

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Lúcia Regina Albuquerque Góis Penaforte

**EFEITOS DA L-ARGININA SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS *IN VIVO* NO
SANGUE E EM CICATRIZ DE RETALHO
MIOCUTÂNEO, E SOBRE A PRESSÃO DE ROTURA
DE CICATRIZ CIRÚRGICA INTESTINAL EM
RATOS**

FORTALEZA
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Lúcia Regina Albuquerque Góis Penaforte

**EFEITOS DA L-ARGININA SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS *IN VIVO* NO
SANGUE E EM CICATRIZ DE RETALHO
MIOCUTÂNEO, E SOBRE A PRESSÃO DE ROTURA
DE CICATRIZ CIRÚRGICA INTESTINAL EM
RATOS**

Dissertação apresentada em
cumprimento às exigências para
obtenção do Grau de Mestre do
Programa de Pós-graduação *Stricto
Sensu* do Departamento de Cirurgia, da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Fortaleza
2002

P64e Penaforte, Lúcia Regina Albuquerque Góis
Efeitos da L-arginina sobre as concentrações de
metabólitos *in vivo* no sangue e em cicatriz de retalho
miocutâneo, e sobre a pressão de rotura de cicatriz cirúrgica
intestinal em ratos. / Lúcia Regina Albuquerque Góis
Penaforte. Fortaleza, 2002.
96 p. : il. Color.

Dissertação (Mestrado de Medicina) – Universidade
Federal do Ceará, 2002.
Área de concentração: Cirurgia Geral.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão Vasconcelos.

I. Cicatrização. II. L-arginina. III. Metabolismo.
IV. Penaforte, Lúcia Regina Albuquerque Góis. V. Título.
VI. Trauma. Cirúrgico. VII. Ratos.

LÚCIA REGINA ALBUQUERQUE GÓIS PENAFORTE

**EFEITOS DA L-ARGININA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE
METABÓLITOS *IN VIVO* NO SANGUE E EM CICATRIZ DE
RETALHO MIOCUTÂNEO, E SOBRE A PRESSÃO DE ROTURA DE
CICATRIZ CIRÚRGICA INTESTINAL EM RATOS**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
(Orientador da Dissertação de Mestrado)
Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina

Profa. Dra. Sara Lúcia Cavalcante
Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina

Profa. Dra. Lydia Massako Ferreira
Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

**Tudo posso Naquele que me fortalece.
Ao nosso Deus toda honra e toda a
glória.**

**Ao meu querido pai Lydio Luciano de Goes
*In Memoriam***

**À minha mãe Crisantina e aos meus filhos,
Felipe, Alice e Natália a quem muito amo.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, pelo estímulo, compreensão, paciência, dedicação ao ensino, disponibilidade para as discussões, independente de horários, quer na Universidade, quer na sua própria residência, sacrificando suas horas de lazer, para assegurar a conclusão do presente trabalho que é de grande relevância para a minha formação acadêmica.

Aos colegas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pelo estímulo e companheirismo.

Aos colegas do Instituto Dr. José Frota, principalmente ao Serviço de Cirurgia Plástica (ao qual pertenço), pelo estímulo.

Ao professor Sérgio Botelho Guimarães pelo seu inestimável apoio e colaboração, principalmente para a publicação do trabalho.

Ao professor Rômulo Augusto Feio Farias por compartilhar comigo sua vasta experiência em pesquisa com animais.

Ao professor Lúcio Flávio Gonzaga e Silva pela presteza e total disponibilidade para ajudar.

A Bibliotecária e amiga Isabel Bezerra de Oliveira pela colaboração na normatização e em todo processo de elaboração e conclusão deste trabalho.

A Bibliotecária Norma de Carvalho Linhares pela ajuda na pesquisa bibliográfica.

Ao Residente em Cirurgia Plástica Manuel Barboza Jr. por sua gentil participação nas fotografias e importante colaboração na apresentação do meu trabalho de mestrado.

A Tatiane Roseno de Oliveira e Gisele Collyer Alves pela impecável dedicação, espírito científico, disponibilidade a toda hora, como bolsistas, na pesquisa bibliográfica, nas atividades de Laboratório, nas

cirurgias e cuidados com os animais. Tatiane e Gisele deixaram uma marca de força, amizade e otimismo nesta colaboração científica.

Ao jovem estudante de medicina Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos pelo seu empenho em ajudar na organização das tabelas para confecção dos gráficos.

Ao jovem estudante de medicina Thiago Magalhães pela disposição em participar e ajudar neste estudo.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, Bento e Paulo, pela surpreendente ajuda e fiel colaboração durante todo o decorrer desta pesquisa. Ao Bento cuidador dos animais.

Ao senhor Francisco Evanir Gonçalves de Lima, funcionário da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela imprescindível ajuda técnica na preparação e execução dos ensaios metabólicos.

À secretária do Mestrado Maria Luciene Vieira de Oliveira, pela inspiradora dedicação ao seu trabalho e por todo o apoio ao meu trabalho de mestranda.

Ao Dr. Jean Crispin Ribeiro pelo seu plano de pesquisa de anastomoses no tubo digestivo de ratos.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes pelos felizes aconselhamentos.

À Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha pela disponibilidade.

Ao Prof. Modolin que contribuiu com seus trabalhos científicos enviados pelo correio, com sua solidariedade característica e sua humildade de grande mestre.

À Profa. Dra. Rosangely de Cassia Cavanha Corsi da USP que colaborou, mesmo distante com sua fé, experiência e competência.

Ao Dr. Aprígio Mendes Filho, pelo incentivo.

À Profa. Dra Sara Lúcia Cavalcante, exemplo de mulher inteligente, culta, honesta e extremamente dedicada à Ciência. Muito obrigada por aceitar participar da Banca examinadora.

À Profa. Dra Lydia Massako Ferreira, colega cirurgiã plástica e paradigma de competência e dedicação ao ensino, à pesquisa e a Cirurgia Plástica. Sinto-me honrada pela sua presença na Banca examinadora.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, cientista de produção profícua, exemplo de humildade, generosidade e profissionalismo, pela colaboração iluminada, espiritual e efetiva.

Ao Prof. Dr Francisco Antônio Guimarães, que por seu intermédio consegui material imprescindível para esta pesquisa. Muito obrigada por ter aberto um portal decisivo para a concretização deste mestrado.

Ao Prof Dr. Harbans Arora que resgatou este trabalho em algum universo paralelo.

À minha grande amiga Vânia Abreu Guimarães (*in memoriam*), guerreira, estudiosíssima, mãe, esposa, filha, médica, enfim um ser humano que viveu para ajudar e amar. Do seu leito de morte transmitiu-me força, energia e um eterno exemplo de transcendência e de lealdade à verdade científica. Deus esteja com você, minha amiga!!!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço com todo meu coração.

*Aplicai toda a diligência em juntar
à vossa fé a virtude,
à virtude o conhecimento,
ao conhecimento o autodomínio,
ao autodomínio a perseverança,
à perseverança a piedade,
a piedade o amor fraternal
e ao amor fraternal a caridade.
(Segunda Epístola de São Pedro 1,5-7)*

*“A ciência avança por meio de respostas
exploratórias a uma série de questões
cada vez mais sutis que penetram cada vez
mais fundo na essência dos fenômenos
naturais”.*

PASTEUR, 1873.

*“Os processos pelos quais as moléculas
biológicas são degradadas e
ressintetizadas formam uma rede
complexa e altamente controlada de
reações enzimáticas interdependentes,
conhecidas de modo coletivo como vida”.*

VOET, 2000.

RESUMO

EFEITOS DA L-ARGININA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS *IN VIVO* NO SANGUE E EM CICATRIZ DE RETALHO MIOCUTÂNEO, E SOBRE A PRESSÃO DE ROTURA DE CICATRIZ CIRÚRGICA INTESTINAL EM RATOS

A epitelização, contração e deposição da matriz de tecido conjuntivo constituem mecanismos pelos quais as feridas cicatrizam. Estudos demonstraram que L-arginina favorece a cicatrização, aumentando a síntese de colágeno. Objetivou-se, neste trabalho, estudar os efeitos da suplementação de L-arginina sobre concentrações *in vivo* de glicose, piruvato, lactato e corpos cetônicos no sangue e em cicatriz de retalho miocutâneo, como também verificação da pressão de ruptura de cicatriz intestinal. Quarenta e oito ratos brancos, machos, da linhagem Wistar, foram divididos em dois grupos: (G-1/Controle) e (G-2/Experimento). Ambos foram submetidos à confecção de retalho miocutâneo e dorsal, suturado com nylon monofilamentado nº5.0 e também, submetidos a laparotomia mediana e, jejunotomia de dois centímetros na borda antemesentérica seguida de sutura imediata com fio poliglecaprone 25, nº5.0. No pós-operatório os animais do G1/C receberam suplementação alimentar de caseinato de cálcio (fonte protéica intacta de alto valor biológico, 5% do VCT/dia). Os animais do G-2/E receberam suplementação alimentar com L-arginina (5% do VCT/dia). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos e após cada 7,14 e 30 dias foram coletadas amostras de sangue e de segmento de área cicatricial do retalho miocutâneo para estudos enzimáticos com dosagem de metabólitos, como também realizado teste de pressão de rotura no segmento intestinal contendo cicatriz. A queda das concentrações sanguíneas de piruvato, lactato e corpos cetônicos no 14º pós-operatório, no grupo E em relação ao grupo C, sugere maior utilização destes metabólitos nos tecidos periféricos por possível ação anabólica da oferta de L-arginina. O aumento das concentrações tissulares, no retalho miocutâneo, de corpos cetônicos no 30º dia pós-operatório nos animais tratados com suplementação alimentar de L-arginina traduziu provável aumento de captação desses metabólitos pelos tecidos em cicatrização. Observou-se um aumento da pressão de rotura no 14º pós-operatório do G-2/E em relação ao G-1/C. Os resultados sugerem que suplementação de L-arginina tem efeito sobre concentrações séricas de substratos e sobre cicatrização cutânea, muscular e de intestino delgado.

Palavras Chave: trauma cirúrgico, metabolismo, cicatrização, L-arginina, ratos.

ABSTRACT

EFFECTS OF L-ARGININE UPON THE CONCENTRATION OF METABOLITES, *IN VIVO*, IN THE BLOOD, MIOCUTANEOUS SKIN GRAFT SCAR AND ON THE PRESSURE OF RUPTURE OF INTESTINAL SURGICAL SCAR IN RATS.

Cicatrization, contraction and deposition of connective tissue matrix constitute healing mechanisms for the development of the wound scar. Studies have demonstrated that L-arginine favors cicatrization, increasing the synthesis of collagen. The aim of this paper was to study the effects of L-arginine upon the concentrations of glucose, pyruvate, lactate and ketone bodies, *in vivo*, in blood, miocutaneous skin graft scar and on the pressure of rupture of intestinal surgical scar in rats. Forty-eight white Wistar male rats, were distributed in 2 groups: (G1/control) and G2/experiment). A pedunculated miocutaneous skin graft was raised on the dorsum of all rats followed by immediate suturing with nylon 5-0. Jejunotomies were also performed on the antimesenteric border of the small intestine. Bowel sutures were carried out utilizing synthetic material (poliglecaprone 25). Oral supplementation of L-arginine (5% of TCI/day) was delivered via gavage to G-2/Experiment rats beginning 12 hours following surgical procedures daily. G-1/Control animals were fed sodium caseinate instead. Blood samples were collected 7, 14 and 30 days later. Measurement of intestinal rupture pressure was carried out at the same intervals, following blood samples collection. Decreased concentrations of pyruvate lactate and ketone bodies in the 14th postoperative day suggest greater utilization by peripheral tissues due to a possible anabolic effect of L-arginine. Increased ketone bodies concentrations in the miocutaneous graft in the 30th postoperative day in L-arginine treated rats may be due to increased uptake of these metabolites by healing tissues. Group G-2/E intestinal rupture pressure was greater than G-1/C on the 14th day. These results suggest that oral supplementation of L-arginine has effects upon blood concentrations of metabolites and on the cutaneous, muscular and small intestine cicatrization.

Subject Headings: Surgical injury, metabolism, wound healing, L-Arginine, rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Rato da linhagem Wistar (<i>Rattus norvegicus albinos</i>) com desenho de retalho dorsal.....	36
FIGURA 2 – Rato Wistar em decúbito ventral – Demarcação do retalho miocutâneo com detalhe da área a ser excisada (no pós-operatório), para procedimento dos experimentos. Em amarelo, pele do dorso. Panículo carnoso, em azul. Músculo, em preto e lilás.....	38
FIGURA 3A – Retalho – Confeção da área miocutânea do retalho dorsal Retalho pediculado medindo em sua extremidade cefálica, medindo 3x3x3cm.....	39
FIGURA 3B – Retalho miocutâneo – Detalhe das fibras musculares.....	39
FIGURA 3C – Sutura do retalho com nylon monofilamentado 5.0.....	40
FIGURA 4A – Decúbito dorsal para laparotomia.....	40
FIGURA 4B – Laparotomia mediana com exposição do intestino delgado.....	41
FIGURA 4C – Localização da área (no jejuno) a cerca de 6cm do ângulo de Treitz.....	41
FIGURA 4D – Segmento do jejuno contendo placas de Payer (pinça superior apontando para as placas), local que não deve ser incisado.....	42
FIGURA 4E – Enteroromia de aproximadamente 2cm na borda anti-mesentérica do intestino delgado.....	43
FIGURA 4F – Intestino aberto, pronto para ser suturado, mostrando circulação preservada 1 a 2 mm da borda antemesentérica....	43
FIGURA 4G – Sutura com Poliglecaprone25(Monocryl 25(monocryl 15.0, com agulha ½ circ. de 1,5cm, Ethicon Johnson & Johnson).....	44
FIGURA 5 - Gavagem.....	46

FIGURA 6 – Material de Gavagem.....	48
FIGURA 7 - No pós-operatório, sob a mesma anestesia inalatória, todos os grupos foram submetidos a coleta de sangue da aorta abdominal, para dosagem dos metabólitos.....	55
FIGURA 8 – Teste de Pressão de Rotura.....	68
FIGURA 9 – Ciclo Glicólise/Gliconeogênese (Ciclo de Cori).....	70
GRÁFICO 1 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Glicose no sangue.....	84
GRÁFICO 2 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Piruvato no Sangue.....	85
GRÁFICO 3 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Lactato no Sangue.....	86
GRÁFICO 4 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Acetoacetato no Sangue.....	87
GRÁFICO 5 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Hidroxibutirato no Sangue.....	88
GRÁFICO 6 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Corpos Cetônicos no Sangue.....	89
GRÁFICO 7 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Glicose em Cicatriz no Retalho miocutâneo.....	90
GRÁFICO 8 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Piruvato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	91
GRÁFICO 9 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Lactato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	92
GRÁFICO 10 - Concentração ($\mu\text{mol/ g}$ de tecido) de Acetoacetato em Cicatriz Retalho Miocutâneo.....	93
GRÁFICO 11 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de 3-Hidroxibutirato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	94
GRÁFICO 12 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Corpos Cetônicos em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	95
GRÁFICO 13 – Medida da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Glicose no sangue.....	84
TABELA 2 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Piruvato no Sangue.....	85
TABELA 3 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Lactato no Sangue.....	86
TABELA 4 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Acetoacetato no Sangue.....	87
TABELA 5 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Hidroxibutirato no Sangue.....	88
TABELA 6 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Corpos Cetônicos no Sangue.....	89
TABELA 7 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Glicose em Cicatriz no Retalho miocutâneo.....	90
TABELA 8 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Piruvato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	91
TABELA 9 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Lactato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	92
TABELA 10 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Acetoacetato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	93
TABELA 11 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de 3-Hidroxibutirato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	94
TABELA 12 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Corpos Cetônicos em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.....	95
TABELA 13 - Medida da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μmol	- Micromol
3-OH buritrato	- 3-hidroxiburitrato
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico
ARG	- L-Arginina
ATP	- Trifosfato de adenosina
Cal	- Calorias
Com	- Comércio
Conc	- Concentração
DDO	- Densidade de ótica
DNA	- Ácido desóxirribonucléico
Et al	- (Et alii) e outros
E	- Esquerda
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
EDRF	- Fator relaxante do endotélio
EPM	- Erro Padrão da média
GC	- Grupo controle
GE	- Grupo experimental
GH	- Hormônio do crescimento
G ₆ Pg	- Glicose-6-fosfato desidrogenase
H ₂ NNH ₂ -XH ₂ O	- Hydrazine hidrate 80%
HCL	- Ácido clorídrico
HK	- Hexoquinase
IFN γ	- Inteferon gama
IL-	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IgA γ	- Imunoglobina A
IgM	- Imunoglobina M

IGF 1	- Fator de crescimento insulina símile
Ind:	- Indústria
K_2HPO_4	- Fosfato de dibasico
Kcal	- Quilocalorias
K	- Constante de equilíbrio
KH_2PO_4	- Fosfato de potássio manobásico
KOH	- Hidróxido de potássio
LDH	- Lactato desidrogenase
Leg	- Legenda
Ltda	- Limitada
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	- Cloreto de magnésio
ml	- Mililitro
mm^3	- Milímetros cúbicos
mM	- Milimolar
M	- Molar
NAD^+	- Forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo
$NADP_+$	- Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- Forma reduzida de nicorinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	- Óxido nítrico
NÓS	- Óxido nítrico sintetase
nm	- Nanômetro
Op	- Operado
P	- Probabilidade de significância
P.O	- Pós-operatório
Sol	- Solução
Supl	- Suplementação

TNE	- Terapia nutricional enteral
TNF	- Fator de necrose tumoral
TRIS	- Hidroximetilaminometano
UV	- Ultra violeta
VCT	- Valor calórico total
VO	- Via oral

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Processo de Cicatrização	19
1.2 Histórico e Avanços	20
1.3 Avanços na Indução da Cicatrização	24
1.4 Metabolismo, Trauma, Nutrição	27
1.4.1 Metabolismo	27
1.4.2 Sentido estrito de trauma	29
1.4.3 Nutrição nos animais experimentais	30
1.4.4 L-Arginina	31
2 OBJETIVO	35
3 MATERIAL	36
3.1 A Amostra	36
3.2 Diversos (Anexo)	46
3.3 Aparelhagem	48
3.4 Reagentes	49
3.5 Enzimas	49
4 MÉTODO	50
4.1 O Estudo	50
4.1.1 Desenho do experimento	51
4.1.2 Pré-operatório	52
4.1.3 Anestesia	52

4.1.4	Técnica operatória	52
4.1.5	Pós-operatório	53
4.2	Preparação dos Espécimes (sangue, tecido dorsal do retalho e intestino delgado)	54
4.2.1	Resistência a pressão de rotura de cicatriz intestinal	55
4.2.2	Preparo do sangue para determinação dos metabólitos	56
4.3	Determinação dos Metabólitos	57
4.3.1	Dosagens bioquímicas: determinação dos metabólitos	57
4.3.2	Determinação do piruvato e do acetoacetato	58
4.3.3	Determinação de L-(+)-Lactato	59
4.3.4	Determinação do D-(-)-3-Hidroxiacetato	60
4.3.5	Determinação da D-Glicose	61
4.3.6	Cálculos dos metabólitos no sangue, e retalho miocutâneo	63
4.3.7	Cálculo dos metabólitos no sangue	63
4.3.8	Cálculo dos metabólitos nos tecidos do retalho miocutâneo	63
4.4	Análise Estatística	64
5	RESULTADOS	65
5.1	Determinação de Metabólitos	65
5.2	Determinação dos Metabólitos no Sangue	65
5.3	Dosagem de Metabólitos na Cicatriz do Retalho Miocutâneo	66
5.4	Determinação da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal	67
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Processo da Cicatrização

O processo da cicatrização pode ser compreendido como uma reação de defesa do organismo agredido para manter sua integridade, sua homeostase, enfim, manter constante sua estrutura corporal e seu equilíbrio com o meio ambiente. Para restabelecer uma solução de continuidade produzida em seus tecidos, por qualquer agente traumático, o organismo utiliza-se da cicatrização que envolve quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz protéica extra-celular e remodelação de cicatriz (MODOLIN, 1997; BIONDO-SIMÕES, 1998).

A cicatriz é a resultante de um complicado e, ainda, misterioso processo de substituição de células destruídas por células vivas. Obviamente é imperfeita, porquanto seja formada por tecido conjuntivo não especializado. Será permanente, mas sempre visível, sua qualidade a depender do agente causador da perda de continuidade dos tecidos, ou seja, do agente causador da ferida, do tratamento que esta receberá, de sua localização no organismo e finalmente do estado de nutrição, de saúde e dos fatores genéticos do indivíduo. Poderá ser de boa qualidade ou patológica, prevalecendo, contudo, a verdade científica magistralmente resumida por Peacock: “uma ferida, uma cicatriz” (PEACOCK, 1976; ARRUDA VEIGA, SANTOIA e JOSÉ, 1992; COHEN, 1999). O processo de cicatrização resulta de um mecanismo competitivo entre a síntese e lise do colágeno. Assim, qualquer fator que aumente a lise ou faça diminuir a síntese do colágeno, pode concorrer para a alteração da cicatrização (PEACOCK, 1977).

Em termos clínicos o processo de cicatrização pode ser classificado em:

a) Primeira intenção ou cicatrização primária: quando a ferida é superficial e limpa e seu tratamento é de sutura imediata;

b) Segunda intenção ou cicatrização secundária: quando a ferida é aberta e se fecha por formação de tecido de granulação, seguido de contração e reepitelização;

c) Terceira intenção ou fechamento primário retardado: quando a ferida é temporariamente mantida aberta sendo fechada após quatro ou sete dias, com aproximação ou sutura (ORGILL e DEMLING, 1988).

Graças às descobertas em metabologia cirúrgica, bioquímica e nutrição, surgiu uma nova época na qual se pretende interferir na biologia molecular, influenciando na síntese das substâncias responsáveis pelo envolvimento dos fenômenos cicatriciais. Entretanto, em nível local, persiste o princípio de interferência mínima, isto é, causar o mínimo de trauma químico e cirúrgico aos tecidos danificados, para que o processo de cicatrização seja levado a termo sem modificar significativamente suas células originais (POLK JR. e LOPEZ-MAYOR, 1969; CORSI et al., 1994).

1.2 Histórico e Avanços

À luz da tradução dos hieróglifos do grande papiro de Edwin Smith, a humanidade toma conhecimento da medicina no Antigo Egito. *Imhothep* (2800 a.C.) representa a primeira figura de um médico na história da civilização. Dominava múltiplas artes e foi, antes de tudo, um cirurgião que teve seu respeitado nome conservado de geração em geração, devido a sua habilidade para curar doenças e tratar feridas. Após séculos da sua morte, foi elevado ao grau de deus da cura (MCDOWELL, 1977).

A despeito do número de divindades e de encantamentos invocados no decorrer das dinastias faraônicas, o povo do Nilo teve escolas de medicina chamadas Escolas de Vida, onde ingressavam também, jovens de outras gloriosas civilizações. Ensinavam o tratamento de vários tipos de feridas, principalmente com extrato de plantas, cascas, folhas, sementes, sal, gordura ou mel. As operações cirúrgicas eram realizadas com métodos delicados, remoção de corpos estranhos, limpeza com unguentos suaves e cicatrização por segunda intenção ou, por meio de aproximação das bordas da ferida e suturas com tiras de linho impregnadas de resina ou atadas com carne fresca. Utilizavam curativos com resina de mirra, com látex e linho. (THORWALD, 1959; MCDOWELL, 1977).

O Código de Hamurabi (1728 a.C.), em escrita cuneiforme sobre pedra negra de diorito, relata as *Leis da Equidade* da Babilônia e também testemunha, no capítulo sobre honorários médicos e penalidades profissionais, o tratamento de feridas graves (LYONS e PETRUCCELLI, 1987).

Data de 600 a.C. o tratado de cirurgia hindu, *Sushruta Samhitá* que contém revelações do *Mestre de Benares*, um cirurgião chamado Sushruta, sobre ética médica e técnicas cirúrgicas com instrumental delicado (semelhantes ao material da atualidade) e, recomendações para tratamento pós-operatório envolvendo toda uma filosofia de respeito ao bem-estar do paciente. Como fio de sutura, Sushruta utilizou tiras de couro, fibras de casca de árvore, fios de algodão, tendões de animais e, até crina de cavalo (THORWALD, 1959; MCDOWELL, 1977).

Em 460 a.C., os ensinamentos de Hipócrates não diferiam dos ensinamentos dos médicos egípcios e dos fundamentos de Sushruta, exceto na parte técnica cirúrgica e na dissecação de cadáveres que os egípcios e o *Mestre*

de Benares foram insuperáveis. Os escritos deixados pelo médico grego, em sua maior parte, não são realmente dele. A medicina Hipocrática, no entanto, foi a primeira que adquiriu a conotação de ciência, é baseada na observação e sua maior contribuição está no campo da ética médica com o princípio da não agressão *Primum nihil nocere* (THORWALD, 1959; LYONS e PETRUCELLI, 1987).

No século XV, com a descoberta da pólvora e o aparecimento dos graves ferimentos de guerra, os cirurgiões passaram a utilizar o cautério com mais frequência e a suave limpeza das feridas foi substituída pelo tratamento com óleo fervente e água escaldante. Passava a prevalecer o princípio de que a secreção purulenta era benéfica para uma cicatrização acelerada (POLK JR., 1969).

Ambroise Paré, em 1586, retornou aos velhos princípios da interferência mínima, revoltado que estava com inúmeras mortes por infecção. Afirmou, então: “A natureza fará a cicatrização desde que o médico não atrapalhe sua evolução” (POLK JR., 1969).

Mestres da Cirurgia do século XIX, como Semmelweis, Halsted e Lister preocuparam-se em preconizar limpeza minuciosa das feridas, o uso de suturas para a aproximação de suas bordas, assepsia e antissepsia visando controlar as infecções, operações menos agressivas para tratar os tecidos com gentileza e obter uma melhor cicatriz. A melhor maneira de evitar supuração seria deixar as feridas limpas com suturas estéreis. Publicaram trabalhos científicos e desenvolveram esforços para a conscientização da importância de manter a limpeza das feridas, das salas de operações e das suas próprias mãos e roupas. Foram desacreditados. Lister recebeu o trabalho do químico francês Louis Pasteur, em 1863, *Recherches sur la Putréfaction* (sobre a

fermentação, putrefação e micróbios), com respeito e credibilidade. Realizou suas próprias experiências publicando-as na revista médica *The Lancet*, “Do princípio anticéptico na prática da Cirurgia”. Lister utilizou fios de sutura feitos com intestino de animal, embebido numa solução de ácido fênico, criando a base da cirurgia do futuro. Foram ridicularizados. Era difícil acreditar, na época, que micróbios estavam em toda parte, principalmente em hospitais sujos (THORWALD, 1959; LYONS e PETRUCELLI, 1987).

Então, Robert Koch, em 1877 descobriu e isolou o bacilo do antraz. Koch utilizou o microscópio e ratos na sua experiência, tintas para dar coloração das bactérias e para distingui-las umas das outras e do ambiente. Além disso fotografou suas lâminas através de microscópio e fez descobertas como o bacilo da tuberculose e o da cólera (THORWALD, 1959). Realizou o controle das bactérias por assepsia, antissépticos e antimicrobianos. Este foi o prenúncio de uma nova era na abordagem das feridas.

O advento da Cirurgia Plástica produziu um impacto real sobre toda a Cirurgia, porque foi decorrente de uma compreensão da biologia da ferida e da necessidade de evitar danos maiores aos tecidos traumatizados. Através de técnicas especializadas, material cirúrgico menos traumático, material de sutura delicado, é possível minimizar cicatrizes, reduzir a probabilidade de infecção pós-operatória e o tempo de internamento do paciente (MURRAY e MULLIKEN, 1977).

Embora a cicatrização seja um processo único, do início do século XX até hoje é dividido em *fases*, para melhor interpretação de seus fenômenos.

Em 1910, Carrel, descreveu dois eventos que ainda são aceitos:

- a) Fase quiescente ou inicial – indo até o quinto dia após sutura;
- b) Fase da cicatrização propriamente dita – a partir do quinto dia pós sutura.

1.3 Avanços na Indução da Cicatrização

Howes e Harvey publicaram, em 1929, algumas modificações à classificação anterior, descrevendo o processo da cicatrização em três fases:

- a) Fase lenta ou inflamatória: caracterizada pela reação inflamatória com eliminação de detritos, deposição de proteínas não colágenas, glicoproteínas e migração de fibroblastos e de células epiteliais. A duração dessa fase é de quatro ou seis dias, a contar do momento em que ocorre o ferimento;
- b) Fase de fibroplasia: dura desde o 4º ou 6º dia até o 15º e se caracteriza pela proliferação dos fibroblastos que realizam a síntese de mucopolissacarídeos, coproteínas e colágeno que é transformado em fibras. Nessa fase ocorre um aumento da resistência da ferida, e o conteúdo em colágeno chega ao máximo;
- c) Fase de maturação: não fica nitidamente demarcado seu tempo de duração. A resistência tensional aumenta com várias velocidades em diferentes tecidos, à medida que as fibras colágenas se tornam mais insolúveis, e são remarcadas (STEPHENSON, 1977; BIONDO-SIMÕES, 1998).

Durante as duas últimas décadas, o progresso na compreensão dos fenômenos cicatriciais e no tratamento das feridas foi maior do que o observado nos últimos dois mil anos (COHEN et al., 1999). O avanço técnico e científico da humanidade não foi capaz de torná-la incólume aos traumas e

ferimentos. As ocorrências próprias do mundo primitivo sucederam-se aquelas do mundo moderno. O trabalho repetitivo com novas máquinas de alta precisão tecnológica, os meios de transporte com alta velocidade, as guerras com suas diversas e sofisticadas armas químicas e nucleares, extremamente destrutivas, deixam nos sobreviventes danos irreparáveis ou feridas crônicas difíceis de tratar. O grande ônus social e os fortes encargos financeiros impostos pelo tratamento das feridas crônicas estimularam as pesquisas sobre o processo cicatricial, agentes farmacológicos e estudos sobre o trauma, obrigando as autoridades de saúde pública e órgãos federais de financiamento dos cuidados a saúde, reconhecerem a necessidade de apoiar as referidas pesquisas. A elucidação dos fenômenos da cura das mais diversas formas de lesões, passou do plano anatômico ao plano bioquímico e, deste ao plano molecular, tornando cada vez mais clara a intimidade do processo cicatricial. E há esperança que surjam novos agentes farmacológicos capazes de controlar e de aprimorar a qualidade das cicatrizes resultantes de feridas crônicas e agudas (COHEN et al., 1999).

Surpreendentemente, dentre os recursos empregados no tratamento tópico, retomou-se o uso do mel ou do açúcar (a glicose hipertônica é bactericida) (HOLANDA et al., 1984; COHEN et al., 1999).

Os últimos 20 anos foram importantes para o aprofundamento e o incremento dos conhecimentos que são descritos por Carrel, no início do século passado. A atividade das células, o estudo da angiogênese e das enzimas juntaram-se ao desenvolvimento da microscopia eletrônica, de forma que pode-se atribuir à cicatrização fatores sistêmicos e locais.

Segundo Biondo-Simões (1998), as células no organismo são distribuídas em três grupos: lábeis, estáveis e permanentes.

Células Lábeis – Estão em atividade mitótica e continuam sua proliferação através da vida, como as células dos epitélios de revestimento de todos os ductos de glândulas, células da medula óssea e tecidos hemolinfopoiéticos.

Células Estáveis – Possuem baixa taxa de duplicação, porém entram em mitose quando recebem um estímulo. Podem proliferar rapidamente como resposta a um trauma. Exemplo: células parenquimatosas de todos os órgãos glandulares do corpo, tais como os hepatócitos, as células glandulares do pâncreas, derivados mesodérmicos como os fibroblastos, células de musculatura lisa e células endoteliais.

Células Perenes ou Permanentes – São as que, acredita-se, só possuem capacidade de divisão no período embrionário. Saem do ciclo mitótico na vida pós-natal. Exemplos: neurônios, células musculares e cardíacas e do músculo esquelético.

Diante do exposto, a regeneração e/ou a reparação dar-se-á de modo diverso em diferentes órgãos e tecidos afetados. Incrementando as divisões de Carrel (1910) e de Howes et al. (1929), no final do século XX a cicatrização foi dividida em cinco fases; inflamatória, de proliferação celular, de formação de tecido conjuntivo, de contração da ferida e de remodelação (ORGILL e DEMLING, 1998).

Os fatores que interferem na cicatrização podem ser divididos em sistêmicos e locais. Os primeiros, estão presentes em grande número de doenças sistêmicas que provocam deficiência na cicatrização, como doenças hereditárias (doenças da prolidase e dos distúrbios da coagulação), alterações vasculares, doenças metabólicas, hipertireoidismo, deficiências imunológicas,

trauma, choque e septicemia, insuficiências renal e hepática. Outros fatores sistêmicos comprovadamente relacionados ao retardo da cicatrização como drogas imunossupressoras quimioterápicas, radioterapia, estado nutricional principalmente com deficiência das vitaminas C, A, E, do complexo B, deficiência de zinco e ferro, falta de oxigenação, dos tecidos e o uso de corticóide (LODOVICI, 1974; PEACOCK, 1977; MODOLIN e BEVILACQUA, 1985; CORSI et al., 1994).

A propósito dos fatores locais como a técnica cirúrgica, a circulação dos tecidos (a velocidade de cicatrização é diretamente proporcional à temperatura dos tecidos), a presença de tecidos desvitalizados, a presença de corpos estranhos, o emprego de antissépticos locais, as inflamações e infecções locais, os curativos, esses fenômenos que envolvem a cicatrização dos tecidos são objetos de estudos (COHEN et al., 1999).

Apesar de todo o progresso para elucidação dos fatores que influenciam o fenômeno da cicatrização, no estado atual não se pode dispensar o estudo da ação estimulatória dos aminoácidos sobre o processo pós trauma na regeneração dos tecidos.

1.4 Metabolismo, Trauma e Nutrição

1.4.1 Metabolismo

Conjunto dos fenômenos físico-químicos que ocorrem no interior das células e que produzem alterações moleculares (DORLAND, 1994). O metabolismo é, fundamentalmente, o processo geral por meio do qual os sistemas vivos adquirem e usam energia livre para realizarem suas funções (VOET, VOET e PRATT, 2000). É tradicionalmente dividido em duas partes:

- a) Catabolismo ou degradação – processo através do qual os nutrientes e os constituintes celulares são degradados para o aproveitamento de seus componentes e/ou para geração de energia. Tais reações, geralmente, realizam a oxidação exergônica (reação que libera energia, por exemplo a fosforilação oxidativa) das moléculas nutrientes. A energia livre liberada é utilizada para realizar processos endergônicos (reação que captura energia, por exemplo, a fotossíntese), como as reações anabólicas, o trabalho mecânico e transporte ativo de moléculas em direções contrárias a gradientes de concentração (DE ROBERTIS e DE ROBERTIS, 1993; VOET, VOET e PRATT, 2000);
- b) Anabolismo ou biossíntese – processo através do qual as biomoléculas são sintetizadas a partir de componentes mais simples (VOET, VOET e PRATT, 2000).

Uma via metabólica pode ser entendida em vários níveis: a) em termos de seqüência de reações em que um nutriente é convertido em produtos finais e em energia, podendo a via ser seguida por rastreamento de um determinado metabólito marcado. Knoop, em 1904, alimentou cães com ácidos graxos marcados quimicamente com grupos fenil e isolou da urina os produtos fenilados finais do metabolismo; b) em termos dos mecanismos pelos quais cada intermediário é convertido em seu sucessor. Análises desse tipo exigem que as enzimas que catalisam cada uma das reações sejam isoladas e caracterizadas; c) em termos dos mecanismos de controle que regulam o fluxo dos metabólitos através da via metabólica. Inclui as relações entre os vários órgãos que ajustam suas capacidades metabólicas às necessidades do organismo como um todo (VOET, VOET e PRATT, 2000).

As técnicas de estudo dos processos metabólicos progrediram do uso de organismos inteiros a fatias finas de tecidos, evoluindo para cultura de

células e organelas isoladas por ultracentrifugação. (KREISEL, SAKAGUTE e ROSELINO, 1998).

1.4.2 Sentido estrito de trauma

É o produto da ação mecânica de um agente externo sobre o corpo, não podendo ser confundido lesão com ferida. *Lesão* é alteração morfológica visível macro ou microscopicamente, permanente ou não, decorrente de trauma. Lesão é gênero com várias espécies, sendo *Ferida* uma delas. Anteriormente definidas como perda de continuidade dos tecidos, podendo ser causada por múltiplos fatores, sendo as feridas incisais cirúrgicas, promovem reações liberadoras de energia como todas as outras (FREIRE, 1994).

A fase inicial da resposta metabólica ao trauma cujos objetivos são manter o volume circulatório e a perfusão tissular é caracterizada por uma mobilização de substratos por instabilidade hemodinâmica e por aumento na concentração plasmática das catecolaminas. A taxa metabólica basal cai, a concentração plasmática da insulina é variável a despeito de uma possível inibição desse hormônio pela ação das altas concentrações de catecolaminas em nível das células pancreáticas. O glicogênio e as reservas de triacilgliceróis (triglicerídeos) são liberados para imediata produção de energia (DE ROBERTIS e DE ROBERTIS, 1993).

A fase hipermetabólica de equilíbrio ou catabólica é caracterizada por um aumento no gasto energético, quebra dos tecidos corporais, como proteínas. O aumento na concentração de insulina e glucagon tem sido registrado. Essa fase pode ser considerada como sendo o resultado do equilíbrio entre a ação anabolizante da insulina e as ações catabólicas dos hormônios, ou seja, os glicocorticóides, o glucagon e as catecolaminas. Outra

característica é a presença do hipermetabolismo, o qual parece ser proporcional ao grau do estresse.

O processo inflamatório que ocorre em consequência do trauma pode resultar em inflamação aguda ou inflamação crônica. A aguda pode evoluir para resolução ou para abscesso. O abscesso pode causar destruição tecidual importante como a inflamação crônica evoluindo para destruição tecidual. A destruição tecidual é importante, pode evoluir para Restauração e a restauração para regeneração ou reparo por fibrose (ESPERANÇA, 2001). O primeiro evento é a quimiotaxia das células inflamatórias, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais no local da ferida. Estes fatores se difundem, no local do trauma e são rapidamente degradados pelas proteases. A cicatrização contínua mediada por novos fatores. Sintetizados pelas células inflamatórias fibroblastos e células epiteliais (BIONDO-SIMÕES, 1998).

1.4.3 Nutrição nos animais experimentais

O estado nutricional de animais de laboratório compreende energia oriunda das proteínas, hidratos de carbono, lipídios, minerais, vitaminas e fibras. Em várias circunstâncias, as alterações da dieta visam determinar a importância dos nutrientes na fisiologia do animal, assim como as modificações anatômicas e metabólicas a que ele é imposto. O rato em crescimento necessita de 8 a 25g de ingestão de ração diária e de 5 a 8 ml de água por dia (VANNUCCHI, IGLESIAS e JORDÃO, 1998). Os aminoácidos provenientes da digestão protéica são degradados e oxidados.

O valor nutritivo da proteína depende dos aminoácidos que a constitui e, do ponto de vista nutricional, os aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais.

A arginina é considerada aminoácido essencial para o rato em crescimento, ao lado da lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, Leucina, isoleucina, treonina, metionina e valina (VANNUCCHI, IGLESIAS e JORDÃO, 1998).

1.4.4 L-Arginina

A L-arginina é um aminoácido polar, incluído no grupo dos que possuem cadeia lateral carregada. Tem massa molecular de 174,2 Dalton, com pK1 ((-COOH) = 1,82, pK2 ((-NH₃⁺) = 8,99 e pKR (guanidina) = 12,48, com ocorrência, em média, de 5,1% em proteínas (VOET et al., 2000).

A L-arginina é um aminoácido essencial para ratos em crescimento, e embora possa ser sintetizada pelo organismo do animal não será suficiente para suprir a demanda do crescimento normal (VANNUCCHI, IGLESIAS e JORDÃO, 1998).

A L-arginina possui numerosos e peculiares efeitos farmacológicos como o estímulo na liberação do hormônio de crescimento e indução da liberação de insulina e IGF-1 (Fator de Crescimento Insulina Símile). Este fator de crescimento está presente no fígado, plasma e fibroblastos e estimula a síntese de proteoglicanos sulfatados, colágeno e a proliferação de fibroblastos (BARBUL, 1990; FAINTUCH, 1995; COHEN K, 1999). Estimula também a liberação da prolactina, e glucagon. Após o trauma, a L-arginina ajuda a manter funcionando o sistema imune mediado pelas células T, ou anula eficientemente a supressão imune associada com a injúria. Tem também efeito benéfico no catabolismo protéico pós-injúria (BARBUL et al., 1990). Em roedores e pacientes que foram traumatizados por cirurgias, a L-arginina aumenta a retenção de nitrogênio através da redução de sua perda

pela urina (ELSAIR et al., 1978; BARBUL et al., 1981). Assim a suplementação de L-arginina na dieta reduz o catabolismo protéico e aumenta a resposta imune dos ratos após o trauma (KIRK & BARBUL, 1990). A suplementação de L-arginina aumenta o peso do timo através do aumento do número de linfócitos e a resposta dos mesmos a estimulação mitogênica. Nos ratos, em sepse, a suplementação também aumenta a síntese hepática de histonas e a síntese de proteínas de fase aguda (LEON et al., 1991). Seifter et al. (1978) demonstraram que suplementos de L-arginina preveniam a perda de peso durante o período pós-operatório em ratos submetidos a procedimento cirúrgico. Além disso, eles demonstraram que um suplemento de 1% de arginina aumentava a força tênsil do tecido lesado e a deposição de colágeno reparativo. Anos mais tarde, foi demonstrado, em humanos sadios voluntários, que doses farmacológicas de L-arginina aumentam significativamente a quantidade de hidroxiprolina. (BARBUL *et al.*, 1990). A hidroxiprolina está presente quase que exclusivamente no colágeno, indicando que a L-arginina aumenta a síntese de colágeno reparativo.

A L-Arg (aminoácido levorrotatório biologicamente mais importante, ou a forma L), dibásico, monocarboxílico, não essencial, é importante para o crescimento e balanço nitrogenado de muitos animais jovens em condições de estresse, sepse e trauma, podendo tornar-se semi-essencial, ou condicionalmente essencial (FISHER, 1999). L-Arg é bem conhecido nas áreas de suporte nutricional e metabolismo, juntamente com a histidina, é um componente semi-essencial da dieta, seguido dos oito aminoácidos indispensáveis de Rose (FAINTUCH, 1995). Antes mesmo de sua adição interativa a preparados dietéticos enterais e intravenosos, seu papel central no ciclo da uréia e na detoxificação da amônia já estava definido juntamente aos da ornitina e da citrulina. No contexto da farmaconutrição, o apelo seguinte da L-Arg. voltou-se para o terreno da imunoestimulação e do

incentivo à cicatrização de feridas. Investigações experimentais e clínicas da década de 1980, delinearam a utilização desse princípio nutricional por parte dos linfócitos assim como seu auxílio na defesa anti-infecciosa e cicatrização pós-operatória. Tornou-se então um componente obrigatório das dietas para pacientes imunodeprimidos (BARBUL, 1986; FAINTUCH, 1995).

Furchgott (1980) e Moncada (1990), esclareceram que o EDRF (fator relaxante derivado do endotélio), um potente vasodilatador fabricado por células endoteliais e musculares lisas da parede vascular era, de fato o Óxido Nítrico. O gás que tem afinidade por reações de oxi-redução, é produzido a partir da Arginina através das enzimas NO-sintetases ou NOS (FAINTUCH, 1995).

As duas categorias dessas enzimas responsabilizam-se pela produção do óxido nítrico a partir da arginina: as constitutivas, naturalmente presentes em determinadas células e de atuação permanente porém intermitente, e as indutíveis, que somente são acionadas quando um estímulo adequado entra em jogo (endotoxina, citoquinas etc.). As primeiras são características do endotélio vascular e, independentemente do sistema nervoso central e periférico, desempenham funções estritamente fisiológicas, mas que podem se revestir de aspectos fisiopatológicos. A NOS indutível é apanágio do sistema imunológico (monócitos, macrófagos, células de Kupfer). (FAINTUCH, 1995).

A L-Arg. aumenta a retenção de nitrogênio pós traumático, principalmente reduzindo as perdas renais de nitrogênio. Em roedores submetidos a cirurgia e em pacientes cirúrgicos, foi demonstrado, relacionado a esse efeito no metabolismo protéico que, a arginina estimula a cicatrização

das feridas em roedores através da mensuração da força tênsil da cicatriz e síntese reparativa do colágeno (BARBUL, 1990).

A oferta de L-arginina a portadores de trauma deve continuar sendo objeto de estudo. Os efeitos da L-arginina sobre a cicatrização, força tênsil de anastomose e sobre o metabolismo dos tecidos envolvidos no processo cicatricial devem ser elucidadas através de estudos experimentais e clínicos.

2 OBJETIVO

1.1 – Objetivou-se, neste trabalho, estudar os efeitos da suplementação alimentar de L-arginina, em ratos, *in vivo*, sobre as concentrações de glicose, piruvato, lactato e corpos cetônicos no sangue e em cicatriz de retalho miocutâneo em processo de cicatrização.

2.2 – Aferir pressão de ruptura das cicatrizes intestinais nos animais, em pós-operatório com suplementação alimentar com L-arginina.

3 MATERIAL

O material utilizado para realização deste experimento está distribuído nos seguintes tópicos.

3.1 A Amostra

Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), (FIG. 1), jovens, em fase de crescimento, saudáveis e bem nutridos, com peso inicial de 250-300g divididos em dois grupos: Grupo Controle e Grupo Experimental, contendo 24 animais cada um. Todos os animais submetidos ao estudo eram provenientes do Biotério de pequenos animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.



FIGURA 1 – Rato da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com desenho de retalho dorsal.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço, forradas com maravalhas, alojados em dependência com ventilação controlada e alimentados com ração balanceada tipo Purina e água *ad libitum*. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

Os animais do Grupo Controle foram mantidos em jejum de 24h (sendo permitida a ingestão de água potável), após o que foram submetidos à cirurgia sob anestesia inalatória com éter dietílico.

Sob tal anestesia os animais foram submetidos a operações para confecção de retalho miocutâneo dorsal (FIG. 2, 3. e 4) e laparotomia com enterotomia da segunda porção do intestino delgado, evitando incisar as placas de Payer (FIG. 5). As feridas da região dorsal, do intestino delgado e da região abdominal foram suturadas, respectivamente com nylon monofilamentado 5.0 (com agulha cortante para cirurgia plástica)(FIG. 3C), Poliglecaprone 25 (fio absorvível, urológico, com agulha de 1,5cm)(e novamente mononylon 5.0. Os animais foram subdivididos em seis subgrupos de acordo com o tempo de suplementação dietética, da seguinte forma:



FIGURA 2 – Rato Wistar em decúbito ventral – Demarcação do retalho miocutâneo com detalhe da área a ser excisada (no pós-operatório), para procedimento dos experimentos. Em amarelo, pele do dorso. Panículo carnoso, em azul. Músculo, em preto e lilás.



FIGURA 3A – Confeção da área miocutânea do retalho dorsal. Retalho pediculado em sua extremidade cefálica, medindo 3x3x3cm.

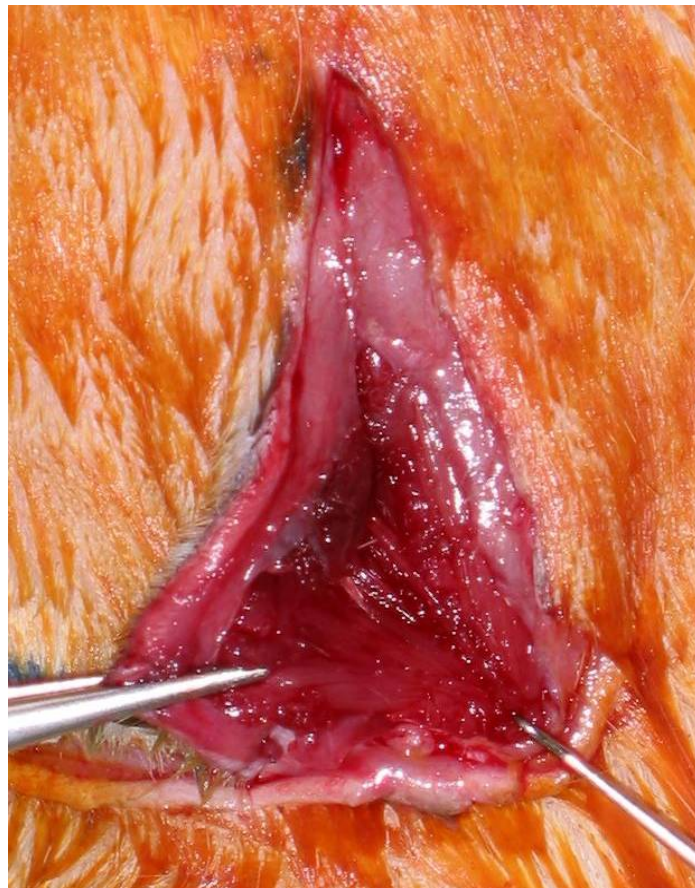


FIGURA 3B – Retalho miocutâneo – Detalhe das fibras musculares.

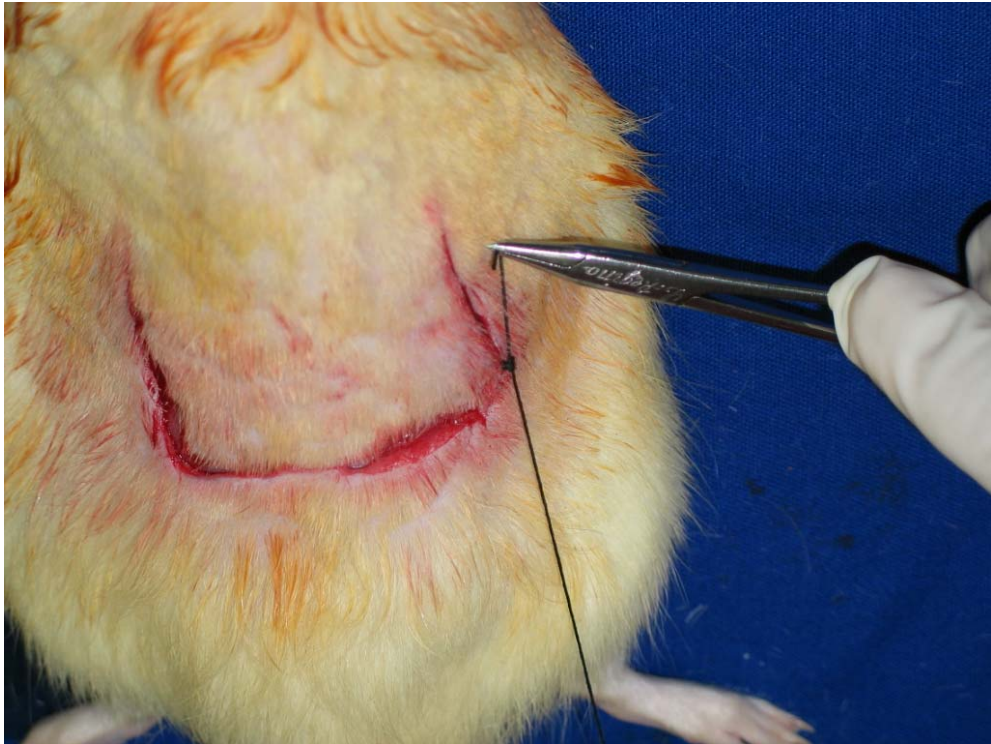


FIGURA 3C – Sutura do retalho com nylon monofilamentado 5.0



FIGURA 4A – Decúbito dorsal para laparotomia.

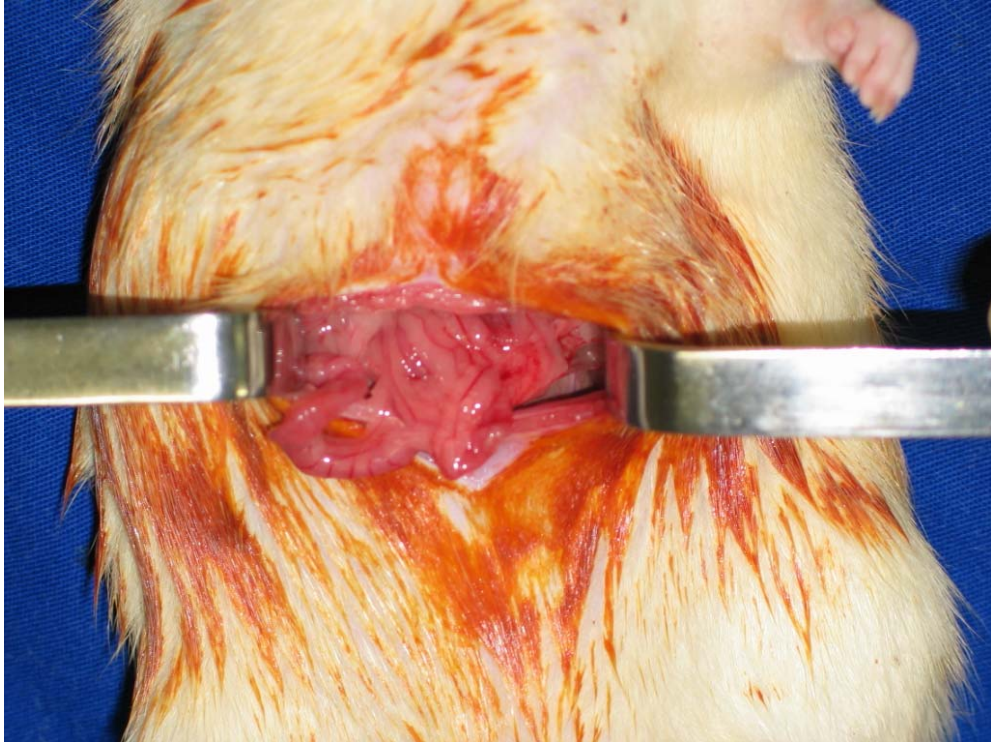


FIGURA 4B - Laparotomia mediana com exposição do intestino delgado

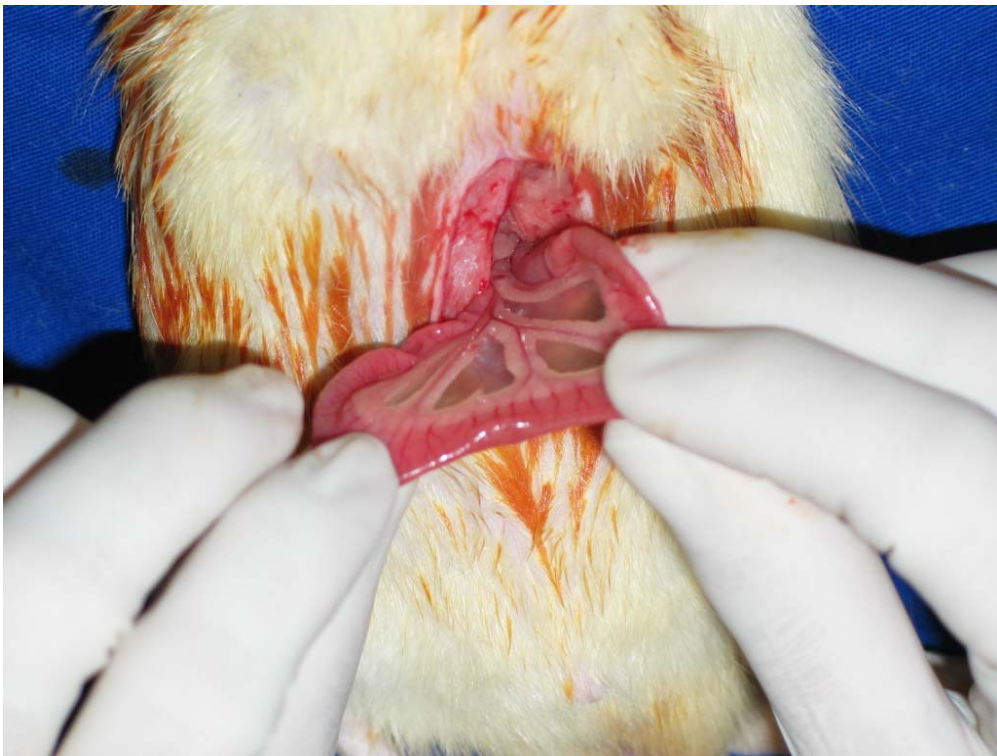


FIGURA 4C – Localização da área (no jejunum) a cerca de 6cm do ângulo de Treitz

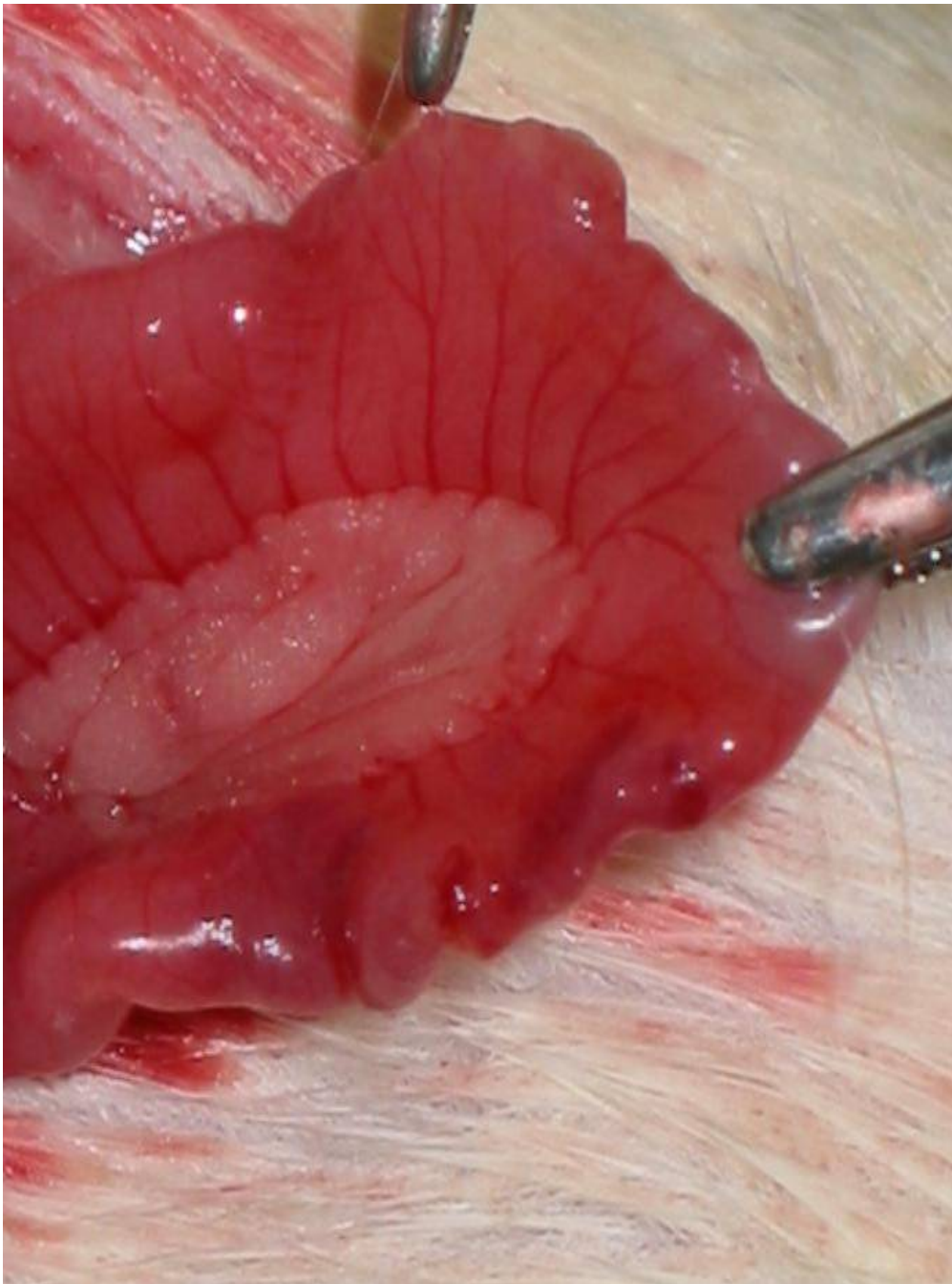


FIGURA 4D - Segmento do jejuno contendo placas de Payer (pinça superior apontando para as placas), local que não deve ser incisado.



FIGURA 4E – Enteroromia de aproximadamente 2cm na borda anti-mesentérica do intestino delgado



FIGURA 4F – Intestino aberto, pronto para ser suturado, mostrando circulação preservada 1 a 2 mm da borda antemesentérica.

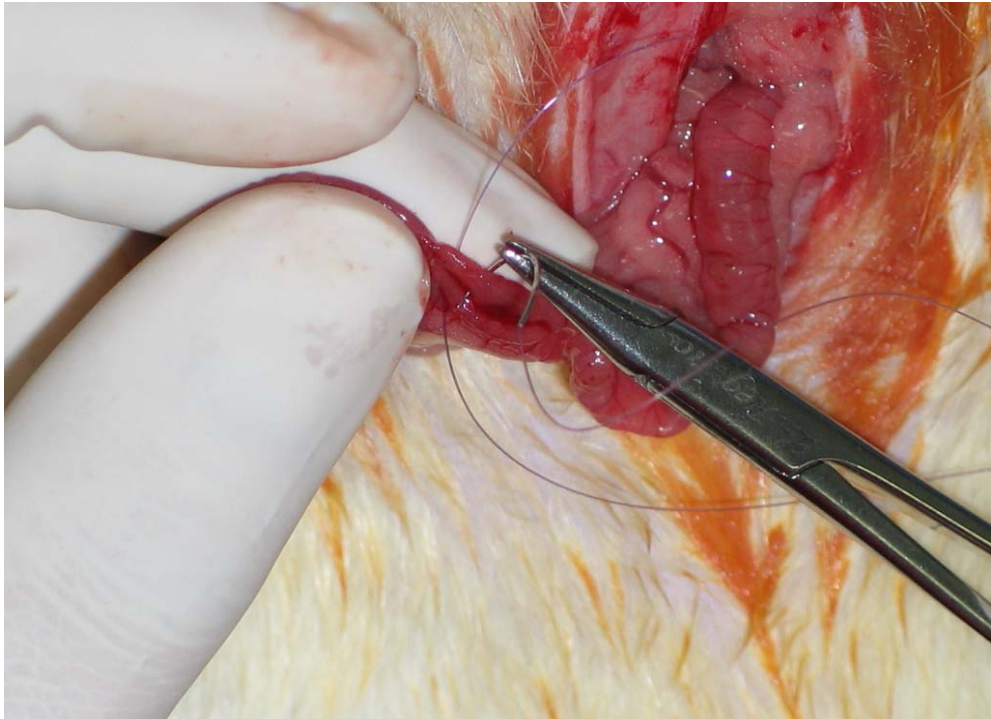


FIGURA 4G - Sutura com Poliglecaprone25(Monocryl 25(monocryl 15.0, com agulha ½ circ. de 1,5cm, Ethicon Johnson & Johnson).

- GC1: (grupo controle1): Constituído por oito animais que, após o ato cirúrgico, foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com dieta padrão do biotério. A este subgrupo foi administrada, através de gavagem diária, suplementação alimentar com 5% do Valor Calórico Total (VCT que, nesses animais corresponde aproximadamente a 72 cal/dia) de Caseinato de Cálcio (fonte protéica intacta de alto valor biológico isocalórica, isoprotéica e isovolumétrica em relação aos grupos) instantâneo dissolvido em 3ml de soro fisiológico e administrado por gavagem (FIG. 6), diariamente, durante sete dias.
- GC2: (grupo controle2): Grupo composto por oito animais que foram mantidos sob a mesma dieta alimentar do anterior, porém durante quatorze dias.
- GC3: (grupo controle3): Oito animais que, analogamente aos anteriores, receberam dieta padrão e suplementação de Caseinato de Cálcio, no entanto, por trinta dias.



FIGURA 5 - Gavagem

O grupo E (N=24), submeteu-se a atos cirúrgicos idênticos ao grupo C, diferenciando-se deste último no que se refere à suplementação alimentar pós-operatória que foi constituída de L-Arginina, no mesmo volume e proporção de diluição do Caseinato de Cálcio, isto é, L-Arginina dissolvida em 3ml de soro fisiológico na concentração de 5% do Valor Calórico Total (VCT), equivalendo a 1g de L-Arginina administrada por gavagem, diariamente.

GE1: (grupo experimental1): Constituído por oito ratos que receberam suplementação alimentar de L-Arginina, através de gavagem diária durante sete dias de pós-operatório.

GE2: (grupo experimental2): A diferir do anterior apenas pelo fato de ser suplementado com L-Arginina durante quatorze dias de pós-operatório.

GE3: (grupo experimental3): A diferir do anterior apenas pelo fato de ser suplementado com L-Arginina durante trinta dias de pós-operatório.

3.2 Diversos (Anexo)

- Caseinato de cálcio em pó.
- L-Arginina, (Ajinomoto Co. INC. Japão) em pó.
- Dieta padrão em pellets do biotério.
- Soro Fisiológico usada para diluição da dieta.
- Éter dietílico.
- Iodopovidona – Povidine (Ceras Johnson, Rio de Janeiro, RJ).
- Tubo de acrílico para administração do éter por inalação.
- Mesa cirúrgica.
- Campos cirúrgicos estéreis descartáveis.
- Lupa oftalmológica, binocular.

- Cubetas para leitura ultravioleta (Ultra-VU disposable cuvettes-American Hospital Supply Corporation-USA).
- Pipeta Gilson graduada 1.000 (França).
- Ponteiras para pipetas Gilson.
- Becher de 10, 50, 100 e 500 ml (Pyrex).
- Tubos de ensaio de vidro de 10ml, marca B.D.
- Erlenmeyer de 125ml, (Pyrex).
- Nitrogênio líquido (White Martins, São Paulo-SP, Brasil).
- Garrafa térmica de 5 litros para acomodar nitrogênio líquido durante o experimento.
- Graal e Pistilo de porcelana.
- Material cirúrgico usado: bisturi lâmina 15 e 18, pinças, tesouras, fios de sutura monofilamentados (nylon 5.0 e Poliglecaprone 25 urológico 5.0, ETHICON JOHNSON& JOHNSON).
- Afastador abdominal de pequena dimensão.
- Placas de Petri.
- Papel Indicador de pH 4-10 – líquido PH. Indikator Lösung Universsalindikator (Copar Ind. e Com. Ltda, Rio de Janeiro-RJ, Brasil).
- Heparina.
- Algodão e gases estéreis.
- Acido Perclórico a 10%.
- Acido Cloridrico (HCL).
- Agulha B-D Microlance de polipropileno 13x3 - 30g 1/2.
- Agulha 25 x 0,8 21 G1 para coleta de sangue arterial.
- Seringas de 3 e 5ml descartáveis.
- Sonda uretral de polietileno n. 6 + seringa descartável com capacidade de 20 cm³ + Becker de vidro com capacidade para 20ml + manômetro de tensiômetro. (Material para teste de rotura das cicatrizes suturas intestinais).



FIGURA 6 – Material de Gavagem

3.3 Aparelhagem

- Balança de precisão Mettler Toledo, modelo AB204-S (Micronal S.A. São Paulo-SP, Brasil).
- Centrífuga Centrífoca Ependorf 5.403 (Made in France).
- Espectrofotômetro (Modelo DU, Beckman, Fullerton, Ca, USA) com medidor de absorvância digital UV – visível e outros acessórios (Modernization system, Gilford, Oberlin, Ohio, USA).
- Medidor de pH micronal (pH – metro B374).
- Agitador de balas magnéticas.
- Freezer e geladeira.

3.4 Reagentes

- (KOH) Hidróxido de potássio (para análise).
- Ácido perclórico 10% (P.A).
- (HCL) Ácido clorídrico (P.A).
- TRIS (Hidroximetilaminometano P.A).
- EDTA (Saldissódico).
- (MgCl₂ 6H₂O) Cloreto de magnésio P.A.
- K₂HPO₄ fosfato de dibásico P.A.
- KH₂PO₄ fosfato de potássio monobásico P.A.
- H₂NNH₂·XH₂O hydrazine hidrate 80%.
- Indicador líquido universal PH 4 - 10 (MERCK).

3.5 Enzimas

- Todas da Boehringer Mannheim – Alemanha.
- ATP (trifosfato de adenosina (C₁₀ H₁₄ N₅ O₁₃ P₃ Na₂ 3H₂O)).
- G6P-DH (glicose-6-fosfato desidrogenase de Leuconostoc mesenteroides).
- HK (hexoquinase).
- NAD (nicotinamida adenina dinucleotídio, C₂₁ H₂₇ N₇O₁₄ P₂ .3H₂O).
- NADH (C₂₁ H₂₇ N₇O₁₄ P₂. Na₂).
- LDH (Lactato deydrogenase) (from hog muscle).
- 3H.BDN = 3 hidroxiputilato deydrogenasi.

4 MÉTODO

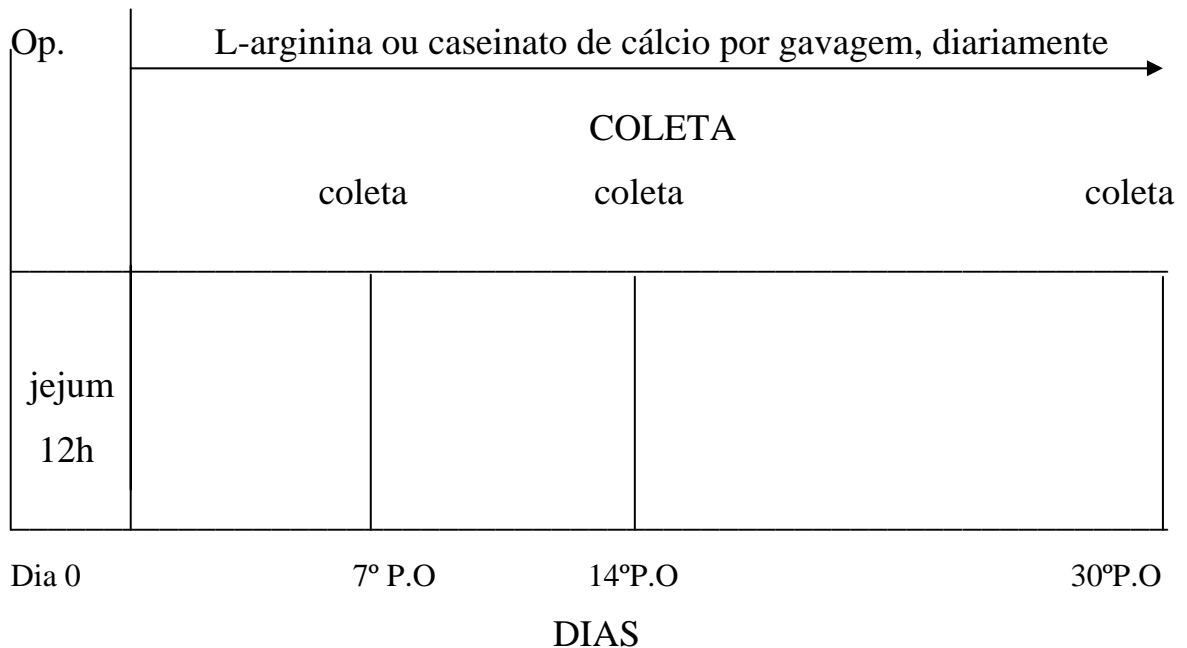
A pesquisa experimental foi realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (CONSEJO DE ORGANIZACIONES INTERNACIONALES DE CIÊNCIAS MÉDICAS, 1990) e de acordo com a Lei Federal n. 6.638 (que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseccção de animais), de 8 de maio de 1979.

4.1 O Estudo

Dieta padrão do biotério suplementada, com L-arginina em pó, diluída em 3ml de soro fisiológico, correspondendo a 5% do valor calórico total (VCT) (que nesses animais corresponde aproximadamente a 72 cal/dia), por gavagem, foi utilizada durante sete dias no primeiro grupo experimental (GE). O segundo grupo experimental foi alimentado durante 14 dias com a mesma dieta e igual suplementação de L-Arginina. O terceiro grupo recebeu, igualmente, a suplementação de L-arginina. A suplementação dos grupos controles (GC) foi realizada com Caseinato de Cálcio em pó – fonte protéica intacta de alto valor biológico, isocalórica e isoproteica – diluído em 3ml de soro fisiológico (5% de VCT), também via gavagem. O emprego da alimentação e suplementação iniciou-se após 12 horas da operação proposta, considerando-se dia zero o dia da operação. Entre o dia zero e as 12 horas subseqüentes, os ratos permaneceram em gaiola individual com água *ad libitum*. As gavagens foram realizadas a partir do 1º dia pós-operatório, diariamente até o 30º dia de estudo. A alimentação ofertada foi de Pellets (alimentação própria do biotério).

4.1.1 Desenho do experimento

Ratos Wistar, em pós-operatório de retalho dorsal e enterotomia + sutura:



- GC1: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets*, do biotério suplementada com caseinato de cálcio correspondente a 5% do VCT (que nesses animais correspondem aproximadamente a 72 cal/dia), água *ad libitum* durante 7 dias.
- GC2: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets* do biotério, suplementada com, caseinato de cálcio correspondente a 5% do VCT (que nesses animais correspondem aproximadamente a 72 cal/dia), água *ad libitum* durante 14 dias.
- GC3: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets*, do biotério suplementada com caseinato de cálcio correspondente a 5% do VCT (que

nesses animais correspondem aproximadamente a 72 cal/dia), água *ad libitum* durante 30 dias.

- GE1: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets* do biotério, suplementada com L-arginina, água *ad libitum* durante 7 dias.
- GE2: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets*, do biotério suplementada com L-arginina, água *ad libitum* durante 14 dias.
- GE3: 8 ratos Wistar, alimentados com dieta padrão, em *pellets* do biotério, suplementada com L-arginina, água *ad libitum* durante 30 dias.

4.1.2 Pré-operatório

Os ratos foram deixados em jejum por 24 horas, sendo fornecida água potável *ad libitum*.

4.1.3 Anestesia

Foi aplicada, individualmente, a anestesia inalatória, alojando-se o animal em campânula de acrílico, contendo em seu interior, uma camada de algodão umedecido em éter dietílico. Após perda dos sentidos do animal foi retirada a campânula e imobilizado, sobre uma prancha de madeira revestida por uma lâmina de plástico fenólico, com extensão dos quatro membros e em decúbito ventral. A anestesia foi mantida com máscara de éter dietílico e ar ambiente, em respiração espontânea.

4.1.4 Técnica operatória

A sistematização da técnica operatória, após pesagem prévia de cada animal e marcação dos mesmos na cauda com tinta permanente, obedeceram as seguintes etapas:

- a) Após indução da anestesia, o animal foi colocado em decúbito ventral, com os membros dianteiros e traseiros fixados à prancha por ligas elásticas;
- b) Tonsura da região dorsal e antissepsia com iodopovidona;
- c) Confeção de retalho dorsal miocutâneo, pediculado, medindo 3x3x3cm. O retalho foi levantado, permanecendo pediculado em sua extremidade proximal, cefálica. A seguir, suturado no mesmo local (como se fosse autonomizado), com fio de nylon monofilamentado 5.0 (mononylon 5.0, da Ethicon J&J) para cirurgia plástica agulha 3/8 de 1,95cm, em pontos separados. Foram utilizados gazes embebidas em soro fisiológico, estéreis, para enxugar o sangue. Ao término do procedimento, a ferida cirúrgica suturada foi pincelada com iodopovidona;
- d) O animal foi colocado em decúbito dorsal;
- e) Realizada tonsura abdominal e antissepsia com iodopovidona;
- f) Laparotomia mediana, a partir do apêndice xifóide, medindo aproximadamente 5cm de comprimento;
- g) Exteriorização de intestino delgado a cerca de 6cm do ligamento correspondente ao ângulo de Treitz (no animal);
- h) Realizada enterotomia de aproximadamente 2cm na borda antemesentérica jejunal (a \pm 6cm do ângulo de Treitz) e, em seguida, a sutura das bordas da ferida cirúrgica foi efetuada com Poliglecaprone 25 (Monocryl 5.0, com agulha 1/2 circ de 1,5cm Ethicon, Johnson & Johnson), fio de sutura monofilamentar, absorvível em sutura contínua interrompida, finalizada por quatro nós, sendo o primeiro duplo. Finalmente a síntese da parede abdominal com mononylon 5.0.

4.1.5 Pós-operatório

- a) Pós-operatório com jejum de 12 horas e água potável *ad libitum*.

- b) Após o jejum, o grupo controle recebeu alimentação para ratos de laboratório com acréscimo de suplementação alimentar com 5% do VCT de Caseinato de cálcio (fonte protéica de alto valor biológico, isocalórica e isoproteica), a 5% do Valor Calórico Total que, nesses animais, corresponde aproximadamente a 72 cal/dia, durante 7 dias, por gavagem.
- c) Após o jejum, o grupo experimental recebeu 1g de L-arginina dissolvida em 3ml de soro fisiológico, diariamente, durante 7 dias, por meio de gavagem.
- d) No sétimo dia pós-operatório ambos os grupos são operados.
- e) De cada rato são retiradas, sob anestesia inalatória, amostras do retalho dorsal, de sangue da aorta abdominal e do segmento do intestino delgado contendo cicatriz cirúrgica.
- f) Sacrifício do animal por exposição prolongada ao anestésico
- g) O procedimento pós-operatório, a retirada de amostras para exames especializados e o sacrifício final é o mesmo para os animais dos grupos de 14 e 30 dias.

4.2 Preparação dos Espécimes (sangue, tecido dorsal do retalho e intestino delgado)

Imediatamente após a excisão cirúrgica, metade do tecido do retalho dorsal foi prensado e mergulhado em nitrogênio líquido. A seguir esmagado com pistilo e transformado em microfragmentos, sempre dentro do recipiente de porcelana (graal) mantendo-se o tecido congelado durante o procedimento, pelo uso intermitente de nitrogênio líquido (WILLIAMSON, 1976; WOLLENBERGER *et al*, 1960 apud GARCIA, 1994). O tecido microfragmentado é levado para tubos de ensaio, contendo Ácido Perclórico a 10%(5ml), assim como o sangue retirado aorta abdominal (FIG.7), para determinação dos metabólitos.

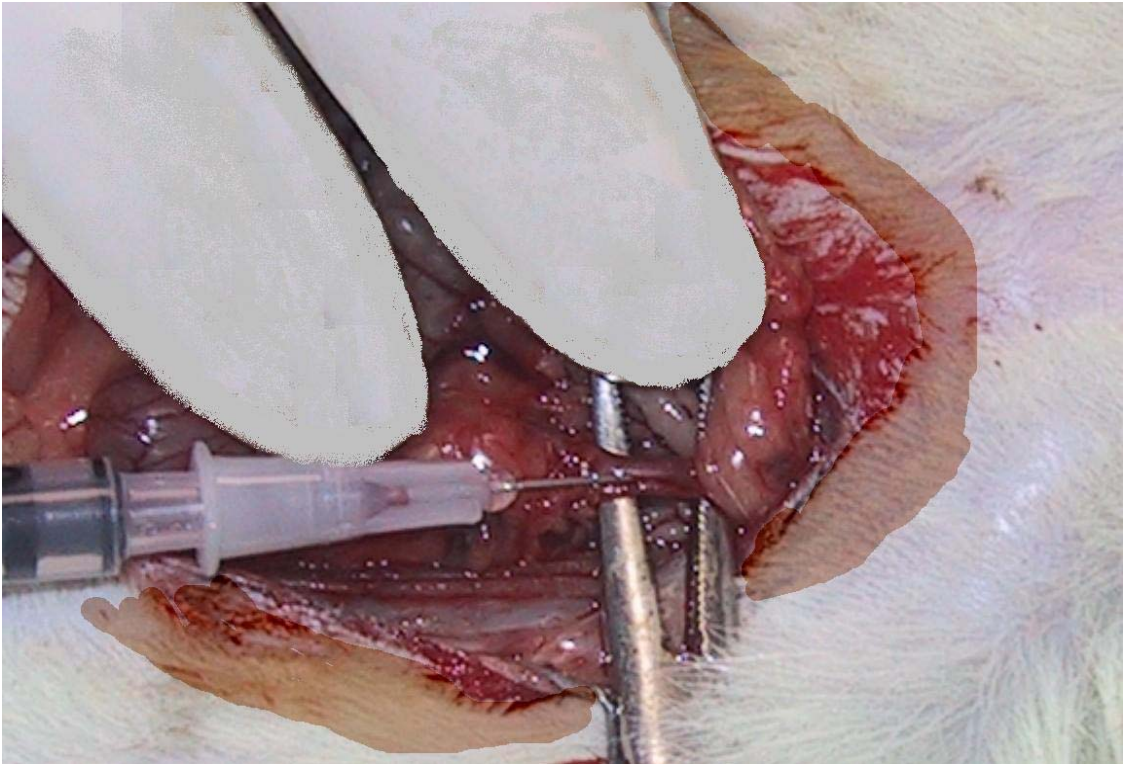


FIGURA 7 - No pós-operatório, sob a mesma anestesia inalatória, todos os grupos foram submetidos a coleta de sangue da aorta abdominal, para dosagem dos metabólitos.

4.2.1 Resistência a pressão de rotura de cicatriz intestinal

A força tensil de cada cicatriz intestinal foi avaliada medindo-se a pressão de rotura das mesmas através do seguinte procedimento:

O método utilizado para avaliar a pressão de rotura da cicatriz intestinal foi o método semelhante ao preconizado por Chlmsky, há quase um século e atualmente ainda empregado, com modificações, por muitos pesquisadores. (CARRIL, 1970; LEONARDI et al., 1977; NARESSE, 1987; VERDERESE, 1993 apud APRILLI, 1998; MEDEIROS, 1990 apud RIBEIRO, 1998).

Uma das extremidades do segmento intestinal ressecado contendo cicatriz cirúrgica, foi completamente ocluída, atada com fio de algodão,

enquanto a outra foi atada em torno de uma sonda uretral n. 6 conectada ao manômetro do tensiômetro, formando um segmento de alça fechada. A peça foi então imersa em recipiente contendo soro fisiológico (FIG. 20). Em seguida, foi conectada uma seringa descartável ao manômetro do tensiômetro, pela qual foi insuflado o ar na luz do segmento do intestino delgado que foi distendido até se observar a formação de bolha de ar na água, representando a rotura área cicatricial. Foi registrada nessa ocasião a pressão de rotura da cicatriz (apud MEDEIROS, 1990).

4.2.2 Preparo do sangue para determinação dos metabólitos

Após realizada a laparotomia foi dissecada a aorta abdominal de onde foi retirado 1 ml sangue (com seringa heparinizada) que, assim como o segmento do tecido dorsal microfragmentado, foi para tubos de ensaio, previamente pesados, contendo Ácido Perclórico a 10% (5ml). Desse modo as proteínas foram rapidamente inativadas e puderam ser removidas por centrifugação (3000rpm, durante 10 minutos).

O precipitado resultante, foi desprezado. E o sobrenadante (extrato ácido) foi colocado em tubos de ensaio de vidro de 10ml, previamente pesados. Os tubos foram também pesados com o extrato ácido, obtendo-se o volume do ácido. A adição de um indicador universal de pH juntamente com uma solução de hidróxido de potássio 20% permitiu ajustar-se o pH entre 7 e 8 para a obtenção do extrato, neutro. Os tubos foram novamente pesados e centrifugados (3000rpm, durante 10 minutos); o sobrenadante (extrato neutro) foi usado para a análise espectrofotométrica dos metabólitos. Para preservação, as amostras foram armazenadas, congeladas a 20° centígrados negativos.

4.3 Determinação dos Metabólitos

Para a determinação dos metabólitos foram utilizados métodos enzimáticos de Hohorst et al. (1959) Williamson et al. (1962), descritos e utilizados por Vasconcelos, 1987, Garcia, 1994 e Silva, 1998.

Foram dosados os metabólitos, Glicose, Piruvato, Lactato e Corpos cetônicos (Acetoacetato e 3-hidroxiacetato).

4.3.1 Dosagens bioquímicas: determinação dos metabólitos

Os metabólitos foram determinados no sangue da aorta abdominal e nos tecidos do retalho dorsal miocutâneo. Incluíram-se os precursores da glicogênese (piruvato e lactato) os corpos cetônicos (acetoacetato e 3-hidroxiacetato) e D-glicose.

É conveniente mostrar os princípios básicos da análise enzimática, antes mesmo da apresentação dos detalhes envolvidos na determinação dos vários metabólitos especificados.

Um ensaio enzimático de substratos é baseado no princípio de uma reação enzimática específica, em que a participação do substrato é completada com a redução de NADH/NADP. Os nucleotídeos piridina (NAD⁺, NADP) absorvem luz a 260nm (nanômetro), e no estado reduzido (NADH, NADHP) têm uma absorção adicional de no máximo 340nm. Portanto, através de medida de absorvância a 340nm, a conversão enzimática do substrato pode ser acompanhada diretamente de uma cubeta no espectrofotômetro. Independentemente se NAD⁺ aceita H⁺ ou se NADH doa H⁺, a densidade óptica aumenta ou diminui em 6,22 unidades com a produção ou consumo de um micromol de NADH/NADHP.

Sabendo-se que em uma reação enzimática específica, um micromol de substrato usualmente reage com um micromol de NAD⁺/NADP

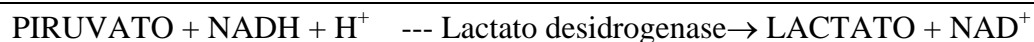
(ou NADH/NADPH), a mudança na absorbância refletirá rigorosamente a quantidade de substrato consumida pela reação. Sendo as condições de ensaios ótimas, a conversão do substrato é praticamente completa, e a diferença da absorbância pode ser usada para calcular a concentração do substrato, no sangue e no retalho miocutâneo, multiplicando-se por um fator de diluição adequado.

A especificidade de um ensaio enzimático depende da pureza da enzima, enquanto a precisão depende da realização do ensaio em condições ideais. A sensibilidade do ensaio enzimático é limitada pelo fato de que a conversão suficiente de NAD⁺/NADP em NADH/NADPH, ou vice-versa, deve ocorrer para produzir uma mudança mensurável na absorbância.

4.3.2 Determinação do piruvato e do acetoacetato

Piruvato e acetoacetato têm condições de ensaio similares e podem ser medidos seqüencialmente na mesma amostra e na mesma cubeta (WILLIAMSON, 1962).

Reações:



O equilíbrio da primeira reação em pH 7 é suficientemente desviado para a direita, garantindo uma medida quantitativa dos níveis de piruvato desde que a concentração de NADH não seja menor que 0,01mM (milimolar). Com o mesmo pH e com excesso de NADH compatível, pelo menos 98% do

acetoacetato é reduzido para 3-hidroxiacetato. No entanto, devido à baixa atividade da preparação de 3-hidroxiacetato desidrogenase, a segunda reação ocorre com uma velocidade menor que a primeira.

Solução tampão para ensaio:

10ml de fosfato de potássio 0,1 molar, pH 6,9

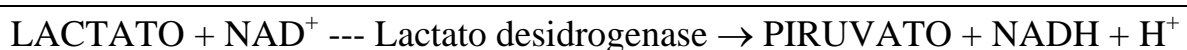
01ml de NADH a 0,5%

Uma solução fresca foi preparada para cada ensaio. O volume total em cada cubeta foi de 2ml, consistindo de 1ml de amostra contendo ácido perclórico neutralizado e 1ml de solução tampão. A cubeta para controle continha 1ml de água destilada e 1ml de solução tampão do ensaio. As cubetas foram então lidas no espectrofotômetro antes e 10 minutos após adição de 0,01ml de lactato desidrogenase em cada cubeta, sendo lidas novamente após 30 e 35 minutos.

4.3.3 Determinação de L-(+)-Lactato

As concentrações de lactato foram determinadas de acordo com o método descrito por HOHORST (1963) *apud* VASCONCELOS (1987).

Seqüência da reação



O equilíbrio da reação ocorre no lado do lactato e NAD^+ . No entanto, para garantir a completa conversão do lactato, os produtos da reação devem ser removidos. Prótons são aprisionados por uma reação alcalina; o piruvato reage com hidrato de hidrazina na solução tampão para formar piruvato hidrazona e, além disso, um grande excesso de NAD^+ e enzima é

usado para se obter rapidamente um ponto final da reação. A lactato desidrogenase reage somente com L-(+)-Lactato e isso oferece especificidade para o ensaio.

Solução tampão para o ensaio:

40ml de tris 0,2 M

05ml de Hidrato de hidrazina 100%

25mg de EDTA

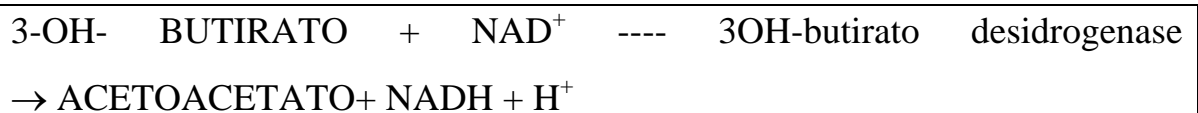
Completa-se para 100 ml com água destilada.

O pH da solução tampão foi ajustado para 9,5 com ácido hidrolórico 5M, e a solução pode ser estocada por até duas semanas a 4 graus centígrados. No início do ensaio, 1ml de NAD⁺ 1% foi adicionado a cada 10ml de solução tampão. O volume total correspondendo em cada cubeta 2ml, consistindo de 0,2ml da amostra neutralizada, 0,8ml de água destilada e 1ml de solução tampão contendo NAD⁺ 1%. Todas as cubetas foram lidas a 340nm antes, em 30 e 35 minutos após a adição de 0,01ml de lactato desidrogenase.

4.3.4 Determinação do D-(-)-3-Hidroxibutirato

As concentrações de 3-hidroxibutirato foram determinadas de acordo com o método descrito por WILLIAMSON et al., (1962).

Reação



O equilíbrio da reação com pH 8 é alcançado, quando, aproximadamente, 40% do 3-hidroxiacetato é oxidado para acetoacetato. No entanto, a presença da hidrazina, na solução tampão aprisiona o acetoacetato formado como uma hidrazona e a reação segue quantitativamente da esquerda para a direita:

Solução tampão para o ensaio

70ml de solução TRIS 0,1 M, pH 8,5

0,25ml de hidrato de hidrazina

25mg de EDTA

Completa-se para 100ml com água destilada

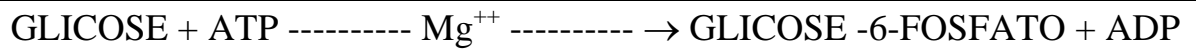
O pH da solução do ensaio foi ajustado para 8,5 com ácido hidrocloreto 5M e a solução pode ser armazenada até por duas semanas a 4 graus centígrados. Antes de iniciar o ensaio, 1ml de NAD⁺ a 1% foi adicionado a 10ml de solução tampão. O volume total em cada cubeta foi de 2ml, consistindo de 0,5ml da amostra neutralizada, 0,5ml de água destilada e 1ml de solução tampão com NAD⁺. As cubetas foram lidas a 340 nm antes, 30 e 35 minutos após adição de 0,01ml da enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase.

4.3.5 Determinação da D-Glicose

A glicose sangüínea foi determinada de acordo com o método descrito por SLEIN (1963) *apud* VASCONCELOS (1987).

Reação:

a) Reação auxiliar



b) Reação indicadora



Com pH 7,5, o equilíbrio para a reação indicadora é desviada para a direita, o que garante o término completo de ambas as reações, desde que a glicose-6-fosfato formada na reação anterior é rapidamente usada na reação seguinte. Ainda que a hexoquinase catalise a fosforilação de vários outros monossacárides, a especificidade do ensaio provém da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que não reage com outras hexoses ou pentoses que não seja a glicose-fosfato.

Solução tampão para o ensaio:

20ml de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0

2ml de cloreto de magnésio 0,1M

2ml de ATP 0,01M

2ml de NAD⁺ 1%

0,13ml de G6PD (1 mg/ml)

Esta solução foi renovada para cada ensaio. O volume total em cada cubeta foi de 2ml, consistindo de 0,2ml de amostra neutralizada, 0,8ml de água destilada e 1ml de solução tampão do ensaio. A cubeta controle continha 1ml de água destilada e 1ml da solução tampão. Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes, 10 a 15 minutos após adição de 0,01ml de hexoquinase.

4.3.6 Cálculos dos metabólitos no sangue e retalho miocutâneo

Todos os cálculos dos metabólitos são baseados nas alterações de densidade ótica medidas a 340nm nas amostras das cubetas, seguidas após adição da enzima e subtraídas das mudanças inespecíficas que podem ocorrer nas cubetas de controle.

Portanto:

Diferença de densidade ótica (DDO) = (alteração da absorbância da amostra na cubeta) – (alteração da absorbância na cubeta controle).

Desde que o coeficiente molar de extinção de NADH é $6,22\mu\text{mol}$, a quantidade de substrato na cubeta é igual a $(\text{DDO}/6,22) \times \text{volume total na cubeta}$. Este resultado é então multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato.

4.3.7 Cálculo dos metabólitos no sangue

$(\text{Peso do sangue} + \text{HClO}_4 / \text{peso do sangue}) \times (\text{peso do extrato neutro} / \text{peso do extrato ácido}) \times (\text{volume total da cubeta} / \text{volume do extrato neutro na cubeta}) \times (\text{DDO}/6,22) = \mu\text{mol do metabólito/ml de sangue}$.

4.3.8 Cálculo dos metabólitos nos tecidos do retalho miocutâneo

$(\text{Peso dos tecidos} + \text{HClO}_4 / \text{peso dos tecidos}) \times (\text{peso do extrato neutro} / \text{peso do extrato ácido}) \times (\text{volume total da cubeta} / \text{volume do extrato neutro na cubeta}) \times (\text{DDO}/6,22) = (\mu\text{mol do metabólito/g de tecido miocutâneo})$.

4.4 Análise Estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média), nas tabelas e nas representações gráficas.

A análise estatística foi realizada com o Software Minitab Statistical Package Macintosh, empregado o teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos, obedecendo aos níveis de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação dos Metabólitos

Os metabólitos foram determinados tanto no sangue retirado da aorta abdominal, quanto na pele e músculo da região dorsal nos ratos Wistar, submetidos ao estresse e ao trauma cirúrgico. A concentração no sangue foi dosada em micromol por ml. A concentração de metabólitos no retalho miocutâneo dorsal foi dosado em micromol por grama de tecido. Os metabólitos foram determinados tanto no sangue da aorta abdominal quanto no fragmento do retalho miocutâneo, por métodos enzimáticos.

Os metabólitos dosados D-Glicose, Piruvato, Lactato, Aceto Acetato e 3-Hidroxiacetato.

Os métodos enzimáticos utilizados foram aqueles descritos por Hohorst et al. (1959) e Williamson et al. (1962). (VASCONCELOS, 1987; GARCIA, 1994; SILVA, 1998)

5.2 Determinação dos Metabólitos no Sangue

A concentração de glicose no sangue não diferiu de forma significativa entre os grupos estudados (TABELA 1 e GRÁFICO 1).

A concentração de Piruvato aferida no sangue foi significativamente menor ($0,453 \pm 0,12$ versus $1,597 \pm 0,41$) comparando-se os valores aferidos no grupo GE versus GC no 14º dia de pós-operatório. Observou-se aumento significativo entre a concentração de Piruvato no sangue dos GC do 14º dia em

relação aos animais do mesmo grupo (7º e 30º dia)(TABELA 2 e GRÁFICO 2)

A análise da concentração de Lactato no sangue dos animais do GE foi significativamente menor ($5,103 \pm 0,78$ versus $7,795 \pm 0,51$) que a concentração aferida no respectivo controle GC no 14º dia. Observou-se aumento significante ($7,795 \pm 0,51$ versus $3,629 \pm 0,86$) na concentração de lactato no sangue dos animais do GE, no 14º dia, em comparação aos valores aferidos no 7º dia de pós-operatório e no 30º dia do mesmo grupo (TABELA 3 e GRÁFICO 3).

Ocorreu queda significante ($0,325 \pm 0,06$ versus $0,725 \pm 0,07$) na concentração de Corpos cetônicos no sangue dos animais do grupo GE em relação a concentração aferida no grupo GC no 14º dia de pós-operatório. Observou-se ainda queda significante ($0,325 \pm 0,06$ versus $0,516 \pm 0,054$) nas concentrações de Corpos cetônicos no sangue dos animais do grupo GE no 14º dia quando comparadas as concentrações aferidas no 7º dia no mesmo grupo (TABELA 6 e GRÁFICO.6).

5.3 Dosagem de Metabólitos na Cicatriz do Retalho Miocutâneo

A dosagem de Glicose na cicatriz do retalho miocutâneo dorsal do rato Wistar não apresentou concentração com diferenças significante ao longo do período pós-operatório, mesmo comparando os dois grupos entre si (TABELA 7 e GRÁFICO 7).

Não se observaram diferenças significantes na concentração de piruvato em nenhum dos retalhos do GE ou GC estudados (TABELA e GRÁFICO 8). Não foram observadas diferenças significantes na concentração

de lactato aferida na cicatriz do retalho miocutâneo em nenhum dos grupos estudados (TABELA 9 e GRÁFICO 9).

Observou-se aumento significativo ($0,525 \pm 0,10$ *versus* $0,164 \pm 0,04$) na concentração de Corpos Cetônicos na cicatriz do retalho miocutâneo no 30º dia em pós-operatório do GE em relação à concentração aferida no 7º dia de pós-operatório nos animais do mesmo grupo (TABELA 12 e GRÁFICO 12).

A concentração de 3-Hidroxidobutirato na cicatriz dos retalhos miocutâneos dos animais operados não apresentou diferença entre GE e GC.

Observou-se queda significativa ($0,144 \pm 0,081$ *versus* $0,438 \pm 0,124$) na concentração aferida de Acetoacetato nas cicatrizes do GE em relação ao GC. Entre os animais do GE houve aumento significativo de Acetoacetato nas cicatrizes dos animais do 30º dia em relação aos do 7º e 14º dias do mesmo grupo (TABELA 10 e GRÁFICO 10)

5.4 Determinação da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal (FIG. 8)

Foi observado um aumento significativo da pressão de rotura da cicatriz intestinal nos animais do GE, no 14º dia de pós-operatório, em relação ao GC ($275 \pm 8,16$ *versus* $191,66 \pm 26,83$).

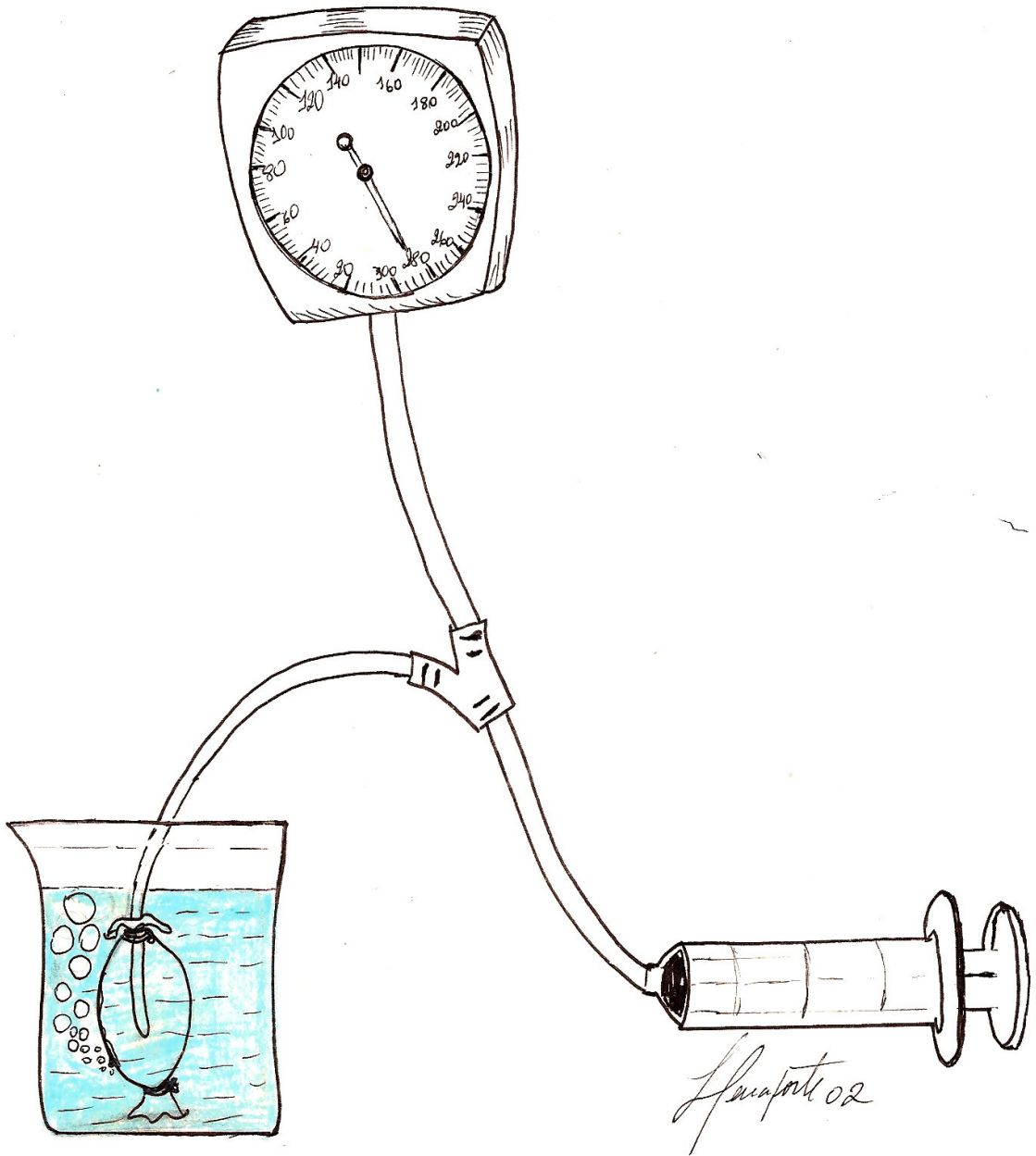


FIGURA 8 – Teste de Pressão de Rótura

6 DISCUSSÃO

Dentre as citocinas e mediadores responsáveis por toda comunicação para as interações intercelulares, estudos apontam para IGF-1 (Fator de crescimento insulina símile 1), TDGF (Fator Plaquetário de crescimento), TDF-b (Fator transformador de crescimento beta) e EGF (Fator de crescimento epidérmico). Sabe-se que compostos peptídicos ao serem liberados das plaquetas parecem iniciar a série de eventos que leva a cicatrização (COHEN, 1979; STEPHEN, 1998; BIONDO-SIMÕES, 1998; FISHER, 1999).

A L-arginina é secretagoga do GH e IGF-1. O IGF-1 possui seqüência de aminoácidos semelhantes ao da pró-insulina, é produzido por hepatócitos, células miocárdicas, pneumócitos, células renais, pancreáticas, cerebrais, cartilaginosas e musculares.

Fisher (1999) refere que as citocinas tem importante papel durante a resposta catabólica pois causam proteólise muscular e aumento da lactocemia para incrementar a produção de glicose através da gliconeogênese (FIG. 9). A glicose é a principal fonte de energia dos componentes celulares da ferida em cicatrização. Como as reservas corporais de glicose são limitadas e o glicogênio hepático e muscular é consumido em poucos dias após a lesão, é necessário um mecanismo para síntese de nova glicose.

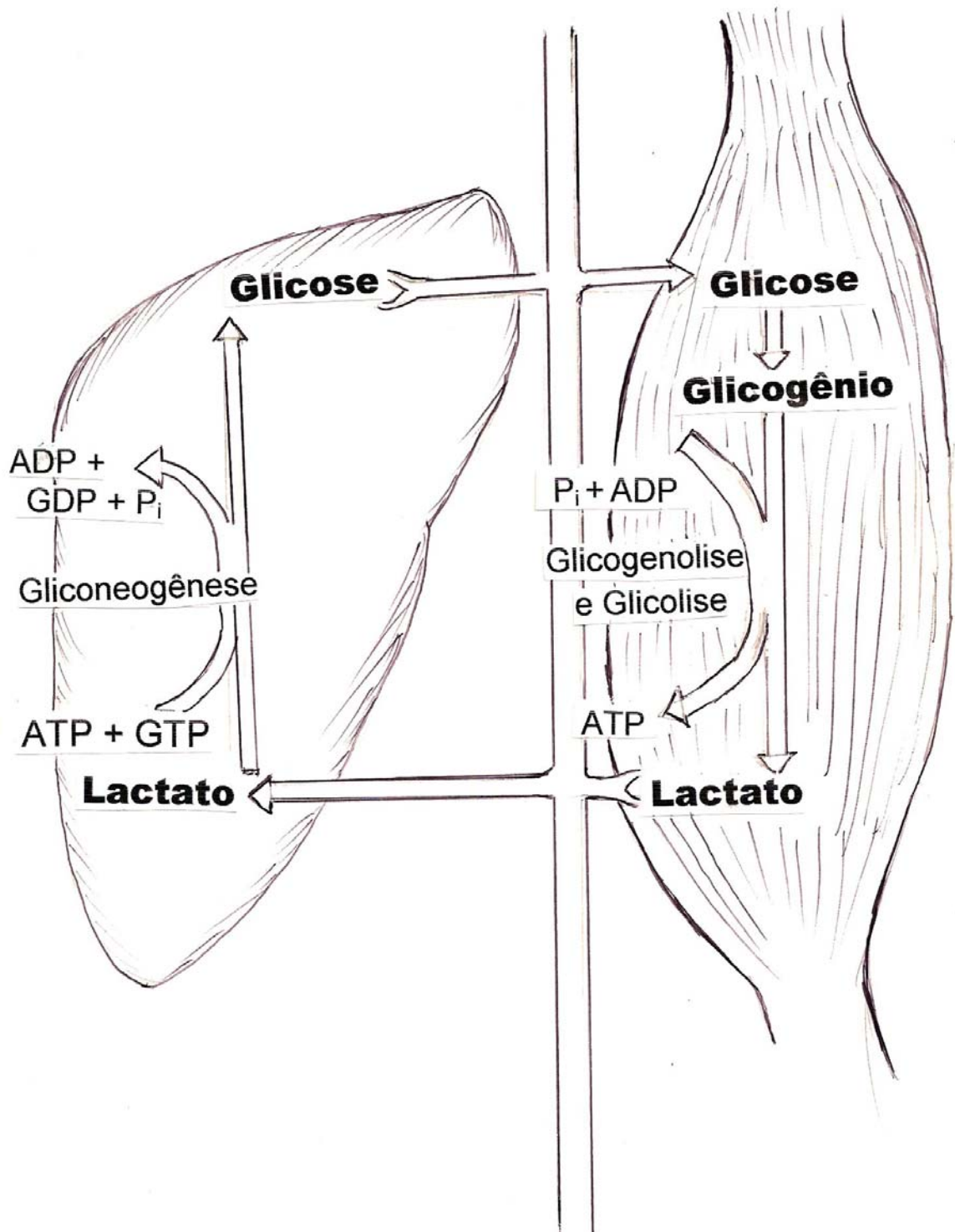


FIGURA 9 – Ciclo Glicólise/Gliconeogênese (Ciclo de Cori)

No presente estudo a oferta de L-arginina não causou alteração na glicemia dos animais do GE em comparação à concentração de glicose nos animais do GC. (TABELAS 1 e 7 e GRÁFICOS 1 e 7) Silva et al.(2001) encontraram redução na glicemia de animais recipientes de L-arginina (5% do valor calórico total por dia) durante 7 dias(TABELAS 1 e 2 e GRÁFICOS 1 e 2). Estes autores sugeriram que a redução da glicemia seria resultante da ação secretagoga de L-arginina decorrentes do aumento de insulina e IGF-1.

No presente estudo não houve alteração na glicemia, porém verificou-se a queda significativa na concentração sanguínea de lactato e piruvato nos animais tratados com suplementação alimentar de L-arginina no 14º pós-operatório. Segundo Freitas et al. (1991), das fases de resposta metabólica ao trauma, seria esta (do 14º pós-operatório), a fase hipermetabólica ou catabólica. Esta fase se caracteriza por aumento no gasto energético, quebra dos tecidos corporais, especialmente da proteína, e aumento na concentração sanguínea de lactato, insulina e glucagon (BASILE, 1980).

O decréscimo nas concentrações sanguíneas de lactato e piruvato, no presente estudo (TABELAS 2 e 3 e GRÁFICOS. 2 e 3), podem refletir ação anabólica da oferta exógena de L-arginina, sendo tais substratos captados e mais intensamente utilizados por tecidos periféricos (músculo e pele).

A queda significativa da concentração de metabólitos no sangue dos ratos do GE no 14º pós-operatório (TABELAS 2, 3, 4 e 5 e GRÁFICOS 2, 3, 4 e 5), na fase hipermetabólica e de proliferação do colágeno, sugere que houve atuação favorável anabólica da L-arginina secretagoga do GH e que possivelmente liberaria insulina e IGF-1, modulando a maior captação do piruvato e lactato por tecidos periféricos com conseqüente queda nas

concentrações desses metabólitos no sangue. Este fator de crescimento insulina símile está presente no fígado, plasma e fibroblastos, estimula a síntese de proteoglicanos sulfatados, colágeno e a proliferação de fibroblastos.

O tratamento com L-arginina pode induzir aumento de insulinemia no que pode levar a diminuição da síntese de corpos cetônicos com queda de cetonemia (TABELA 6 e GRÁFICO 6).

O aumento significativo nas concentrações de corpos cetônicos no retalho miocutâneo no 30º pós-operatório do GE em relação ao 7º pós-operatório do mesmo grupo (TABELA 12 e GRÁFICO 12), pode ser explicada por um maior anabolismo nos animais recipientes de L-arginina exógena com elevação da captação e utilização desses metabólitos por tecidos em cicatrização.

No presente estudo L-arginina causou redução significativa da concentração de acetoacetato, na pele, no 7º e 14º dia pós-operatórios. Tal fato pode sugerir aumento da utilização deste metabólito pela cicatriz do retalho miocutâneo de animais do GE (TABELA 10 e GRÁFICO 10). Entretanto, a oferta de L-arginina não causou nenhuma diferença nas concentrações de 3-hidroxi-butirato e de corpos cetônicos, na cicatriz do retalho miocutâneo, em nenhum dos tempos estudados quando comparados a animais do grupo GE e GC (TABELAS 11 e 12 e GRÁFICOS 11 e 12).

A L-arginina é precursora de óxido nítrico (NO). Sabe-se que a NO sintetase resultante do estresse cirúrgico, facilita a síntese do óxido nítrico (NO), mediante seqüência específica, a partir do radical guanidino da arginina, agindo como inibidor da trombose e da agregação plaquetária, condicionando aumento do fluxo sanguíneo nos tecidos em cicatrização. A

medida da oxigenação no local da ferida cirúrgica propicia a epitelização e o aumento da força tênsil da cicatriz por formação de colágeno mais estável, auxiliando a quimiotaxia e facilitando, assim, o processo cicatricial (MODOLIN, 1985; FAINTUCH, 1995; COHEN, 1999).

A atividade mitótica do fibroblasto no tecido de granulação começa a declinar a partir do 8º dia e, praticamente desaparece por volta do 15º dia após seu advento. É, então que os fibroblastos começam a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação e de modo semelhante a um processo de usinagem bioquímica, produzem os componentes da substância fundamental e o colágeno (MODOLIN, 1985). Atualmente admite-se que os miofibroblastos sejam as células contráteis e que o colágeno seria o responsável por mantê-los em posição nos tecidos recém-contráídos. A contração é caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas; é máxima cinco a 15 dias após a lesão e contribui para o fechamento efetivo desta. O processo de remodelação é lento, a força tênsil, que depende basicamente do colágeno, leva tempo para se desenvolver. Duas semanas após a lesão a cicatriz é frágil e tem 5% da força tênsil normal. Esta aumenta progressivamente até o 1º ano após a lesão, mas terá sempre, no máximo, 80% da força tênsil normal (GABBIANI, 1971; COHEN, 1979; GOSLEN, 1988; CORSI, 1994).

No presente estudo a oferta de L-arginina provocou aumento significativo na pressão de rotura da cicatriz intestinal no 14º pós-operatório (TABELA 13 e GRÁFICO 13).

Foram excluídos da amostra animais cujas alças intestinais, contendo cicatriz de enterotomia, apresentaram vazamento de ar nas extremidades das alças ligadas, durante o teste de rotura (5 animais do GC e 5

animais do GE) (TAB.13). A enterotomia a 6cm do que seria o ângulo de Treitz, evitando as placas de Payer (que representam acúmulo de tecido linfóide) (FIG.17), foi realizada em sentido longitudinal na borda anti-mesentérica do jejuno preservando a vascularização de cada uma das faces da alça intestinal (FIG.17). O epitélio gastrointestinal apresenta a maior taxa de renovação celular de todos os tecidos do organismo (IGLESIAS, 1998).

A evolução cicatricial das feridas cutâneas intestinais apresentam semelhanças embora existam diferenças metabólicas importantes. Porém, a força tênsil em anastomoses intestinais se desenvolve mais rapidamente do que a força tênsil cutânea. (BIONDO-SIMÕES, 1998). O aumento da pressão de rotura da cicatriz intestinal significa que durante a fase da cicatrização, dita de fibroplasia ou proliferativa (14^o dia), houve atuação anabólica favorável por parte da oferta exógena de L-arginina.

Sabe-se que a L-arginina é precursora para a síntese de prolina e hidroxiprolina, que participam da formação de colágeno (molécula com alternância de cadeias peptídicas que se distribuem na seqüência Prolina-Glicina-Hidroxiprolina e Lisina- Glicina-Hidroxilisina) que assegura força, e integridade aos tecidos. Este fato pode ter contribuído para o aumento da pressão de rotura da cicatriz intestinal de animais recipientes deste aminoácido (BARBUL et al., 1977).

Os resultados sugerem que a suplementação alimentar de L-arginina através de sua ação anabólica teria efeito sobre as concentrações de substratos e sobre a cicatrização intestinal e cutânea-muscular.

A atuação da L-arginina como coadjuvante no tratamento de portadores de trauma é um tema para estudos experimentais e clínicos que

desperta o interesse de todas as especialidades médicas. O controle da cicatrização é um antigo desejo da humanidade que será realizado pela ciência, com a somatória de novos conhecimentos, na eterna luta para ultrapassar seus limites.

7 CONCLUSÃO

1 A suplementação alimentar de L-arginina induz uma redução significativa nas concentrações sanguíneas de piruvato, lactato e corpos cetônicos no 14º dia de pós-operatório.

2 A suplementação alimentar de L-arginina induz um aumento significativo nas concentrações tissulares de corpos cetônicos no 30º dia de pós-operatório.

3 A pressão de rotura da cicatriz operatória intestinal foi maior no 14º dia pós-operatório em animais do grupo experimental recipientes de L-arginina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APRILLI, F. Anastomoses intestinais. In: CASTRO E SILVA JR., O. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 38, p. 421-432.

ARRUDA VEIGA, M. C. F.; SANTOIA, A. C.; JOSÉ, J. L. Influência do teor protéico da dieta sobre a gênese do tecido de reparo em retos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 42, p. 414-19, 1992.

BANDT, de J. P. Amino acids with anabolic properties. **Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 1, n. 3, may., 1998.

BARBUL, A. Biochemistry, physiology and therapeutic implications, **J Parenter Enteral Nutr**, v. 10, p. 227-38, 1986.

BARBUL, A. *et al.* Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. **Surgery**, v. 108, p. 331-37, 1990.

BARBUL, A. *et al.* Metabolic and immune effects of arginine in post-injury hyperalimentation. **J Trauma**, 1981; 21: 970-4.

BARBUL, A.; RETTURA, G.; LEVENSON, S. M.; SEIFER, E. Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent. **Surgical Forum**, v. 28, p. 101-03, 1977.

_____. Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. **Am J Clin Nutr**, v. 37, p. 786-94, 1983.

BARBUL, A.; WASSERKRUG, H.; RETTURA, G.; LEVENSON, S. M.; EFRON, G. Immunoestimulatory effects of arginine in normal and injured rats. **J Surg Res**, v. 29, p. 228-35, 1980.

BASILE FILHO, A.; SANTOS, J. E. Avaliação do estado nutricional do paciente cirúrgico. In: Manual de Suporte Nutricional no Paciente *Cirúrgico*. Eds. BASILE FILHO, A. e SANTOS, J., pp.39-40, Hospital das Clínicas: UNICAMPI, Campinas, São Paulo, 1988.

BEVILACQUA, R. G.; MODOLIN, M.; BEVILACQUA, L. R.; MASPES, V.; GONÇALVES, E. L.; MARGARIDO, N. F. Estudo experimental dos

efeitos da indometacina sobre a contração das feridas abertas. **Rev Paul Med**, v. 106, p. 105-08, 1988.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Cicatrização. In: CASTRO E SILVA JR., O. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 23, p. 265-74.

BRENDA, E. Ferimentos Excisionais Tratados por Minoxidil em Ratos. **Revista brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 6, n. 3, p. 69-72. 1991.

CARREL, A. The treatment of wounds. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 15, n. 25, p. 2148-50, 1910.

COHEN, K., *et al.* Wound care and wound healing. In: SCHWARTZ, S. I. **Principles of surgery**. 7.ed. New York: McGRAW-HILL, 1999. 1296p. Cap. 8, p. 263-95.

COHEN I. K.; MOORE C. K., Diogelmann RF. Onset and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, 1988.

CORSI, R. C. C. Efeito do uso prolongado da ciclosporina A sobre a cicatrização da pele: aspectos clínicos e histológicos. São Paulo, 1998. 239p. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

CORSI, R. C. C. *et al.* Cicatrização das feridas – Revisão da literatura. **Rev. Bras. Cir.**, v. 84, p. 19-53, 1994.

DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 307 p.

DORLAND, W. A. N. **Illustrated Medical Dictionary**. 28. ed. Saunders, 1994.

ELSAIR, J. *et al.* Effect of arginine chlorhydrate on nitrogen balance during the three days following routine surgery in man. **Biomedicine**, 1978; 29: 312-7.

ESPERANÇA, J. C. P. Patologia, lesão e restauração. In: FREIRE E. **Trauma: a doença do século**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. Cap. 5, p. 103-159.

FAINTUCH, J.; FAINTUCH, J. Efeitos cardiovasculares da arginina e do óxido nítrico. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v. 50, p. 334-38, 1995.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigation. In: ALTMAN, P. I.; KATZ, D. D. (Eds.) – Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, mouse and rat. Bethesda, **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, v. 1, p. 237-38, 1979.

FREITAS, J. X. R. *et al.* Trauma. In: Suporte Nutricional. Rio de Janeiro: Ed. Riela M. C. Guanabara Koogan, Cap. 26, p. 306-314, 1991.

GABBIANI G.; RYAN G. B.; MAYNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 102: 103.

GARCIA, J. H. P. **Alterações metabólicas induzidas por isquemia hepática normotérmica experimental.** Fortaleza, 1994. 122p. Tese (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará.

GUIMARÃES, S. B. **Estudo experimental das alterações agudas na glicemia e concentrações testiculares de ATP e glicose induzidas por torsão unilateral *in vivo*.** Fortaleza, 2002. 75p. Tese (Mestre em cirurgia) Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará.

HARKNESS, John E.; WAGNER, Joseph E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores.** 3. ed. São Paulo: Roca, 1993.

HOLANDA, L. A. C. *et al.* O açúcar granulado no tratamento das infecções tegumentares. **Ceará Médico**, n. 1-2, p. 36-38, 1984.

IGLESIAS, A. C. R. G. *et al.* Modelos experimentais para estudo da adaptação intestinal. In: CASTRO E SILVA JR., O. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia.** São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 3, p. 389-404.

JUVA, K.; PROCOP, D. J. Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen. *Science*, 152: 92-4, 1966.

KIRK, S. J.; BARBUL, A. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. **JPEN**, v. 14 (5suppl), p. 227-38, 1990.

KREISEL, U.; SAKAGUTE, L. H.; ROSELINO, J. E. S. Evolução dos conceitos bioquímicos da enzimologia à biologia molecular. In: CASTRO E SILVA JR., O. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia.** São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 2, p. 31-62.

LEITE, C. V. S., *et al.* Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon distal no rato. Estudo da Força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, p. 145-50, 1993.

LEON, P. *et al.* Arginine supplementation improves histone and acute phase protein synthesis during gram-negative sepsis in the rat. **JPEN**, 15: 503, 1991.

LODOVICI, O. Cicatrização das feridas. **Arq. Hosp. Santa Casa São Paulo**, v. 20, p. 115-20, 1974.

LYONS, A. S.; PETRUCELLI, R. J. **Medicine an illustrated history**. New York: Harry N. Abrams, Inc., 1987.

McDOWELL, F. **The source book of Plastic Surgery**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1977.

MODOLIN, M. L. A.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. **Rev Bras Clín Terap**, v. XIV, n. 6, p. 208, 1985.

MODOLIN, M. L. A.; BEVILACQUA, R. G.; MARGARIDO, N. F.; GONÇALVES, E. L. Cicatrização das feridas abertas na desnutrição com hipoproteinemia. Estudo experimental. **Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo**. v. 37, p. 275-78. 1982.

MODOLIN, M. L. A.; GEMPERLI, R.; PIGOSSI, N.; LODOVICI, O. Efeitos da triamcinolona (acetil-triamcinolona) sobre as cicatrizes queloidianas. **Rev Paul Med**, v. 102, p. 163-65, 1984.

MURRAY, J. E.; MULLIKEN, J. B. Princípios gerais de cirurgia plástica. **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte**, v. 57, p. 849-53, 1977.

NIXON, D., HEYMAFIELDS, S., COBEN, A., *et al.*: Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. **Am J Med**, v. 68, p. 683-690, 1980.

NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256. Brasília, 1999. 141p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

OLDS, Ronald J.; OLDS, Joan R. **A colour atlas of the rat: dissection guide**. London: Medical Publications, 1979.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit Car Med**, v. 16, p. 899-908, 1998.

PANDO, J. C. Patologia e restauração. In: FREIRE, E. Trauma a doença dos séculos. Atheneu, 2001. v.1, Cap. 5, p. 103-59.

PEACOCK, E. E. **Repair and regeneration**. In: Reconstructive Plastic Surgery. 2.ed. New York: W. B. Saunders Company, 1977. 595p. Cap. 3. p. 78-103.

POLK JR., H. C.; LOPEZ-MAYOR, J. F. Postoperative wound infection: a prospective study of determinant factors and prevention. **Surgery**, 1969; 66: 103.

RAKOFF, J. S.; SILER, T. M.; SINHA, Y. N.; YEN, S. S. C., Prolactin and growth hormone release in response to sequential stimulation by arginine and synthetic TRF. **J Clin Endocrin Metab**, v. 137, p. 641-44, 1973.

RAMALHO, Ramon *et al.* Enxerto epidermogorduroso e suas aplicações. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.** São Paulo, v. 1, n. 2, p. 55-70 mai./ago., 1997. p. 65-70.

REGADAS, F. S. P. *et al.* Estudo comparativo entre as suturas contínua e separada em anastomose cólica. Trabalho experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.5(4), n.1, p.141-46, 1990.

RIBEIRO, F. J. C. **Avaliação qualitativa e quantitativa da resposta inflamatória comparando a ação do fio de polipropileno com o fio de poligliconato em anastomoses realizadas em colos de ratos**. Fortaleza, 1998. 125p. Tese (Mestrado em cirurgia). Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará.

ROSE, W. C. The amino acid requirements of man. **Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol**, v. 8, p. 546-52, 1949.

_____. The nutritive significance of the amino acids and certain related compound. **Science** (Washington DC), v. 86, p. 298-300, 1937.

RUISSEAU, J.P.D.U.; GRENSTEIN, J.P.; WINITZ, M.; BIRNBAUM, S. M. Studies on the metabolism of amino acids and related compounds in vivo VI. Apud FAINTUCH. Free amino acid levels in the tissue of rats protected against ammonia toxicity. **Arch Biochem Biophys** 68: 161-171, 1957.

SILVA, Lúcio Flávio Gonzaga **Repercussão da terapia nutricional enteral, enriquecida com L-arginina, sobre o metabolismo de ratos Wistar portadores de tumor de Walker implantado no rim.** Fortaleza, 1998. 174p. Tese (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

STEPHENSON, K. L. Suturas. **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte**, v. 57, p. 863-73, 1977.

THORWALD, J. O século do cirurgião. In: **Biblioteca de seleções.** Rio de Janeiro: Editora Ypiranga, 1959, p.167-315.

_____. **O segredo dos médicos antigos.** 2.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 319p.

VANNUCCHI, H.; IGLESIAS, A. C. R. G.; JORDÃO JR., A. A. Nutrição e avaliação do estado nutricional de animais de laboratório. In: CASTRO E SILVA JR., O. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia.** São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 8, p. 110-34.

VASCONCELOS, P. R. L. Hepatic metabolism during sepsis. Oxford, 1987. 267p. Tese (Doutorado em Filosofia) University of Oxford.

VOET, Donald, VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: ARTMED Editora, 2000.

WELLE, Steplem. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 as anabolic agents. **Lippincott-Raven Publishers.** n. 950 Uiversit of Rochester: Ney York, 1998.p. 257-262.

WILLIAMSON, R. C. Torsion of the testis and allied conditions. **Br. J. Urol.**, v. 63, n. 6, p. 465-76, 1976.

ANEXOS

TABELA 1 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Glicose no sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	4,067 \pm 0,525 (8)	4,607 \pm 0,430 (8)	3,585 \pm 0,438 (8)
Grupo E	3,910 \pm 0,353 (8)	3,455 \pm 0,929 (8)	3,125 \pm 0,810 (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

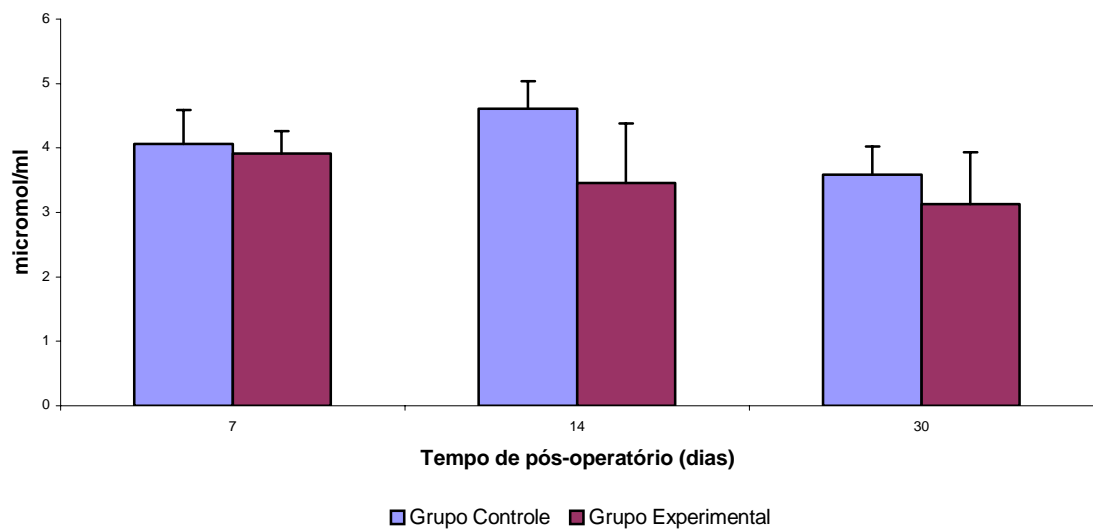


FIGURA 1 - Concentração (micromol/ml) de Glicose no Sangue

TABELA 2 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Piruvato no Sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	$0,429 \pm 0,070$ (8)	$1,597 \pm 0,414$ ** (8)	$0,722 \pm 0,447$ + (8)
Grupo E	$0,646 \pm 0,145$ (8)	$0,453 \pm 0,125$ * (8)	$0,766 \pm 0,265$ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo GC

** $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

+ $p < 0,05$ em relação ao 14º dia do mesmo grupo

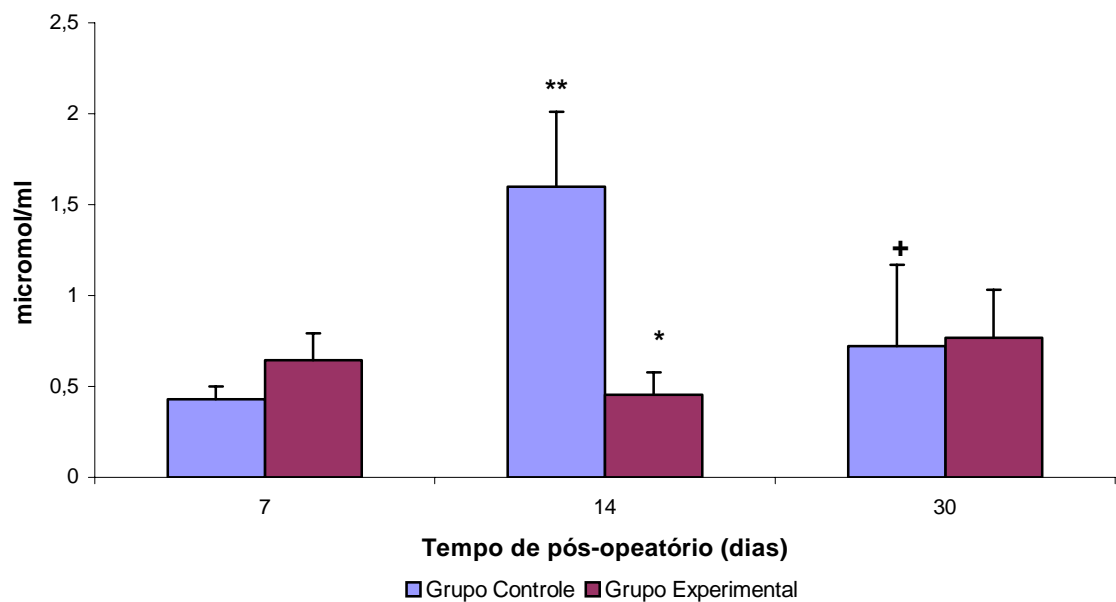


FIGURA 2 - Concentração (micromol/ml) de Piruvato no Sangue

TABELA 3 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Lactato no Sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	$3,629 \pm 0,862$ (8)	$7,795 \pm 0,507$ ** (8)	$4,796 \pm 0,326$ + (8)
Grupo E	$4,598 \pm 0,631$ (8)	$5,103 \pm 0,787$ * (8)	$4,700 \pm 0,794$ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

** $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

+ $p < 0,05$ em relação ao 14º dia do mesmo grupo

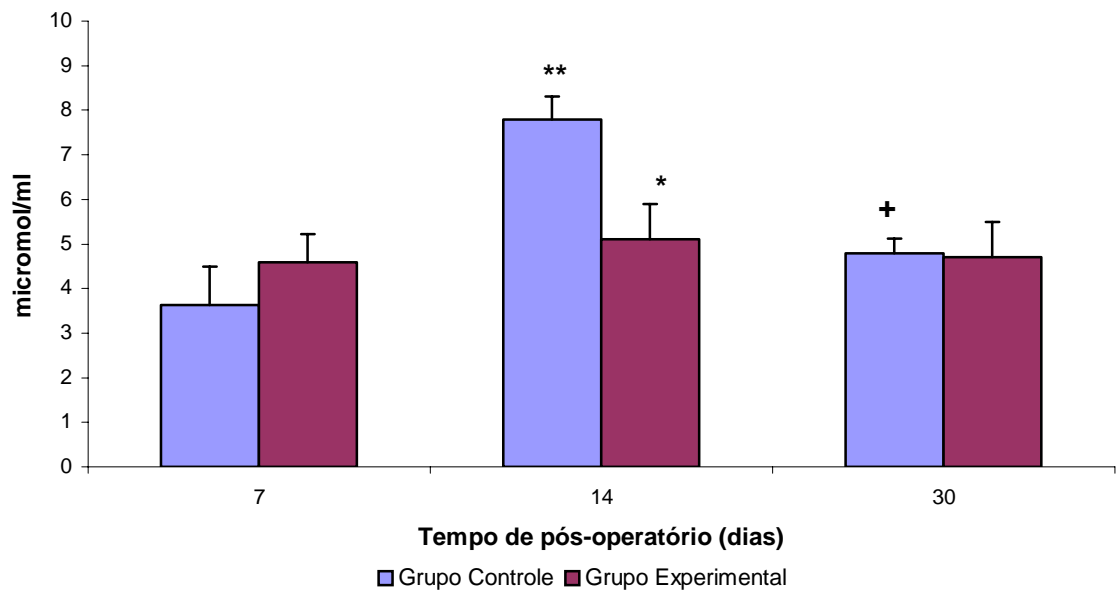


FIGURA 3 - Concentração (micromol/ml) de Lactato no Sangue

TABELA 4 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Acetoacetato no Sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	0,226 \pm 0,086 (8)	0,426 \pm 0,041 + (8)	0,144 \pm 0,036 ++ (8)
Grupo E	0,284 \pm 0,049 (8)	0,174 \pm 0,022 * (8)	0,134 \pm 0,031 ** (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

** $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

+ $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

++ $p < 0,05$ em relação ao 7º dia no mesmo grupo

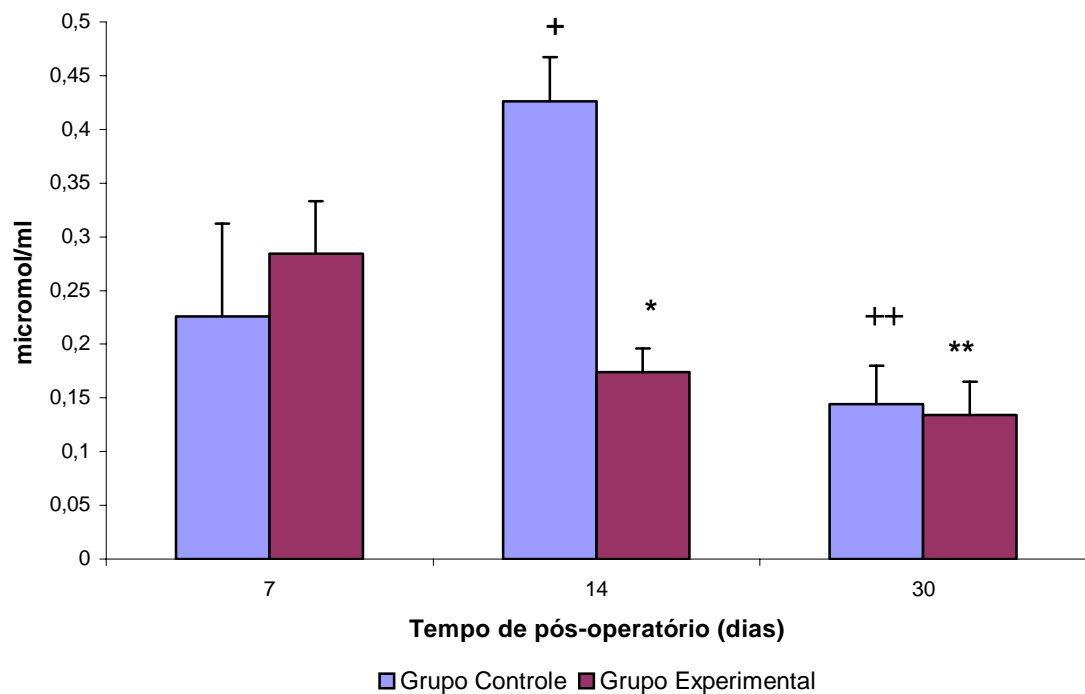


FIGURA 4 - Concentração (micromol/ml) de Acetoacetato no Sangue

TABELA 5 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Hidroxibutirato no Sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	$0,239 \pm 0,049$ (8)	$0,331 \pm 0,049$ (8)	$0,341 \pm 0,062$ (8)
Grupo E	$0,213 \pm 0,067$ (8)	$0,142 \pm 0,048$ * (8)	$0,276 \pm 0,062$ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

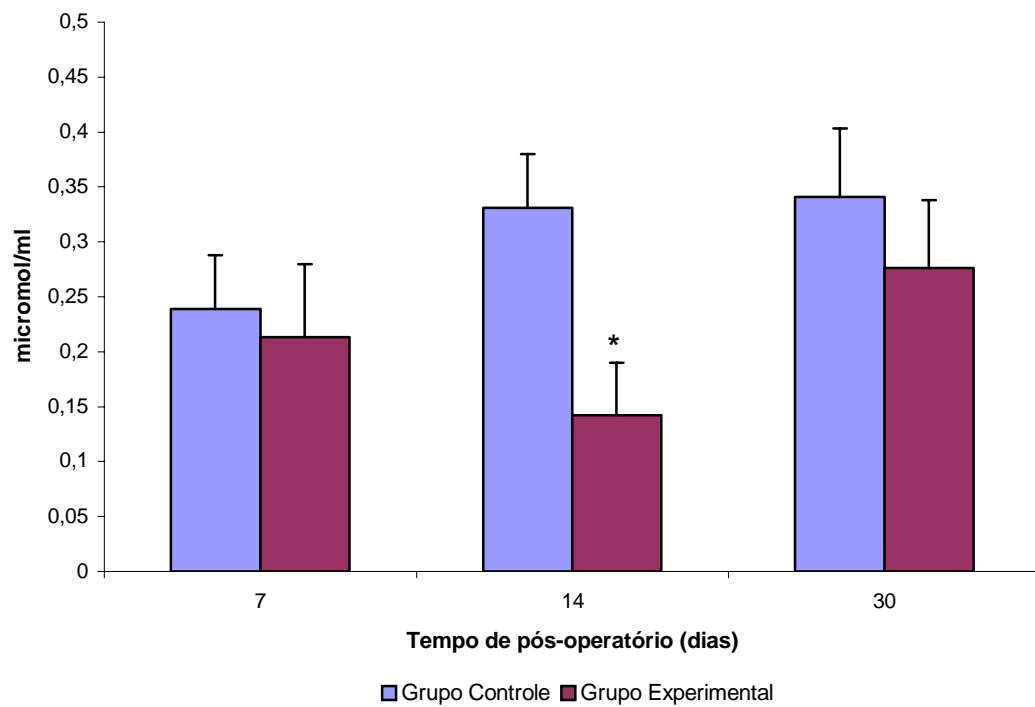


FIGURA 5 - Concentração (micromol/ml) de Hidroxibutirato no Sangue

TABELA 6 - Concentração ($\mu\text{mol/ml}$) de Corpos Cetônicos no Sangue

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	0,466 \pm 0,091 (8)	0,725 \pm 0,070 (8)	0,504 \pm 0,286 (8)
Grupo E	0,516 \pm 0,054 ** (8)	0,325 \pm 0,064 * (8)	0,488 \pm 0,093 (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

** $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

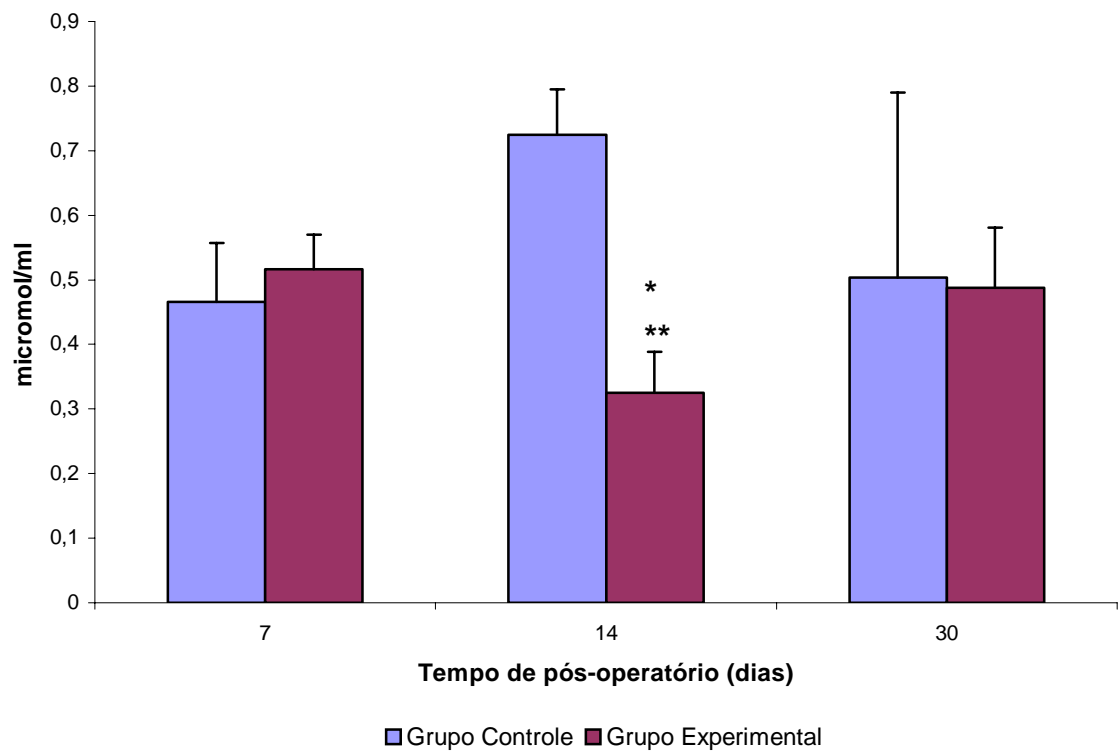


FIGURA 6 - Concentração (micromol/ml) de Corpos Cetônicos no Sangue

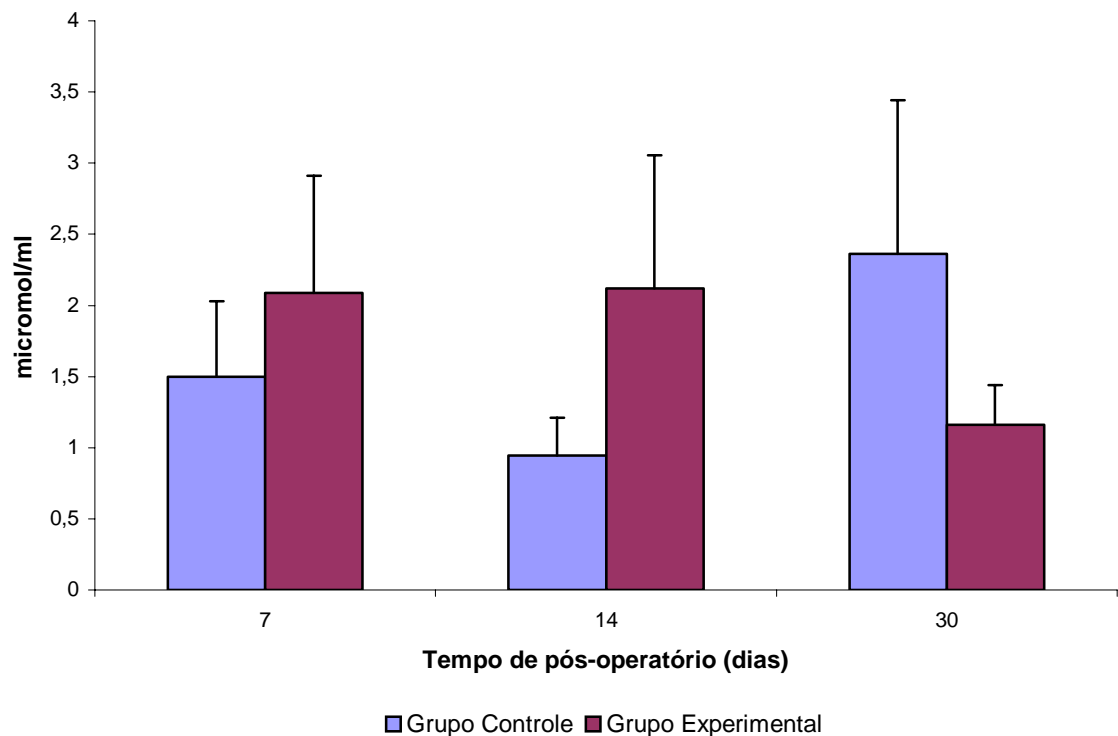
TABELA 7 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Glicose em Cicatriz no Retalho miocutâneo

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	1,497 \pm 0,534 (8)	0,943 \pm 0,269 (8)	2,360 \pm 1,080 (8)
Grupo E	2,089 \pm 0,821 (8)	2,120 \pm 0,934 (8)	1,159 \pm 0,283 (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney



FIGUIRA 7 - Concentração (micromol/ml) de Glicose em Cicatriz de Retalho Miocutâneo

TABELA 8 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Piruvato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	0,587 \pm 0,176 (8)	0,719 \pm 0,148 (8)	0,719 \pm 0,169 (8)
Grupo E	0,974 \pm 0,216 (8)	1,615 \pm 0,714 (8)	1,068 \pm 0,226 (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

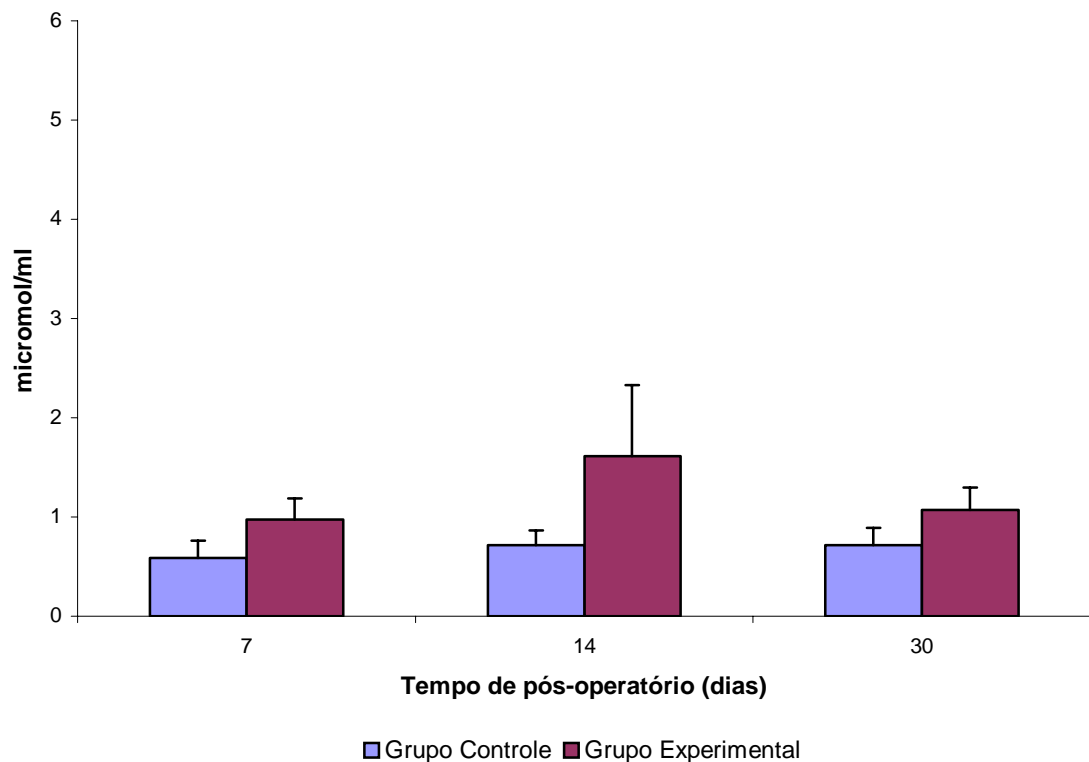


FIGURA 8 - Concentração (micromol/ml) de Piruvato em Cicatriz de Retalho Miocutâneo

TABELA 9 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Lactato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	$3,286 \pm 0,86$ (8)	$1,747 \pm 0,965$ (8)	$1,686 \pm 0,626$ (8)
Grupo E	$2,748 \pm 0,968$ (8)	$2,253 \pm 0,709$ (8)	$2,458 \pm 0,814$ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

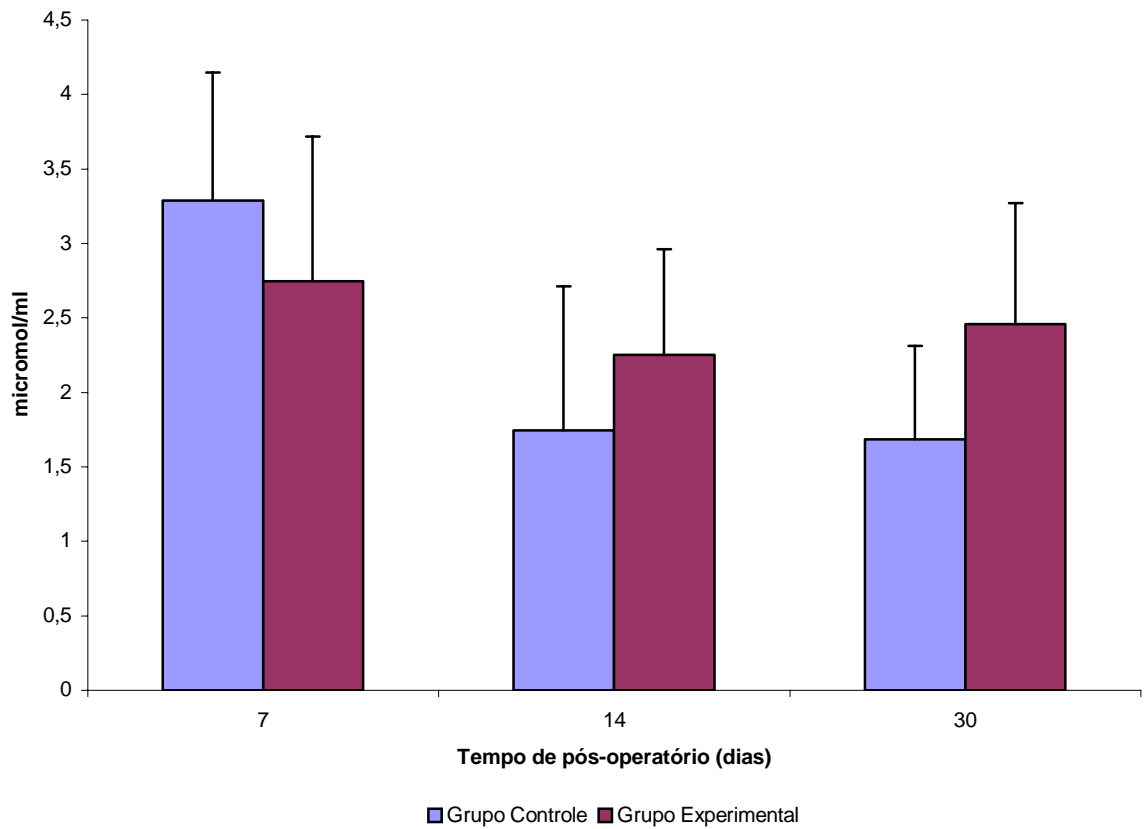


FIGURA 9 - Concentração (micromol/ml) de Lactato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo

TABELA 10 - Concentração ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de tecido) de Acetoacetato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	0,382 \pm 0,097 (8)	0,438 \pm 0,124 (8)	0,391 \pm 0,075 (8)
Grupo E	0,058 \pm 0,011 ** (8)	0,144 \pm 0,081 * (8)	0,425 \pm 0,069 ++ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

** $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle

+ $p < 0,05$ em relação ao 14º dia do mesmo grupo

++ $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

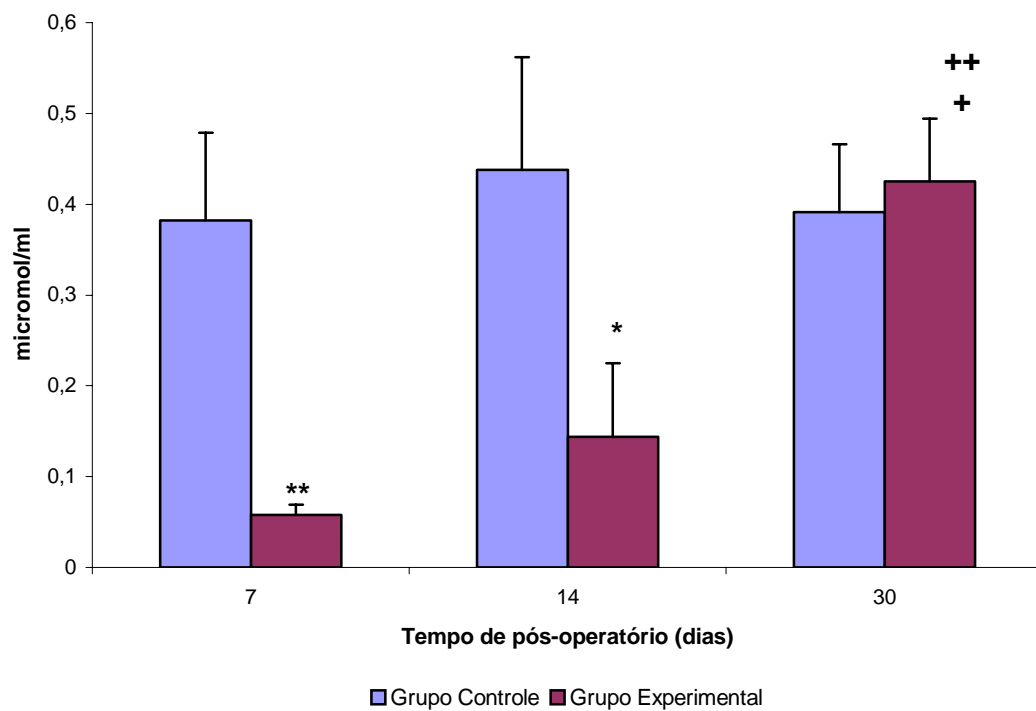


FIGURA 10 - Concentração (micromol/ml) de Acetoacetato em Cicatriz de Retalho Miocutâneo

TABELA 11 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de 3-Hidroxiacetato em Cicatriz do Retalho Miocutâneo.

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	$0,058 \pm 0,039$ (8)	$0,025 \pm 0,017$ (8)	$0,059 \pm 0,019$ (8)
Grupo E	$0,106 \pm 0,038$ (8)	$0,038 \pm 0,016$ (8)	$0,108 \pm 0,054$ (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

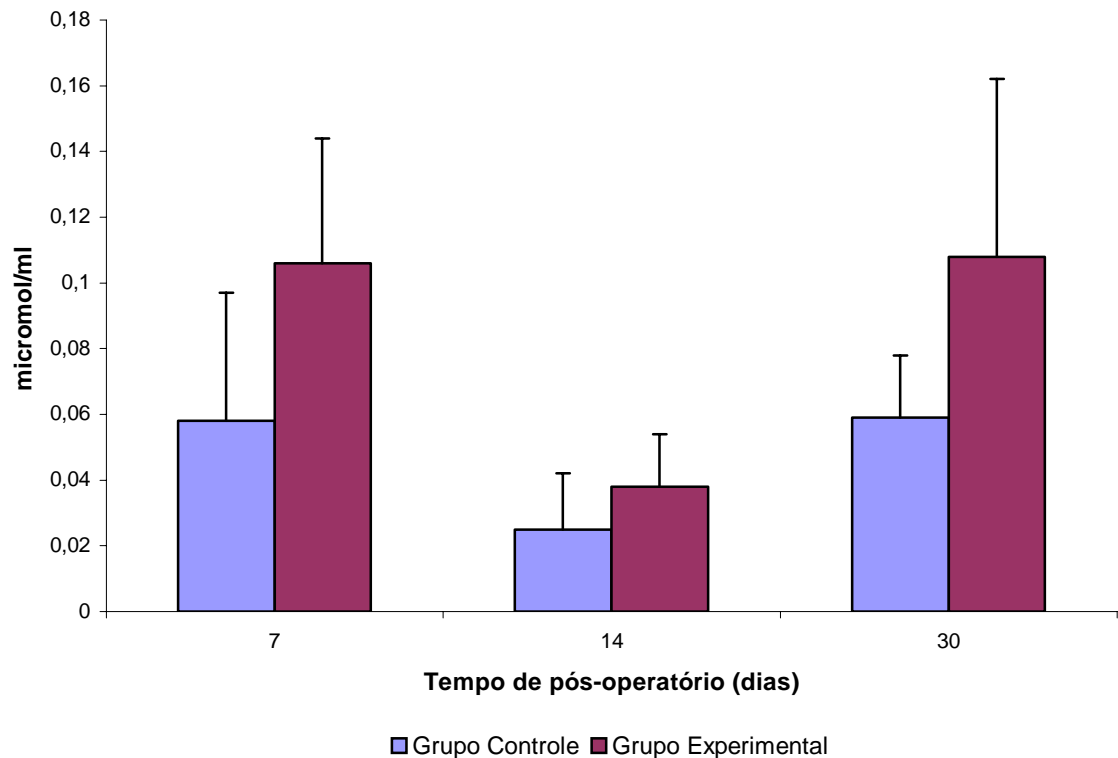


FIGURA 11 - Concentração (micromol/ml) de 3-Hidroxiacetato em Cicatriz de Retalho Miocutâneo

TABELA 12 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) de Corpos Cetônicos em Cicatriz do Retalho Miocutâneo

	Tempo de Pós-Operatório (dias)		
	7	14	30
Grupo C	0,448 \pm 0,117 (8)	0,476 \pm 0,135 (8)	0,451 \pm 0,085 (8)
Grupo E	0,164 \pm 0,045 (8)	0,238 \pm 0,115 (8)	0,525 \pm 0,101 * (8)

Grupo C – animais operados e alimentados com dieta suplementada com caseinato

Grupo E – animais operados e alimentados com dieta suplementada com arginina

Resultados expressos como média \pm E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* $p < 0,05$ em relação ao 7º dia do mesmo grupo

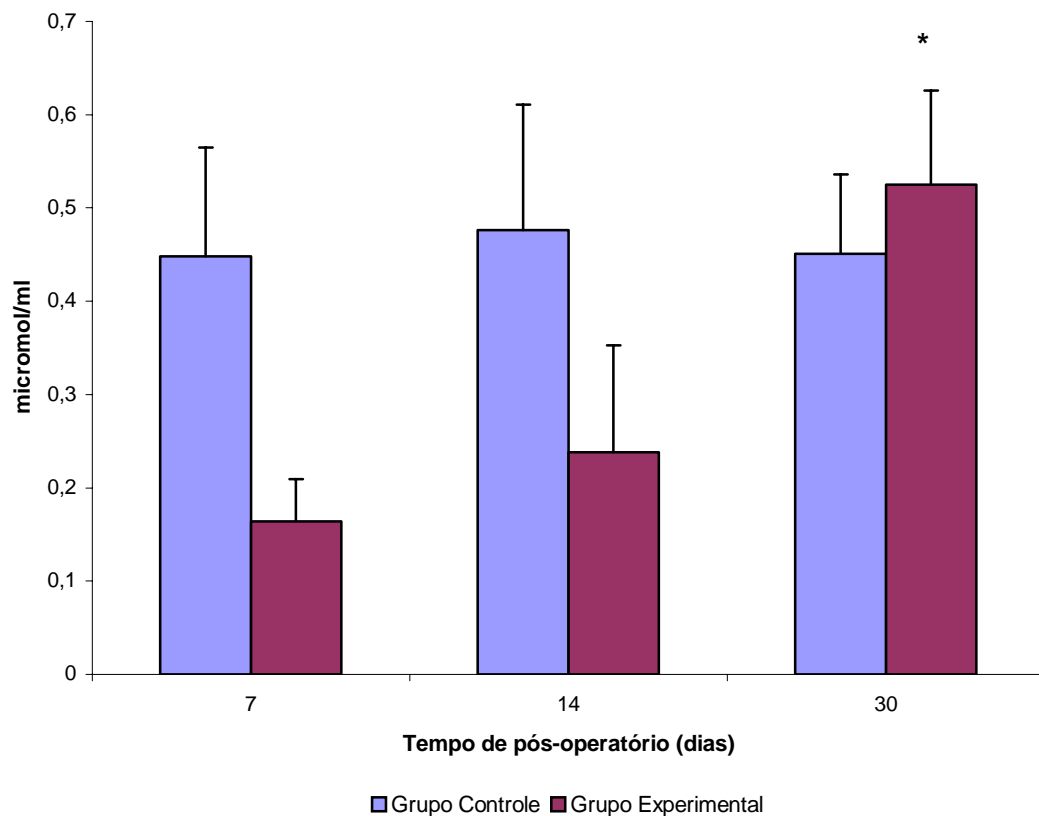


FIGURA 12 - Concentração (micromol/ml) de Corpos Cetônicos em Cicatriz de Retalho Miocutâneo

TABELA 13 – Medida da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal

	Intervalo (dias)		
	7	14	30
Grupo Controle	164,29 (7)	191,66 (6)	291,67 (6)
	±	±	±
	45,40	26,83	3,65
Grupo Experimento	227,14 (7)	275,00 (6)*	288,57 (6)
	±	±	±
	23,77	8,16	6,67

Resultados expressos como média ± E.P.M. com número de observações entre parênteses (n). Teste de Mann Whitney

* p <0,05 em relação ao respectivo grupo controle

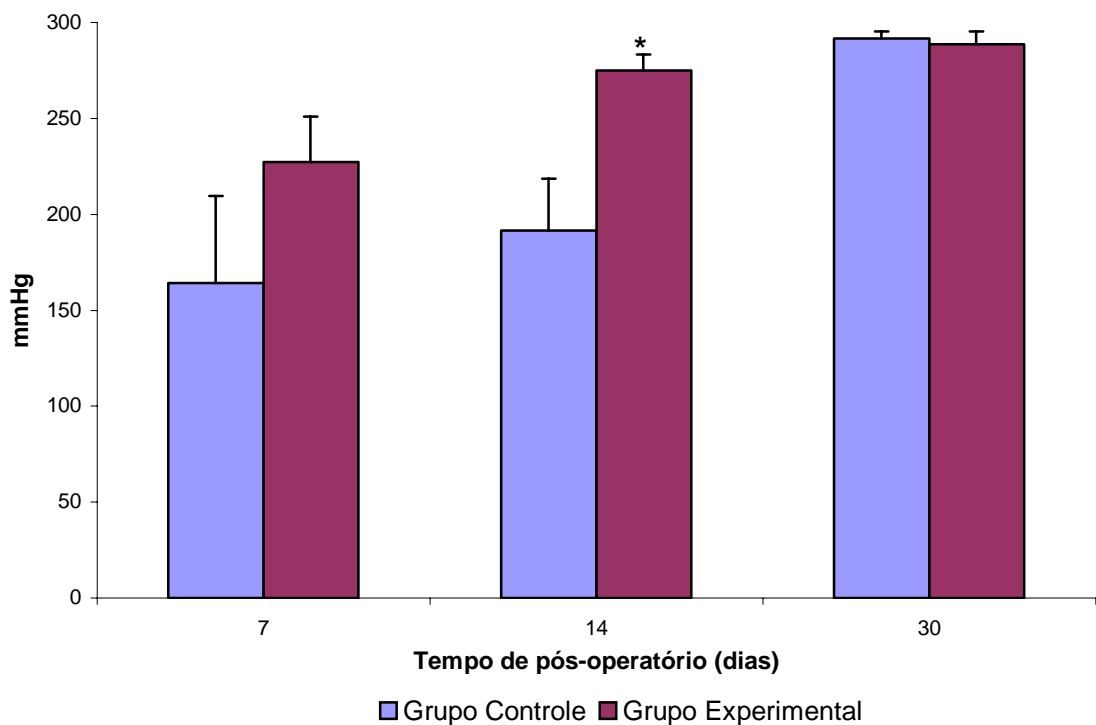


FIGURA 13 - Medida da Pressão de Rotura da Cicatriz Intestinal

