCOCITÁRIA REEPITELIZAÇÃO DE BORDAS PROLIFERAÇÃO ANGIOFIBROBLÁSTICA:

Crosta Fibrinoleucocitária		Reepitelização de bordas		Proliferação angiofibroblástica	
Grupo Controle	Grupo Arginina	Grupo Controle	Grupo Arginina	Grupo Controle	Grupo Arginina
1	1	1,93±0,21	1,4±0,52	1,97±0,11	1,37±0,46
não se aplica avaliação estatística		p=0,0074		p=0,0007	

Legenda: p: significância estatística;

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões entre os escores médios de leituras dos critérios de avaliação de tecido de granulação (tabela 10) dos grupos controle e arginina obteve-se os valores de $p = 0,0074$ e $p = 0,0007$, considerados significantes para a reepitelização de bordas e proliferação angiofibroblástica respectivamente.

APÊNDICE 5

AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR

A avaliação imunoistoquímica e histométrica da densidade microvascular em amostras de tecido cicatricial foi realizada de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Empregou-se o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais (Biotin anti-CD34 antibody clone PC10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:100), de acordo com as especificações do fabricante:

1. 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. Secagem das lâminas a 37°C por 12 horas.
3. Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 minutos); álcool etílico absoluto (3x 1 minutos); álcool etílico 80% (1x 1 minutos)
4. Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.
5. Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retrifer (Dako[®]) à cuba de banho-maria à 99°C por 40 minutos. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.
6. 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. Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida em temperatura de 4 a 8°C por 12 horas.
8. Lavar as lâminas em tampão TBS tris pH 7,3 e deixar no tampão por 15 minutos.
9. Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako[®]) e deixar por 30 minutos.
10. Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako[®]) e deixar por 30 minutos.
11. Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.
12. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Lavar em água da torneira e deixar por 5 min.
13. Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 minutos).
14. Diafanizar com xilol (3 x 5 minutos).
15. Montar as lâminas.

16. Nas leituras histométricas quantificam-se os núcleos celulares corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação cada campo tinha uma área de $7.578,94 \mu^2$.
17. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, representando a densidade microvascular tecidual. Para cada caso foram analisadas em cem células a porcentagem CD34 positivas.
18. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos foram comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se obtido $p > 0,05$ foram calculadas as médias aritméticas de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 11: RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOMÉTRICAS, EM TRES CAMPOS MICROSCÓPICOS, DA AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICAL

Grupos	Grupo Arginina				Grupo Controle			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
	421,20	748,36	339,27	502,94	221,20	298,36	239,27	252,94
	478,30	356,03	463,27	432,53	456,30	421,57	463,27	447,05
	386,58	324,45	314,74	341,92	286,30	301,45	314,74	300,83
	406,20	466,90	445,41	439,50	136,20	156,90	145,41	146,17
	452,80	421,65	407,64	427,36	412,70	398,65	407,64	406,33
	476,30	397,37	255,32	376,33	256,30	249,37	255,32	253,66
	654,08	631,65	567,84	617,86	241,23	247,65	267,84	252,24
	542,32	524,32	503,47	523,37	156,31	186,32	103,47	148,70
	421,14	456,74	384,21	420,70	321,47	368,74	384,21	358,14
	425,47	471,32	245,69	380,83	221,65	296,32	245,69	254,55
MX± DP	Validação $p=0,1618$			446,33	Validação $p=0,8929$			282,06
				81,59				99,08

Legenda= Mx±DP: Média ± Desvio Padrão; p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre os escores, nos três leituras microscópicas das densidades microvasculares nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 11), obteve-se valores de $p = 0,1618$ no grupo arginina e $p=0,8929$ para o grupo controle, considerados não significantes.

TABELA 12: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE MICROVASCULAR CICATRICAL

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	282,06±99,12
Grupo Arginina	446,33±81,59
p^*	0,0008

Legenda: p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões das densidades microvasculares nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 11), obteve-se o valor de $p = 0,0008$ considerado significativo.

APÊNDICE 6

AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS

A avaliação imunoistoquímica e histométrica da densidade tecidual de miofibroblastos em amostras de tecido muscular cicatricial foi realizada de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Empregou-se o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais (Biotin anti- α SMA antibody clone PJC10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:400, de acordo com as especificações do fabricante:

1. 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. Secagem das lâminas a 37°C por 12 horas.
3. Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 min); álcool etílico absoluto (3x 1 minuto); álcool etílico 80% (1x 1 minuto)
4. Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.
5. Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retrifer (Dako[®]) à cuba de banho-maria à 99°C por 40 minutos. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.
6. 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. Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida em temperatura de 4 a 8°C por 12 horas.
8. Lavar as lâminas em tampão TBS tris pH 7,3 e deixar no tampão por 15 minutos.
9. Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako[®]) e deixar por 30 minutos.
10. Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako[®]) e deixar por 30 minutos.
11. Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.
12. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Lavar em água da torneira e deixar por 5 minutos.
13. Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 minutos).
14. Diafanizar com xilol (3 x 5 minutos).
15. Montar as lâminas.

16. Nas leituras histométricas quantificam-se os núcleos celulares corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação cada campo tinha uma área de $7.578,94 \mu^2$.
17. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, representando a densidade microvascular tecidual.
18. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos foram comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se obtido $p > 0,05$ foram calculadas as médias aritméticas de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 13: RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOMÉTRICAS, EM TRES CAMPOS MICROSCÓPICOS, DA AVALIAÇÃO DA DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS

Grupos	Grupo Arginina				Grupo Controle			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
	261,58	695,30	331,73	429,54	285,02	415,02	528,61	409,55
	242,06	261,52	605,55	369,71	267,94	753,25	88,50	369,90
	439,44	321,14	454,57	405,05	189,15	195,62	490,81	291,86
	261,52	261,58	695,30	406,13	753,25	188,50	185,32	375,69
	695,30	695,30	261,52	550,71	285,44	189,15	189,15	221,25
	261,52	261,58	695,30	406,13	415,02	528,61	225,36	389,67
	386,58	324,45	314,74	341,92	321,14	454,57	261,58	345,76
	406,20	466,90	445,41	439,50	261,58	695,30	242,06	399,65
	542,32	524,32	503,47	523,37	695,30	261,52	439,44	465,42
	421,14	456,74	384,21	420,70	261,58	695,30	261,52	406,13
MX± DP	Validação $p=0,5517$			429,28	Validação $p=0,7768$			367,49
				63,78				68,34

Legenda: Mx±DP= Média ± Desvio Padrão; p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões nas três leituras microscópicas das densidades teciduais de miofibroblastos nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 12), obteve-se valores de $p = 0,5517$ no grupo arginina e $p=0,7768$ para o grupo controle, considerados não significantes.

TABELA 14: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO A DENSIDADE TECIDUAL DE MIOFIBROBLASTOS

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	429,28±63,78
Grupo Arginina	367,49±68,34
p*	0,0511

Legenda: p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões das densidades teciduais de miofibroblastos nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 13), obteve-se o valor de $p = 0,0511$ considerado não significativo.

APÊNDICE 7

DOSAGEM DE NITRATOS E NITRITOS SÉRICOS

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:

- Foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca, em volumes entre 8 a 10 ml, em tubos de ensaio contendo EDTA e homogeneizadas suavemente por inversão.
- As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, o plasma foi retirado e filtrado em filtros de 30 kD (Millipore, Bedford, MA, USA), separado em quatro alíquotas de 100µl em tubos "ependorf" devidamente identificados e congeladas a -80°C até a oportunidade da análise.

MÉTODO:

- Descongelar dois frascos de cada amostra contendo 100µl e pipetadar duas alíquotas de 50µl de cada em cada orifício de uma placa de Terazaki, perfazendo o total de quatro alíquotas de uma mesma amostra (tetraplicatas);
- Distribuir em cada orifício da placa os seguintes reagentes (fornecidos com o kit):
 - 30 µl da amostra em uma cubeta de reação;
 - 150 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 2%, N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,2% e ácido ortofosfórico em água destilada/deionizada);
 - A mistura amostra/reagente de Griess é incubada por cinco minutos a 37°C.
 - Realizar leitura em espectrofotômetro a 520 nm.
 - Obter as densidades óticas dos testes 1, 2, 3 e 4 e aplicar teste estatístico de ANOVA, se os valor e p forem >0,05 deverá ser calculdas as médias entras dosagens.
 - Preparar simultaneamente ao teste uma curva de calibração com padrão de nitritos nas concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200 µmol/L;
- Interpolar por regressão linear as médias das amostras na curva de calibração e obter os resultados em µmol/L. Esta técnica apresenta coeficiente de variação (CV) intraensaio de 5,8% e interensaio de 4,4%, além de limite de detecção de 0,5 µmol/L e linearidade até 40 µmol/L, coeficiente de correlação $r^2 = 0,9771$.

GRÁFICO 7 : CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE NITRATO DE SÓDIO A 520 NM

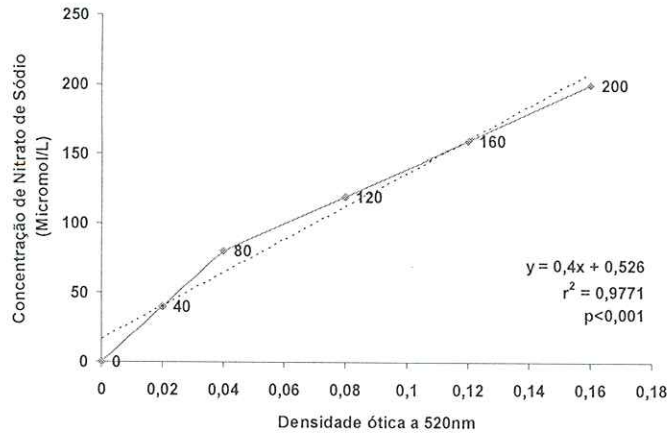


TABELA 15: RESULTADOS DAS DOSAGENS DE NITRATOS SÉRICOS EM QUADRUPLICATAS

Grupos	Grupo Arginina						Grupo Controle					
	Densidades óticas a 520 nm					µmol/L y=0,4X+0,526	Densidades óticas a 520 nm					µmol/L y=0,4X+0,526
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Média (X)		Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Média (X)	
	0,9	1,36	1,41	1,17	1,01	0,99	1,65	1,58	1,98	1,36	1,51	1,13
	1,36	1,44	1,54	1,23	1,51	1,13	1,36	1,25	1,18	1,61	1,48	1,12
	1,26	1,32	0,97	0,88	1,49	1,12	0,86	0,78	0,84	0,87	1,27	1,03
	0,98	0,88	0,97	0,98	1,56	1,15	0,66	0,67	0,98	0,59	1,38	1,08
	1,32	1,32	1,54	1,65	2,17	1,39	0,89	1,32	1,14	1,21	1,91	1,29
	1,56	1,32	1,32	1,64	2,37	1,47	1,32	1,45	1,32	0,97	2,21	1,41
	1,87	1,95	1,65	1,87	2,87	1,67	1,36	1,28	1,24	1,39	2,45	1,51
	1,02	0,98	0,96	1,15	2,42	1,49	0,97	0,84	0,87	1,11	2,36	1,47
	0,89	0,66	0,87	1,02	2,49	1,52	1,32	1,65	1,54	1,35	2,97	1,71
	0,78	0,65	0,98	0,65	2,61	1,57	1,45	1,36	1,41	1,12	3,07	1,75
MX± DP	p=0,9941					1,35±0,23	p=0,9269					1,35±0,26

Legenda= Mx±DP: Média ± Desvio Padrão; p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as densidades óticas, nos quatro testes para dosagens de nitratos séricos nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 14), obteve-se valores de p = 0,9941 no grupo arginina e p=0,9269 para o grupo controle, considerados não significantes.

TABELA 16: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ARGININA QUANTO ÀS DOSAGENS DE NITRATOS SÉRICOS

Grupos	Média ± Desvio Padrão
Grupo Controle	1,35±0,23
Grupo Arginina	1,35±0,26
p*	0,9903

Legenda: p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método T-Student, as médias e os desvios padrões das dosagens de nitratos séricos nas amostras dos grupos tratados pela arginina e controle (tabela 15), obteve-se o valor de p = 0,9903 considerado não significante.