

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

**EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO LEITE ENRIQUECIDO COM ÔMEGA 9, 6 E 3 EM
RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA POR CONDUÇÃO DIRETA**

FORTALEZA
2018

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

**EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO LEITE ENRIQUECIDO COM ÔMEGA 9, 6 E 3 EM
RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA POR CONDUÇÃO DIRETA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão Vasconcelos

**FORTALEZA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C196e Campelo, Ana Paula Bomfim Soares.

Efeitos nutracêuticos do leite enriquecido com ômega 9, 6 e 3 em ratos submetidos à queimadura térmica por condução direta / Ana Paula Bomfim Soares Campelo. – 2018.
157 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

1. Queimadura. 2. Pele. 3. Ácido graxos. 4. Colágeno. 5. Nf-kB. I. Título.

CDD 617

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

**EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO LEITE ENRIQUECIDO COM ÔMEGA 9, 6 E 3 EM
RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA POR CONDUÇÃO DIRETA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Carmelo Silveira Carneiro Leão
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha
Centro Universitário Unichristus

Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita
Universidade Estadual do Ceará

**Ao Grande Arquiteto do Universo, pelas
oportunidades e pessoas que surgiram nesta
vida**

Aos meus pais JOSÉ ANTÔNIO SOARES E ANA MARIA SOARES pelos ensinamentos ao longo da minha vida.

Ao meu esposo MARCIO WILKER SOARES CAMPELO, pelo grande apoio, dedicação, companheirismo, paciência, amor e por suas palavras de incentivo nos diversos momentos que passamos e superamos juntos.

Ao meu primogênito MARCIO VICTOR WILKER SOARES CAMPELO, por ter crescido vivenciando todo processo do mestrado e doutorado, tendo paciência e amor comigo nos diversos momentos.

À minha grata surpresa de muito amor que chegou para alegrar mais a minha vida, meu caçulinha THIAGO PIETRO SOARES CAMPELO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, pesquisador e profissional competente, a quem, além da orientação do presente estudo, agradeço as oportunidades ao longo desses oito anos, confiança, apoio, atenção, por ter acreditado na viabilidade do nosso projeto desta forma contribuindo na minha formação profissional, acadêmica e pessoal.

Ao Professor Doutor JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA, pesquisador e profissional competente, pela colaboração, apoio, credibilidade e viabilizando a realização do projeto no biotério e no laboratório do Centro Universitário Unichristus, nosso eterno Obrigada.

Aos Professores Doutores CARMELO SILVEIRA CARNEIRO LEÃO FILHO, CHARLES JEAN GOMES DE MESQUITA e JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA, pela participação da minha banca de qualificação de doutorado, acrescentando muito a tese.

Ao Professor Doutor MARCIO WILKER SOARES CAMPELO, pesquisador e profissional competente, pela colaboração, apoio, ajuda na realização dos experimentos, histologia e imunohistoquímica. Agradeço por ter confiado e acreditado em mim.

À Professora Doutora GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, pela colaboração e assistência no laboratório de morfologia da UFC.

Ao Professor Doutor ALEJANDRO PEDRO AYALA, pela colaboração e apoio validando os parâmetros físico do equipamento utilizado nesta tese no laboratório de física do Departamento de Física da UFC.

À Professora Doutora FLÁVIA ALMEIDA SANTOS, pela colaboração, assistência e apoio na execução das dosagens bioquímicas.

Ao Professor Doutor FRANCISCO VAGNALDO FECHINNI JAMACARU, pelo apoio e presteza e participação deste estudo, acrescentando muito ao mesmo.

À pós-doutoranda ANA FLÁVIA SERAINE CUSTÓDIO VIANA pelo apoio na execução das dosagens bioquímicas.

Aos professores da Pós-Graduação em cirurgia que contribuíram para minha formação neste curso.

Ao mestrando DANIEL VIEIRA PINTO da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e assistência na realização de parte dos experimentos no LABCONTE.

Aos alunos da Graduação FRANCISCO EVANILSON SILVA BRAGA, GABRIEL MAIA DINIZ, VITOR HUGO SAAVEDRA e MILENA OLIVEIRA FREITAS do Centro Universitário Unichristus pela ajuda, dedicação e apoio na realização experimental deste estudo.

As técnicas de laboratório de Morfologia MARIA DO SOCORRO F. MONTE e CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS, pelo auxílio e apoio na realização da Imunohistoquímica.

Ao Sr. EMANUEL e seus assistentes técnicos do biotério e do laboratório de cirurgia experimental do Centro Universitário Unichristus, pela atenção e presteza com que ajudaram no cuidado com os animais.

Ao Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pelo cuidado, atenção e presteza com que atendeu às nossas solicitações.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Sra. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e Sra. MAGDA GOMES FONTENELE, pela boa vontade, apoio e dedicação.

A Empresa NVTRO e a equipe de nutricionistas, pelo apoio e preparação das misturas de óleos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro como a bolsa de estudo e taxa de bancada durante todo o curso.

À Funcap pelo apoio financeiro para finalização deste trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO LEITE ENRIQUECIDO COM ÔMEGA 9, 6 E 3 EM RATOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA POR CONDUÇÃO DIRETA. ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO. Pós-Graduação *Stricto-Sensu* do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas). Julho, 2018. Orientador Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

No presente estudo misturas de óleos foram usadas em concentrações nutricionais com alta proporção de ômega-9 : ômega-6, com propriedades antioxidantes e baixa relação ômega-6 : ômega-3, com propriedades antiinflamatórias. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do leite enriquecido com óleos de ω_9 , ω_6 e ω_3 (leite modificado) na queimadura térmica. Foram utilizados 48 ratos wistar, distribuídos em quatro grupos, subdivididos em dois tempos (3 dias e 21 dias). Os grupos foram os seguintes: Água, queimado água (Q + A), queimado + leite (Q + L), queimado + leite modificado (Q+LM), com doze animais em cada grupo. Foram administrados água, leite, leite modificado, durante vinte e um dias consecutivos, *ad libitum*, aos respectivos grupos após a indução da queimadura no dorso do animal que foi realizada com bloco de metal de 1 x 1 cm aquecido eletronicamente em 200°C. Foi avaliada a evolução da massa corpórea do animal, consumo de líquido, consumo de ração, involução da área queimada, espessura da pele reepitelizada, tipo de colágeno, expressão de NFkB, estresse oxidativo (dosagem da concentração do malonaldeído (MDA) e glutatona reduzida GSH; atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e catalase. No terceiro e no vigésimo primeiro dia (D3 e D21), conforme protocolo, os animais foram anestesiados, fotografadas as lesões, em seguida foram colhidas amostras para análise. O grupo Q+LM apresentou menor lesão da área de queimadura, menor espessura da epiderme e maior proporção do colágeno tipo I/III em relação aos demais queimados, concentração de MDA, GSH foi semelhante ao grupo Água e maior que os grupos QA+A e Q+L. A atividade das enzimas GPx e catalase, em tempos diferentes, foram maiores que o grupo Q+A e Q+L. A mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 diminuiu o tempo de cicatrização com melhor formação de colágeno, inibiu a expressão do NFk-B e reduziu o estresse oxidativo.

Descritores: queimadura; pele; ácido graxos; colágeno; NFkB; estresse oxidativo.

ABSTRACT

NUTRACEUTICAL EFFECTS OF MILK ENRICHED WITH ÔMEGA 9 6 AND 3 IN RATS SUBMITTED TO THERMAL BURNING BY DIRECT CONDUCT. ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO. *Stricto Sensu* post-graduation. Department of Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará (Degree of Doctor of science Medical-surgery). July 2018. Advisor: PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

In the present study mixtures of oils were used in nutraceutical concentrations with low ratio omega-9 : omega-3 with antioxidant properties, and low ratio omega-6 : omega-3 with anti-inflammatory properties. The aim of this study was to examine the effects of milk enriched with ω_9 , ω_6 and ω_3 (modified milk) oils in thermal burn. Forty-eight wistar rats, divided into four groups and followed two times (3 days and 21 days). The groups were as follows: Water, burned water (B+W), burned + milk (B+M), burned + modified milk (B+MM) with twelve animals in each group. Water, milk, and modified milk were administered for twenty-one consecutive days, *ad libitum*, to the respective groups after induction of burn on the animal's back which was performed with a 1 x 1 cm metal block heated electronically at 392 °F. The evolution of body mass, fluid intake, feed intake, burned area involution, reepitheIALIZED epidermis thickness, collagen type, NFk-B expression, oxidative stress (MDA), reduced glutathione (GSH), activity of the glutathione peroxidase (GPx) and catalase were evaluated. On the third and the twenty-first day (D3 and D21), the animals were anesthetized, photographs of the lesions, then skin samples were collected for analysis. The B+MM group had a lower macroscopic lesion, a lower epidermal thickness and a higher proportion of collagen type I/III than the other burned ones. The MDA, GSH concentration of the B+MM group were the same as the Water group. The B+W and B+M groups had higher concentrations of MDA than the Water group. The GSH concentration of the B+MM group was higher than the B+A and B+M groups. The activity of the GPx and catalase enzymes, at different times, were higher in the B+MM group of the B+W and B+M groups. The mixes of omega-9, 6 and 3 oils decreases healing time with better collagen formation, inhibits NFkB expression and reduces oxidative stress.

Keywords: burn; skin; fatty acid; collagen; NFkB; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático da pele	19
Figura 2.	Imagem histológica de pele queimada de rato Wistar	19
Figura 3.	Imagem de pele integra com aumento de 10x	23
Figura 4.	Imagem representativa dos tipos celulares e camadas da epiderme (estratos)	25
Figura 5.	Zonas da queimadura.	33
Figura 6.	Fases clássicas da cicatrização de feridas	35
Figura 7.	Relação entre agentes oxidantes e antioxidantes	40
Figura 8.	Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados	53
Figura 9.	Metabolismo dos eicosanóides	54
Figura 10.	Fluxograma experimental	62
Figura 11.	Ato anestésico no membro pélvico direito/face medial	63
Figura 12.	Preparo do local a ser realizada a queimadura	65
Figura 13.	Demarcação de área. Molde vazado confeccionado e caneta dermatográfica	65
Figura 14.	Antissepsia da pele com clorexidine 2%.	66
Figura 15.	Equipamento completo utilizado para realização da queimadura	67
Figura 16.	Realização da queimadura por 9 segundos	67
Figura 17.	Delimitação e cálculo da área de lesão	69
Figura 18.	Imagem do software Image J, utilizado o para quantificar a espessura da epiderme	70
Figura 19.	Imagem do Programa SAMM	72
Figura 20.	Resultado do primeiro passo, com densidade de área vermelha	73
Figura 21.	Imagem representativa do resultado do segundo passo	73
Figura 22.	Imagem do programa SAMM ao pressionar o icone Col III verde	74
Figura 23.	Imagem representativa da tela do sistema de análise morfológica	76
Figura 24.	Média massa corpórea dos animais no primeiro dia (D1), sétimo dia (D7), décimo quarto dia (D14) e vigésimo primeiro dia (D21)	82
Figura 25.	Consumo de líquido na primeira semana do experimento	83
Figura 26.	Consumo de líquido na segunda semana do experimento	84
Figura 27.	Consumo de líquido na terceira semana do experimento	85
Figura 28.	Média do consumo de líquido dos animais na primeira semana (1 sem), segunda semana (2 sem), terceira semana (3 sem)	86
Figura 29.	Consumo de ração na primeira semana (1º semana) do experimento	87
Figura 30.	Consumo de ração na segunda semana do experimento	88
Figura 31.	Consumo de ração na terceira semana do experimento	89
Figura 32.	Média do consumo de ração dos animais na primeira semana (1º sem), segunda semana (2º sem), terceira semana (3º sem)	90

Figura 33.	Área lesão da queimadura no primeiro dia do experimento	91
Figura 34.	Área de lesão da queimadura no sétimo dia do experimento	92
Figura 35.	Área de lesão da queimadura no vigésimo primeiro dia do experimento	93
Figura 36.	Comparação intragrupo da área de queimadura no primeiro dia (D1), sétimo (D7) e vigésimo primeiro (D21)	94
Figura 37.	Taxa de cicatrização entre o primeiro e o vigésimo primeiro dia do experimento	95
Figura 38.	Imagem representativa dos animais com seu respectivo tratamento e tempo de evolução	96
Figura 39.	Espessura da epiderme no vigésimo primeiro dia	97
Figura 40.	Quantificação do colágeno tipo I no vigésimo primeiro dia	98
Figura 41.	Imagem representativa de pele corada com <i>picrosirius red</i>	98
Figura 42.	Quantificação do colágeno tipo III no vigésimo primeiro dia	99
Figura 43.	Razão entre a porcentagem de colágeno tipo I e o tipo III no vigésimo primeiro dia	100
Figura 44.	Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no terceiro dia	101
Figura 45.	Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no vigésimo primeiro dia	102
Figura 46.	Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no terceiro dia e vigésimo primeiro	103
Figura 47.	Dosagem de MDA no terceiro dia	104
Figura 48.	Dosagem de MDA no vigésimo primeiro dia	105
Figura 49.	Dosagem de MDA no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental	106
Figura 50.	Dosagem de GSH no terceiro dia experimental	107
Figura 51.	Dosagem de GSH no vigésimo primeiro dia experimental	108
Figura 52.	Dosagem de GSH no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental	109
Figura 53.	Dosagem de GPx no terceiro dia experimental	110
Figura 54.	Dosagem da glutationa peroxidase no vigésimo primeiro dia experimental	111
Figura 55.	Atividade da glutationa peroxidase no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental	112
Figura 56.	Atividade da enzima catalase no terceiro dia experimental	113
Figura 57.	Atividade da enzima catalase no vigésimo primeiro dia experimental	113
Figura 58.	Atividade da catalase no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental	114

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Classificação dos óleos ômega em estudo	50
Quadro 2.	Divisão dos grupos e composição das misturas de óleos ômega	60
Quadro 3.	Composição do leite desnatado sem lactose e com adição da mistura de óleos ômega	61
Tabela 1.	Evolução da massa corpórea dos animais	82
Tabela 2.	Média do consumo de líquido em mililitros (ml) dos animais	83
Tabela 3.	Média do consumo de ração animais (em grama) por semana	87
Tabela 4.	Área de queimadura no primeiro dia (D1), sétimo (D7) e vigésimo primeiro (D21)	91
Tabela 5.	Taxa de cicatrização entre o primeiro e o vigésimo primeiro dia do experimento	95
Tabela 6.	Espessura da epiderme no vigésimo primeiro dia	96
Tabela 7.	Porcentagem do colágeno tipo I no vigésimo primeiro dia	97
Tabela 8.	Porcentagem do colágeno tipo III no vigésimo primeiro dia	99
Tabela 9.	Razão do colágeno tipo I / tipo III no vigésimo primeiro dia	100
Tabela 10.	Porcentagem de área marcada anti-NFkB no terceiro dia e vigésimo primeiro	101
Tabela 11.	Dosagem de MDA no terceiro e vigésimo dia experimental	104
Tabela 12.	Dosagem de GSH no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental	107
Tabela 13.	Dosagem de GPx no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental	109
Tabela 14.	Dosagem da atividade da enzima catalase no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental	112

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido araquidônico
AG – Ácidos graxos
AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI- Ácido graxo poliinsaturado
AA – Ácido araquidônico
ALA – Alfa linolênico
AL- Ácido linoléico
BSA – Albumina sérica bovina
CAT- Catalase
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX - Ciclooxigenase
D – Dia
DHA – Docosahexaenóico
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EPA – Eicosapentaenóico
EROS - Espécies reativas de oxigênio
ETA - Ácido eicosatrienóico
Et al – e colaboradores
GPx - Glutathione peroxidase
GSH - Glutathione reduzida
GST - Glutathione S transferase
H₂O₂ - Peróxidos de hidrogênio
HE – Hematoxilina eosina
HO - radical hidroxila
IL-1 – Interleucina 1
ω – Ômega
LO – Lipoxigenase
LT - leucotrieno
M – Misturas
MDA - Malondialdeído
NF-KB – Fator nuclear Kappa B
PBS – Solução tamponada de fosfato PG – Prostaglandina
P – Nível de significância estatística

PG - Prostaglandina

Q + A – Queimado + água

Q + L – Queimado + leite

Q + LM – Queimado + leite modificado

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

SAMM – Sistema de análise morfológica TX – Tromboxanos

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TNF α – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	Anatomia E Fisiologia Da Pele	22
1.2	Fisiopatologia Da Queimadura Térmica	30
1.3	Fisiologia Da Cicatrização De Feridas	34
1.4	Modelos Experimentais De Queimadura	48
1.5	Óleos: Ômega 9,Ômega 6 E Ômega 3	49
1.6	Justificativa Do Estudo	56
2	Objetivo	58
3	Método	59
4	Resultados	81
5	Discussão	115
6	Conclusão	133
	Referências	
	Anexo 1- Aprovação Do Comitê De Ética	
	Anexo 2 – Ata de aprovação	

1 INTRODUÇÃO

Queimaduras são lesões dos tecidos em decorrência de trauma de origem térmica resultante da exposição à chamas, líquidos ou superfícies quentes, frias, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção (MOZINGO *et al.*, 2005; American Burn Association, 2015).

Cerca de um milhão de pessoas sofrem queimaduras no Brasil a cada ano, de acordo com informações do Ministério da Saúde, sendo que 100.000 pacientes buscaram atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes foram a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões. As maiores vítimas, segundo o Ministério, são crianças e pessoas de baixa renda (BRASIL, MS, 2017).

No caso das crianças, se a queimadura atingir 10% do corpo, há risco de morte. Já em adultos, o risco existe se a área atingida for superior a 15% (BRASIL, MS, 2017).

Os acidentes por queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no país, perdendo apenas para os acidentes automobilísticos.

Entre as lesões por causas externas, a queimadura constitui a terceira causa de morte no Brasil; entretanto, ainda não se dispõe de um sistema eficiente de centralização de dados relativo às queimaduras, embora as estatísticas que existam revelem a gravidade dessas lesões.

Os gastos com hospitalização das vítimas de queimaduras no Brasil são exorbitantes e chegam a ser considerados incalculáveis por alguns autores (GOMES; MACIEIRA; SERRA, 2001; MACIEL; SERRA, 2004).

Mundialmente, estima-se em quatro milhões, as seqüelas resultantes de queimaduras, aproximadamente 70% em crianças. Anualmente mais de dois milhões de pessoas são vítimas de queimaduras nos EUA. Aproximadamente 25%

destes necessitam de tratamento em centros especializados de queimados (FERGUSON *et al.*, 1996). Em média 90% dos pacientes queimados têm, em maior ou menor grau, seu revestimento cutâneo atingido, alterando sua morfologia e função, sendo fundamental o conhecimento destas características na abordagem das queimaduras (BENSON; DICKSON; BOYCE, 2006).

Nos tecidos de revestimento, as queimaduras podem determinar destruição parcial ou total da pele e seus anexos, podendo atingir camadas mais profundas como o tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos (ver figura 1 e 2).

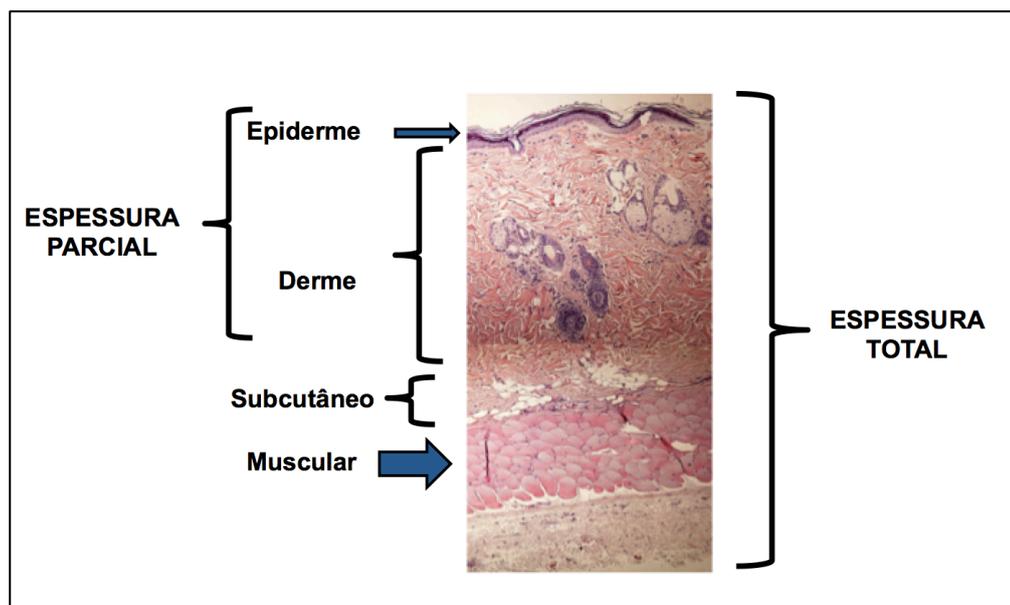


Figura 1. Desenho esquemático da pele demonstrando as camadas da pele envolvidas na queimadura parcial e ou total da pele de rato. (Fonte: arquivo pessoal).

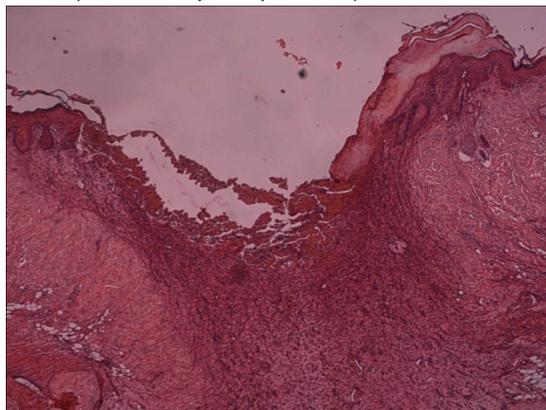


Figura 2. Imagem histologica corada com hematoxilina-eosina representativa de queimadura em pele de rato Wistar. (Fonte: Arquivo pessoal).

As lesões induzidas por queimaduras podem ser classificadas em inicial e retardada. A lesão inicial divide-se por sua vez em dano físico (direto e indireto) e lesão mediada pela inflamação. A lesão retardada corresponde ao dano em resposta à rejeição de tecido necrótico (XU, 2004; DEMLING; DESANTI, 2005).

O dano físico direto ocorre imediatamente após a exposição da pele a uma fonte térmica causando rápida desnaturação proteica e lesão celular, provocando necrose da interface cutânea. Mesmo depois de retirada a fonte, o calor não se dissipa imediatamente e o calor residual acumula-se levando ao dano secundário indireto, que persiste por 6 a 12 h após o trauma térmico inicial (XU, et. al., 2004).

A lesão induzida pela inflamação pode ser local e/ou sistêmica. A resposta inflamatória local desencadeada pela queimadura inicia-se por volta de 1h, persistindo por dias após o trauma térmico. Embora a inflamação seja necessária à reparação tecidual, a produção excessiva de mediadores, proteases e oxidantes causam danos adicionais aos epitelíocitos e ao endotélio capilar (DEMLING; DESANTI, 2005).

Com o trauma térmico, há exposição do colágeno no tecido afetado e conseqüentemente ativação e liberação da histamina pelos mastócitos. A histamina provoca aumento da permeabilidade capilar, que, por sua vez, permite a passagem de um filtrado plasmático para o interstício dos tecidos afetados, provocando importante edema tecidual. Também é ativado o sistema calicreína produzindo cininas que colaboram mais ainda para o aumento da permeabilidade capilar, agravando o edema tecidual (PANNIER; WASSERMANN, 2002). As cininas e a exposição do colágeno ativam o sistema fosfolipase – ácido aracdônico, liberando prostaglandinas e, dentre estas, a prostaciclina (PGI₂), aumentando ainda mais a permeabilidade capilar e o edema.

Outra via ativada pelo ácido aracdônico é a do tromboxano que pode aumentar a agregação plaquetária, depósitos nas paredes dos capilares, ocasionando um aumento da pressão hidrostática, contribuindo ainda mais para o edema tecidual (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado que deriva diretamente de fontes dietéticas ou da conversão a partir do ácido graxo essencial, ácido linoleico.

O ácido araquidônico não ocorre em forma livre nas células, mas normalmente são esterificados nos fosfolipídios das membranas, são liberados a partir dos mesmos mediante a ativação das fosfolipases celulares por estímulos mecânicos, químicos e físicos (térmico) e por outros mediadores da inflamação. Seus metabolitos podem seguir duas vias principais (via da ciclooxigenase que conduz à geração de prostaglandinas e a via da lipoxigenase) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

Os ácidos graxos insaturados possuem uma ou mais duplas ligações podendo ser monoinsaturados (ômega-9) ou poliinsaturados (ômega-6 e ômega-3) e geralmente na forma líquida à temperatura ambiente (LENHINGER, 1986).

Dietas ricas em ácidos graxos ômega-3 são substratos precários para conversão a metabolitos ativos da ciclooxigenase, como também para a série da lipooxigenase. Este tipo de dieta inibe a agregação plaquetária e a trombose e impede o aumento do processo inflamatório (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

Os ácidos graxos considerados essenciais são: linoleico (ômega-6), α -linolênico (ALA), eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) que são os ômega-3 e são requeridos pelo organismo em cerca de 6-10 % da gordura ingerida (equivalente a 5-10 g/dia). Podem ser fornecidos na dieta pelos óleos vegetais (ácido linoleico e linolênico) e pelos óleos de peixes (EPA e DHA) (CURI *et al.*, 2002).

A organização mundial da saúde (WHO, 2003) preconiza uma dieta contendo 5 a 8 % das calorias totais provenientes do ômega-6, enquanto 1 a 2 % oriundas do ômega-3.

Vários estudos experimentais em ratos têm sido realizados utilizando ácidos graxos poliinsaturados (ZHANG; ZHANG e FRITSCHÉ, 2004; XU *et al.*, 2011), evidenciando benefícios da suplementação dietética dos mesmos após exposição aos raios ultravioleta (LU *et al.*, 2003) e após queimaduras por líquido aquecido (ZHANG; FRITSCHÉ, 2004; XU *et al.*, 2011).

Entretanto, há poucos estudos na literatura que envolvam a administração simultânea de ômega-9, 6 e 3 (mistura dos três ácidos graxos) com concentrações, proporções pré-estabelecidas em bebidas lácteas em ratos submetidos à queimadura por condução térmica.

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo, representando 15% de seu peso. Trata-se do manto de revestimento do organismo, que isola os componentes orgânicos do ambiente externo. Sua complexa estrutura de tecidos, de várias naturezas, está adaptada a exercer diferentes funções, tais como proteção, termorregulação e percepção, entre outras (RIZZO, 2011).

Composta de três camadas principais: epiderme (camada externa), derme (camada intermediária) e hipoderme, ou tecido celular subcutâneo (camada interna) (Silva *et al.*, 2007) (ver figura 3).

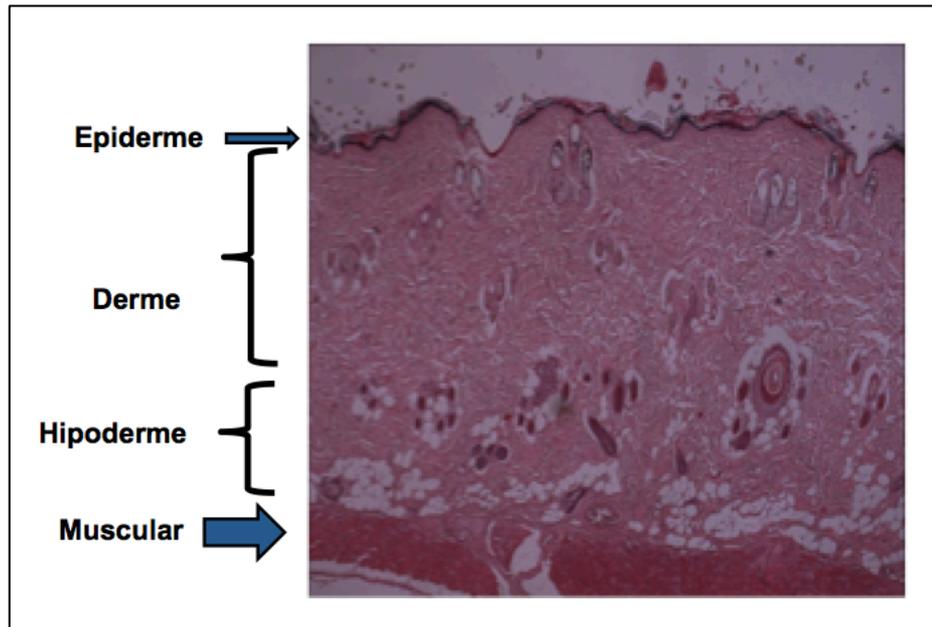


Figura 3. Imagem de pele integra com aumento de 10x. Observar as camadas da pele e suas estruturas da epiderme, derme, hipoderme e muscular. (Fonte: Arquivo pessoal).

Segundo RIZZO, 2011, a epiderme é um epitélio estratificado composto por queratinócitos e formado por quatro camadas celulares distintas (ver figura 4):

a) Camada Germinativa ou Basal.

Trata-se da camada mais profunda da epiderme, formada por dois tipos de células : as células basais e os melanócitos.

As células basais apresentam uma configuração cilíndrica e encontram-se unidas entre si por pontes intercelulares denominadas desmossomas, estruturas de adesão que dão suporte ao epitélio. As células basais possuem intensa atividade mitótica, o que caracteriza a camada germinativa, que dá origem às outras camadas da epiderme.

Os melanócitos, por meio de uma relação funcional com os queratinócitos, constituem-se nas células produtoras da melanina, produto pigmentar responsável pela coloração do tegumento. Cabe ressaltar que a quantidade de melanócitos não varia em relação às etnias – as diferenças raciais de pigmentação, portanto,

dependem da sua capacidade funcional, isto é, da sua capacidade de produção de melanina. A melanina também protege a pele das radiações ultravioletas do sol, por meio da absorção da energia solar.

b) Camada Espinhosa ou Malpighiana.

Essa camada é formada por células espinhosas, de configuração poliédrica, que vão se achatando progressivamente em direção à superfície (SILVA et al., 2007). Os desmossomas também são as estruturas responsáveis pela adesão celular nessa camada da epiderme.

c) Camada Granulosa

É constituída por células granulosas, que se caracterizam pela presença de uma grande quantidade de grânulos de queratoialina, que expressam a queratinização da epiderme.

d) Camada Córnea

É formada por células epidérmicas anucleadas, constituídas de queratina. Essa camada é mais espessa nas regiões palmo-plantares, onde mais uma camada compõe a epiderme, o estrato lúcido, localizado entre a camada córnea e granulosa. Trata-se de uma camada composta por células anucleadas, planas e transparentes.

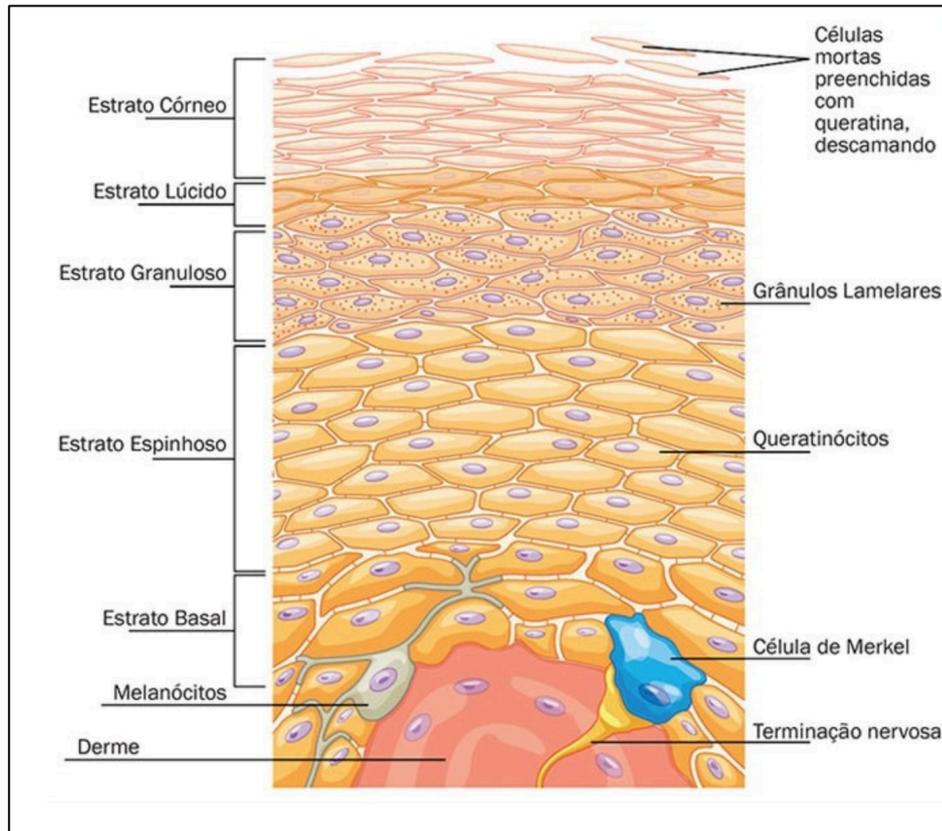


Figura 4. Imagem representativa dos tipos celulares e camadas da epiderme (estratos).

Ainda na epiderme, há as células de Langerhans, que constituem de 2 a 8% da população celular dessa camada, excedendo uma importante função imunológica: elas atuam no processamento primário dos antígenos exógenos que atingem a pele, apresentando-os aos linfócitos T e dando início, assim, à sua ativação. Segundo Sampaio e Rivitti (2001) 2, é possível que, com tais propriedades imunes, as células de Langerhans participem não somente das reações de sensibilização das dermatites de contato, mas também da rejeição de enxertos e da proteção contra infecções virais.

Com relação ao pH cutâneo, é possível observar que a epiderme é ácida em todas as suas camadas, porém apresenta algumas variações. A maior acidez é detectada na camada córnea, como pH entre 5,4 e 5,6.

A derme constitui-se de substância fundamental, um gel viscoso rico em

mucopolissacarídeos que participa da resistência mecânica da pele, e material fibrilar de três tipos: fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares.

As fibras colágenas representam 95% do tecido conjuntivo da derme e promovem sustentação às estruturas que compõe a derme, além de participarem da fixação da epiderme à derme.

A família de fibras do colágeno é composta por mais de 20 tipos geneticamente diferentes, sendo os mais frequentemente encontrados na derme os tipos I, II, III, IV VI, VII. O colágeno tipo I forma mas abundante, sendo fibras espessas, mecanicamente estáveis e responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. O colágeno tipo III é o segundo mais frequente, forma fibrilas, geralmente presentes logo abaixo da membrana basal, e participa da fixação da epiderme à derme. O colágeno tipo I também está presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III também está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (BARASCUK et. al., 2011; COUDROY et. al., 2015).

A diferenciação entre os tipos de colágeno configura-se como um exercício difícil, sendo uma das técnicas mais executáveis a coloração histoquímica de Picrossirius Red, seguida da técnica de polarização da luz, realizada neste estudo, a qual confere diferenciação entre colágenos I e III, sendo essa a justificativa para a análise mais específica desses dois tipos (MODAK et al., 2015))

As fibras elásticas estão presentes em grande quantidade na pele humana. Constituídas de elastina, elas conferem elasticidade à pele, contribuindo para a proteção mecânica, e também participam da ligação da entre derme e epiderme.

As fibras reticulares são formadas por colágeno tipo III, produzido por fibroblastos e células reticulares. Elas formam o arcabouço dos órgãos

hematopoiéticos (baço, linfonodos, medula vermelha etc.) e as redes em torno das células musculares e dos órgãos epiteliais (fígado, glândulas endócrinas).

Na derme encontram-se ainda as estruturas anexas da pele: glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e pelos. As unhas também são consideradas anexos cutâneos e consistem em estruturas queratinizadas que recobrem a falange distal.

As glândulas sudoríparas dividem-se em écrinas e apócrinas. As primeiras encontram-se por toda a pele, predominando nas regiões palmo-plantares e nas axilas, e fazem ligação com a superfície epidérmica. A secreção sudoral écrina é inodora, incolor e compreende 99% de água; desempenha um papel fundamental na regulação da temperatura corporal podendo atingir, em condições adversas de temperatura, a produção de 10 a 20 litros de sudorese em 24 horas.

As glândulas sudoríparas apócrinas, por sua vez, encontram-se nas regiões axilares, perimamílares, anoperineal e, de forma modificada, no conduto auditivo externo, pálpebras e mamas. Diferentemente das glândulas écrinas, as glândulas sudoríparas apócrinas desembocam nos folículos pilossebáceos, ou nas suas proximidades. A secreção sudoral apócrina ocorre em pequena quantidade, tem aspecto leitoso e produz odor, decorrente da ação de bactérias próprias das regiões em que são encontradas.

As glândulas sebáceas estão presentes em toda a pele, exceto nas regiões palmo-plantares, porém são encontradas em maior quantidade nas regiões frontal, mediotorácicas e atrás das orelhas (regiões denominadas seborreicas). Elas desembocam sempre em um folículo pilossebáceo, ou com ou sem pelo. O produto da secreção sebácea é o sebo, que constitui-se em importante proteção contra a proliferação de bactérias e fungos, e juntamente com o suor origina no estrato

córneo a película ou manto hidrolipídico, que desempenha valioso papel na retenção de água na pele. O sebo, juntamente com os lipídios da queratinização, constituem a emulsão lipídica da superfície da pele, composta por ácidos graxos e outras gorduras, que juntamente com os eletrólitos do suor, atuam como agentes emulsificantes.

Os pêlos, situados em invaginações profundas da epiderme, são estruturas filiformes constituídas por células queratinizadas produzidas pelos folículos pilosos. Anexa ao folículo pilosos encontra-se uma glândula sebácea, constituindo o complexo denominado aparelho ou folículo pilossebáceo, que também é composto pelo músculo eretor do pelo. Do ponto de vista funcional, os pelos servem como proteção mecânica nas áreas orificiais e no couro cabeludo, como proteção dos raios ultravioleta. Por conta de sua abundante inervação, os pelos fazem parte do aparelho sensorial cutâneo.

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo é a camada mais profunda da pele, de espessura variável e constituída exclusivamente de tecido adiposo. Geralmente, em sua porção superior são encontradas as áreas secretoras das glândulas sudoríparas, além de vasos sanguíneos, pelos e terminações nervosas. A hipoderme presta uma grande contribuição ao isolamento térmico, na proteção mecânica do organismo à pressão e traumas, além de constituir um depósito nutritivo de reserva e facilitar a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Com relação ao pH, a hipoderme, assim como a derme, apresenta pH alcalino, também menor que o pH sanguíneo.

Há ainda, na pele, uma rede vascular constituída de vasos sanguíneos e linfáticos, que distribuem-se a partir da porção superficial da derme e estendem-se em nível dermo-hipodérmico. Os vasos da pele, além de exercerem função metabólica e de nutrição, participam também no controle da temperatura e da regulação da pressão sanguínea.

A musculatura da pele é predominantemente lisa e compreende os músculos eretores dos pelos, os dartos do escroto e a musculatura da aréola mamária. A musculatura estriada encontra-se na pele do pescoço e da face (musculatura da mímica).

Conforme foi possível observar, cada camada da pele possui capacidades específicas, por conta de uma estruturação diferenciada, e em função disso, esse tegumento constitui-se em um órgão capaz de desempenhar múltiplas funções:

a) Proteção: Conforme mencionado anteriormente, todas as camadas da pele exercem função protetora, por meio de diferentes mecanismos: mecânicos, humorais (sebo), celulares (melanina) e imunológicos (células de Langerhans). A camada córnea presta valiosa contribuição para a proteção da pele, pois impede a perda de água, eletrólitos e outras substâncias exógenas, e sua superfície relativamente seca dificulta a proliferação de microorganismos.

b) Termorregulação: O controle homeostático da temperatura orgânica é processado pela pele por meio de dois mecanismos: a sudorese, que resfria a superfície cutânea, que permite maior ou menor dissipação de calor.

c) Percepção: É exercida por uma complexa e especializada rede cutânea de terminações nervosas que capta estímulos dolorosos, táteis e térmicos (frio e calor).

d) Secreção: A secreção sebácea exerce função antibacteriana e antifúngica; além disso, atua na manutenção da integridade da pele, particularmente da camada

córnea, evitando a perda de água. O sebo também contém substâncias precursoras da vitamina D.

1.2 Fisiopatologia da queimadura térmica

Em queimaduras cutâneas, a pele serve de barreira à transferência de energia para tecidos mais profundos, no qual o local onde a maior parte da lesão ficará delimitada. Mesmo uma rápida exposição a uma fonte de temperatura como: água, chamas ou objeto aquecido poderá levar à coagulação imediata de várias camadas da pele. Em temperaturas superiores a 44°C e abaixo dos 51°C as lesões celulares dobram a cada aumento de grau. Acima dos 51°C ocorrerá destruição rápida da cútis e acima dos 60°C a necrose por coagulação proteica é imediata (XU, 2004).

A destruição tecidual está relacionada ao tipo de fonte de calor, temperatura (CAMPELO et.al.,2011), tempo de exposição, espessura da pele atingida e/ou a pressão exercida sobre a pele pelo elemento de contato. Mesmo após a retirada da fonte, o calor não se dissipa imediatamente e o calor residual acumula-se levando a dano secundário indireto, que persiste por 6 a 12hs após trauma térmico inicial (XU, 2004).

A lesão induzida pela inflamação pode ser local e/ou sistêmica. A resposta inflamatória local desencadeada pela queimadura inicia-se por volta de 1h, persistindo por várias horas (MEHMET *et al.*, 2011) após o trauma térmico. Tal persistência ocorre devido a reação bioquímica ao calor e à reação inflamatória local. Embora a inflamação seja necessária à reparação tecidual, a produção excessiva de mediadores, proteases e oxidantes causam danos adicionais aos epitelíocitos e endotélio capilar (DEMLING; DENSANTI, 2005).

Atuam nestes processos, provavelmente, histamina, serotonina, íons H⁺, cininas e bradigininas, dentre outras substâncias. Esta fase de reação termobioquímica continua afetando os tecidos viáveis e lesados após a lesão inicial, levando a uma série de lesões inflamatórias que podem ativar a cascata de coagulação e causar microtrombos que, por sua vez, podem levar a necrose anóxica, edema e isquemias adicionais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; XU, 2004).

Na fase de dano retardado, fatores exógenos e endógenos que incluem inflamação persistente, colonização bacteriana ou trauma mecânico, associados à crosta que se forma na superfície queimada e/ou agentes tópicos aplicados à ferida são elementos comumente encontrados. Esta fase iniciada 72h após a queimadura consiste na resposta dos tecidos viáveis à desintegração de tecidos necróticos na interface da zona de lesão (XU, 2004).

O acúmulo de neutrófilos no exsudato causa danos aos tecidos viáveis através de proteases e oxidantes dos neutrófilos e pelo aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos sãos. Tal reação, mista e extensa pode incluir proteólise de histiócitos necróticos, regeneração de histiócitos viáveis e infecção microbiana. A atividade proteolítica causa lesão do tecido de granulação incipiente inibindo fatores de crescimento e dificultando o processo de reparação. Ao mesmo tempo, as células viáveis restantes iniciam um processo de regeneração em um ambiente desfavorável, potencializando a inflamação.

A combinação destes fatores altera o equilíbrio da flora residente agravando o dano local, podendo levar à resposta inflamatória sistêmica (DEMLING; DESANTI, 2005).

A resposta sistêmica, por sua vez, acontece em graus variados à quaisquer

queimaduras, ocorrendo liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios na circulação que podem levar a alterações à distância em vários aparelhos e sistemas. Quando a queimadura acomete mais de 30% da área de superfície corporal total a resposta sistêmica aumenta exponencialmente (BARBOSA *et al.*, 2003).

Dentre os efeitos imunológicos destacam-se a diminuição inespecífica da resposta imune, afetando tanto a via humoral quanto a imunidade regulada por células mediadoras inflamatórias (RAVAGE *et al.*, 1998).

Num corte perpendicular à pele queimada podem ser identificadas três zonas concêntricas e tridimensionais da lesão descritas por Jackson em 1947 (ver figura 5):

a) Zona Central ou zona de necrose: consiste na área diretamente lesada pelo contato máximo, ocorrendo perda tecidual irreversível devido à coagulação dos constituintes proteicos da pele.

b) Zona intermediária ou zona de estase: devendo-se ao dano térmico indireto e ao dano termo-bioquímico, resultante da estase circulatória e da degeneração tecidual causada pela formação progressiva de microtrombos.

c) Zona de hiperemia (camada mais externa): os tecidos apresentam a reação inflamatória causada pela lesão térmica e química locais, caracterizando-se por alterações potencialmente reversíveis como edema, hiperemia, anóxia e exsudação (KAO; GARNER, 2000; XU, 2004).

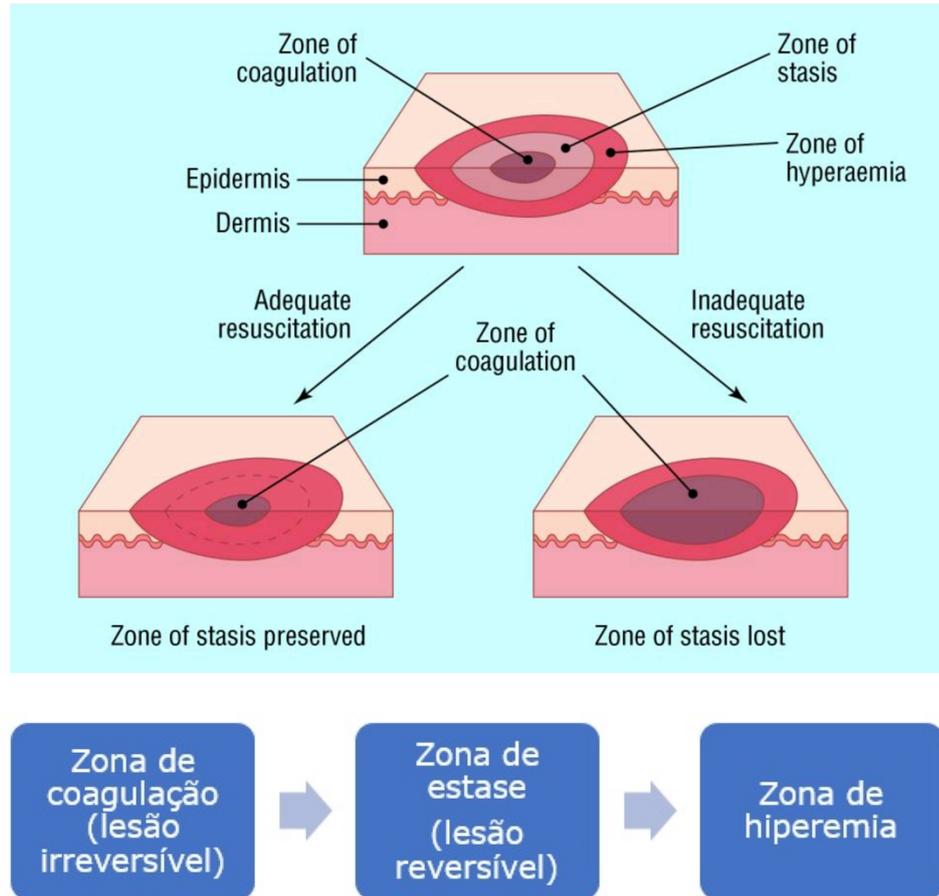


Figura 5. Zonas da queimadura. Observar na imagem superior o primeiro dia da queimadura e o tamanho das zonas (zona de coagulação (necrose), zona de estase e zona de hiperemia). Seguindo a seta da direita o resultado quando se inicia o tratamento adequado com zona de coagulação menor, zona de estase preservada. Seguindo a seta da direita o resultado quando não inicia o tratamento adequando nas primeiras horas, observar aumento da zona de coagulação no local da zona de estase (zona de estase evolui para zona de necrose) (Fonte: adaptado de HETTIARATCHY et. al., 2004).

As alterações fisiopatológicas dentro destas três zonas revelam a biodinâmica mais complicada de todas as feridas, envolvendo vários mediadores inflamatórios e estando intimamente relacionados à administrações de diferentes medidas terapêuticas (XU, 2004). Terapêutica que provoque mais lesão local pode agravar a lesão nas outras zonas. Medidas efetivas no tratamento dos tecidos abaixo da zona de necrose podem prevenir ou reverter a lesão na zona de estase e/ou de hiperemia. Medidas terapêuticas que podem levar a coagulação ou que não hidratam a pele podem provocar a formação de crostas que, adicionalmente, podem

levar a uma lesão letal aos tecidos da zona de estase e hiperemia, causando aumento da extensão e profundidade da queimadura (GUEUGNIAUD *et al.*, 2000).

1.3 Fisiologia da cicatrização de feridas

A cicatrização em tese, consiste em uma complexa sequência de eventos coordenados e desencadeados pelo organismo, que o objetivam reconstituir estrutural e funcionalmente o tecido comprometido em sua maior plenitude.

De acordo com o comprometimento tecidual, pode-se classificar as feridas em:

- Ferida de espessura parcial (ou feridas epidérmicas): nas quais a lesão acomete a epiderme e a camada superficial da derme.
- Ferida de espessura total (ou feridas dérmicas): nas quais ocorre o acometimento de toda a epiderme, derme e tecido subcutâneo, podendo estender a ao tecido muscular e ósseo.

1.3.1 Cicatrização de feridas de espessura parcial

Inicialmente, as feridas são preenchidas por sangue, restos celulares desvitalizados e partículas de tecidos, que formam uma crosta. As células epiteliais separam-se da membrana basal, migram em direção à área lesionada, proliferam-se por mitose e progressivamente incorporam-se à camada epitelial. No momento em que a cicatrização for concluída, sob a crosta, esta se desprende. Inicia-se então o processo de queratinização das células proliferadas. O processo de regeneração é chamado de reepitelização. A cicatrização de ferida de espessura parcial resulta de uma cicatriz frequentemente imperceptível.

1.3.2 Cicatrização de feridas de espessura total

A cicatrização desse tipo de lesão é bem mais complexa e de longa duração, se comparada à cicatrização das feridas de espessura parcial. Há a necessidade de formação de um novo tecido, o tecido de granulação seguido de epitelização e contração da ferida, até que ocorra o seu reparo por completo.

O processo de cicatrização de feridas de espessura total compreende três fases : inflamatória, fibroblástica e de remodelamento. Tais fases são complexas e altamente coordenadas; sobrepõem-se uma à outra e aos eventos que finalizam uma fase, estimulando o início de outra (ver figura 6).

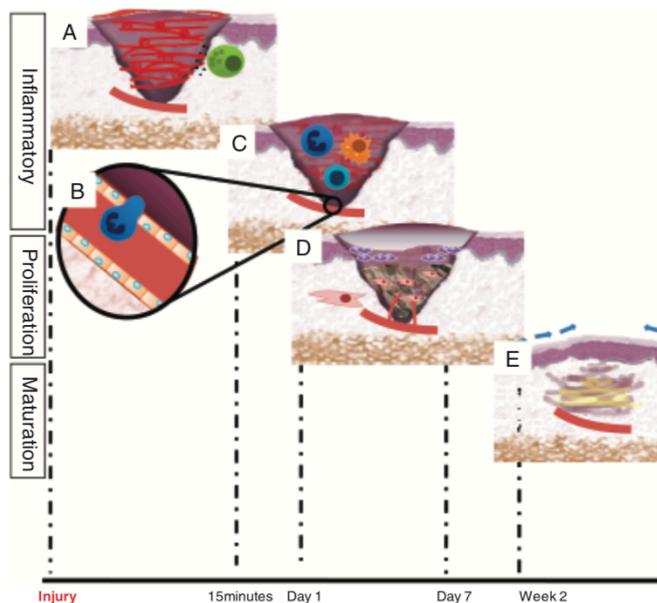


Figura 6. Fases clássicas da cicatrização de feridas. (A) Fase inflamatória inicial com células inflamatórias, fibrina, plaquetas e fatores quimiotáticos. (B) Aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (C) Neutrófilos, monócitos que se diferenciam em linfócitos T, macrófagos. Essas células produzem fatores que atraem a migração de queratinócitos e fibroblastos. (D) Fase de proliferação, reepitelização, neovascularização e formação de tecido de granulação. (E) maturação do colágeno. (Fonte: SHIH et. al., 2010).

1.3.2 Fases da cicatrização

1.3.2.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória prepara a ferida para a cicatrização, removendo restos celulares e tecidos desvitalizados. Alguns autores costumam chama-lá também de fase defensiva, fase final ou fase exsudativa. Imediatamente após o surgimento da ferida, inicia-se o processo de inflamação, que consiste em uma reação natural do tecido vivo a qualquer agressão local. Para Gogia (2003) o processo inflamatório desencadeia a cicatrização; se não houver inflamação, a cicatrização da ferida será retardada.

O processo inflamatório consiste em resposta vascular e celular, responsáveis pelo controle do sangramento e pela remoção de microorganismos, material inorgânico e tecidos desvitalizados.

Inicialmente, o processo inflamatório caracteriza-se por reações vasculares. Em princípio ocorre uma vasoconstrição transitória de vasos sanguíneos e linfáticos, visando inibir uma perda sanguínea significativa na área lesada. Simultaneamente a essa resposta, ocorre o desencadeamento da cascata de coagulação, que, ao ser concluída, resulta na conversão do fibrinogênio em fibrina, por meio da ação da trombina. Essas duas reações iniciais visam inibir uma perda sanguínea significativa por parte da área lesada.

O próximo evento fundamental da inflamação é a vasodilatação, que aumenta o fluxo sanguíneo local. A permeabilidade vascular é aumentada e, por conta disso, ocorre extravasamento de líquido plasmático para o meio extravascular. Tampões de fibrina provenientes do plasma extravasado bloqueiam o fluxo linfático e “fecham” a ferida, localizando a inflamação e inibindo a disseminação de infecção.

À medida que essas reações ocorrem, é possível observar os sinais clínicos

locais de inflamação aguda, tais como calor, rubor, edema e dor. Vale ressaltar que a percepção desses sinais varia de acordo com alguns sinais intrínsecos, que podem apresentar-se em maior ou menor intensidade, de acordo com o indivíduo.

Ainda durante a vasodilatação, que é mais duradoura se comparada a vasoconstrição, ocorre um evento chamado marginação leucocitária, que consiste na orientação periférica dos leucócitos, inicialmente de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), ao longo do endotélio vascular, que torna-se aderente. Em seguida, estes migram, através da parede vascular, para o tecido intersticial, processo denominado emigração. Atraídos por agentes quimiotáticos, os neutrófilos iniciam o processo de migração unidirecional para o leito da ferida, evento denominado quimiotaxia. A partir daí, inicia-se o processo de fagocitose, mecanismo de digestão enzimática realizada pelos leucócitos, visando eliminar da ferida bactérias, tecidos desvitalizados, restos celulares e demais substâncias.

Os neutrófilos, entretanto, são células de vida curta e na maior parte das respostas inflamatórias, predominam nas primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos pelos monócitos, que sobrevivem mais tempo nos tecidos. Cabe ressaltar que, à medida que os neutrófilos morrem, ocorre a liberação de enzimas intracelulares que, juntamente com outros produtos da degradação celular, tornam-se parte do exsudato da ferida.

Os monócitos são leucócitos mononucleares que estão envolvidos em todas as fases da cicatrização. Por meio dos mesmos mecanismos de marginação, adesão, emigração e quimiotaxia, eles chegam ao local da lesão transformando-se em macrófagos, a fim de realizar a fagocitose de substâncias estranhas (GOGIA, 2003). Os macrófagos são as células mais importantes no auxílio à fagocitose, possuem um grande número de enzimas hidrolíticas, o que explica sua capacidade

de degradar rapidamente vários tipos de materiais, inclusive partículas relativamente grandes; eles irão eliminar da ferida todo material que não foi solubilizado pelos neutrófilos, inclusive neutrófilos mortos.

Quando essa fase vai finalizando, a atividade fagocitária dos macrófagos começa a reduzir, assim como o edema e os outros sinais clínicos de inflamação. Inicia-se então a segunda fase do processo de cicatrização.

1.3.2.1.1 Estresse oxidativo

A pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (RNS). Estas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, sendo que há um equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando assim ao chamado estresse oxidativo (RASILAINEN et al., 2002) (Figura 7).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou por uma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de EROS (espécies reativas de oxigênio) e RNS (espécies reativas de nitrogênio). No organismo, estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas, entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (CELI, 2010; OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010).

A produção de EROS está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons (ROCK *et al.*, 1996).

Dessa forma, encontram-se relacionados com diversas patologias em humanos, como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, neoplasias e AIDS (OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010). Na medicina veterinária, o estresse oxidativo também tem sido relacionado com numerosas afecções, como sepse, mastite, enterites, pneumonia, doenças respiratórias e articulares (CELI, 2010).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e esses mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases, que são proteínas de membrana que tem a função de transferir elétrons através das membranas celulares (BARBOSA *et al.*, 2010).

O radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) é o mais deletério ao organismo, já que possui meia-vida curta, o que dificulta o sequestro *in vivo*. É formado no organismo principalmente por dois mecanismos: por exposição a radiação ionizante. Causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. Nos aminoácidos e proteínas, o radical pode reagir na cadeia lateral,

onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, gerando danos com consequente perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular.

A pele, por sua importância, é um órgão cujas células possuem mecanismos enzimáticos de resposta rápida, bem como moléculas antioxidantes de baixo peso molecular para contrabalançar o efeito deletério causado por um estresse oxidativo (RASILAINEN et al., 2002), como apresentado na Figura 7.

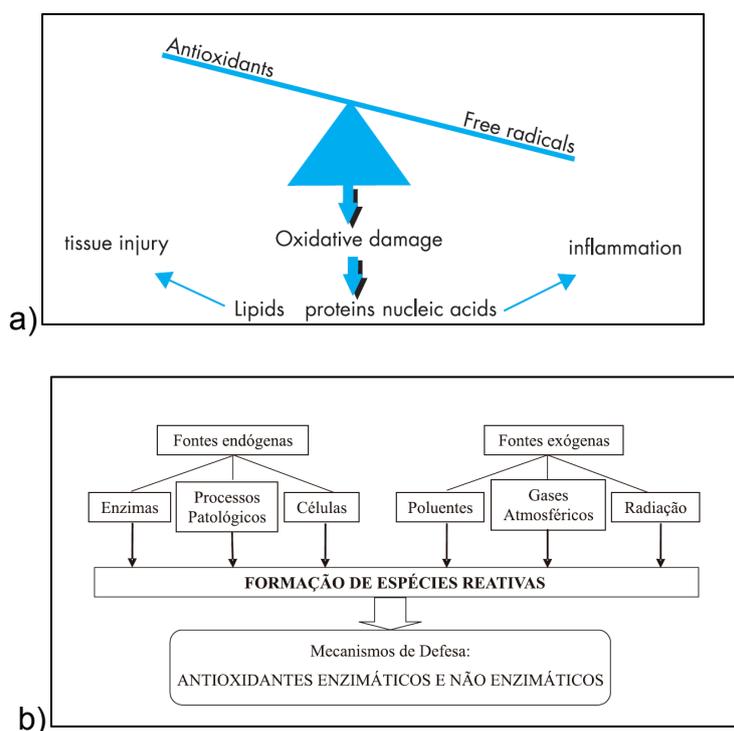


Figura 7 – (A) O estresse oxidativo existe quando há um excesso de radicais livres sobre as defesas antioxidantes. Como consequência, os radicais atacam e oxidam outros componentes celulares principalmente os lipídeos (particularmente os poliinsaturados), proteínas e ácidos nucléicos. Isso leva a uma lesão tecidual e, em alguns casos, o influxo de células inflamatórias para o local da lesão (KELLY, 2003) **(B)** Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa. Fonte: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007.

Dentre as EROS formadas na pele, podemos destacar os radicais hidroxila (HO^\bullet) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), os radicais peroxila e alcoxila (RO_2^\bullet e RO^\bullet), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das EROS, também estão envolvidas em processos redox outras espécies

intermediárias, as RNS, tais como $\dot{\text{NO}}$ e espécies reativas de enxofre, com importância biológica significativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies citadas pode sofrer ação de agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo. Este, por sua vez, pode ser restabelecido pelos sistemas antioxidantes presentes no tecido cutâneo.

O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997). A CAT e a GPx são as principais responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 . A GPx, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada (GSSG) (ROVER-JR; KUBOTA; HÖEHR, 2001).

Os antioxidantes não enzimáticos, ou de baixo peso molecular também contribuem para a manutenção do balanço redox celular. Nesta classe inclui-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com as EROS/RNS (BIALY et al., 2002).

Dentre as substâncias endógenas podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno que apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina E, devido, provavelmente, à sua porção fenólica, comum a ambas as moléculas (KVAM; DAHLE, 2003) e à melatonina, reguladora do relógio biológico nos mamíferos, que também apresenta atividade antioxidante, além de induzir a síntese

de antioxidantes enzimáticos *in vivo*, como a glutathione peroxidase (REITER, 1997). Destacam-se também o ácido lipóico, um cofator essencial em vários complexos enzimáticos que apresenta atividade antioxidante e que pode atuar como regenerador de formas oxidadas de glutathione, ascorbato e α -tocoferol (PODDA et al., 2001); bem como a melanina, um pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel protetor contra a radiação UV, que também possui papel antioxidante, protegendo a pele principalmente contra $O_2^{\bullet-}$ e RO_2 (SERGEEV; UKHINA; SHIMANOVSKIĬ, 1999).

Além de todo o sistema antioxidante endógeno exemplificado, a pele conta ainda com um eficiente mecanismo de reparo, caso os danos já tenham ocorrido, envolvendo enzimas e substâncias de baixo peso molecular (ICHIHASHI et al., 2003). Por exemplo: lesões oxidativas em DNA podem ser identificadas por enzimas específicas, removidas e reparadas, ou ainda, substâncias que sofreram ataque de radicais podem ser restauradas pela doação de hidrogênio de outras moléculas (ICHIHASHI et al., 2003).

A aplicação tópica ou oral de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, buscam-se novas substâncias com ação antioxidante, bem como substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes. Alguns antioxidantes fundamentais são normalmente adquiridos pela dieta, como por exemplo, as vitaminas C e E, os carotenóides e substâncias fenólicas derivadas de plantas. A vitamina E, ou α -tocoferol, além de estabilizar as bicamadas lipídicas no estrato córneo, é um dos mais importantes inibidores da

peroxidação lipídica em animais, por capturar RO_2^\bullet (BURTON et al, 1998).

Também para restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, bem como para prevenção ou tratamento de patologias causadas por estresse oxidativo, são utilizadas muitas classes de substâncias antioxidantes provenientes de produtos naturais. Muitos extratos são veiculados em formulações para uso tópico, tendo sua eficácia comprovada. Além disso, inúmeras são as formas orais de suplementação, como a ingestão de chás, cápsulas, decotos, entre outros. Diversos estudos descritos na literatura abordam o uso de antioxidantes oriundos de produtos naturais. A eficácia de antioxidantes desta origem é extensamente investigada (ALEXIS et al., 1999; GOMES et al., 2001).

1.3.2.1.1.1 Biomarcadores de estresse oxidativo e antioxidantes

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo. É o principal indicador da peroxidação lipídica determinado por titulação contra o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é indicador de dano celular. O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm e fluorescência em 553 nm. Associado com esse indicador, a mieloperoxidase é envolvida não somente na geração de EROS, mas também na ativação da atividade inflamatória (VASCONCELOS et al., 2007).

O método de *Ferrous Oxidation-Xylenol Orange* (FOX) foi originalmente desenvolvido para determinar o nível hidropéroxido lipídico em sistemas biológicos. O íon ferroso (Fe^{2+}) é oxidado pelo hidropéroxido (oxidante) para formar o íon

férrico (Fe^{3+}). Este é, em seguida, tratado com o reagente *xylenol-orange* (XO) formando o complexo Fe^{3+} – XO (cor azul violeta) que é detectado por espectrofotômetro a 550 nm. Esse método é utilizado para determinar a formação ou presença de hidroperóxido na amostra biológica, atividade da lipoxigenase bem como o estudo da peroxidação lipídica. É menos reativo ou não reage a endoperóxidos (JIANG et al., 1992)

A oxidação de lipídeos, processo conhecido como peroxidação lipídica, pode iniciar-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna das mitocôndrias. A peroxidação lipídica traz consequências homeostáticas graves para as membranas atacadas, principalmente na perda de sua integridade devido a alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989). Esta agressão acaba por interferir em mecanismos celulares importantes, incluindo sistemas enzimáticos, expressão gênica, entre outros. (CREMONESE et al., 2001),

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativas do oxigênio, porém as membranas biológicas (retículo endoplasmático, membranas mitocondriais ou plasmáticas) são as mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, podendo acarretar alterações na organização estrutural, funcional, enzimática e na permeabilidade das membranas celulares (CECHINI, 1990).

O uso da técnica de quimiluminescência permite a quantificação do estresse oxidativo na pele. Em circunstâncias normais, os processos fisiológicos levam à formação de radicais, resultando em emissão de fótons (na ordem de 20 a 40

contagens por segundo), contudo essas quantidades são muito baixas para serem detectadas pelos métodos atualmente empregadas. No estresse oxidativo, os níveis de radicais são geralmente aumentados, permitindo assim sua detecção através da emissão de fótons produzidos (GUARATINI et al., 2007).

Os sistemas de defesa antioxidante nas células incluem compostos como a glutathione (GSH): tiol mais abundante envolvido no sistema de defesa antioxidante ativado diretamente para remoção de EROS. Há também enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S transferase (GST). A GSH e essas enzimas servem como biomarcadores para a defesa antioxidante devido às suas habilidades de eliminar e atenuar os efeitos das EROS.

Enfim, a fase inflamatória da cicatrização tem como objetivo o recrutamento de células inflamatórias e produção de radicais livres que atuam no o desbridamento tecidual e produção de fatores de crescimento essenciais para a fase de proliferação tecidual.

1.3.2.2 Fase fibroblástica

Essa fase estende-se até a epitelização total da ferida e também pode ser chamada de fase proliferativa ou fase reconstitutiva, de acordo com o autor consultado.

Uma vez que a ferida “foi limpa” pelos leucócitos, o reparo do tecido danificado continua (GOGIA, 2003). Inicia-se o processo de migração de células endoteliais da periferia para o centro da lesão; elas continuam a proliferar-se e dão origem ao tecido de granulação.

O tecido de granulação é um tipo especializado de tecido, com aspecto róseo

e granular, em que ocorre intensa proliferação de novos vasos sanguíneos e de fibroblastos. É importante ressaltar que os macrófagos continuam presentes no tecido de granulação, mas agora em menor intensidade, eliminando compulsivamente os restos de material, fibrina e outros corpos estranhos do local (Gogia, 2003).

Os novos vasos originam-se por meio de brotação a partir dos vasos preexistentes, o que consiste em um importante processo biológico denominado angiogênese ou neovascularização.

Os fibroblastos são sintetizados a partir de células mesenquimais indiferenciadas que migram para o leito da ferida. Tratam-se das células responsáveis pela produção de colágeno entre outros componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo (fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina). A integridade da ferida depende do colágeno, proteína que proporciona resistência e rigidez àquela; entretanto, ao final da cicatrização, apenas 80% da resistência tensional original a pele é recuperada.

À medida que a proliferação epitelial persiste, e que a ferida está totalmente preenchida pelo tecido de granulação, ocorre sua epitelização gradual, que proporciona uma fina cobertura sobre a pele.

Enquanto o processo de reepitelização se completa, outro evento é iniciado: a contração da ferida, processo que consiste na mobilização dos tecidos circunjacentes, promovendo um movimento centrípeto da pele normal em toda a sua espessura, pelas forças exercidas pela retração do tecido de granulação que promovem a contração da ferida. Os fibroblastos também estão envolvidos nesse processo; eles diferenciam-se em miofibroblastos, que são células responsáveis pela contração da ferida, pois têm a habilidade de distensão e retração. Os

miofibroblastos aderem às margens da ferida e puxam toda a epiderme para dentro. A contração da ferida recompõe toda a lesão, resultando na formação do tecido cicatricial.

Na medida em que a cicatriz vai se formando, o número de fibroblastos na ferida é reduzindo gradativamente, até o seu desaparecimento (que ocorre somente após o término da formação do tecido cicatricial), o que caracteriza o final da fase fibroblástica.

1.3.3.3 Fase de remodelamento

Essa fase é denominada, por alguns autores, de fase de maturação, e consiste basicamente na reorganização das fibras de colágeno e na substituição das fibras tipo III pelas do tipo I .

A fase de remodelamento inicia-se a partir da formação do tecido cicatricial e caracteriza-se pelas mudanças na forma, tamanho e resistência da cicatriz.

Durante a formação do tecido cicatricial, ocorrem coordenadamente a produção e a degradação de colágeno. A cicatriz torna-se uma estrutura densa e repleta de fibras de colágeno desorganizadas.

A reorganização das fibras de colágeno é um processo que permite que o tecido cicatricial aleatoriamente depositado seja arranjado tanto em orientação linear, como lateral. É nesse momento que o organismo tenta corrigir eventuais “defeitos” da cicatriz, como o quelóide ou a cicatriz hipertrófica (alterações que ocorrem em virtude da excessiva deposição de colágeno) (GOGIA, 2003). Vale ressaltar que o queiloide estende-se além dos limites da lesão original.

Na medida em que o remodelamento avança, a coloração rosa e brilhante de uma cicatriz imatura vai sendo gradativamente substituída por um tom mais suave

até atingir um tom esbranquiçado, característico de uma lesão madura. O processo de remodelamento normalmente estende-se de 12 a 15 meses.

A natureza da cicatrização é a mesma para todas as feridas, mas de acordo com a perda tecidual, o processo de cicatrização pode ocorrer de duas formas: cicatrização por primeira intenção e cicatrização por segunda intenção (GOGIA, 2003).

1.4 Modelos experimentais de queimaduras

O direcionamento das pesquisas em queimaduras têm-se modificado consideravelmente nas últimas décadas: nos anos 60 e 70 do século passado os estudos eram baseados no tratamento do choque hipovolêmico pós-queimadura, resultando em abordagem mais precoce e métodos mais efetivos de controle de danos.

Na década de 80, estudos direcionavam-se ao controle da infecção, no qual uma vez superada a fase de ressuscitação, a infecção é a principal causa de morte em pacientes com grandes queimaduras (XU, 2004).

Na década de 90 as investigações eram voltadas para análise de mediadores da resposta imunoinflamatória local e sistêmica, precoce e/ou tardia, subseqüentes à lesão térmica, procurando identificar estes mediadores e avaliar seu papel na modificação destas respostas (DAVIDSON, 1998). Paralelamente, foram estudadas inúmeras abordagens no tratamento de queimaduras de espessura parcial ou total, buscando prevenir seqüelas e promover uma cura mais rápida.

Atualmente, permanece imprescindível o uso de animais para o estudo em queimaduras. Uma pesquisa eletrônica na base de dados Medline-Pubmed da National Library of Medicine do Instituto Nacional de Saúde dos EUA em busca de

artigos publicados de 1947 a 26 de junho de 2018, utilizando as palavras-chave queimadura, pele e animal, revelaram apenas 4728 artigos.

O rato Wistar tem sido largamente utilizado nas pesquisas experimentais. Quando comparado com o Sprague-Dawley possui um corpo maior em relação à cauda, é mais resistente à infecção, tornando-o um bom modelo para estudos em queimaduras, especialmente quando um maior tempo de sobrevivência é necessário (DAVIDSON, 1998; GOTTRUP; AGREN; KARLSMARK, 2000).

Para a investigação da fisiopatologia e das formas de tratamento de lesões por queimadura, vários modelos diferentes foram utilizados incluindo desde contato com água em ebulição (BARBOSA *et al.*, 2003), placa de bronze aquecida (MEYER; SILVA, 1999), placa de alumínio aquecida (MEDEIROS *et al.*, 1999), escaldadura sobre 45 % da superfície corpórea (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e placa de cobre com controle de temperatura na superfície de contato digital (CAMPELO *et al.*, 2011). Esses métodos apresentados podem variar a temperatura de 60 a 200 graus Celsius e causar queimadura de espessura parcial ou total.

CAMPELO *et al.* (2011) demonstraram que a queimadura térmica por condução direta à 100 ou 150 °C durante 9 segundos é capaz de ocasionar lesão de espessura parcial (epiderme e derme) em pele de ratos, e quando as queimaduras são realizadas a 200 °C durante 9 segundos a lesão é de espessura total atingindo até a musculatura.

1.5 Óleos: Ômega 9 (oleico), Ômega 6 (linoleico) e Ômega 3 (docosaheptaenóico, eicosapentaenóico e linolênico)

Esses óleos são ácidos graxos (AG) que são inicialmente isolados de fontes naturais, principalmente de lipídios, e são ácidos carboxílicos monocarboxílicos que

podem ser representados pela forma RCOOH (na maioria das vezes o agrupamento R é uma cadeia carbônica) e são classificados de acordo com: o tamanho da cadeia hidrocarbônica (curta – até quatro átomos de carbono; média – de seis a dez átomos de carbono; e longa – mais de dez átomos de carbono); presença de insaturações - ligações duplas entre átomos da cadeia R - (saturados – não possuem insaturações na cadeia hidrocarbônica; insaturados – possuem insaturações) e quantidade de insaturações (monoinsaturadas – apenas uma ligação dupla; poliinsaturadas – duas ou mais ligações duplas) (DAHELE et al., 2006). Sendo assim os óleos ômega em estudo estão classificados conforme quadro abaixo:

Quadro 1. Classificação dos óleos ômega em estudo

Classe	Nome sistemático	Nome comum	Carbonos*	Duplas ligações**
Ômega-3	Docosahexaenóico	DHA	22	6
Ômega-3	Eicosapentaenóico	EPA	20	5
Ômega-3	Octadecatrienóico	Linolênico	18	3
Ômega-6	Octadecadienóico	Linoleico	18	2
Ômega-9	Octadecenóico	Oleico	18	1 [#]

*Número de carbonos

**Número de duplas ligações

Monoinsaturado

Cada classe é composta por uma família de AG, sendo que todos os membros desta família podem ser sintetizados biologicamente a partir daqueles oferecidos na dieta. Por exemplo, o ácido araquidônico (20:4 ômega-6) é sintetizado a partir do ácido parental da classe ômega-6, o ácido linoleico (18:2). Contudo o AG de uma determinada classe não pode ser biologicamente convertido em outra classe, isto é, nenhum membro da família ômega-9 (ácido oleico) pode ser convertido em ômega-6 (ácido linoleico).

Desde a década de 1930 a essencialidade de alguns ácidos graxos são conhecidas por serem imprescindíveis ao organismo e por não poderem ser sintetizados pelo mesmo. BURR, G.O. e BURR, M.M. (1929) reverteram a descamação anormal da pele e formação de caspa, inchaço da cauda e membros pélvico que evoluem para necrose, perda de pelo, aparecimento de feridas em ratos quando adicionado a dieta óleo enriquecido com ácido linoleico (ômega-6).

A essencialidade dos AG ômega-3 demorou a ser caracterizada pela dificuldade em estudar seus efeitos nos modelos animais e pelo fato de somente ter sido evidenciada em humanos quando começaram administrar dietas parenterais suplementadas com AG ômega-6. Apenas na década de 90 com Innis (1991) foi comprovada a essencialidade do ômega-3, quando reverteu alterações neurológicas e visuais em uma menina de 6 anos que mantinha uma dieta parenteral rica em ômega 6 e pobre em ômega-3.

O AG ômega-9 (ácido oleico) confere proteção contra a peroxidação lipídica diferente dos ácidos graxos polinsaturados como linolênico, EPA, DHA que contêm 4, 5 e 6 duplas ligações respectivamente são muito menos estáveis (CURI *et al.*, 2002). O uso de formulações ricas em lipídios na forma monoinsaturada, comparado ao uso de poliinsaturados evidenciou menor resposta inflamatória e menor produção de radicais livres com fórmula rica em monoinsaturados (CURI *et al.*, 2002).

Ácidos graxos frequentemente incorporados em membranas fosfolipídicas são o ômega-3: eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ômega-6: ácido araquidônico (AA), e ômega-9: ácido oleico (OA). EPA e DHA têm efeitos diretos sobre a fluidez estrutural e funcional da membranas celulares. Por meio de

incorporação dos fosfolípidos nas membranas celulares, os ácidos graxos poli-insaturados influenciam nas respostas imunes e inflamatórias, atuando na fluidez das membranas (facilitando ou dificultando a adesão de receptores, moléculas de superfície e de produção de enzimas), à síntese de moduladores de inflamação (eicosanóide) e na transdução de sinal, com maior ou menor produção de citocinas inflamatórias (CALDER, 2013).

As membranas que são ricas em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) são menos susceptíveis a oxidação por radicais livres do que as membranas ricas em ácidos graxos saturados, possivelmente porque o maior número de insaturações aumentam a probabilidade das duplas ligações do que em espécies reativas do oxigênio (BITTENCOURT *et al.*, 2002).

As dietas ancestrais eram ricas em vegetais, frutas, carnes e peixes e continham proporções similares de AGPI ômega-6 e ômega-3. Já as dietas ocidentais atuais tem uma razão mais próxima de 10 a 20 para 1, devido principalmente a um aumento do consumo de óleos vegetais e gordura saturada e uma redução no consumo de peixe (DAHELE; FEARON, 2006).

Atualmente, a adequação do balanço dietético de lipídios tem motivado inúmeras investigações. Em pacientes com alterações das respostas metabólicas, o equilíbrio entre os lipídios da dieta tem como propósito controlar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória exacerbada, por meio da relação entre os tipos de ácidos graxos poliinsaturados ingeridos (CALDER, 2003), que afetam a síntese de eicosanóides que atuam como mensageiros intermediários de fatores de crescimento, controlando o crescimento e diferenciação de células epiteliais (CAPONE; BAGGA; GLASPY, 1997).

Os lipídios de 18 átomos de carbonos (ácido linolênico [18:3 - ômega-3], ácido linoleico [18:2 - ômega-6] e ácido oleico [18:1 - ômega-9]) usam as mesmas enzimas - dessaturases ($\Delta 6$ e $\Delta 5$) e uma elongase - para sintetizar seus derivados com 20 átomos de carbonos: ácido eicosapentaenóico (EPA) (20:5 - ômega-3), ácido araquidônico (AA) (20:4 - ômega-6) e ácido eicosatrienóico (ETA) (20:3 - ômega-9). Em ordem de preferência, os substratos para essas enzimas são: ômega-3 > ômega-6 > ômega-9 (Figura 8). Entretanto, existem duas classes de lipídios essenciais para as sínteses dos eicosanóides: ômega-6 e ômega-3, por meio dos seus derivados ácidos eicosapentaenóico e araquidônico (BISTRAN, 2003).

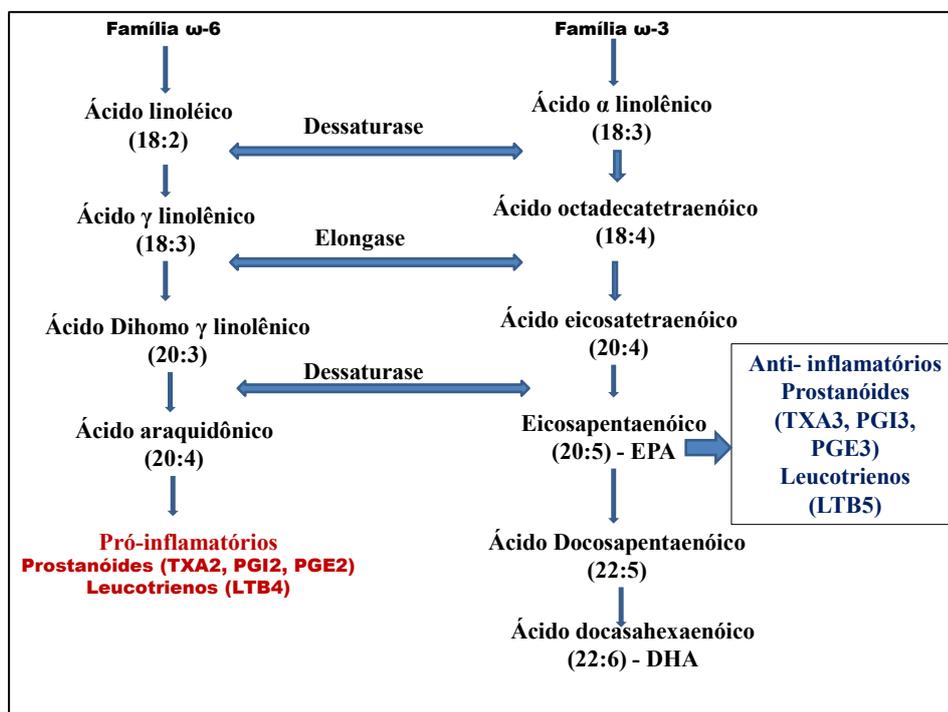


Figura 8. Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados. Abreviatura: ω -6 = ômega-6; ω -3 = ômega-3 Adaptado de CALDER (2003).

O alto consumo de ácido linoleico (ômega-6) favorece o aumento do conteúdo de ácido araquidônico (AA) nos fosfolipídios das membranas celulares, aumentando, conseqüentemente, a produção de prostaglandina (PG) E2 e leucotrieno (LT) B4, por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX),

respectivamente. A ingestão de óleo de peixe introduz EPA nos fosfolipídios das membranas, inibindo o metabolismo do AA por competição pelas mesmas vias enzimáticas (COX e 5-LOX), promovendo a formação de PGE₃, em vez de PGE₂, e LTB₅, em vez de LTB₄, que são mediadores inflamatórios menos ativos (Figura 9) (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000). Em geral, o ácido linoleico é precursor da síntese de eicosanóides com características pró-inflamatórias, como o tromboxano A₂ (TXA₂), as PGI₂ e PGE₂ e os LTB₄ (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; KELLEY, 2001).

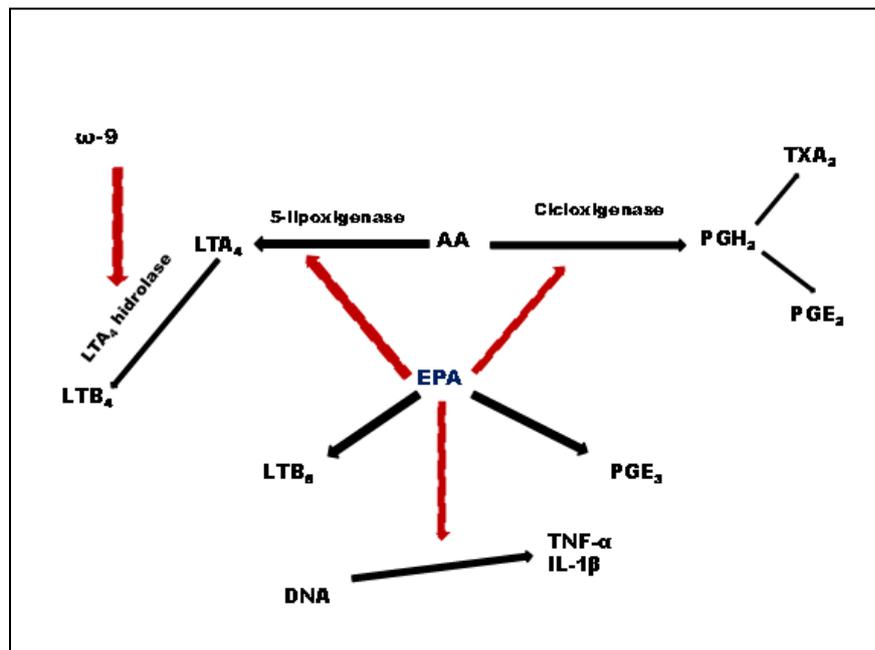


Figura 9. Metabolismo dos eicosanóides durante a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos por meio do ácido araquidônico (AA) e do ácido eicopentaenoico (EPA). Setas preta = via de síntese; setas vermelhas = via inibitória. Abreviatura: ω-6 = ômega-6; ω-3 = ômega-3 .

As PGE₂ e os LTB₄ são os mediadores que possuem o maior potencial pró-inflamatório. A PGE₂ induz à febre, promove vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e potencializa a dor e o edema causados por outros agentes, como bradicinina e histamina. Por outro lado, a PGE₂ inibe a produção do

TNF- α e IL-1, apresentando, nesse aspecto, característica antiinflamatória. Tem potencial imunossupressor, pois inibe a proliferação de linfócitos, a atividade das células *natural killer* (NK) e a produção de IL-2 e Interferon (IFN). O LTB4 aumenta a permeabilidade vascular, o fluxo sangüíneo e a quimiotaxia dos leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e de TNF α , IL-1 e IL-6. Em todos esses aspectos, o LTB4 é pró-inflamatório (GRIMBLE, 2002; CALDER, 2003). Como citado, os tromboxanos (TX) também provêm do metabolismo dos eicosanóides. Entre eles, o TXA2 é o principal subproduto do AA, promovendo agregação plaquetária, adesão leucocitária e contração da musculatura lisa (CALDER, 2003).

Por outro lado o aumento da oferta de ácidos graxos da família ômega-3, como o ácido linolênico ou de EPA e de DHA, favorece a síntese de eicosanóides como a PGE3, TXA3 e LTB5, que possuem características antiinflamatórias. Esse equilíbrio proporciona menor formação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo alguns dos efeitos imunossupressores (Figura 8 e 9) (ROBERT, 2005; NAKAMURA, 2005).

Helton e Espart (2001) demonstraram que o EPA, ao competir com os AA na membrana celular causa alterações na produção de TNF- α . Esses efeitos estão associados à redução no NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) que é um fator de transcrição nuclear encontrado em todos os tipos celulares, estando envolvido em repostas a estímulos, tais como, estresse oxidativo, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, antígenos virais ou bacterianos.

A produção de fatores inflamatório, radicais livres oxigenados e estresse oxidativo também pode ser diminuídos com o uso de ácidos graxo monoinsturado

oleico (ômega-9) (GALLAND et. al., 2010; QUILES et. al., 2006; GILINGHAM et. al., 2011; BERGOUIGNAM et. al., 2009; LATREILLE et. al., 2011).

A produção de radicais livres pela peroxidação das membranas podem levar ao aumento de dano no DNA. Vários trabalhos demonstram que o óleo de oliva, rico em ômega-9, reduz a peroxidação lipídica e dano ao DNA (SYED et. al., 2010; QING et. al., 2007; AMEL et. al., 2010; THANAA et. al., 2014; LOPEZ et al., 2004).

Níveis de ingestão adequada (AI) de ácidos graxos essenciais foram estabelecidos pelo *Institute of Medicine*, por meio das *Dietary Reference Intakes* (DRIs), baseadas na ingestão média da população americana. Esses valores preconizados de consumo são de 17g e 12g/dia de ácido linoleico (ômega-6) e 1,6g e 1,1g/dia de ácido linolênico (ômega -3) para homens e mulheres, respectivamente (WELCH *et al.*, 2010).

1.6 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Modelos experimentais de queimaduras em animais têm sido uma ferramenta essencial para o estudo da fisiopatologia de lesões cutâneas (queimaduras) em humanos, investigar novos métodos de tratamento (KAUFMAN *et al.*, 1990), e avaliar a influência da administração de fármacos em resposta ao trauma (AULICK *et al.*, 1981).

No presente estudo foram utilizadas misturas de óleos em concentrações nutracêuticas com razão de ômega-6 : ômega-3 baixa que favorece uma ação anti-inflamatória e a razão de ômega-9 : ômega-6 alta com ação antioxidante conforme apresentado em outras situações biológicas (ALLAYEE; ROTH; HODIS, 2009; SIMOPOULOS 2002, 2008; CAMPELO et. al., 2011), sendo este o primeiro trabalho

em que as misturas de óleos inseridas dentro de uma bebida láctea são administradas em ratos queimados *ad libitum*.

Considerando que essas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas, o balanço entre ômega-9, 6 e 3 na dieta é de grande importância. O presente estudo foi desenhado para analisar os efeitos das misturas de óleos de ômega-9, 6 e 3, avaliando a queimadura térmica, estresse oxidativo e cicatrização da queimadura da pele de ratos.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Estudar os efeitos nutracêuticos do leite enriquecido com misturas de óleos ômega 9, 6 e 3 em ratos submetidos à queimadura térmica por condução direta.

2.1 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos da mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 na avaliação macroscópica das lesões por queimadura de espessura total;
- Avaliar o efeito das mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 na espessura da epiderme;
- Estudar o efeito das mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 na proporção do colágeno tipo I e tipo III;
- Avaliar a imunomarcção do fator de transcrição nuclear (NF-kB) nos animais tratados com a mistura de óleos ômega 9, 6 e 3;
- Avaliar o efeito das mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 nos biomarcadores (malondialdeído, glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e catalase) de estresse oxidativo em amostras de pele de ratos queimados.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi de caráter experimental, interinstitucional, com o uso de animais vivos e controle intra-indivíduo, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638, de 08 de Maio de 1979, sendo no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) da Faculdade de Medicina do Centro Universitário Christus (Unichristus) e no laboratório de Nutrigenômica da Universidade Federal do Ceará, analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob número 69/2016 de 28 de julho de 2016

As condições do alojamento até o bem estar geral dos animais, foram controladas pela direção do biotério e os procedimentos foram baseados nos princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement).

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central do Centro Universitário Christus (Unichristus) e mantidos no laboratório de cirurgia experimental da Unichristus, com massa corporal média de $253,2 \pm 2.58$ g .

Todos receberam ração padrão e líquido *ad libitum*, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais, em gaiolas individuais, com ciclos de dia (12horas) e noite (12horas).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 48 animais divididos em quatro grupos, de dois tempos (três dias e vinte e um dias). Os grupos foram: água, queimado+água (Q + água), queimado + leite (Q + L), queimado + leite modificado (Q + LM), com doze animais em cada grupo, sendo 6 animais sacrificados com três dias e 6 com vinte e um dias pós-queimadura), ver distribuição dos grupos no quadro 2 e proporções de óleos ômega-9, 6 e 3 no quadro 3.

Quadro 2. Divisão dos grupos e composição das misturas de óleos ômega.

Grupos	Composição	ômega 3, 6 e 9
Água	Água	–
Q + Água	Água	–
Q + L	Leite Desnatado sem lactose	–
Q + LM	Leite Desnatado sem Lactose adicionado mistura de óleos	Sim

Abreviaturas: Q + Água = grupo queimado administrado água; Q + L = grupo queimado administrado leite; Q + LM = grupo queimado administrado leite modificado.

Quadro 3. Composição do leite desnatado sem lactose e com adição da mistura de óleos ômega (ω -9, ω -6 e ω -3). Fonte: NVTRO.

Composição do leite desnatado sem lactose + mistura de óleos
Leite desnatado
Óleo de girassol (fonte de ω -9, ω -6 e ω -3)
Óleo de canola (fonte de ω -9, ω -6 e ω -3)
Óleo de peixe (fonte de ω -3)
Azeite de oliva (fonte de ω -9)
Aroma Grasse GA 127790
Sucralose
Aroma de baunilha
Aroma de leite
Água

A dose que foi ministrada de cada solução corresponde a 150 ml/dia de água ou leite ou leite modificado, obedecendo à proporção de 3,4:1 (ômega-9 : ômega-6) e 1,4:1 (ômega-6 : ômega-3).

3.4 Fluxograma experimental

Inicialmente os animais foram pesados, anestesiados, depilados, delimitada área no dorso do animal com molde vazado confeccionado com película de écran, demarcado a área a ser queimada utilizando caneta dermatográfica, realizada antissepsia da pele com clorexidine a 2%, em seguida submetidos a indução do procedimento cirúrgico (indução da queimadura), foram ofertados aos animais em livre demanda ração e líquido em garrafas individualizadas contendo a água ou leite ou leite modificado, sendo colocada cada garrafa em seu respectivo grupo e trocada a cada 24 h. Antes e após a troca da ração e das garrafas foram mensuradas suas

respectivas quantidades para determinar quanto o animal consumiu de ração e de água durante o experimento.

Foram administrados, durante vinte e um dias (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7...D21) consecutivos, sempre no mesmo horário, *ad libitum*, das soluções descritas no quadro 2 conforme seus respectivos grupos.

No terceiro e no vigésimo primeiro dia (D3 e D21) pós-queimadura, conforme protocolo, os animais foram anestesiados, realizadas as fotografias das lesões, em seguida foram colhidas amostras de pele para análise da sua espessura (D21), tipo de colágeno (D21) , imunohistoquímica (D3 e D21) e estresse oxidativo (D3 e D21). No sétimo dia (D7) os animais foram anestesiados, removidas as crostas delicadamente com gases umedecidas com solução fisiológica 0,9%, realizada as fotografias das lesões e retornado para as gaiolas até 21º dia (ver figura 10).

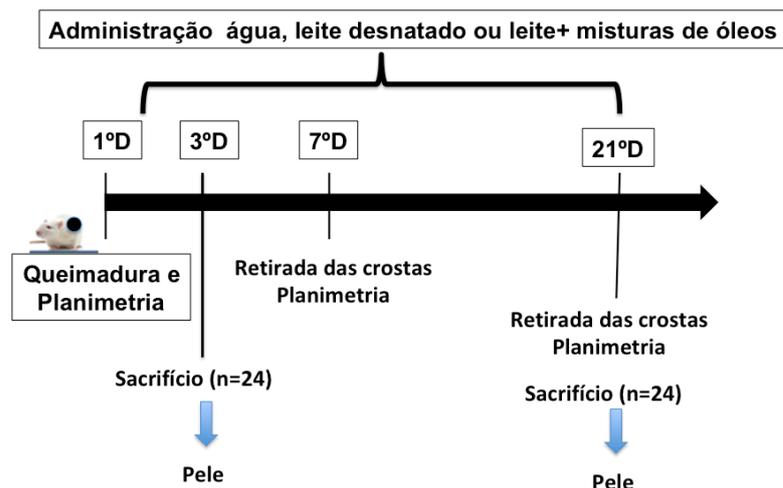


Figura 10. Fluxograma experimental. Abreviaturas: 1ºD = primeiro dia experimental; 3ºD = terceiro dia experimental ; 7ºD = sétimo dia experimental e 21ºD = vigésimo primeiro dia experimental.

3.5 Técnica Anestésica e Analgesia

Os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina a 5% na dose de 90mg/kg e cloridrato de xilazina a 2%, na dose de 10mg/kg, administrados simultaneamente, por via intramuscular, na parte posterior do membro pélvico direito (figura 11). Os animais foram considerados anestesiados quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais, e retirada da pata ao estímulo doloroso por preensão.



Figura 11. Ato anestésico no membro pélvico direito/face medial. (Fonte: arquivo pessoal).

Foi realizado controle rigoroso dos tempos e da temperatura dos animais (por meio de termômetro retal) dos animais, mantendo-os entre 36° e 37° graus Celsius utilizando meios físicos (uso de lâmpada incandescente para aquecer, quando necessário) durante todo o procedimento cirúrgico. Também foi verificado se os animais apresentavam cianose de extremidade ou mucosas durante todo o experimento.

A analgesia foi administrada por via oral (*ad libitum*) durante as primeiras 24h de pós-operatório, utilizando 30mg de fosfato de codeína (Janssen Cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brasil) na proporção de um comprimido triturado e dissolvido em 500 ml de água (THURMON et. al., 1996; GRIMM et. al, 2015).

3.6 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram acomodados em bancada cirúrgica durante todo o procedimento.

Após a certificação de que os animais estavam anestesiados, os mesmos tiveram o dorso depilado, incluindo flancos até a raiz da cauda, utilizando barbeador elétrico (figura 12). Foram colocados em decúbito ventral sobre pranchetas cirúrgicas, previamente higienizadas com álcool a 70%, secas e protegidas por campo cirúrgico. Demarcou-se no dorso do animal em seis áreas simétricas de 1 x 1 cm, laterais à linha média dorsal, guardando a distância entre si de 1 cm, mediante a utilização de caneta dermográfica (Sanford, Fine Point, Permanent Marker) e de molde confeccionado com película de écran (figura 13).

Em seguida realizou-se a antissepsia da pele (figura 14) com clorexidina a 2% (Riomed, Ind. Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) e secagem por compressa de gaze.



Figura 12. Preparo do local a ser realizada a queimadura (dorso sendo depilado). (Fonte: arquivo pessoal).

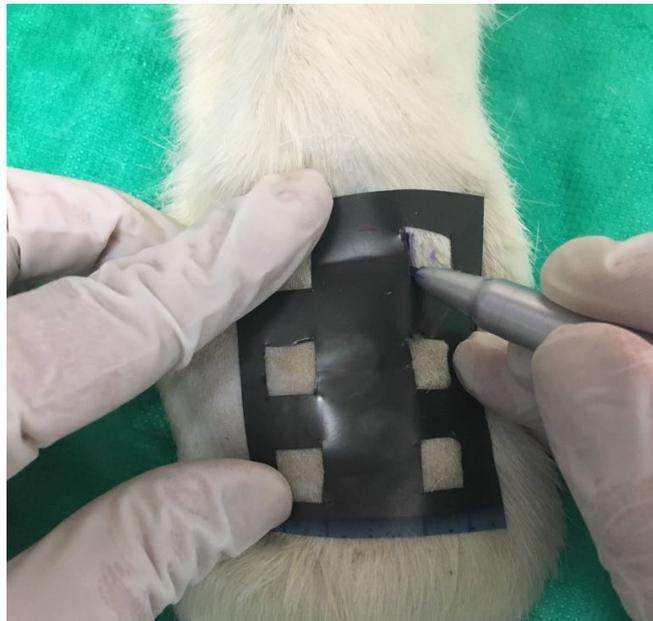


Figura 13. Demarcação de área. Molde vazado confeccionado e caneta dermográfica. (Fonte: arquivo pessoal).

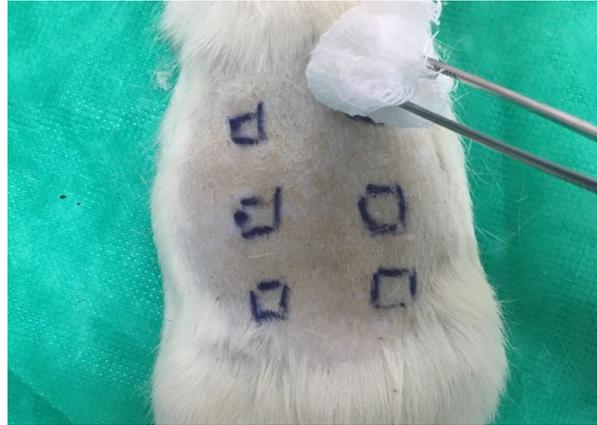


Figura 14. Antissepsia da pele com clorexidina 2%. (Fonte: arquivo pessoal).

3.6.1 Realização das queimaduras

Para realização das queimaduras foi utilizado um ferro de soldar (Hikari 40 W) especialmente preparado (figura 15). A ponta originalmente redonda foi retirada e na haste foi acoplada uma placa fina quadrada de cobre medindo 01 cm de lado (superfície de contato de 1cm²). O sensor de um termostato, preparado para manter uma temperatura constante de 200° C, foi implantado 2 cm acima da área de contato. Foi acoplado também um termômetro digital com um termopar K (ET-110, Houston – Texas, USA inc.), para atestar a temperatura exata no momento da realização da queimadura. O peso total do aparelho era de 90g, incluindo o ferro de soldar, o cabo elétrico de 80 cm de comprimento e o cabo do sensor. O aparelho foi validado e calibrado (validação interna) pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pelo Professor Dr. Alejandro Pedro Ayala (CAMPELO et. al, 2011).

O conjunto foi colocado em contato com a pele previamente demarcada, verticalmente e sem pressão adicional por nove segundos cronometrados (figura 16), sendo os cabos sustentados pelo pesquisador.

Todas as queimaduras foram realizadas a 200 °C durante 9 segundos produzindo lesões de espessura total na pele dos animais (ratos) conforme já publicado por CAMPELO *et al.* (2015).



Figura 15. Equipamento completo utilizado para realização da queimadura. Observar termômetro digital, termopar tipo K na ponta, estabilizador de corrente elétrica com termostato interno. (Fonte: arquivo pessoal).



Figura 16. Realização da queimadura por 9 segundos. (Fonte: arquivo pessoal)

3.7 Sacrifício dos animais

No terceiro e vigésimo primeiro dia os animais foram anestesiados novamente com ketamina mais xilazina e realizada planimetria digital (ver descrição do método abaixo) para quantificar o dano físico (área queimada da pele). Os animais foram sacrificados com infusão de doses letais dos anestésicos, sendo retirados quatro fragmentos de pele (2 x 2 cm) incluindo a porção central de tecido contendo a ferida ou cicatriz circundada por tecido normal, sendo dois fragmentos imersos em paraformaldeído a 4% e dois fragmentos imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

3.8 Planimetria digital

A planimetria digital foi realizada logo após a indução das queimaduras no D1 e nos dias D7 e D21, sendo os animais posicionados em decúbito ventral na mesa cirúrgica, em seguida foram fotografados para quantificação da área de queimadura.

As fotografias (imagens) foram obtidas com câmera digital (Sony, Cyber-Shot, 14.1 Mega pixels, Brasil), montada em tripé com distância padronizada de 35 cm do dorso do animal. Uma régua de 15 cm foi colocada ao lado do animal para calibração usando software para análise das imagens, conforme descrito no tópico abaixo.

3.8.1 Quantificação da área de lesão (D1, D7 e D21).

As imagens adquiridas conforme descrito no tópico 3.4 (formato tiff, 512 x384 pixels) foram calibradas e a área de superfície da ferida (em cm²) foi calculada pela planimetria computarizada usando o programa de computador Image Tool 3.0

(University of Texas Health Center at San Antonio, Texas, USA) conforme descrito em outros trabalhos (MESQUITA et. al., 2010; CAMPELO et. al, 2011; CAMPELO et. al, 2015; CHOI et. al., 2018; INOUE et al., 2018) (ver figura 17).

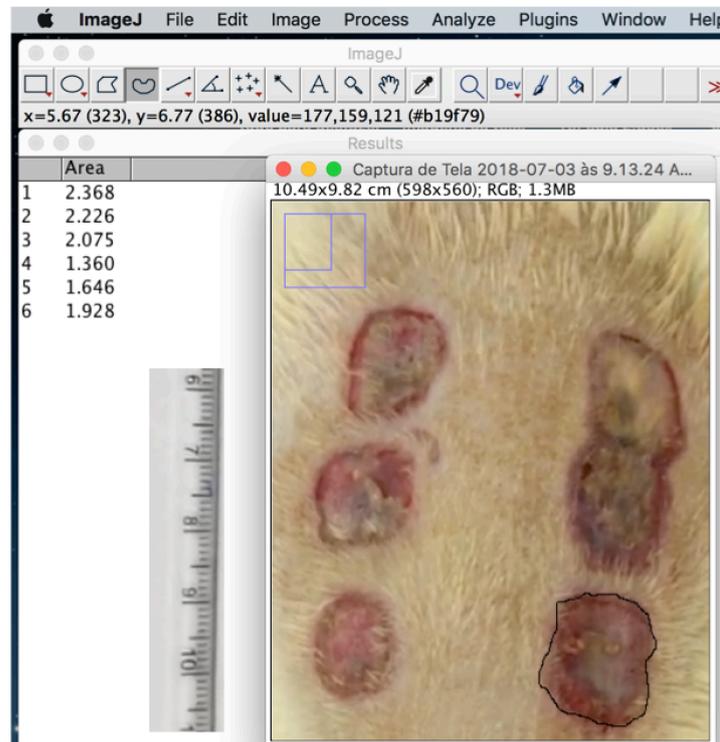


Figura 17. Delimitação e cálculo da área de lesão. (Fonte: arquivo pessoal).

A taxa de cicatrização da lesão foi calculada utilizando a fórmula já publicada por BEN et al. (2016) e MENON et. al. (2017), conforme abaixo:

$$\text{Taxa de cicatrização (\%)} = [1 - (A1^{\circ}D/A21^{\circ}D)] \times 100$$

Nota-se que A1[°]D corresponde a área de lesão no primeiro dia experimental e A21[°]D corresponde a área de lesão no vigésimo primeiro dia pós-queimadura. O resultado foi multiplicado por 100 para ser expresso em porcentagem de área cicatrizada.

3.8.2 Análise da espessura da pele cicatrizada

Na ocasião do sacrifício dos animais no D21, foram retirados dois fragmentos de pele (2 x 2cm) incluindo a porção central de tecido contendo a lesão circundada por tecido normal (até musculatura), com lâmina de bisturi número 15. Após a remoção, as amostras foram fixadas em formaldeído tamponado a 4% e enviadas para processamento histológico. Após inclusão em parafina, as peças foram levadas ao micrótomo e submetidas a corte de 5 micrômetros de espessura. Uma vez montadas as lâminas, os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) conforme publicado anteriormente (CAMPELO et al., 2011. CAMPELO et al., 2015; WANG et. al., 2015). Para avaliar a espessura da pele cicatrizada, foi feita por planimetria digital medindo a espessura da epiderme cicatrizada em cinco pontos distintos por animal conforme WANG et. al. (ver figura 18).

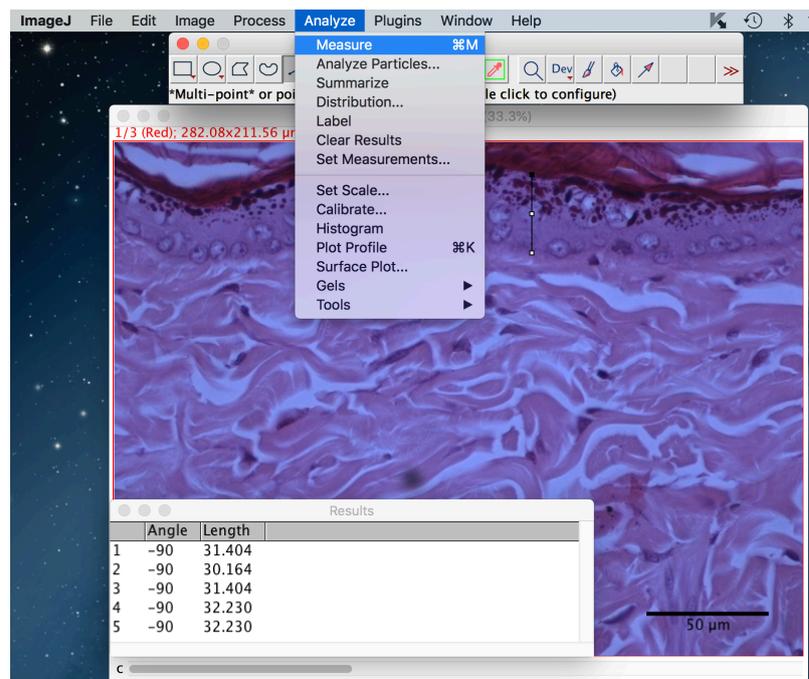


Figura 18. Imagem do software Image J, utilizado para quantificar a espessura da epiderme sempre em ângulo de 90 entre as bordas da epiderme. Software foi calibrado inicialmente com a barra calibradora da própria imagem. (Fonte: arquivo pessoal).

3.9 Histoquímica com coloração *Picrosirius Red*

A técnica com coloração *picrosirius red* permite a obtenção de informações acerca da densidade e do tipo de colágeno formado pela identificação da sua birrefringência, que é a capacidade de brilhar sobre fundo escuro. No exame sob microscópio de luz polarizada, o colágeno tipo I (COL-1), apresenta fibras mais espessas, aglomeradas e fortemente birrefringentes com coloração avermelhada. Já o colágeno tipo III (COL-3), apresenta fibras mais finas, e dispersas no parênquima, fracamente birrefringentes com uma coloração esverdeada (JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979; RITTLÈ, 2017).

Para realização da coloração foi necessário realizar cortes de 5 micrômetros do tecido previamente emblocado em parafina, em seguida desparafinado em xilol (xileno), hidratado em solução de etanol com concentrações decrescentes até água. Corado durante 1 hora em solução de *Sirius Red* a 0,1 % (contendo 4,0 g de ácido pícrico mais 0,1 g de *Sirus Red F3B* (Cl.35782) e completado até 100 ml com água destilada). Em seguida as laminas foram lavadas durante 2 minutos em solução de ácido clorídrico 0,01 N, em seguida os tecidos foram contracorado com hematoxilina de Harris por 6 minutos, desidratados até etanol absoluto e clarificados com xileno. Finalmente, montados em lâmina com resina e lamínula.

As imagens dos cortes histológicos foram fotografadas sob luz polarizada, utilizando-se uma câmera digital CCD Sony DSC W55 de 7.1 Mega Pixels (Sony Inc, Tóquio, Japão) acoplada a microscópio Coleman N-200/T, São Paulo, Brasil, empregando objetiva de 40X, em modo manual, ISO 100, velocidade do obturador 1/2000, abertura F 4,8 em zoom máximo, e armazenadas em arquivos JPEG, escala de 2,083 pixel por micrômetro.

As fotografias foram realizadas em um único dia por uma só pessoa, de forma

a minimizar variações de iluminação.

Com auxílio de programa analisador de imagens (Sistema de Análise Morfométrica, SAMM), um programa de computador desenvolvido especificamente para finalidade (FECHINE JAMACARU, 2006), foram realizadas medidas em *pixels* dos feixes que apresentavam birrefringência em cada lâmina.

As imagens foram analisadas pelo SAMM da seguinte maneira: para a quantificação do colágeno, o sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estrutura de interesse (fibras colágenas do tipo I e III), de acordo com a técnica histoquímica empregada (*picrosirus*). Tal procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente (separar os objetos de interesse dos demais componentes da cena) as estruturas de interesse. Concluída a segmentação, o *software* realizava a quantificação da estrutura de interesse em toda a imagem. Para tanto, determinava a densidade de área, que é definida pelo quociente entre a área ocupada pela estrutura de interesse e a área total do campo estudado, sendo expressa em termos percentuais (Figuras 19 a 22) conforme publicado (MESQUITA et. al., 2010; MESQUITA et. al., 2015).

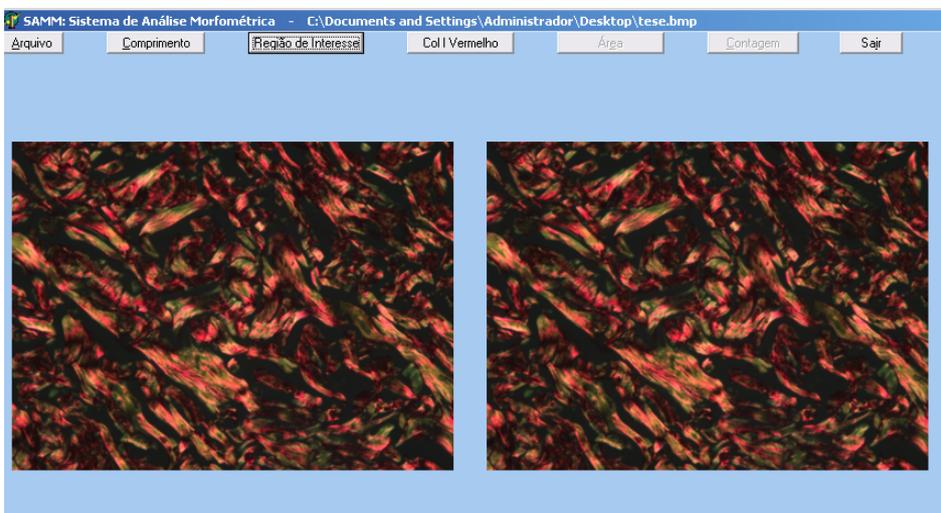


Figura 19. Imagem do Programa SAMM. A) Primeiro passo selecionar toda imagem para análise e em seguida pressionar o icone Col I Vermelho para selecionar automaticamente tudo que for vermelho. (Fonte: arquivo pessoal).

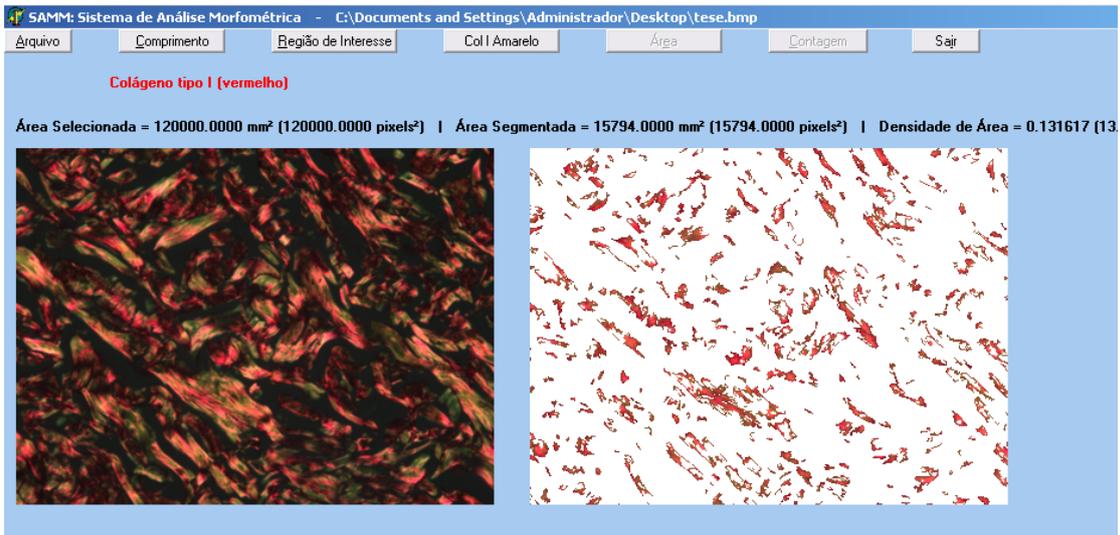


Figura 20 . Resultado do primeiro passo, com densidade de área vermelha. Em seguida selecionar o ícone Col I Amarelo (segundo passo). (Fonte: arquivo pessoal).

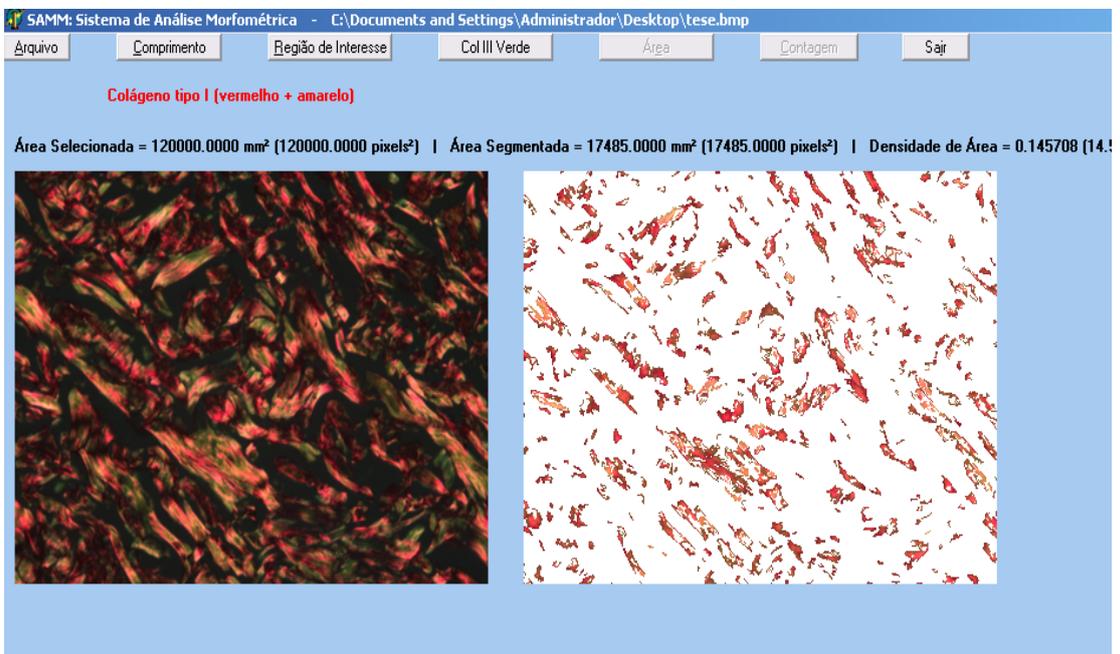


Figura 21. Imagem representativa do resultado do segundo passo que calcula a densidade da cor amarela e soma com a da cor vermelha para determinar a densidade por área do colágeno tipo I. (Fonte: arquivo pessoal).

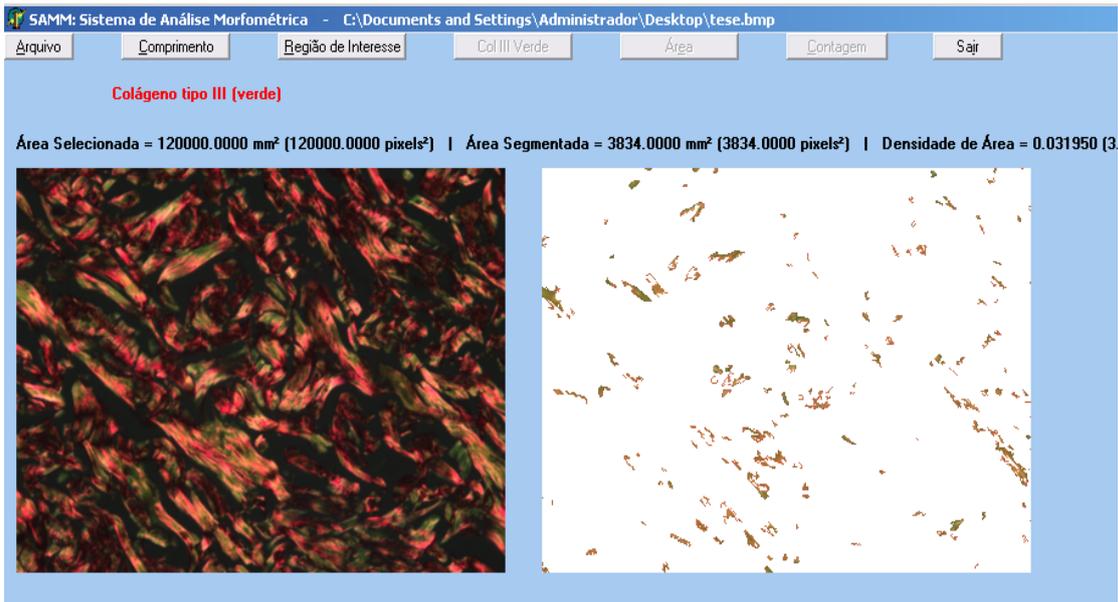


Figura 22. Imagem do programa SAMM ao pressionar o icone Col III verde automaticamente é calculado a densidade de área da cor verde (colágeno tipo III). (Fonte: arquivo pessoal).

3.10 Protocolo da Imunohistoquímica (NF-kB p50 NLS)

Imunohistoquímica para NF-kB p50 (NLS) foram realizadas utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os tecidos foram removidos e fixados em formol 4% por 24 h para inclusão em parafina e posteriormente confecção de lâminas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 10 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (10 minutos). Depois lavados com PBS (10 minutos). Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NF-kB diluído a 1:200 em PBS com albumina sérica bovina a 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído a 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavados, os

cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB). Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário (anti-NF-κB) foi substituído por PBS-BSA a 5%.

3.10.1 Aquisição e processamento das imagens de imunohistoquímica

Imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz (Olympus, X100). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma avaliação panorâmica da peça, utilizando o aumento (40 vezes), com a finalidade de identificar as regiões de maior densidade das estruturas de interesse (borda inicial e final da zona queimada contendo o tecido de reepitelização). Em seguida, utilizando uma ampliação de 200 vezes, foram capturadas imagens digitais coloridas das bordas e área cicatrizada. As imagens foram armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 640 x 480 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

As imagens foram analisadas pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM), um programa de computador desenvolvido para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas de interesse (bordas de lesão e tecido de reepitelização), de acordo com a técnica imunohistoquímica empregada. Este procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente as estruturas de interesse (separando-as dos demais componentes do preparado) na

imagem inteira do campo analisado como numa região de interesse definida pelo operador. Concluída a segmentação, o *software* realizou a quantificação da estrutura de interesse no campo estudado. Para tanto, calculou-se a densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela estrutura de interesse e a área total do campo analisado (Figuras 23) conforme já publicado (CAMPELO et. al., 2015).

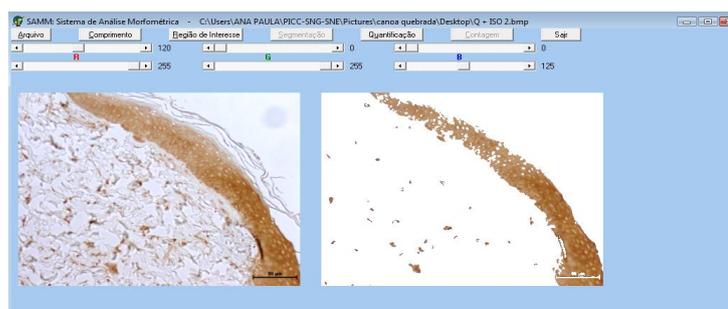


Figura 23. Imagem representativa da tela do sistema de análise morfológica (SAMM). A Esquerda imagem obtida por microscopia de luz com aumento de 200x marcada para anticorpo anti-NF-kB (NLS). A direita mostrando a segmentação da imagem da esquerda que foi quantificada. (Fonte: arquivo pessoal).

3.11 Estudo do estresse oxidativo

3.11.1 Avaliação da peroxidação lipídica da membrana (malondialdeído - MDA)

A técnica teve por objetivo quantificar o malondialdeído (MDA), formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se com a extração desse composto, usando um solvente orgânico (N-butanol), determinando-se a concentração de MDA que reflete a expressão de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O presente estudo foi quantificado pelo método conforme publicado por SVOBODOVA et. al., (2011), frequentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido, a ser analisada, foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C , imediatamente após a coleta.

Após a pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado, 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma

alíquota de 0,5ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0ml de solução aquosa de TBA a 0,6% e 3,0ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 a 1%). Em seguida a mistura foi colocada em banho em ebulição por 45 minutos, logo após resfriada em banho de gelo, seguido de adição de 4,0 ml de N- butanol. Em seguida, agitada por 2 minutos, e centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. Em seguida foi quantificada a absorvância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) com o espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton – Califórnia) a 520nm e 535nm.

A diferença entre os valores obtidos em duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de MDA, usando regressão linear a partir de uma curva padrão. Os valores foram expressos em $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido.

3.11.2 Dosagem dos agentes antioxidantes

3.11.2.1 Dosagem da glutathiona reduzida (GSH)

A dosagem do GSH foi realizada conforme SVOBODOVA et. al., (2011), baseada na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrozenzoico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzoico.

Para isso, as amostras de pele foram pesadas e homogeneizadas em solução de 5ml de EDTA 0,02M gelada, com bastão de vidro e filtrada em lã de vidro. Foram retirados 4,0ml do homogenato e misturou-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético a 50%. O tubo foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Foram retirados 2,0ml do sobrenadante e acrescentou-se 4,0ml de TRIS 0,4M (pH 8,9) e 1,0ml de DTNB 0,01M; agitou-se a mistura para homogeneização.

Em seguida foram lidas as absorvâncias em espectrofotômetro a 412nm, 5

minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de GSH, previamente determinada pelo kit conforme SVOBODOVA et. al. (2011).

3.11.2.2 Dosagem da atividade da enzima glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPX) foi determinada de acordo com um procedimento modificado conforme publicado por NECHIFOR e DINU (2017), no qual a molécula oxidada de glutathiona (GSSG), produzida na reação primária com a GPX, é reduzida por intermédio de uma segunda enzima, a glutathiona redutase, com o auxílio do cofator NADPH.

Esta análise foi realizada com base no decaimento da absorbância no comprimento de onda de 340 nm, devido à oxidação do NADPH provocada pela presença da enzima glutathiona peroxidase.

Para a determinação da atividade enzimática da enzima glutathiona peroxidase, o meio de reação foi composto por 350 µL de tampão fosfato de potássio 171 mM + azida sódica 4,28 mM + EDTA 2,14 mM, 250 µL de glutathiona reduzida 6 mM, 250 µL de NADPH 0,9 mM, 250 µL de glutathiona redutase 2 U/mL e 150 µL de extrato enzimático.

A azida sódica foi adicionada ao meio com o objetivo de inibir a atividade da enzima antioxidante catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água.

Os reativos foram pipetados em tubo de ensaio, em sequência, a temperatura de 22°C (±1). Após rápida homogeneização, foram adicionados 250 µL de peróxido de hidrogênio, efetuando-se a transferência do meio de reação para a cubeta de quartzo e determinando no espectrofotômetro a variação de absorbância

a 340 nm durante 300 segundos, com leituras registradas a cada 15 segundos e zerando o aparelho com água Milli-Q.

Devido ao fato de possuírem baixa estabilidade, as soluções de glutatona redutase e peróxido de hidrogênio foram preparadas minutos antes de cada análise, não sendo estocadas.

Foram testadas três concentrações de peróxido de hidrogênio, 0.72, 7.2 e 72 mM, e em substituição a esse substrato, terc-butil hidroperóxido na concentração de 15 mM.

Paralelamente, foi feita a leitura dos controles, que consistiam no mesmo meio de reação exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água Milli-Q na mesma proporção.

A medida de absorvância do controle é necessária para descontar a oxidação não enzimática que ocorre com o NADPH.

3.11.2.3 Dosagem da Catalase

A catalase foi uma das primeiras enzimas estudadas, em 1923, Warburg sugeriu que a catalase continha ferro, através de um estudo de observação de um complexo enzima – substrato.

Após a calibração do equipamento, foi colocado em uma cubeta de quartzo 1mL de tampão fosfato a 25°C, logo em seguida o aparelho foi zerado, e o tampão descartado. Em seguida, 955µl de tampão fosfato foram adicionados na cubeta com 10µl da amostra, na concentração de 0,8µg/µl, após 10seg o aparelho foi zerado e o valor dado foi utilizado como basal. Os experimentos foram feitos em duplicata. As dosagens de CAT total foram baseadas no consumo de H₂O₂, essa reação foi

detectada por espectrofotômetro em 240nm com tempo total de 56 segundos e intervalo de tempo de 7 segundos conforme descrito por MARTINEZ et. al. (2018).

3.12 Análise Estatística

Os dados do estudo foram digitados no Excel for Windows, versão 2007 da Microsoft e analisados pelo Graphpad Prism versão 5.0 para Windows. Analisados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Dados que obedeceram a curva de normalidade foram submetidos a testes paramétricos (Análise de variância – ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey) e os resultados apresentados com média \pm desvio padrão (média \pm DP). Sempre realizando comparações entre todos os grupos.

O nível de significância foi estabelecida em 5% para todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução do peso dos animais

Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) na média da massa corpórea entre os grupos Água, Q+A, Q+L e Q+LM no primeiro dia de experimento (ver tabela 1 e figura 24).

No sétimo dia, os grupos Q+A e Q+LM não apresentam diferença estatística significativa da média da massa corpórea ($p>0,05$) quando comparados com o grupo água. Nesse tempo a média da massa corpórea do grupo Q+L foi menor que a média do grupo Água com diferença estatística significativa ($p<0,05$) (ver Tabela 1 e figura 24).

No décimo quarto dia (D14) a média da massa corpórea do grupo Q+L foi menor do que o do grupo Água com diferença estatística significativa ($p<0,05$). Neste tempo, não houve diferença estatística entre os grupos água, Q+A e Q+LM ($p>0,05$) (ver tabela 1 e figura 24).

No D21 houve menor média da massa corpórea dos animais no grupo Q+A, Q+L e Q+LM com diferença estatística significativa ($p<0,05$) quando comparados com o grupo Água (ver tabela 1 e figura 24). Não houve diferença entre as médias da massa corpórea entre os grupos Q+A, Q+L e Q+LM ($p>0,05$) (ver tabela 1 e figura 25).

O grupo Água foi o único que apresentou no D21 média da massa corpórea maior que o D1 e o D7 com diferença estatística significativa ($p<0,05$) (ver tabela 1 e figura 24).

Tabela 1. Evolução da massa corpórea dos animais, após queimadura nos grupos tratados com leite, leite modificado e controles.

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
D1	252.5	4.55	256.7	3.933	250.5	13.5	253.1	4.663
D7	264.2	10.36	255.7	10.29	234.7	22.02	250.5	7.148
D14	287.3	11.89	261.3	15.44	242.3	21.45	264.3	5.888
D21	313.7	14.98	272.2	18.44	244.7	19.95	272	12.46

Nota: Dados apresentado em média (g) \pm desvio padrão (DP). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D1 = primeiro dia experimental; D7 = sétimo dia experimental; D14 = décimo quarto dia experimental; D21 = vigésimo primeiro dia experimental.

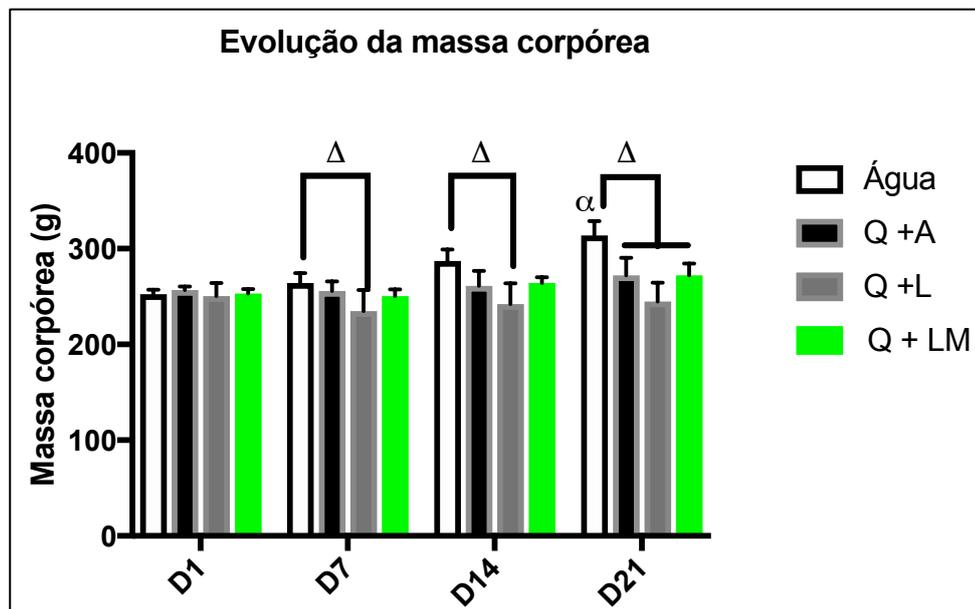


Figura 24. Média massa corpórea dos animais no primeiro dia (D1), sétimo dia (D7), décimo quarto dia (D14) e vigésimo primeiro dia (D21). Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. $^{\Delta}p < 0,05$ (comparação A vs. Q+L no D7 e D14; no D21 as comparações A vs. Q+A, A vs. Q+L, A vs. Q+LM); $^{\alpha}p < 0,05$ (comparação intergrupo do grupo água, sendo D21 vs. D1 e D21 vs. D7), realizado teste ANOVA dois fatores e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.2 Avaliação da quantidade de líquido ingerido pelos animais

Na primeira semana pós-queimadura a média do consumo de líquido no grupo Q+A foi menor que o grupo Água, Q+L e Q+LM com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Por outro lado, a média do consumo de líquido, na primeira semana, dos grupos Q+L e Q+LM foram superiores quando comparados com os grupos Água e Q+A com diferença estatística significativa. Não houve diferença estatística no consumo de líquido entre os grupos Q+L e Q+LM (ver tabela 2 e figura 25).

Tabela 2. Média do consumo de líquido em mililitros (ml) dos animais.

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1ºsem	307.8	15.09	212.7	14.93	525.2	5.256	544.5	62.04
2ºsem	322.7	12.6	321.8	17.97	508.2	19.14	754.7	57.3
3ºsem	322.8	14.23	315	24.89	326.3	6.917	664.5	81.7

Nota: Dados apresentado em média (ml) \pm desvio padrão (DP). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; 1º sem = primeira semana; 2º sem = segunda semana; 3º = terceira semana.

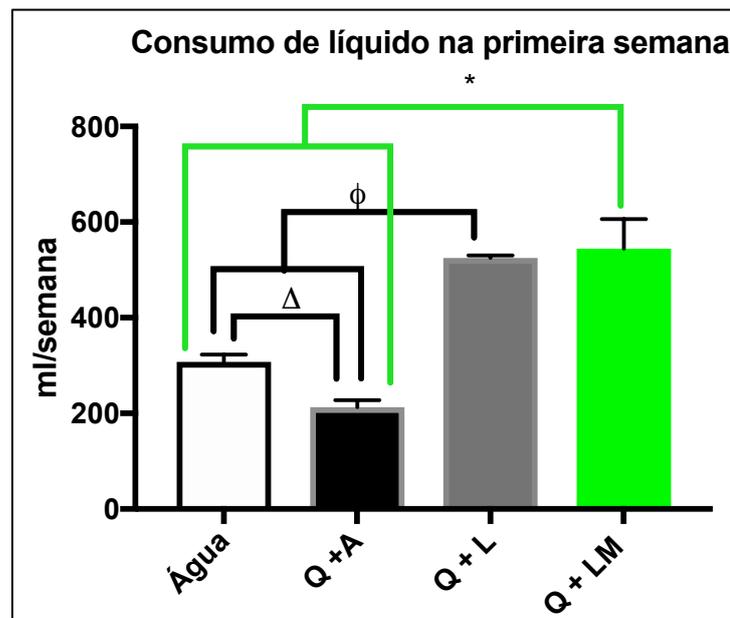


Figura 25. Consumo de líquido na primeira semana do experimento. Resultado expresso em ml/semana, representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água), $\phi p < 0,05$ (Q+L vs. Água, Q+L vs Q+A), $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na segunda semana pós-queimadura a média do consumo de líquido do grupo Q+A quando comparado com grupo água não apresentou diferença estatística ($p>0,05$), por outro lado, a média do Q+A foi inferior a dos grupos Q+L e Q+LM com diferença estatística significativa ($p<0,05$). Nesse mesmo período o grupo Q+LM apresentou maior consumo de líquido que o grupo Q+L com diferença estatística ($p<0,05$) (ver tabela 2 e figura 26).

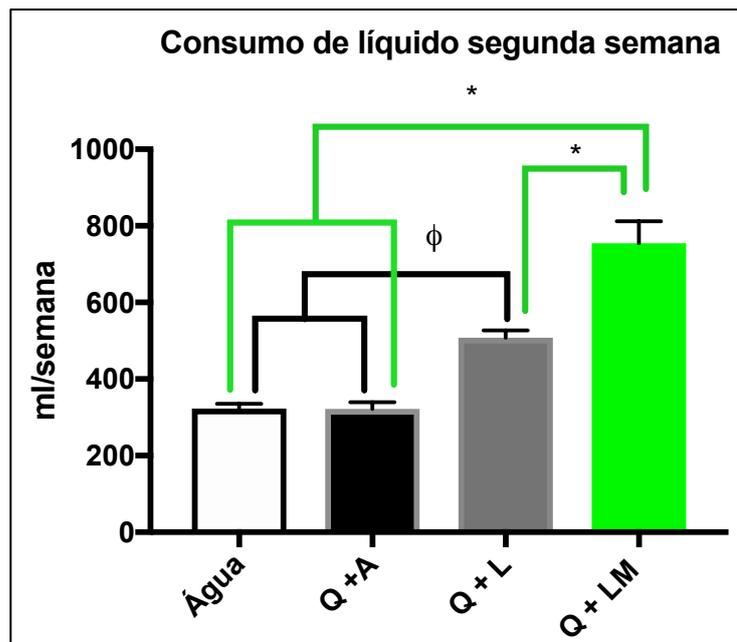


Figura 26. Consumo de líquido na segunda semana do experimento. Resultado expresso em ml/semana, representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. $\phi p<0,05$ (Q+L vs. Água, Q+L vs Q+A), $*p<0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na terceira semana a média do consumo de líquido dos grupos Água, Q+A e Q+L não apresentou diferença estatística quando comparada entre eles ($p>0,05$). A média do consumo de líquido do grupo Q+LM foi maior que a dos grupos Água, Q+A e Q+L, com diferença estatística significativa ($p<0,05$) (ver tabela 2 e figura 27).

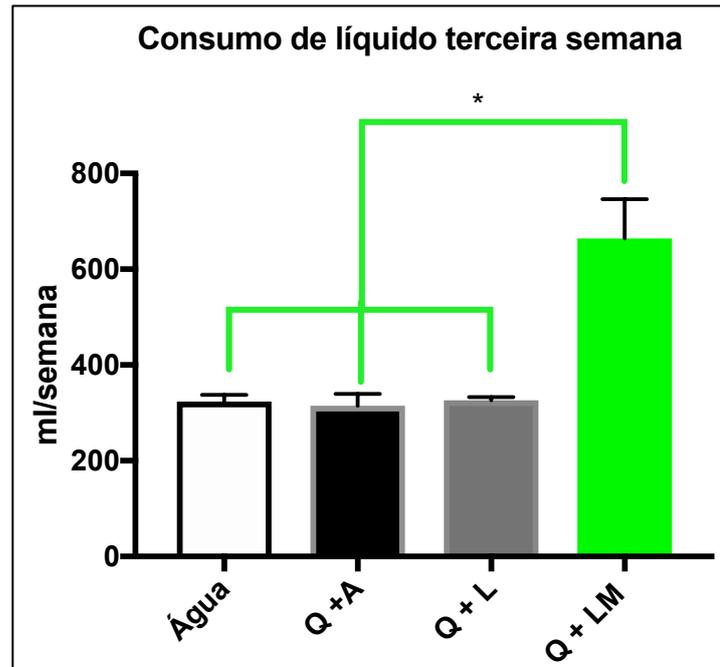


Figura 27. Consumo de líquido na terceira semana do experimento. Resultado expresso em ml/semana, representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. * $p < 0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver tabela 2 e figura 28):

- a) A média do consumo de líquido do grupo água não apresentou diferença estatística quando comparada as três semanas experimental entre si.
- b) A média do consumo de líquido do grupo Q+A na primeira semana experimentais foi menor do que as da segunda e terceira semana experimental com diferença estatística significativa ($P < 0,05$).
- c) Comparando a média do consumo de líquido do grupo Q+L entre a primeira e segunda semana experimental houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Ao comparar a segunda semana com a terceira

semana experimental houve uma diminuição significativa do consumo de líquido ($P < 0,05$).

- d) Comparando a média do consumo de líquido do grupo Q+LM entre a primeira semana e a segunda semana, houve um aumento do consumo de líquido na segunda semana com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre a segunda e terceira semana ($p > 0,05$).

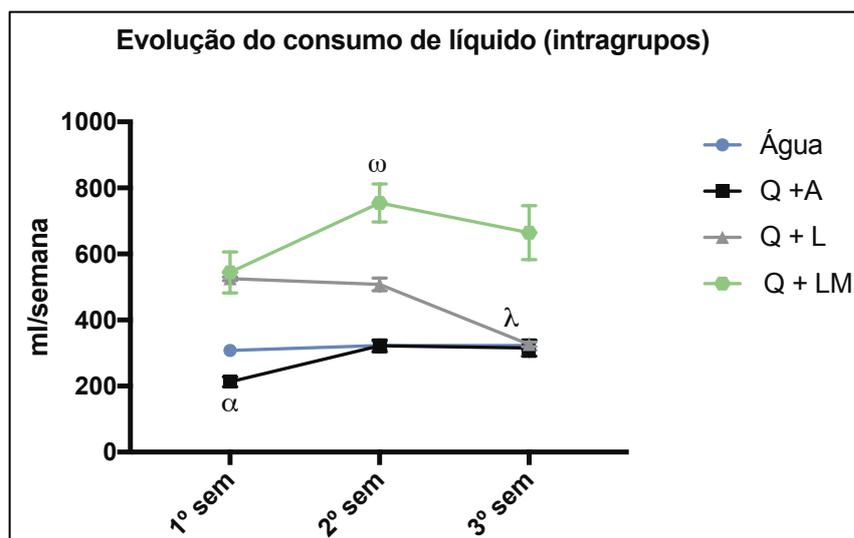


Figura 28. Média do consumo de líquido dos animais na primeira semana (1 sem), segunda semana (2 sem), terceira semana (3 sem). Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. $^{\alpha}p < 0,05$ (Q+A (1º sem) vs. Q+A (2º sem)), $^{\lambda}p < 0,05$ (Q+L (3º sem) vs. Q+L (2º sem)), $^{\omega}p < 0,05$ (Q+LM (2 sem) vs. Q+LM (1º sem)). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.3 Avaliação da quantidade de ração consumida pelos animais

Na primeira semana pós-queimadura a média do consumo de ração do grupo Q+A não houve diferença estatística quando comparado com o grupo Água. Por outro lado, a média do consumo de ração dos grupos Q+L e Q+LM foram menores que dos grupos Água e Q+A com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística quando comparado o grupo Q+LM com o grupo Q+L

($P > 0,05$) (ver tabela 3 e figura 29).

Tabela 3. Média do consumo de ração animais (em grama) por semana

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1º sem	307.8	15.09	212.7	14.93	525.2	5.256	544.5	62.04
2º sem	322.7	12.6	321.8	17.97	508.2	19.14	754.7	57.3
3º sem	322.8	14.23	315	24.89	326.3	6.917	664.5	81.7

Nota: Dados apresentado em média (ml) \pm desvio padrão (DP). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; 1º sem = primeira semana; 2º sem = segunda semana; 3º = terceira semana.

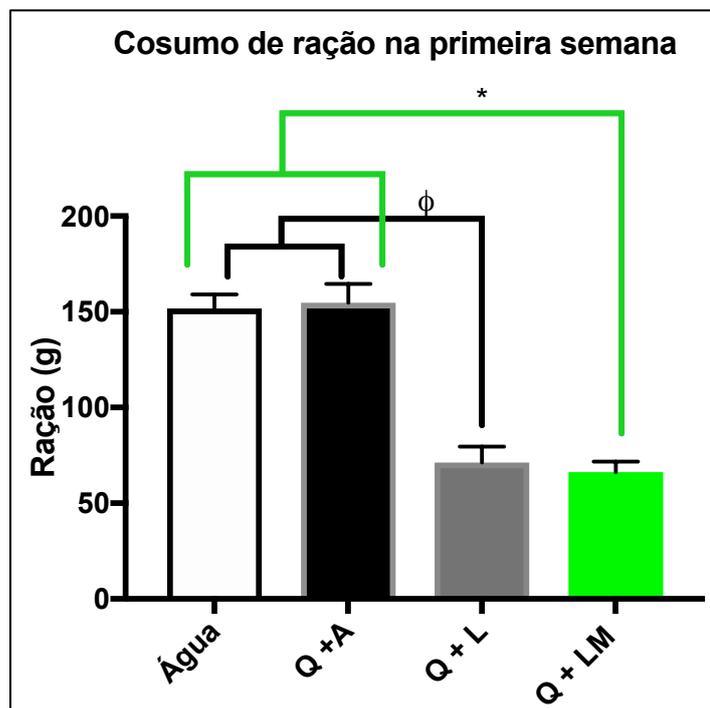


Figura 29. Consumo de ração na primeira semana (1º semana) do experimento. Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. $\phi p < 0,05$ (Q+L vs. Água, Q+L vs Q+A), $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na segunda semana pós-queimadura a média do consumo ração do grupo Q+A foi maior do que a dos grupos Q+L e Q+LM, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística quando comparado o grupo

Q+A e o grupo Água. Por outro lado, a média do consumo de ração dos grupos Q+LM e Q+L foi menor do que o grupo água com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Nessa mesma semana, a média do consumo de ração grupo Q+LM foi menor que a do grupo Q+L com diferença estatística significativa (ver tabela 3 e figura 30).

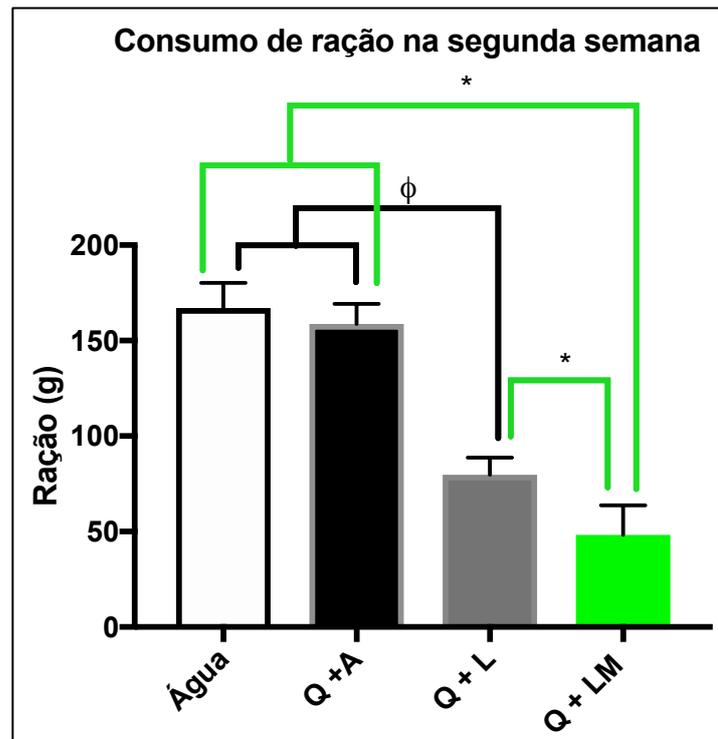


Figura 30. Consumo de ração na segunda semana do experimento. Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. $\phi p < 0,05$ (Q+L vs. Água, Q+L vs Q+A), $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na terceira semana pós-queimadura a média do consumo ração do grupo Q+A foi maior do que a dos grupos Q+L e Q+LM, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística quando comparado o grupo Q+A e o grupo Água. Por outro lado, a média do consumo de ração dos grupos Q+LM e Q+L foi menor do que o grupo água com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Nessa mesma semana, a média do consumo de ração grupo Q+LM foi

menor que a do grupo Q+L com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 3 e figura 31).

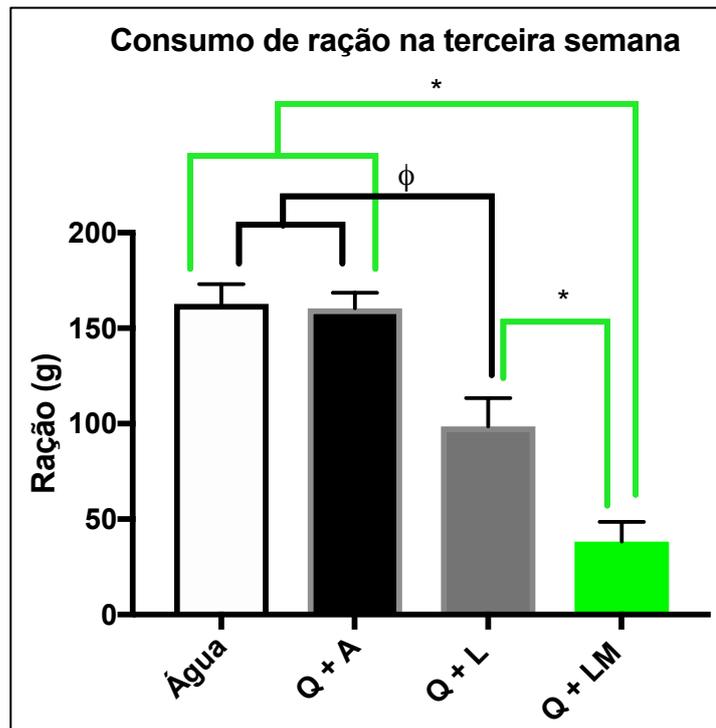


Figura 31. Consumo de ração na terceira semana do experimento. Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. $\phi p < 0,05$ (Q+L vs. Água, Q+L vs Q+A), $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Água; Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver tabela 3 e figura 32):

- a) Não houve diferença estatística na média do consumo de ração do grupo água quando comparadas as três semanas experimentais entre si.
- b) Não houve diferença estatística na média do consumo de ração do grupo Q+A quando comparadas as três semanas experimentais entre si.

- c) Comparando a média do consumo de ração do grupo Q+L entre a primeira e segunda semana experimental houve um aumento do consumo na terceira semana com diferença estatística significativa ($P>0,05$).
- d) Comparando a média do consumo de ração do grupo Q+LM entre a primeira semana e a terceira semana, houve uma diminuição do consumo de ração na terceira semana com diferença estatística significativa ($p<0,05$). Não foi observado diferença estatística entre a primeira e a segunda semana e nem entre a segunda e terceira semana ($p>0,05$).

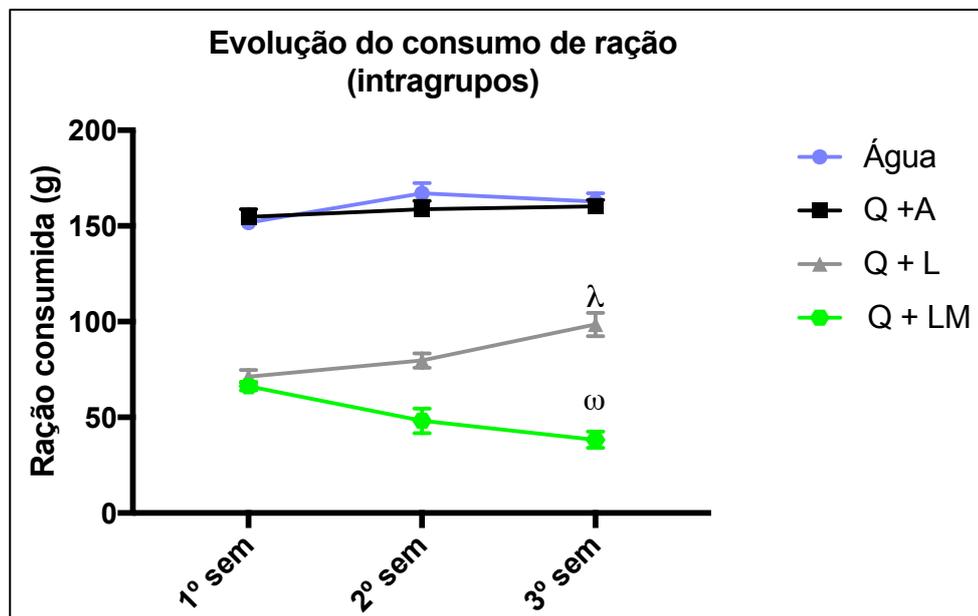


Figura 32. Média do consumo de ração dos animais na primeira semana (1º sem), segunda semana (2º sem), terceira semana (3º sem). Resultado expresso em grama (g), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. $\lambda p<0,05$ (Q+L (3º sem) vs. Q+L (1º sem e 2º sem)), $\omega p<0,05$ (Q+LM (3 sem) vs. Q+ LM (1º sem)). Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.4 Avaliação da área de lesão

Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos Q+A, Q+L e Q+LM no primeiro dia experimental (ver tabela 4 e figura 33).

Tabela 4. Área de queimadura no primeiro dia (D1), sétimo (D7) e vigésimo primeiro (D21).

	Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
D1	8.255	1.967	8.355	1.125	8.31	1.205
D7	15.32	4.062	13.52	1.75	6.908	1.751
D21	4.987	1.745	4.91	0.1094	1.967	0.2203

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D1 = primeiro dia experimental; D7 = sétimo dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

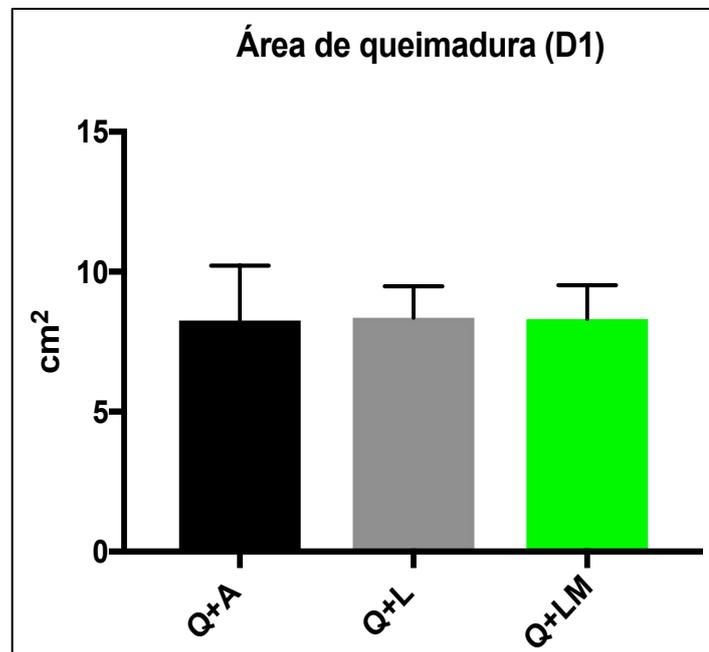


Figura 33. Área lesão da queimadura no primeiro dia do experimento. Resultado expresso em cm^2 , representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D1 = primeiro dia experimental.

No Sétimo dia pós-queimadura, os grupos Q+A e Q+L apresentaram área de queimadura maior que o grupo Q+LM com diferença estatisticamente significativa

($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Q+A e Q+L (ver tabela 4 e figura 34).

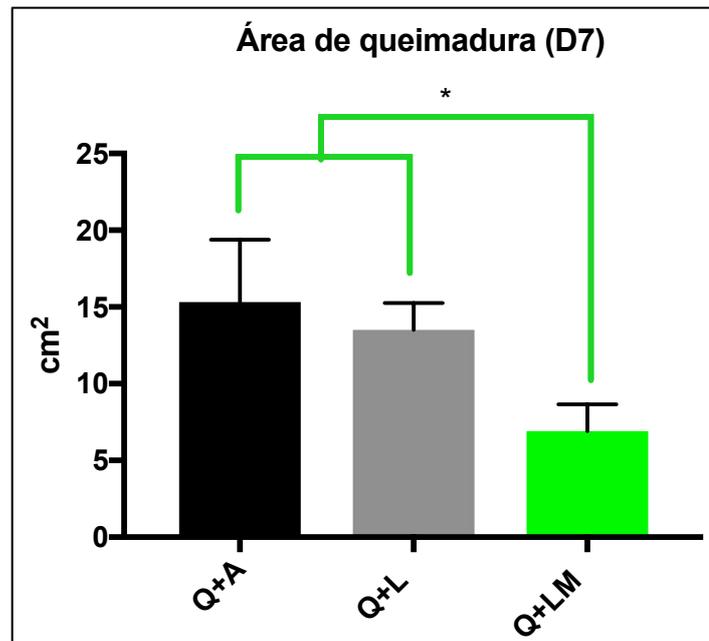


Figura 34. Área de lesão da queimadura no sétimo dia do experimento. Resultado expresso em cm^2 , representado em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D7= sétimo dia experimental.

No vigésimo primeiro dia pós-queimadura, os grupos Q+A e Q+L apresentaram área de queimadura maior que o grupo Q+LM com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Q+A e Q+L (ver tabela 4 e figura 35).

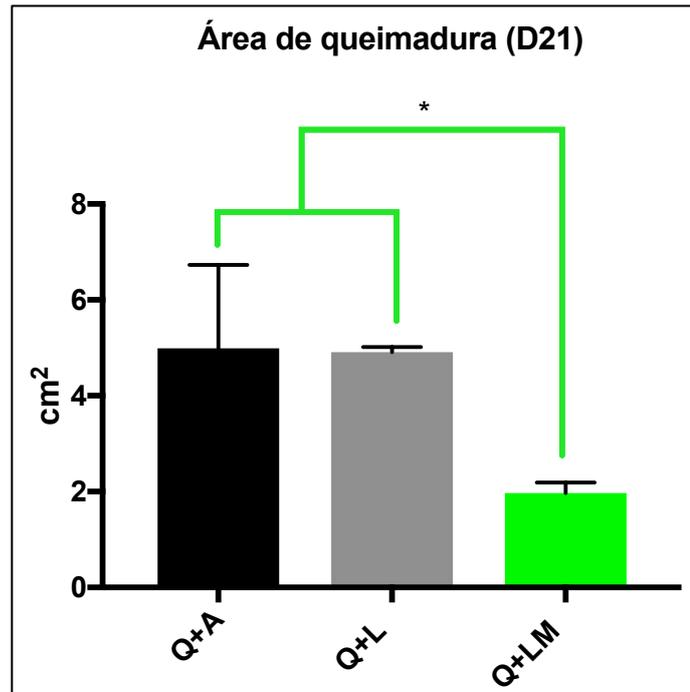


Figura 35. Área de lesão da queimadura no vigésimo primeiro dia do experimento. Resultado expresso em cm^2 , representado em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver tabela 4 e figura 36 e):

a) Maior área de lesão do grupo Q+A no sétimo dia em comparação com o primeiro dia com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), e menor área de lesão do grupo Q+A no vigésimo primeiro dia em comparação com o sétimo dia com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

b) Maior área de lesão do grupo Q+L no sétimo dia em comparação com o primeiro dia com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), e menor área de lesão do grupo Q+L no vigésimo primeiro dia em comparação com o sétimo dia com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

c) Não houve diferença estatística na área de lesão no grupo Q+LM quando comparado o primeiro e o sétimo dia experimental.

d) Houve menor área de lesão no grupo Q+LM no vigésimo primeiro dia quando comparado com o primeiro e o sétimo dia experimental.

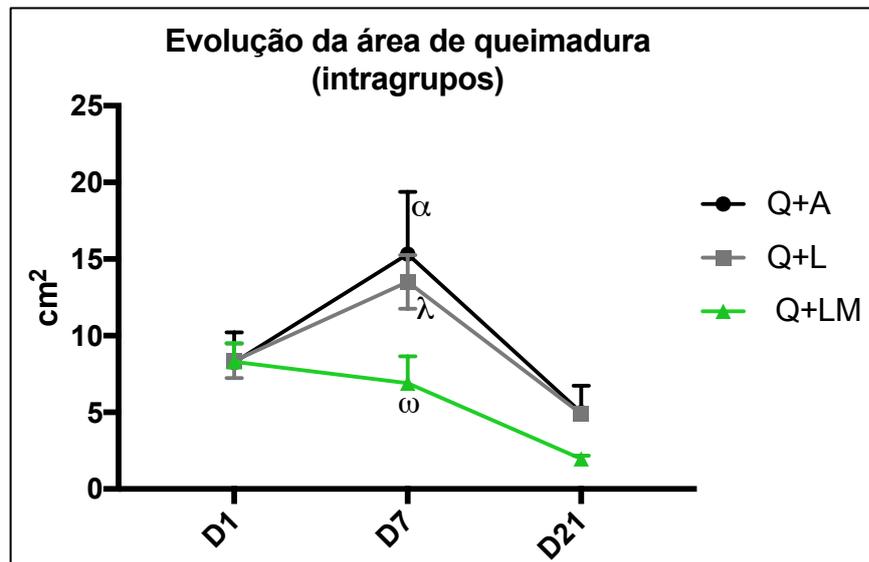


Figura 36. Comparação intragrupo da área de queimadura no primeiro dia (D1), sétimo (D7) e vigésimo primeiro (D21). Resultado expresso em cm^2 , representado em média e desvio padrão. $^{\omega}p < 0,05$ (Q+LM (D21) vs. Q+LM (D7); Q+LM (D7) vs. Q+LM (D1)), $^{\lambda}p < 0,01$ (Q+L (D7) vs Q+L (D1); Q+L (D7) vs Q+L (D21)), $^{\alpha}p < 0,01$ (Q+L (D7) vs Q+L (D1); Q+L (D7) vs Q+L (D21)). Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D1 = primeiro dia experimental; D7 = sétimo dia experimental; D21 = vigésimo primeiro dia experimental.

4.5 Taxa de cicatrização da lesão

Houve maior cicatrização no grupo Q+LM em comparação aos grupos Q+A ou Q+L com diferença estatística significativa ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos Q+A e Q+L (ver tabela 5, figura 37 e 38).

Tabela 5. Taxa de cicatrização entre o primeiro e o vigésimo primeiro dia do experimento.

	Q + A	Q + L	Q + LM
Média	39.5881	41.2327	76.32
DP	2.59	0.99	1.05

Nota: Resultado expresso em porcentagem de cicatrização. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

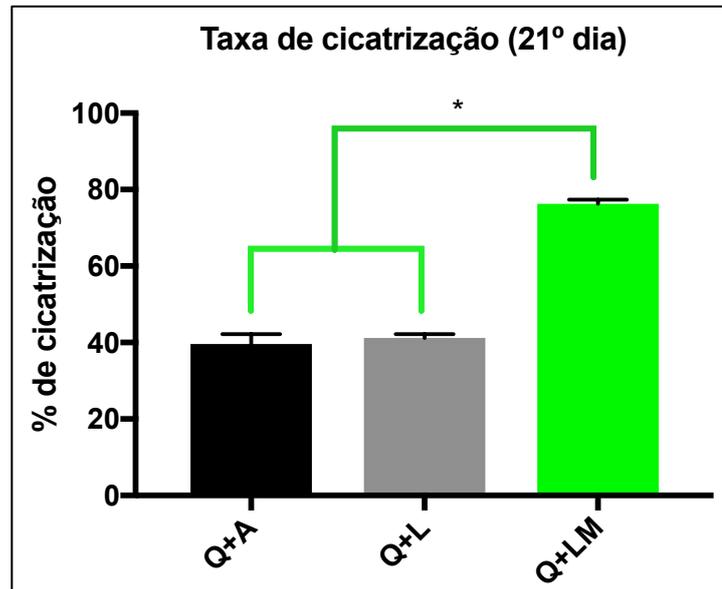


Figura 37. Taxa de cicatrização entre o primeiro e o vigésimo primeiro dia do experimento. Resultado expresso em porcentagem de cicatrização, representados em média e desvio padrão . * $p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L), realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

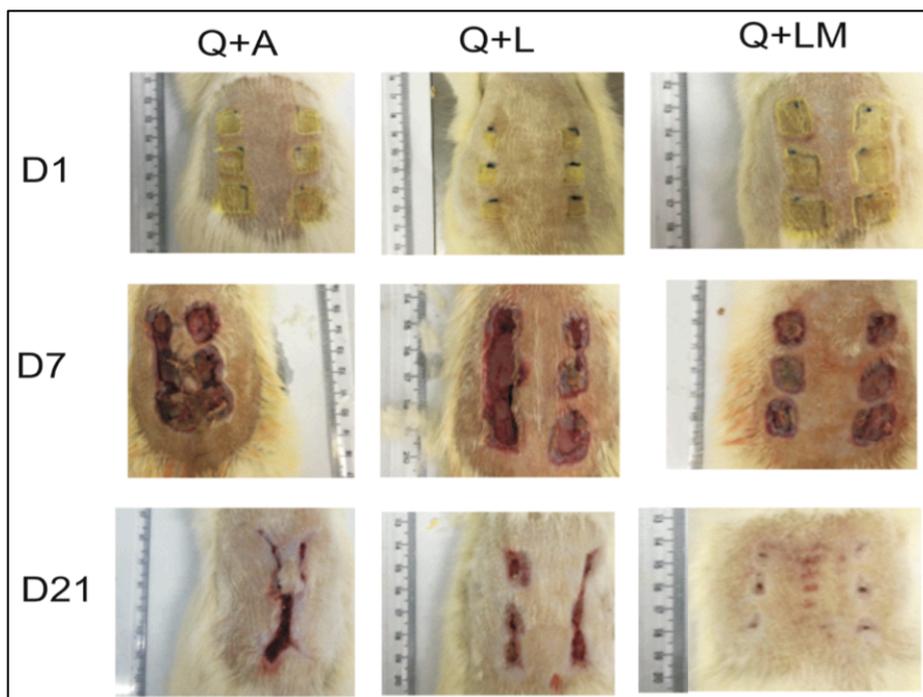


Figura 38. Imagem representativa dos animais com seu respectivo tratamento e tempo de evolução. Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D1 = primeiro dia experimental; D7 = sétimo dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

4.6 Espessura da pele cicatrizada

A média da espessura da pele cicatrizada do grupo Q+A e Q+L foram maiores que a dos grupos Água e Q+LM com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (ver figura 3) (ver tabela 6 e figura 39). Não há diferença estatisticamente entre os grupos Q+A e Q+L.

A média da espessura da pele do grupo Q+LM foi maior que a do grupo Água com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 6 e figura 39).

Tabela 6. Espessura da epiderme no vigésimo primeiro dia

	Água	Q+A	Q+L	Q+LM
Média	0.03023	0.1441	0.1726	0.0763
DP	0.007947	0.04968	0.01752	0.01149

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

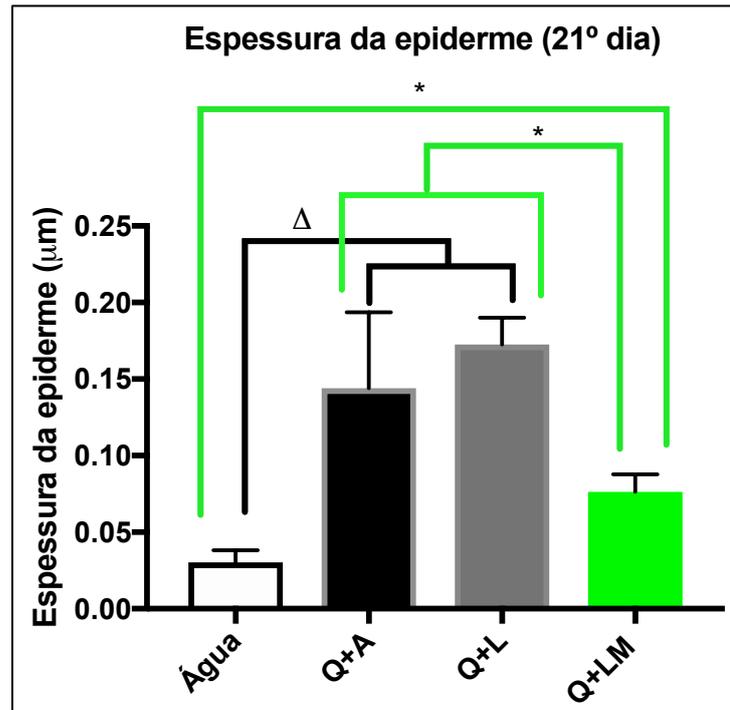


Figura 39. Espessura da epiderme no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em μm , representados em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ (Q+LM vs. Água, Q+LM vs. Q+A, Q+LM vs. Q+L), $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.7 Quantificação do colágeno tipo I, III e razão I/III

4.7.1 Colágeno tipo I

Houve maior porcentagem de colágeno tipo I nos grupos Água e Q+LM quando comparados com o grupo Q+A, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 7 e figura 40 e 41).

Não houve diferença estática significativa entre o grupo Q+L e os grupos do estudo ($p > 0,05$) (ver tabela 7 e figura 40 e 41).

Tabela 7. Porcentagem do colágeno tipo I no vigésimo primeiro dia.

	Água	Q+A	Q+L	Q+LM
Média	29.83	14.42	25.00	34.09
DP	3.88	8.594	9.27	12.30

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

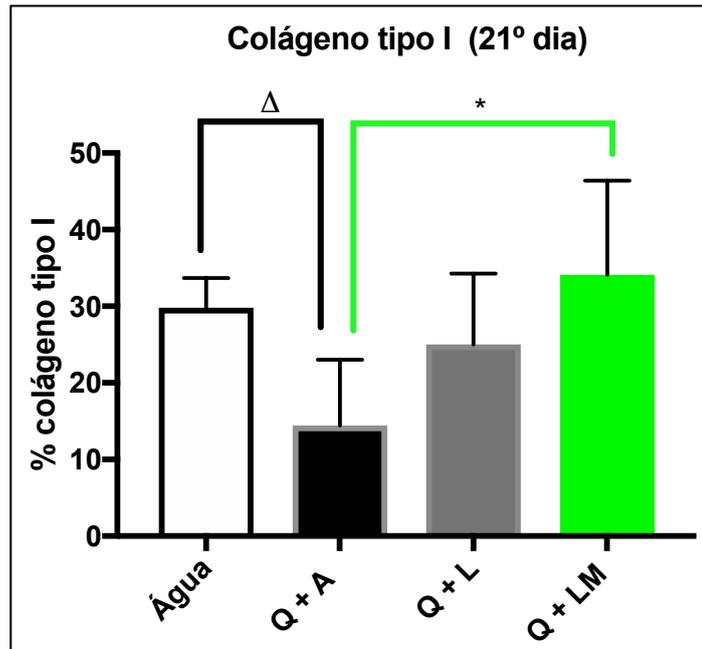


Figura 40. Quantificação do colágeno tipo I no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em porcentagem de colágeno, representados em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

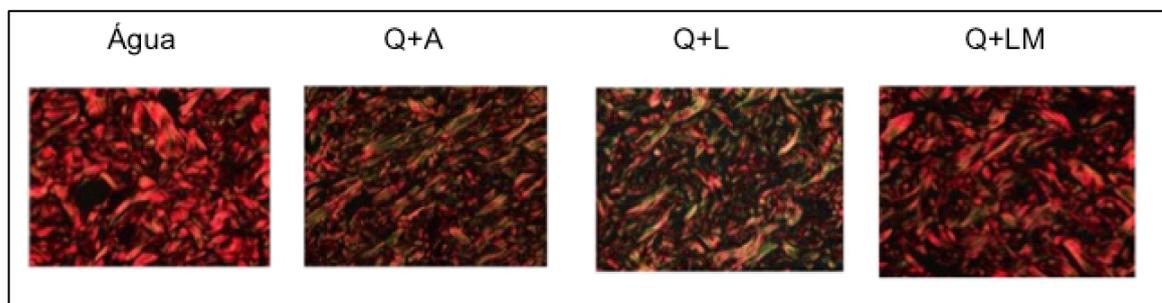


Figura 41. Imagem representativa de pele corada com picrossirus red e visualizada em microscopia ótica com polarizador de luz. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.7.2 Colágeno tipo III

Houve maior porcentagem de colágeno tipo III nos grupos Q+A e Q+L quando comparados com o grupo Água e Q+LM, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 8 e figura 42).

Não houve diferença estática significativa entre o grupo Água e o grupo Q+LM ($p>0,05$) (ver tabela 8 e figura 42).

Tabela 8. Porcentagem do colágeno tipo III no vigésimo primeiro dia.

	Água	Q+A	Q+L	Q+LM
Média	5.988	15.00	13.420	6.847
DP	1.389	8.00	3.057	2.875

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; DP = desvio padrão.

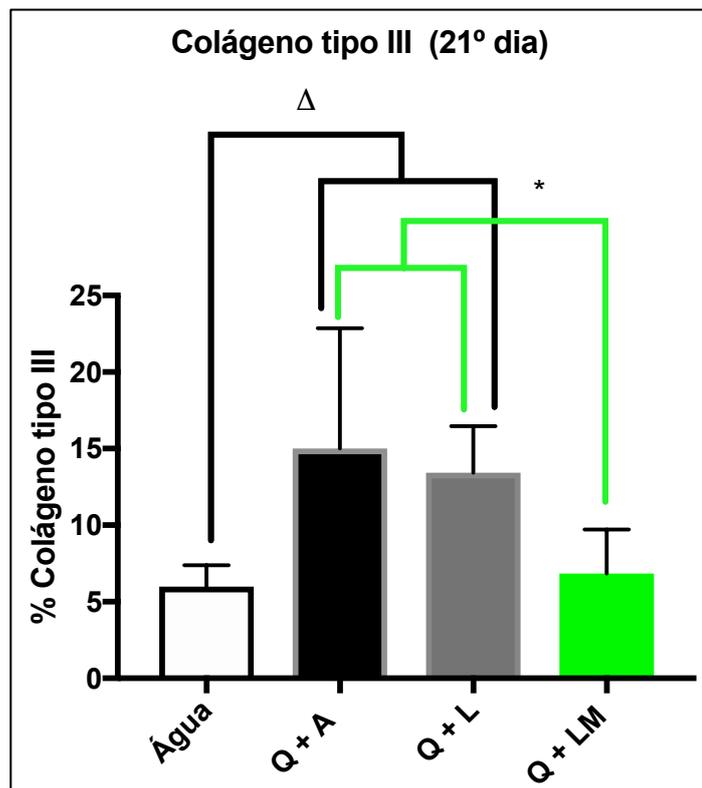


Figura 42. Quantificação do colágeno tipo III no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em porcentagem de colágeno, representados em média e desvio padrão. $\Delta p<0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p<0,05$ (Q+LM vs. Q+A e Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.7.3 Razão colágeno tipo I e III

A razão entre os colágenos tipo I e III foi maior nos grupos Água e Q+LM do que nos grupos Q+A e Q+L com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 9 e figura 43).

Houve maior razão no grupo Q+L quando comparado com o grupo Q+A com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 9 e figura 43).

Tabela 9. Razão do colágeno tipo I / tipo III no vigésimo primeiro dia.

	Água	Q+A	Q+L	Q+LM
Média	5.0700	0.9714	2.0380	4.868
DP	0.5254	0.1988	0.4808	1.038

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

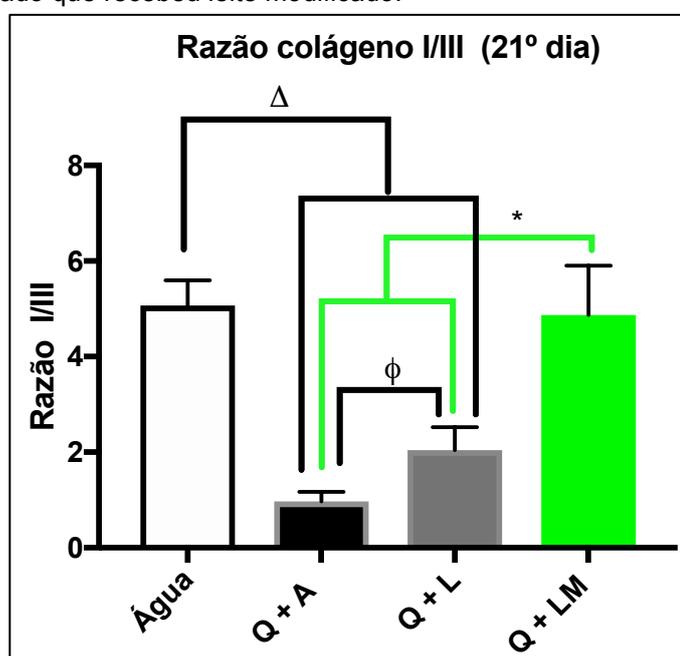


Figura 43. Razão entre a porcentagem de colágeno tipo I e o tipo III no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A e Q+LM vs. Q+L); $\phi p < 0,05$ (Q+L vs. Q+A). Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

4.8 Marcação imunohistoquímica para NF-kB

No terceiro dia houve um aumento da imunomarcação, na pele queimada, do NF-kB nos grupos Q+A e Q+L, quando comparados com os grupos Q+LM e água, com diferença estatística ($P < 0,001$). (ver tabela 10 e figura 44).

Não houve diferença estatística no terceiro dia quando comparado os grupos Q+A vs. Q+L ($p > 0,5$) (ver tabela 10 e figura 44).

Tabela 10. Porcentagem de área marcada anti-NFkB no terceiro dia e vigésimo primeiro.

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
D3	14.88	2.942	35.68	2.983	28.71	6.52	10.31	3.019
D21	15.53	2.481	23.75	2.5	21.35	5.379	9.67	1.609

Nota: Dosagem de MDA expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

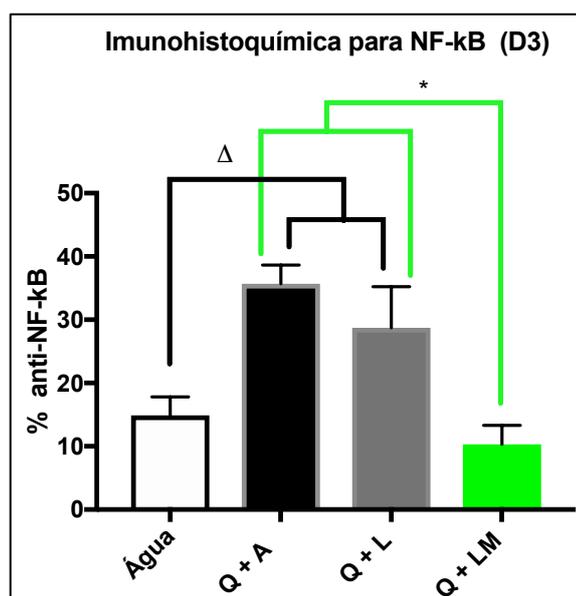


Figura 44. Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no terceiro dia. Resultado expresso em porcentagem de área marcada, representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e pós-teste múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D3 = terceiro dia experimental.

No vigésimo primeiro dia houve menor expressão do NF-kB no grupo Q+LM quando comparado com os grupos água, Q+A e Q+L com diferença estatística ($p < 0,05$) (ver tabela 10 e figura 45).

No vigésimo primeiro dia houve maior imunomarcagem do NF-kB nos grupos Q+A e Q+L quando comparado com o grupo Água com diferença estatística ($p < 0,05$) (ver tabela 10 e figura 45).

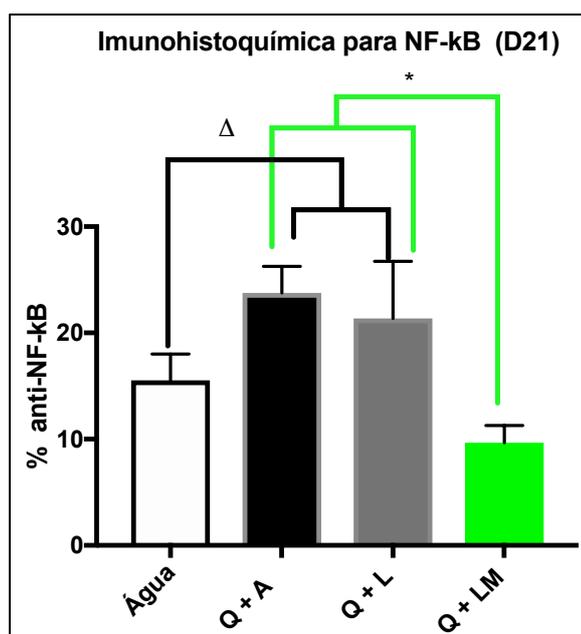


Figura 45. Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em porcentagem de área marcada, representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e pós-teste múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21 = vigésimo primeiro dia experimental.

Ao realizar a comparação intragrupos do terceiro com o vigésimo primeiro dia ocorreu maior expressão do NFkB nos grupos Q+A e Q+L no terceiro dia em relação ao vigésimo primeiro dia com diferença estatística ($P < 0,05$) (ver tabela 10 e figura 46).

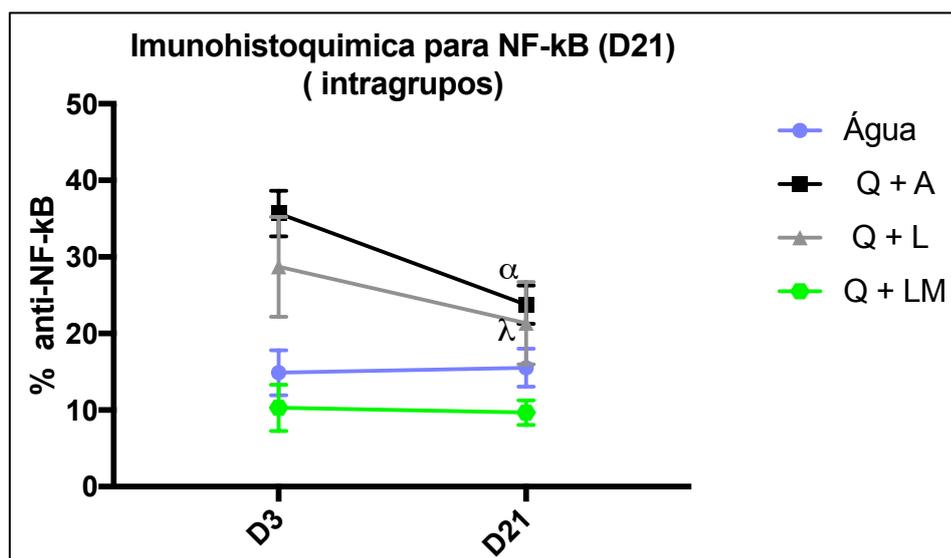


Figura 46. Porcentagem de área marcada anti-NF-kB no terceiro dia e vigésimo primeiro. Resultado expresso em porcentagem de área marcada, representado em média e desvio padrão. Na comparação intragrupos temos: $^{\alpha}p < 0,05$ (Q+A: D3 vs. D21), $^{\lambda}p < 0,05$ (Q+L: D3 vs. D21), realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D3 = terceiro dia experimental; D21 = vigésimo primeiro dia experimental.

4.9 Avaliação do estresse oxidativo

4.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica de membrana (malondialdeído – MDA)

A média da dosagem do MDA foi maior nos grupos Q+A e Q+L em relação aos grupos Q+LM e água, no terceiro dia com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 11 e figura 47).

Não houve diferença estatística significativa entre as médias da dosagem de MDA entre os grupos água e Q+LM no terceiro dia (ver tabela 11 e figura 47).

Tabela 11. Dosagem de MDA no terceiro e vigésimo dia experimental.

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
D3	0.0104	0.005	0.03748	0.003	0.03524	0.004	0.01283	0.003
D21	0.01097	0.004	0.02461	0.007	0.01931	0.001	0.009538	0.002

Nota: Dosagem de MDA expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

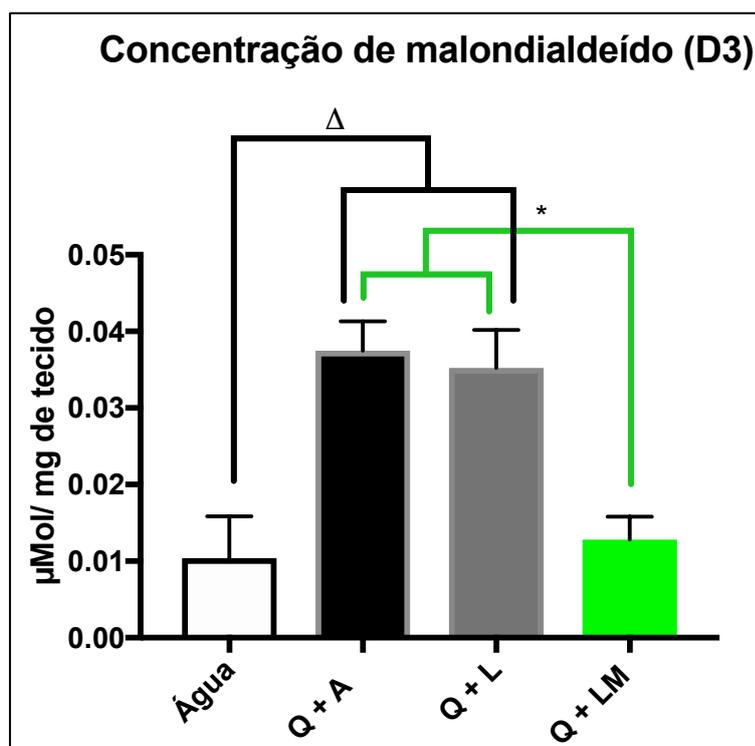


Figura 47. Dosagem de MDA no terceiro dia. Resultado expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A e Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D3 = terceiro dia experimental.

A média da dosagem do MDA foi maior nos grupos Q+A e Q+L em relação aos grupos Q+LM e Água, no vigésimo primeiro dia com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (ver tabela 11 e figura 48).

Não houve diferença estatística significativa entre as médias da dosagem de MDA entre os grupos Água e Q+LM no vigésimo primeiro dia (ver tabela 11 e figura 48).

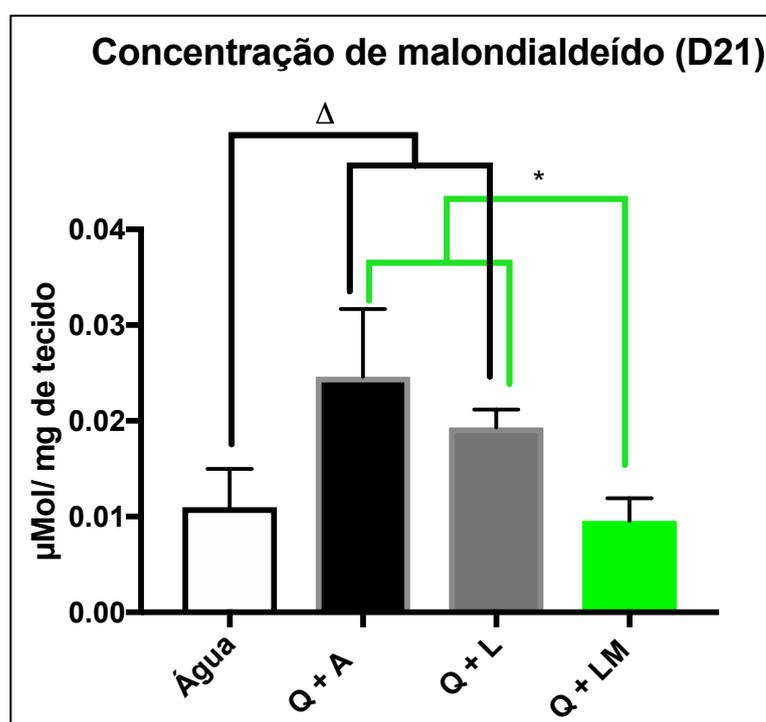


Figura 48. Dosagem de MDA no vigésimo primeiro dia. Resultado expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+A e Q+LM vs. Q+L). Foram realizados teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver figura 49 e tabela 11):

- a) Maior concentração de MDA no grupo Q+A no terceiro dia do que no vigésimo primeiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

b) Maior concentração de MDA no grupo Q+L no terceiro dia do que no vigésimo primeiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

c) Não houve diferença estatística na concentração de MDA no grupo Q+LM quando comparado o terceiro com o vigésimo dia experimental ($p > 0,05$).

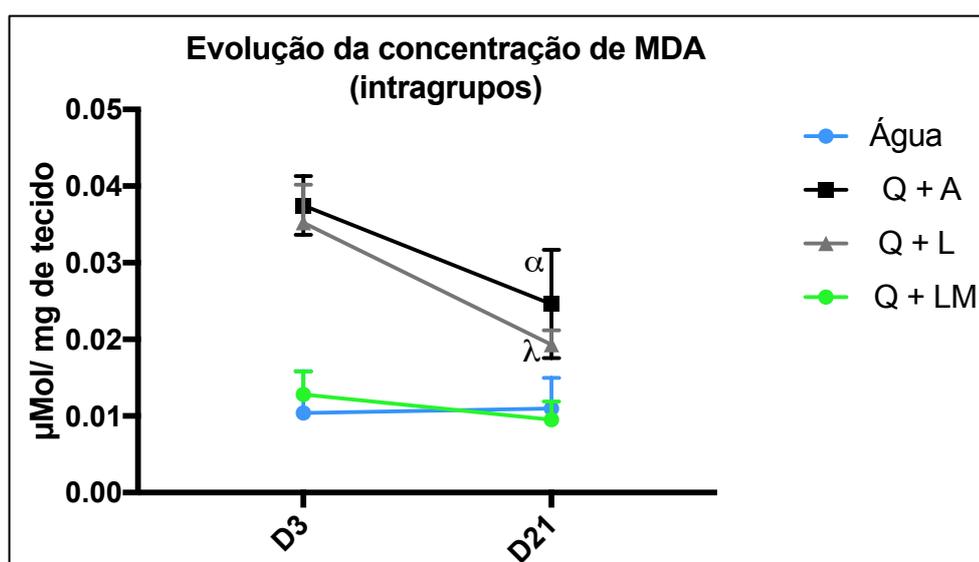


Figura 49. Dosagem de MDA no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. $^{\alpha}p < 0,05$ (Q+A: D3 vs. D21); $^{\lambda}p < 0,05$ (Q+L: D3 vs. D21). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

4.9.2 Avaliação do efeito antioxidante

4.9.2.1 Concentração da Glutathiona reduzida (GSH)

A média da concentração da glutathiona reduzida no terceiro dia experimental não houve diferença estatística significativa entre os grupos em estudo ($p > 0,05$) (ver tabela 12 e figura 50).

Tabela 12. Dosagem de GSH no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental.

	Água		Q+A		Q+ L		Q+ LM	
	média	DP	média	DP	Media	DP	média	DP
D3	0.05403	0.03215	0.02746	0.0168	0.03178	0.01956	0.04148	0.00904
D21	0.05155	0.00348	0.02253	0.006185	0.02176	0.003301	0.06205	0.003539

Abreviaturas: Q+A = Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21= vigésimo primeiro dia de experimento.

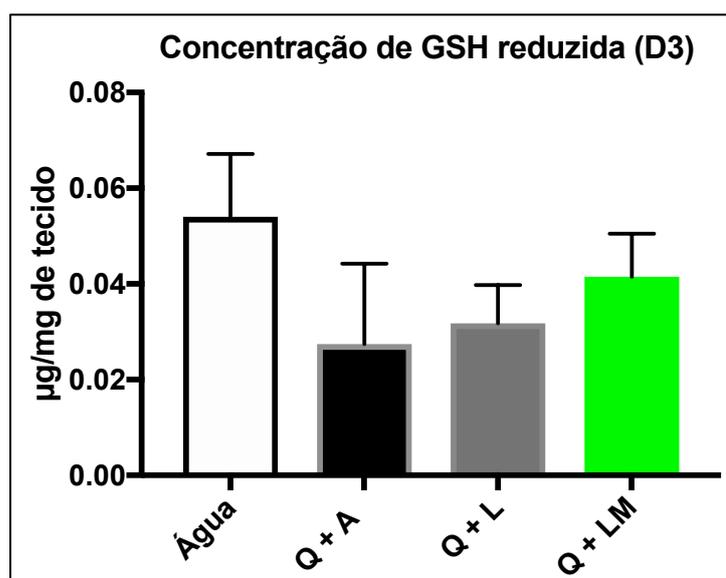


Figura 50. Dosagem de GSH no terceiro dia experimental. Resultado expresso em µg/mg de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey, sendo $p > 0,05$ em todas as comparações. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Houve maior concentração de glutathiona reduzida no grupo Q+LM e no grupo água em comparação com os grupos Q+L e Q+A com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no vigésimo primeiro dia experimental (ver tabela 12 e figura 51).

Não houve diferença estatística entre os grupos Q+A e Q+L ($p > 0,05$) no vigésimo primeiro dia experimental (ver tabela 12 e figura 51).

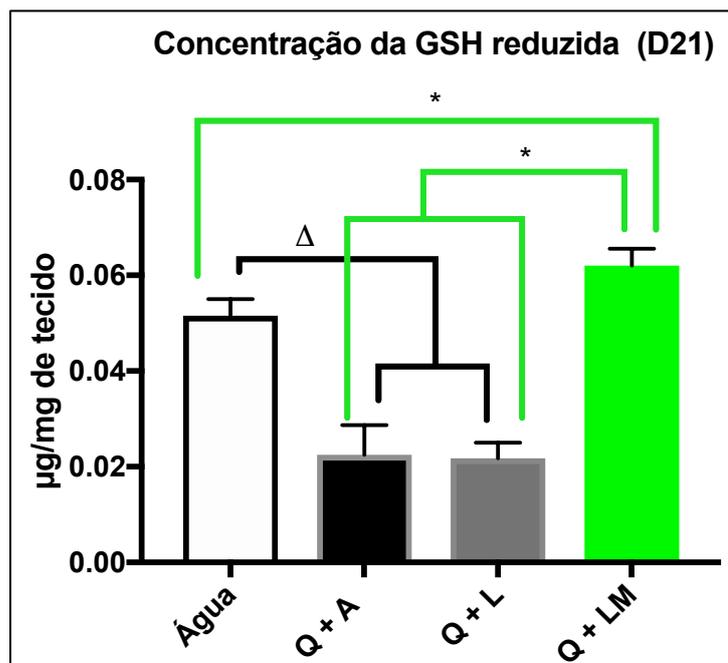


Figura 51. Dosagem de GSH no vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q + LM vs. Q+ A; Q+ LM vs. Q + L; Q+LM vs. Água. Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21= vigésimo primeiro dia de experimento.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver tabela 12 e figura 52):

- Maior concentração de GSH no grupo Q+LM no vigésimo primeiro dia do que no terceiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$)
- Menor concentração de GSH no grupo Q+L no vigésimo primeiro dia do que no terceiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$)
- Não houve diferença estatística na concentração de GSH entre o terceiro e vigésimo primeiro dia experimental no grupo Q+A ($p > 0,05$).

d) Não houve diferença estatística na concentração de GSH entre o terceiro e vigésimo primeiro dia experimental no grupo Água ($p > 0,05$).

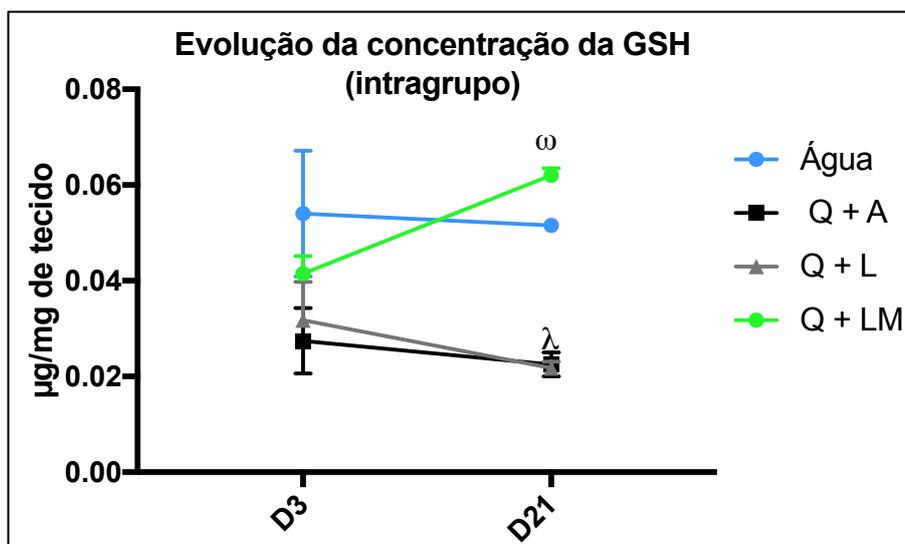


Figura 52. Dosagem de GSH no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. $^{\omega}p < 0,05$ (Q+LM: D21 vs. D3); $^{\lambda}p < 0,05$ (Q+L: D21 vs. D3). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

4.9.2.2 Concentração da GPx (glutaciona peroxidase)

A média da concentração da enzima glutaciona peroxidase no terceiro dia experimental não houve diferença estatística significativa entre os grupos em estudo ($p > 0,05$) (ver tabela 13 e figura 53).

Tabela 13. Dosagem de GPx no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental.

	Água		Q+A		Q+L		Q+LM	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
D3	2.281402	0.75577	1.195076	0.921025	1.671058	1.06554	1.640023	0.736792
D21	2.937037	0.72176	1.207258	0.691158	0.592358	0.140673	2.673476	0.600273

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21= vigésimo primeiro dia de experimento.

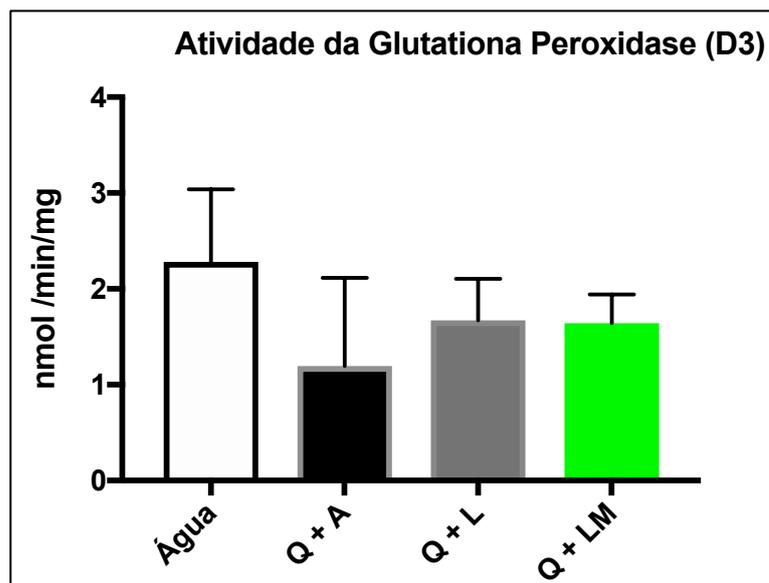


Figura 53. Dosagem de GPx no terceiro dia experimental. Resultado expresso em nmol/min/mg, representado em média e desvio padrão. $p > 0,05$, realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado.

Houve maior concentração de enzima glutaciona peroxidase no grupo Q+LM e no grupo água em comparação com os grupos Q+L e Q+A com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no vigésimo primeiro dia experimental (ver tabela 13 e figura 54).

Houve menor atividade enzimática da glutaciona peroxidase no grupo Q+A e Q+L em comparação com o grupo água com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no vigésimo primeiro dia experimental (ver tabela 13 e figura 54).

Não houve diferença estatística entre os grupos Q+A e Q+L ($p > 0,05$) no vigésimo primeiro dia experimental (ver tabela 13 e figura 54).

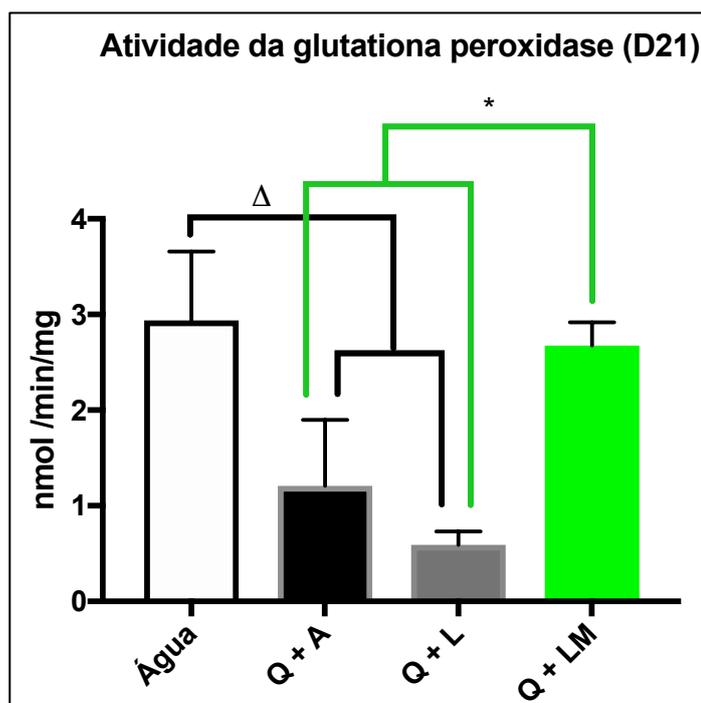


Figura 54. Dosagem da glutaciona peroxidase no vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em nmol/min/mg de tecido, representado em média e desvio padrão. $\Delta p < 0,05$ (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); $*p < 0,05$ (Q+LM vs. Q+L; Q+LM vs. Q+A). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D21 = vigésimo primeiro dia experimental.

Na comparação intragrupos foi observado o seguinte (ver tabela 13 e figura 55):

a) Houve maior atividade da glutaciona peroxidase no grupo Q+LM no vigésimo primeiro dia do que no terceiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

b) Houve menor atividade da glutaciona peroxidase no grupo Q+L no vigésimo primeiro dia do que no terceiro dia experimental com diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

c) Não houve diferença estatística na atividade da glutaciona peroxidase no grupo Q+A quando comparado o terceiro com o vigésimo primeiro dia ($p > 0,05$),

d) Não houve diferença estatística na atividade da glutiona peroxidase no grupo água quando comparado o terceiro com o vigésimo primeiro dia ($p > 0,05$)

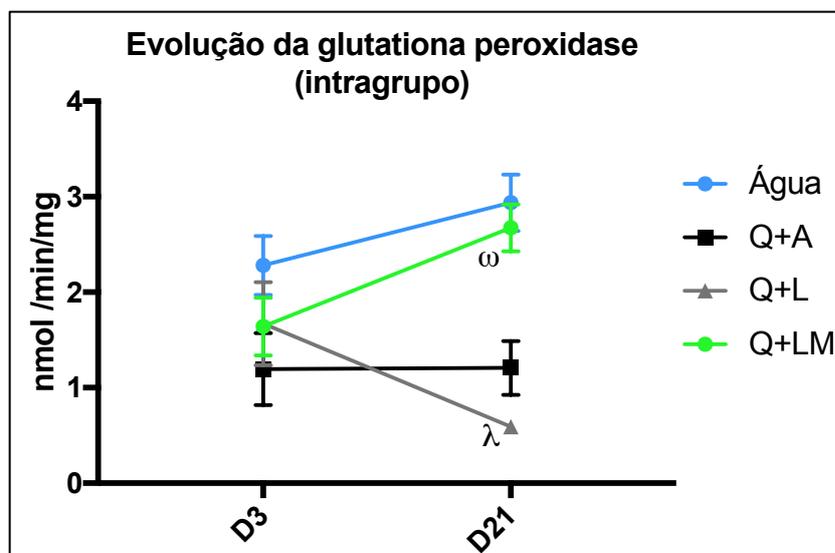


Figura 55. Atividade da glutiona peroxidase no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em nmol/min/mg de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ (Q+LM (D21) vs. Q+LM (D3)); $^\phi p < 0,05$ (Q+L (D21) vs. Q+L (D3)). Realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

4.9.2.3 Concentração da catalase

Houve maior atividade da enzima catalase no grupo Q+LM e no grupo água em comparação com os grupos Q+L e Q+A com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no terceiro dia experimental (ver figura 56 e tabela 14).

Tabela 14. Dosagem da atividade da enzima catalase no terceiro dia e no vigésimo primeiro dia experimental.

	Água		Q+A		Q+SL		Q+M	
	média	DP	média	DP	Media	DP	Media	DP
D3	0.6595	0.136	0.317	0.03732	0.3442	0.05272	0.7638	0.05734
D21	0.6625	0.1299	0.5513	0.1369	0.6789	0.1655	0.8761	0.106

Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado. D3 = terceiro dia experimento; D21= vigésimo primeiro dia de experimento.

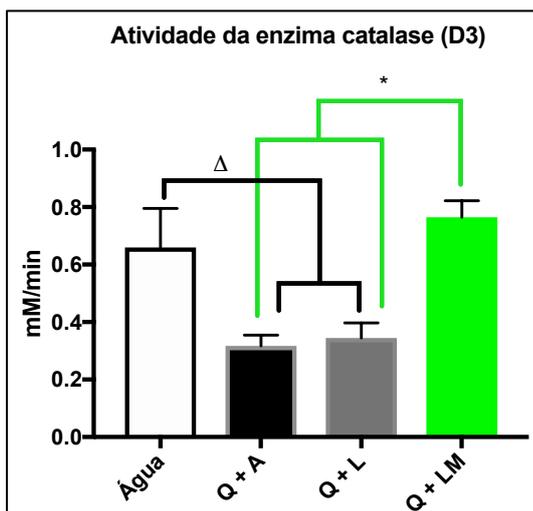


Figura 56. Atividade da enzima catalase no terceiro dia experimental. Resultado expresso em mM/min, representado em média e desvio padrão. Δ p (Q+A vs. Água; Q+L vs. Água); *p<0,05 (Q+LM vs. Q+A; Q+LM vs. Q+L). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado; D3= terceiro dia experimental.

Houve maior atividade da enzima catalase no grupo Q+LM em comparação com os grupos água e Q+A com diferença estatística significativa (p<0,05) no vigésimo primeiro dia experimental (ver figura 57 e tabela 14).

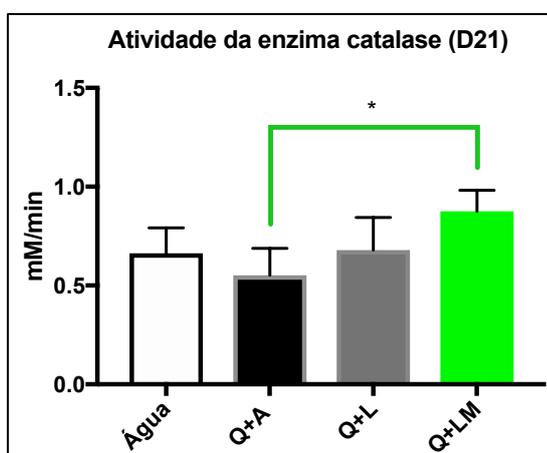


Figura 57. Atividade da enzima catalase no vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em mM/min, representado em média e desvio padrão. *p<0,05 (Q+LM vs. Q+A), realizado teste ANOVA um fator e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+LSL = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite modificado.

Houve diferença estatística da atividade da enzima catalase dos grupos Q+A e Q+L ($p > 0,05$) do terceiro em relação ao vigésimo primeiro dia experimental (ver figura 58 e tabela 14)

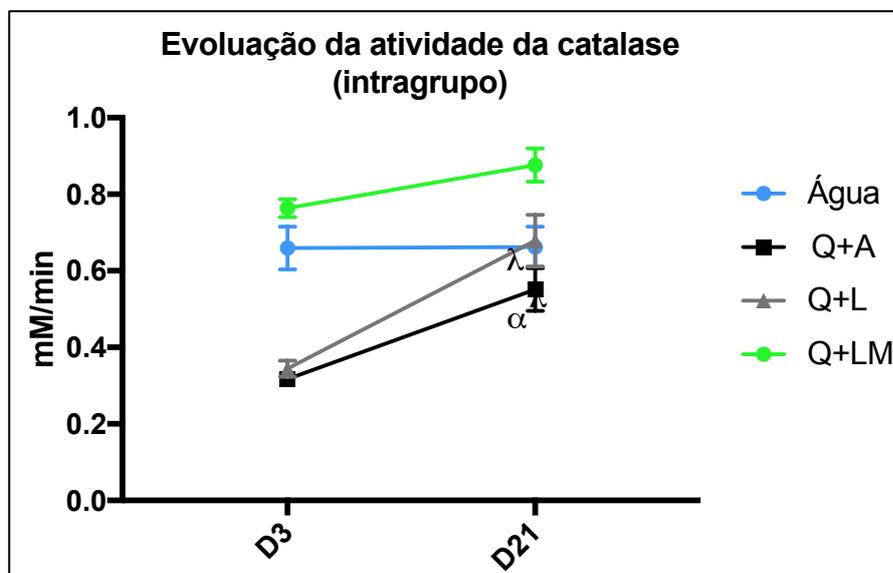


Figura 58. Atividade da catalase no terceiro e vigésimo primeiro dia experimental. Resultado expresso em mM/min de tecido (pele), representado em média e desvio padrão. ^λ $p < 0,05$ (Q+L (D21) vs. Q+L (D3)); ^φ $p < 0,05$ (Q+L (D21) vs. Q+L (D3)). Realizado teste ANOVA e múltiplas comparações de Tukey. Abreviaturas: Q+A = grupo queimado que recebeu água; Q+L = grupo queimado que recebeu leite; Q+LM = grupo queimado que recebeu leite Modificado; D3= terceiro dia experimental; D21= vigésimo primeiro dia experimental.

5 DISCUSSÃO

A terapia nutricional é um dos pilares mais importantes no manejo dos pacientes com queimaduras. A nutrição adequada pode reduzir a mortalidade e as complicações, otimizar a cicatrização de feridas e minimizar os efeitos deletérios da resposta hipermetabólica exagerada (PRELACK et. al. 2007).

O presente estudo foi desenhado para analisar os efeitos das misturas de óleos de ômega 9, 6 e 3 inseridos em bebida láctea administrada em animais com queimadura térmica em alta temperatura, e se a mistura de óleos acelera a cicatrização, apresentando ação protetora durante o processo inflamatório e no estresse oxidativo na pele de ratos queimados por condução direta.

Os modelos *in vitro*, para estudos de queimaduras, são limitados em sua capacidade de capturar todos os aspectos da fisiopatologia da queimadura e as complexas características clínicas da queimadura humana. Por estas razões, foi utilizado nesta tese um modelo animal de queimadura para testar uma nova abordagem terapêutica e possível mecanismo protetor pós-queimadura (SAYEDD et al, 2005; MARSHALL et. al., 2013; WILLIAMS et al., 2009).

Modelos experimentais de queimaduras em animais têm sido uma ferramenta essencial para o estudo da fisiopatologia de lesões cutâneas (queimaduras) em humanos, e para investigar novos métodos de tratamento (KAUFMAN et al., 1990; ZHANG et al., 2018) e estudar a influência da administração de fármacos em resposta ao trauma (AULICK et al., 1981; LIU et al., 2018).

Ratos e humanos compartilham características fisiológicas e patológicas em muitos sistemas de órgãos que já foram bem estabelecidos na literatura. Semelhante aos seres humanos, a pele do rato também é composta das principais camadas (epiderme, derme) da pele humana. No entanto, não imita perfeitamente a

arquitetura da pele humana (DORSETT-MARTIN, 2004). Apesar disso, o rato Wistar foi escolhido por ser um animal de pequeno porte, de fácil aquisição e padronização no que diz respeito à idade, peso, sexo, alojamento, alimentação, cuidados de limpeza e manipulação experimental. Além disso, estes animais são muito utilizados como modelo de avaliação de vários tratamentos de queimaduras (LIVESEY *et al.*, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 1990; SRIVASTAVA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2003; DAVIDSON, 1998; SAPORITO *et al.*, 2017; BAPTISTA *et al.*, 2018). De modo geral, pode-se considerar o rato um bom modelo para o presente experimento, uma vez que não foram constatadas infecções até o último dia de estudo.

O método anestésico demonstrou-se satisfatório pela relativa facilidade da indução anestésica, manutenção do plano anestésico, pequeno volume administrado e rápida recuperação pós-anestésica. Foi realizada também analgesia com derivado morfínico (codeína) melhorando o bem estar dos animais, que foi evidenciado pela quietude dos animais e pela ausência de complicações respiratórias ou morte acidental.

O local escolhido para a realização das queimaduras foi o dorso dos animais, em conformidade com as observações de vários pesquisadores que consideram a pele do dorso como o melhor sítio para avaliar lesões curtâneas experimentais, possuindo uma maior espessura e uniformidade em relação ao ventre e evitando irritação por contato com a saliva e autocanibalismo (KASHYAP; BEEZHOLD; WISEMAN, 1995; HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; MESQUITA *et al.*, 2010; CAMPELO *et al.*, 2011. CAMPELO *et al.*, 2015; SAPORITO *et al.*, 2017; HAYATI *et al.*, 2018; BRASSOLATTI *et al.*, 2018).

As queimaduras foram induzidas por meio da transferência de energia

usando uma placa de cobre em contato direto com a pele, condução direta, em elevada temperatura de forma contínua (200 °C) e controlada eletronicamente, ocasionando lesões térmicas de espessura total (epiderme, derme, hipoderme e musculatura) com lesão dos folículos pilosos, com reepitelização da periferia para o centro da lesão e sem reepitelização central em ratos, esse método foi utilizado no presente estudo devido sua reprodutibilidade e uniformidade das queimaduras (MESQUITA et. al., 2010; CAMPELO et. al., 2011; LIMA et al., 2016), além disso a queimadura realizada (200°C) produz lesão de espessura total o que simula um grande queimado conforme já publicado (CAMPELO et. al, 2011).

O presente estudo representa a primeira demonstração de que misturas de óleos contendo baixa relação de ômega-6 para ômega-3 e alta relação de ômega-9 para ômega-6 inseridos em bebida láctea (leite modificado), administrado *ad libitum*, em modelo experimental de queimadura por condução direta em ratos, em concentrações com ação nutracêutica, resultam em redução do tempo de cicatrização, melhor razão do colágeno I/III, diminuição da imunomarcação do NF-κB e diminuição do estresse oxidativo.

Os nutrientes têm sido tradicionalmente vistos como fontes de calorias básicas para a homeostase celular e os aminoácidos para a síntese de proteínas. Atualmente, evidências sólidas apoiam o conceito de que o aporte de nutracêutico pode melhorar os resultados finais por modular a resposta imune e/ou metabólica (ALEXANDER, 1988; STABLES; [GILROY](#), 2011; LI, et. al.; 2012; YONA et al., 2016; JAUDSZUS et al., 2016).

Nutrientes terapêuticos ou “nutracêuticos” são nutrientes isolados ou combinados que, em doses farmacológicas, modificam a resposta biológica do hospedeiro. Os nutracêuticos mais comumente utilizados são anti-inflamatórios e

antioxidantes, ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA), glutamina, arginina e nucleotídeos (MARTINDALE; ZHOU, 2006; SEELY et al., 2012).

As sociedades ocidentais têm uma dieta com uma razão ômega-6:ômega-3 entre 15:1 e 16,7:1 (SIMOPOULOS, 2002), entretanto DAHELE *et al.*, (2006) relatam uma razão de 10 a 20:1, devido principalmente a um aumento do consumo de óleos vegetais e gordura saturada e uma redução no consumo de peixe. Em geral, numa dieta norte-americana, consome-se ácidos graxos da seguinte forma: 89% são ácido linoléico (AL), enquanto apenas 9% são ALA. Entretanto a razão ômega-6:ômega-3 ideal varia entre 1:1 e 4:1 (SIMOPOULOS, 2002, 2008; HAYAKAWA *et al.*, 2012).

Os Óleos de peixes marinhos possuem um conteúdo consideravelmente maior de ômega-3, principalmente na forma EPA e DHA (ALEXANDER *et al.*, 1998). Trabalhos mostram que uma razão ômega-6:ômega-3 elevada na dieta, tal como as mencionadas no parágrafo acima (15:1 e 20:1), promovem várias doenças influenciando na produção de fatores inflamatórios (ALLAYEE; HOTH; HODIS, 2009). Por outro lado, o consumo de quantidades aumentadas de ômega-3 (ou seja, com uma razão ômega-6:ômega-3 diminuída), tem efeitos opostos.

Hart *et al* (1997) demonstraram, *in vitro*, que o ácido oleico (ômega-9) reduz o estresse oxidativo de forma dose-dependente (quanto maior a concentração maior o efeito antioxidante), sendo a razão ômega-9:ômega-6 maior que 1 unidade.

No experimento em questão foram utilizadas misturas de óleos em concentrações nutracêuticas com razão de ômega-6:ômega-3 baixa que favorecesse uma ação anti-inflamatória e a razão de ômega-9:ômega-6 alta com ação antioxidante conforme apresentado em outras situações biológicas (ALLAYEE *et al.*, 2009; SIMOPOULOS, 2002, 2008; CAMPELO et. al., 2015; TAO et. al., 2016;; MELO et al., 2017; GALÁN-ARRIERO et. al., 2017), sendo este o primeiro trabalho

em que essas razões de óleos, em proporções supracitada, é administrado em bebida láctea em ratos queimados.

O modelo experimental em estudo apresentou reprodutibilidade das lesão (6 em cada animal) não havendo diferença entre a área de queimadura entre os grupos no primeiro dia experimental (lesão inicial). Esse método de indução da queimadura já havia sido validado em publicações anteriores (MESQUITA et. al., 2008; CAMPELO et. al., 2011; CAMPELO et. al., 2015; CHOI et. al., 2018).

A temperatura de 200°C, aplicada ao dorso dos animais, induz uma queimadura de espessura total na pele de ratos conforme já comprovado por CAMPELO et. al. (2011) e que ao aplicar 6 lesões no dorso do animal o presente trabalho reproduz experimentalmente um queimado de terceiro grau de grande extensão, e que queimaduras de terceiro grau de grande extensão podem levar a alterações metabólicas severas (HERNDON et. al., 2001; XI et. al., 2014).

Extensas queimaduras geram um aumento na demanda metabólica, como resultado da perda das propriedades de isolamento da pele e o aumento das demandas de cicatrização de feridas.

O hipermetabolismo é evidente após a lesão e tem um pico de 14 dias após a lesão, quando aumenta o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido, permitindo um aumento adicional na atividade metabólica (DEMLING et. al., 2000) . O desequilíbrio causado pela queimadura na síntese e degradação da proteína é evidente logo após o início da lesão.

No modelo experimental utilizado, no vigésimo primeiro dia, todos os animais perderam massa corpórea quando comparado com os animais que não foram queimados, sendo que os que receberam água (Q+A) ou leite modificado (Q+LM) mantiveram a massa corpórea durante o experimento e só apresentaram

diferença estatística em relação ao grupo não queimado no vigésimo primeiro dia, situação essa em que os animais não queimados apresentaram aumento de peso em relação ao início do experimento com diferença estatística. Por outro lado, o grupo que recebeu leite (Q+L) desde o sétimo dia apresentou perda de massa corpórea significativa em relação aos animais não queimados.

Alguns trabalhos mostram que ratos com queimaduras de espessura total $\geq 30\%$ da área de superfície corporal total (TBSA) têm uma resposta hipermetabólica aguda semelhante à relatada em humanos (HERNDON et. al., 1978; IZAMIS et. al., 2009; BARROW et.al., 2001), persistindo por mais de 14 dias após a lesão (IZAMIS et. al., 2009; CALDWELL et. al., 1959). O aumento no metabolismo pode ser associado com uma redução no conteúdo de proteína e gordura corporal refletindo na perda de massa corpórea.

WADE et. al. (2013) demonstraram que ratos queimados a 100°C não apresentam perda de massa corpórea nos primeiros dias, sendo que apenas no 14º dia esses animais apresentaram perda de massa corpórea. No presente estudo os animais que receberam leite (Q+L) apresentaram desde o sétimo dia uma perda de massa corpórea e que no vigésimo primeiro dia todos os grupos queimados apresentaram massa corpórea inferior ao grupo controle que recebeu água, ficando evidente o estado de catabolismo dos animais.

Por outro lado, os animais queimados que receberam água ou leite modificado, como única fonte de líquido, mantiveram o peso constante, ficando evidente que a dieta com leite modificado não causou a perda de peso, fato este que ocorreu com os animais que receberam leite como única fonte de líquido.

Ao avaliar o consumo de líquidos, os animais que foram queimados e receberam leite ou leite modificado consumiram um volume superior aos que

receberam água tanto na primeira como segunda semana, sendo que os animais queimados que receberam leite na terceira semana apresentaram consumo semelhante ao dos grupos água. Observou-se também que na terceira semana somente o grupo Q+LM manteve o consumo de líquido (leite modificado) superior ao demais grupos.

Por outro lado, o grupo Q+LM e Q+L consumiram menos ração que os grupos água e Q+A em todo os tempos experimentais. Entretanto, na terceira semana o grupo Q+LM também consumiu menos ração que o grupo leite. Segundo WADE et. Al (2013), em experimento com ratos queimados a 100°C, apenas nos primeiros dias os animais queimados diminuem a ingesta de ração.

Vale ressaltar que os animais que consumiram menos ração (Q+L e Q+LM) foram os animais que consumiram mais líquidos (leite e leite modificado), ficando evidente a preferência organoléptica dos animais pela dieta láctea em detrimento da ração. Associado a isso, observou-se também que os animais do grupo Q+LM na terceira semana experimental continuaram preferindo o leite modificado do que a ração, enquanto os animais do grupo Q+L reduziram o consumo de leite e aumentaram o da ração. Sendo assim, fica evidente que os animais preferiram o leite enriquecido por óleos ômega 9, 6 e 3, provavelmente por ficarem mais saciados e sentirem-se melhor, visto que esse grupo demonstrou uma melhor cicatrização das lesões.

Ao quantificar a área das lesões (queimadura) observa-se a reprodutibilidade do método, visto que no primeiro dia não há diferença na área de lesão entre todos os grupos.

No sétimo dia pós queimadura os animais queimados que receberam leite modificado apresentaram menor área de lesão em relação aos que receberam água

ou leite. Além disso, o grupo queimado que recebeu água e o grupo queimado que recebeu leite apresentaram maior área de lesão quando comparadas com a lesão inicial (D1).

O tecido que circunda o centro da área de queimadura inicial pode evoluir com necrose (necrose secundária), aumentando o tamanho e a profundidade das feridas queimadas, sendo a evolução em 24-48h subsequentes e determinadas por três partes da área queimada: área de necrose do centro da ferida, área de estase e área de hiperemia nas bordas. O que pode levar a contraturas deformantes, cicatrizes hipertróficas e função sub-ótima da pele. O que torna a preservação da zona de estase/hiperemia importante para limitar o aumento da área de lesão (HETTIARATCHY et. al., 20004).

O que difere o grupo leite modificado dos demais grupos é o fato do mesmo conter a mistura de óleos ômega 9, 6 e 3 com relações entre ele antioxidante e anti-inflamatório o que pode contribuiu para que não aumentasse a lesão.

A cicatrização normal de uma lesão é um processo altamente dependente da homeostase celular e regulação da fase inflamatória como suporte para as fases seguintes da cicatrização. Ácidos graxos do tipo ômega-3 (EPA e DHA) são enzimaticamente convertidos em resolvinas (JI et. al., 2011; HELLMANN et. al., 2012).

Resolvinas são lipídios mediadores da inflamação que servem para inibir a migração de neutrófilos, aumentar a fagocitose de macrófagos, promovendo a resolução do processo inflamatório e facilitando o início da fase proliferativa da cicatrização das feridas (SERHAN et. al., 2014; DALLI et. al., 2012).

INOUE et. al.(2018) demonstraram que a infiltração no local da queimadura de resolvina D2 diminuiu a necrose secundária, iniciou a regeneração e diminuiu a

inflamação em ratos queimados na primeira semana diminuindo a lesão. Administração sistêmica de resolvina D2, em camundongos com queimadura de espessura parcial, diminuiu o tecido necrótico, preservou a rede microvascular, e também diminuiu os níveis de marcadores inflamatórios (TANG et. al., 2013; BOHR et. al., 2013), outros trabalhos também mostram benefícios das resolvinas na cicatrização de lesão precocemente (MENON et. al., 2017; INOUE et al., 2018).

No presente estudo nos animais do grupo Q+LM, contendo ômega 9, 6 e 3 não houve aumento da lesão no sétimo dia semelhante ao encontrado nos estudos citados acima, o que corrobora que a administração da mistura de óleos possa ter prevenido a necrose secundária devido a conversão enzimática do DHA (ômega-3) em resolvina.

Ao avaliar a área da lesão no vigésimo primeiro dia os animais queimados que receberam leite modificado apresentaram menor área de lesão do que os animais que receberam água e ou leite, sendo que, neste tempo experimental a área cicatrizada total do grupo leite modificado foi superior a dos demais grupos, com algumas áreas de tecido sem ulceração.

MECKLING-GILL et. al. (1999) demonstraram maior proliferação e regeneração celular em cultura de tecido epitelial intestinal como efeito direto de ácidos graxos. O efeito cicatrizante de feridas tem sido observado em vários estudos in vitro e in vivo. Sabe-se que a suplementação com ômega-3 (EPA e ALA) e ácido araquidônico aumenta a migração de células epiteliais capaz de reconstituir a lesão tecidual. Sabe-se também que o uso de óleo de linhaça (ômega-3) em baixas doses, em uso tópico demonstrou ser capaz de diminuir o tempo de cicatrização de lesões cutâneas (FRANCO et. al., 2012).

Estudo recente (ISHAK et. al., 2018) com uso de mistura tópica de ômega 9,

6 e 3 (óleo de linhaça, óleo extraído a erva-do-burro cientificamente *Oenothera biennis* e olive) em biópsia de pele de ratas Wistar fêmeas demonstrou diminuição do tempo de cicatrização, deposição precoce de colágeno, aumento de fatores neovasogênicos e aumento de fatores inflamatórios na fase inicial (3 dias) com diminuição na fase tardia (14 dias), corroborando com nosso estudo da administração de leite modificado em ratos queimados.

Ao estudar a espessura da pele, um fator importante na qualidade de uma cicatrização, observa-se que os animais tratados com leite modificado apresentaram espessura mais próxima dos animais controles (grupo água), diferente dos demais grupos (queimado água e grupo queimado leite) que apresentaram a epiderme espessada.

Estudos demonstram que a cicatrização de epiderme e derme é essencial para qualidade do processo cicatricial, e que a espessura da epiderme e a inflamação da derme reticular quanto mais acentuada maior a chance de desenvolvimento de cicatrizes deficientes (ANDRADE et. al., 2012; OGAWA et. al.; 2017).

Além de uma espessura menor da epiderme no grupo tratado com leite modificado, o mesmo apresentou uma proporção de colágeno tipo I em relação ao tipo III sem diferença estatística com o grupo Água, por outro lado, os grupos tratados com água e o grupo tratado com leite apresentaram epiderme mais espessa e a relação do colágeno tipo I/III menor, o que demonstra uma cicatrização de melhor qualidade no grupo com leite modificado do que nos demais grupos queimados.

Histologicamente, a deposição de colágeno pode aumentar a inflamação e contração da ferida cirúrgica, havendo concomitantes histológicas evidências de aumento em linfócitos, macrófagos e outras células inflamatórias. Sendo que a

relação maior do colágeno tipo I/III é capaz de aumentar a resistência da pele e diminuir a inflamação (JONES et. al., 2008; BERRY et al., 2010).

MENON et. al.(2017) demonstraram que ratos queimados tratados com resolvina E1 exibem maior organização do colágeno maduro e de reepitelização. Como mencionado anteriormente os ácidos graxos (EPA e DHA) são convertido em resolvinas, sendo as da série E proveniente do EPA. O que pode se justificar o fato dos animais que receberam leite modificado apresentarem maior quantidade de colágeno maduro (tipo I) e com reepitelização mais rápida.

HANKENSON et. al.(2000) e JIA et. al. (2004) demonstraram que dietas enriquecidas com omega-3 aumentam a formação de colágeno associado a produção de interleucina-6. Sabe-se que a razão entre os ácidos poliênicos alteram a produção de colágeno via resposta de subtipos dos receptores para PGE2 e ativação dos fibroblastos.

O consumo da dieta com ômega-6 e omega-3 é capaz de aumentar a razão entre o colágeno tipo I e III em fibras miocárdicas (BEAM et. al., 2015). Até o presente momento, não há publicações científicas indexadas que utilizem a mistura de óleos ômega na proporção utilizada nesta tese e que verifique a razão entre o colágeno tipo I e III, sendo que neste trabalho observou-se que os animais que ingeriram o leite modificado apresentaram um aumento dessa relação (colágeno tipo I/III) ficando similar a da pele integra de ratos, provavelmente pela ação dos óleos conforme explicado nos parágrafos acima.

A distinção entre esses tipos de colágeno (I e III) pode ser realizada pela coloração histoquímica com *picrossirus red*, seguida da técnica de polarização da luz, realizada neste estudo, a qual confere diferenciação entre os colágenos tipo I e

III (DAPSON *et. al.*, 2011; MODAK *et. al.*, 2015).

A avaliação imunohistoquímica para NF- κ B (fator de transcrição nuclear envolvido no processo inflamatório), no presente estudo, foi realizada de forma quantitativa utilizando um software desenvolvido especificamente para estudo morfométrico, conforme descrito anteriormente (MESQUITA *et al.*, 2010; CAMPELO *et al.*, 2015), sendo o método automatizado sem interferência do observador após aquisição das imagens como recomendado por FECHINE-JAMACARU (2006).

O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear encontrado em todos os tipos celulares, estando envolvido em repostas a estímulos, tais como: estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, queimaduras (AL-KAISY; SAHIB, 2005; CLARK *et al.*, 2007). O NF- κ B age basicamente como o interruptor “liga/desliga” para a célula gerar mediadores inflamatórios. Ao ser estabilizado no citoplasma com seu complexo inibidor (IKB), fica limitada a quantidade de NF- κ B livre que é translocada ao núcleo para iniciar a cascata inflamatória. Os ácidos graxos ômega-3 são capazes de estabilizar o sistema NF- κ B e influenciar a transdução de sinais e expressão de genes pelo nível de EPA e DHA adquiridos pela dieta (CALDER, 2002).

O EPA e do DHA têm como benefícios a resolução de inflamações e a produção de potentes moléculas anti-inflamatórias e resolvinas (SERHAN, 2005). No presente trabalho a mistura de óleos ômega-9, 6 e 3 foi capaz de inibir o NF- κ B, o que pode ter influenciado na ativação do gene promotor da fibronectina diminuindo a mesma (ALONSO *et. al.*, 1996; MIAO *et al.*, 1993; ISHISE *et. al.*, 2015) e com isso inibindo um dos mecanismos da fibrogenese que em excesso pode ocorrer um depósito anormal de proteínas e colágenos na matriz extracelular podendo evoluir para fibrose e ou contração da ferida anormal (ISHISE *et. al.*, 2015; MOREIRA *et.*

al., 2009). Além disso a inibição do NF-kB pelo leite modificado pode influenciar no metabolismo de produção de diversos fatores inflamatórios. Assim como também os óleos ômega-3 e ômega-6, que utilizam o mesmo sistema enzimático, ocorrendo uma competição por cada enzima (DYEBERG, 1986), pode alterar todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como PG, TX e LT.

Os eicosanóides oriundos do metabolismo de AGPIs ômega-6 são mediadores inflamatórios, enquanto os oriundos do metabolismo de ômega-3 são anti-inflamatórios. Alguns efeitos dos AGPIs sobre os sistemas imune e inflamatório são independentes da geração de eicosanóides e podem ser devido, em parte, a alterações no metabolismo de glicose e glutamina (CURI *et al.*, 1999). Estudos enfatizam que os AGPIs da série ômega-3 afetam as funções imunológicas. Estes ácidos apresentam efeito supressor, inibindo a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão.

Evidências de ômega-3, (EPA) e (DHA), na sua capacidade de modular a inflamação vem de um estudo *in vitro* (VERLENGIA; GORJAO; KANUNFRE, 2004; ENDRES; GHORBANI; KELLEY, 1989), modelos animais (Y AQOUB, CALDER, 1995; AL- KHALIFA; GIVENS; RYMER 2012; MELO *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2014) e estudo clínico (ITARIU *et al.*, 2012).

Estudo recente de osteoartrite induzida por zimozan em ratos evidenciou uma proteção anti-inflamatória pela mistura de óleos omega-9, 6 e 3 (administrada em proporções anti-inflamatórias e antioxidantes) quando utilizado como pré-condicionante a osteoartrite inibindo a expressão do NF-kB (CAVALCANTE, 2014).

A inibição do NF-kB, pela mistura de óleos utilizada, também foi observada em modelo experimental de exodontia de rato (MELO *et al.* 2018), assim como

também em modelo experimental de queimadura de ratos no sétimo dia da queimadura (CAMPELO et. al. 2011), sendo que em todos esses trabalhos a mistura de óleos foi administrada por gavagem orogástrica.

O presente estudo administrou a mistura de óleos inserida em bebida láctea e colocado *ad libitum* na gaiola dos animais, sendo observada menor imunomarcção do NF- κ B no grupo (Q+LM) em relação aos demais grupos em estudo, indicando o efeito anti-inflamatório da mistura de óleos, corroborando por estudos citados acima (CAMPELO et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2014; MELO et al., 2018).

Porém, há necessidade de no futuro realizar dosagem de citocinas/quimiocinas em diversos tempos pós-queimadura em ratos para verificar alterações teciduais e nos níveis séricos de citocinas/quimiocinas com a administração das misturas de óleos e correlacionar com resultados encontrados no presente estudo pela imunomarcção para NF- κ B, avaliando dessa forma se a mistura de óleos reduz a inflamação sistêmica pós-queimadura.

Outro fator importante na fase inflamatória da cicatrização é a avaliação do estado oxidativo tecidual. Sabe-se que em situação de estresse oxidativo elevado há piora da cicatrização das feridas e com retardo da fase proliferativa e de remodelamento (SHIH et al., 2010; RAJAGOPALAN et al., 2018; GILOTRA et al., 2018).

Alguns estudos em animais têm mostrado diversos efeitos do ácido oléico (ômega-9) na cicatrização de feridas (CARDOSO et. al., 2011; RODRIGUES et. al., 2012).

A bebida láctea com mistura de óleos ômega-3, 6 e 9 usada neste estudo

apresenta uma relação entre $\omega 9:\omega 6$ alta com ação antioxidante, o que levantou a hipótese de que o uso desta substância no modelo experimental proposto de queimadura, neste trabalho, poderia diminuir o estresse oxidativo.

Sabe-se que os ácidos graxos ômega-9 (ácido oleico) conferem proteção contra a peroxidação lipídica diferente dos ácidos graxos poliinsaturados como linolênico, EPA, DHA que contêm 4, 5 e 6 duplas ligações, respectivamente, sendo muito menos estáveis (CURI *et. al.*, 2002; GRIMBLE *et. al.*, 2002; OH *et. al.*, 2009).

O uso de formulações ricas em lipídios na forma monoinsaturada, comparado ao uso de poliinsaturados, culminou com menor resposta inflamatória e menor produção de radicais livres com fórmula rica em monoinsaturados (CURI *et al.*, 2002).

O azeite de oliva é rico em ácidos graxos ômega-9, vitamina E e fitoesteróides conhecidos por suas propriedades antioxidantes. O fato da estrutura molecular do azeite de oliva ter somente uma dupla ligação, juntamente com a presença de vitamina E, confere uma maior proteção contra a peroxidação lipídica (GRIMBLE, 2002) reduzindo o acúmulo de EROS (OH *et al.*, 2009).

No presente trabalho, o grupo que recebeu leite modificado apresentou menor peroxidação lipídica, quantificada pela dosagem de MDA, tanto no terceiro dia pós queimadura como no vigésimo dia pós-queimadura quando comparado com o grupo que recebeu água e o grupo que recebeu apenas leite, ficando evidente o efeito anti-peroxidação lipídica da mistura de óleos ômega-9, 6 e 3 que modificou o leite (leite modificado).

O organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante, como mecanismo de defesa contra os radicais livres, que levam a peroxidação lipídica, que são formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos e, quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de estresse oxidativo (MACHADO *et al.*, 2009).

Entre os agentes antioxidantes temos a glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e a catalase que estão envolvidos em modelo experimental de estresse oxidativo (NICOLAU A., 2013; LIU *et al.*, 2018; ZASTROW *et al.*, 2018; RODGERS *et al.*, 2018).

No presente estudo os animais queimados apresentaram diminuição da concentração da glutathiona reduzida e da atividade da glutathiona peroxidase no 21º dia da queimadura, momento este que os animais apresentaram peroxidação lipídica maior que o grupo Água. Por outro lado no terceiro dia não houve diferença estatística do GSH e a glutathiona em relação ao grupo controle. Esses achados são semelhantes aos encontrados em outros trabalhos de queimadura com temperaturas inferiores a 200 °C.

Os animais queimados e que tomaram leite modificado, diferente dos animais que tomaram água ou que tomaram leite, apresentaram maior concentração da GSH e atividade da glutathiona peroxidase com diferença estatística com grupo Água no vigésimo primeiro dia, ficando evidente que a mistura de óleos aumentou esses agentes antioxidantes no vigésimo primeiro dia. O que pode ser correlacionado com uma menor peroxidação lipídica no vigésimo primeiro dia nesses animais

(grupo bebida láctea com mistura de óleos). Por outro lado, no terceiro dia experimental a mistura de óleos não influenciou a concentração do GSH e nem a glutathione peroxidase.

Entretanto, um outro agente antioxidante, a catalase, houve um aumento da sua atividade no grupo leite modificado em relação aos demais grupos tanto no terceiro como no vigésimo primeiro dia pós-queimadura.

Assim como os ácidos graxos ômega-3 e 6 participam da biossíntese de vários mediadores inflamatórios, eles também podem atuar como componentes estruturais, juntamente com o monoinsaturado (ômega-9), para a síntese de fosfolípidos de membrana, contribuindo para a fisiologia da membrana celular em mecanismos como transdução de sinalização, proliferação celular (ZIBOH et. al., 2000) e em especial o ômega-9 inibe espécies reativas de oxigênio (OH et. al.; 2009)

Isto posto, em relação ao estresse oxidativo, observa-se que os animais que receberam leite modificado tiveram menor peroxidação lipídica provavelmente por manter a produção tecidual do GSH e GPx no vigésimo primeiro dia em relação aos demais grupos queimados, e que a catalase influenciou por aumentar a sua atividade no primeiro e vigésimo dia apenas no grupo que recebeu leite modificado.

Após uma lesão cutânea, é importante uma diminuição da inflamação tecidual, diminuição do estresse oxidativo que torne viável uma cicatrização dos tecidos mais próximo possível do fisiológico.

Neste contexto a mistura de óleos, testada neste trabalho, evidencia que é capaz de diminuir o estresse oxidativo, diminuir também a expressão do fator de

transcrição nuclear inflamatório NF- κ B, assim como também uma deposição de colágeno com razão entre o I/III mais compatível com a pele normal.

Futuramente, novos experimentos, poderão ser realizados em ratos submetidos a queimaduras por condução direta para elucidar possíveis ações e mecanismos das misturas de óleos em bebida láctea *ad libitum* em outros tempos distintos, em membrana biológica (curativos) por exemplo, após a queimadura e a associação da mistura de óleos. Além de poderem ser estudos com técnicas de biologia molecular com os tecidos coletados e as amostras de sangue, estudando a expressão de genes envolvidos nos processos inflamatórios, estresse oxidativo e cicatrização.

6 Conclusão

O leite modificado com a mistura de óleos Ômega 9, 6 e 3:

1. Inibe o aumento da área de queimadura.
2. Acelera a cicatrização de pele queimada.
3. Cicatriza a pele com proporção de colágeno tipo I/III de melhor qualidade.
4. Inibe o fator de transcrição nuclear NFkB.
5. Diminui o estresse oxidativo em ratos com pele queimada.



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto *intitulado* “EFEITOS DAS MISTURAS DE ÓLEOS DE ÔMEGA 3, 6 E 9 EM RATOS SUBMETIDOS A QUEIMADURA TÉRMICA POR CONDUÇÃO DIRETA”, protocolo nº69/2016, sob responsabilidade do Pro. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 19 de julho de 2016.

Vigência do projeto	15/07/2016 a 15/07/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/Wistar
Nº de Animais	48
Peso/Idade	200g a 230g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central

Fortaleza, 28 de julho de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC


 S. N. S.



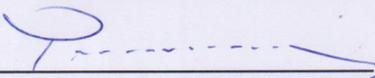
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIRURGIA

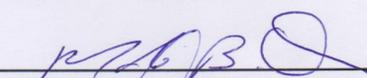
Como parte das exigências para concessão do grau de doutora, às 09:00 horas do dia 27 de Julho de 2018, realizou-se a sessão pública da defesa de tese de doutorado da aluna ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO. O trabalho tinha como título: "Efeitos Nutracêuticos Do Leite Enriquecido Com Ômega 9 6 E 3 Em Ratos Submetidos À Queimadura Térmica Por Condução Direta".

Compunham a banca examinadora os professores(as) doutores(as) PAULO ROBERTO LEITAO DE VASCONCELOS, orientador, REINALDO BARRETO ORIA, CARMELO SILVEIRA CARNEIRO LEAO FILHO, CHARLES JEAN GOMES DE MESQUITA e JOSE LIMA DE CARVALHO ROCHA. A candidata expôs oralmente a tese, em seguida os membros da banca procederam à arguição, e a sessão foi finalizada com a APROVAÇÃO, por parte da banca examinadora, do trabalho sem ressalvas.

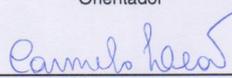
Foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da referida banca:



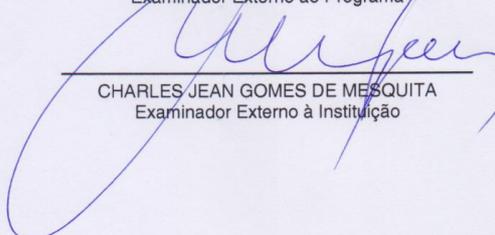
PAULO ROBERTO LEITAO DE VASCONCELOS
Orientador



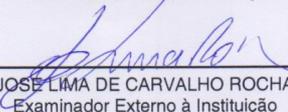
REINALDO BARRETO ORIA
Examinador Externo ao Programa



CARMELO SILVEIRA CARNEIRO LEAO FILHO
Examinador Externo à Instituição



CHARLES JEAN GOMES DE MESQUITA
Examinador Externo à Instituição



JOSE LIMA DE CARVALHO ROCHA
Examinador Externo à Instituição

Fortaleza, 27 de Julho de 2018

REFERÊNCIAS

AL-KAISY, A.A.; SAHIB, A.S. Role of the Antioxidant Effect of Vitamin E With Vitamin C and Topical Povidone-Iodine Ointment in The Treatment of Burns. *Ann Burns Fire Disasters*, v.18, n.1, p.19–30, 2005.

AL-KHALIFA, H; GIVENS, DI; RYMER, C. Effect of n-3 fatty acids on immune function in broiler chickens. *Poult Sci.*,v. 91, p. 74-88, 2012.

ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: The role of w-3 fatty acids. *Nutrition*, v.14, p. 627-633, 1998.

ALEXIS, A. F.; JONES, V. A.; STILLER, M. J. Potential therapeutic applications of tea in dermatology. *Int J Dermatol*. 1999 Oct;38(10):735-43

ALLAYEE, H.; ROTH, N.; HODIS, H.N. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: implications for nutrigenetics. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, v. 2, p.140-148, 2009.

ALONSO C. R., PESCE C. G. & KORNBLIHTT A. R. The CCAAT-binding proteins CP1 and NF-I cooperate with ATF-2 in the transcription of the fibronectin gene. *J. Biol. Chem.* 271, 22271–22279 (1996).

AMEL N., WAFA T., ABIR G., MANEL I., SAMIA D., ISSAM G., MERIEM E., ABDELHED M., MOHAMED H. Effect of olive oil and its fraction oxidative stress and the livers fatty acid composition in 2,4-dichlorophenoxyacetic treated rats. *Nutr. Metab.* 2010;7:80. doi: 10.1186/1743-7075-7-80.

AULICK, L.H.; BAZE, W.B.; JOHNSON, A.A.; WILMORE, D.W.; MASON, A.D.J. A large animal model of burn hypermetabolism. *J Surg Res*, v.31, p.281-287, 1981.

BAPTISTA VIA¹, QUINTANA HT¹, LAZZARIN MC¹, BENFATO ID¹, DE CARVALHO FP¹, LE SUEUR MALUF L¹, DE OLIVEIRA CAM¹, BAPTISTA JDS², DE OLIVEIRA

F¹. Short time insulin treatment post burn improves elastic-collagen rearrangement and reepithelization. *Connect Tissue Res.* 2018 Jun 21.

BARASCUK N, VASSILIADIS E, LARSEN L, WANG J, ZHENG Q, XING R, ET AL. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen--A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. *Clin Biochem.* 2011;44(10-11):900

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; PAULA, S. O. de; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, R.C.C.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, p. 527-533, 2003.

BARROW RE, MEYER NA, JESCHKE MG. Effect of varying burn sizes and ambient temperature on the hypermetabolic rate in thermally injured rats. *J Surg Res.* 2001;17:253–257. doi: 10.1006/jsre.2001.6183.

BEAM J¹, BOTTA A¹, YE J¹, SOLIMAN H², MATIER BJ¹, FORREST M¹, MACLEOD KM³, GHOSH S⁴. Excess Linoleic Acid Increases Collagen I/III Ratio and "Stiffens" the Heart Muscle Following High Fat Diets. *J Biol Chem.* 2015 Sep 18;290(38):23371-84. doi: 10.1074/jbc.M115.682195. Epub 2015 Aug 3.

Ben Djemaa FG, Bellassoued K, Zouari S, El Feki A, Ammar E. Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment. *J Tissue Viability.* 2016 Nov;25(4):193-200.

BENSON, A.; DICKSON, W.A.; BOYCE, D.E. ABC of wound healing- burns. *BMJ*, v.

332, p.649-652, 2006.

BERGOUIGNAN A, MOMKEN I, SCHOELLER DA, SIMON C, BLANC S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Prog Lipid Res.* 2009;48: 128–147.

BERSAMIN, A.; LUICK, B.R.; KING, I.B.; STERN, J.S.; ZIDENBERG-CHERR, S. Westernizing diets influence fat intake, red blood cell fatty acid composition, and health in remote Alaskan Native communities in the center for Alaska Native health study. *J Am Diet Assoc.*, v.108, p.266–273, 2008.

BIALY, T. L.; ROTHE, M. J.; GRANT-KELS, J. M. Dietary factors in the prevention and treatment of nonmelanoma skin cancer and melanoma. *Dermatol Surg.* 2002 Dec;28(12):1143-52.

BISTRIAN, B.R. Clinical aspects of essential fatty acid metabolism: Jonathan Rhoads lecture. *JPEN*, v.27, p.168, 2003.

BITTENCOURT, P. I. H.; SENNA, S. M. Ácidos graxos e aterosclerose. In: In: Curi, Rui. *Entendendo a Gordura: os ácidos graxos.* 1 ed. Manole, v.27, p.381:392. São Paulo, 2002.

BOHR S, PATEL SJ, SARIN D, IRIMIA D, YARMUSH ML, BERTHIAUME F. Resolvin D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a mouse burn wound model. *Wound Repair Regen.* 2013; 21(1):35–43. [PubMed: 23110665]

BRASSOLATTI P¹, KIDO HW², BOSSINI PS³, GABBAI-ARMELIN PR², OTTERÇO AN¹, ALMEIDA-LOPES L³, ZANARDI LM³, NAPOLITANO MA³, DE AVÓ LRDS⁴, FORATO LA⁵, ARAÚJO-MOREIRA FM⁶, PARIZOTTO NA¹. Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. *Biomed Mater Eng.* 2018;29(1):29-42.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BURR, G.O; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*, v.32, p.345-367, 1929.

BURR, G.O; BURR MM. On The nature and role of the effect of fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem*, v.86, p.587-621, 1930.

BURTON, G. W.; TRABER, M. G.; ACUFF, R. V.; WALTERS, D. N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L.; INGOLD, K. U. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr.* 1998 Apr;67(4):669-84.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz j med biol res*, v.36, p.433, 2003.

CALDER, PC. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc.*, v. 72, p. 36-326, 2013.

CALDWELL FT JR, OSTERHOLM JL, SOWER ND, MOYER CA. Metabolic response to thermal trauma of normal and thyroprivic rats at three environmental temperatures. *Ann Surg.* 1959;17:976–988. doi: 10.1097/00000658-195912000-00003.

CAMPELO, A.P.; CAMPELO, M.W.; BRITTO, G.A.; AYALA, A.P.; GUIMARÃES,

S.B.; VASCONCELOS, P.R. Um modelo animal aperfeiçoado para estudo de queimaduras superficiais e profundas da pele. *Acta Cir. Bras.* v.26, p. 38-42, 2011.

CAMPELO AP, CAMPELO MW, BRITO GA, JAMACARU FV, LEITÃO RF, VASCONCELOS PR. Oil mixes omega 9, 6 and 3, enriched with seaweed, promoted reduction of thermal burned modulating NF-kB and Ki-67. *Acta Cir Bras.* 2015 Jun;30(6):430-8.

CAPONE, S.L.; BAGGA, D.; GLASPY, J.A. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acid ratios and breast cancer. *Nutrition*, v.13, n.9.,1997.

CARDOSO.R. Cardoso, S. Favoreto Jr., L.L.Oliveira, J.O. Vancim, G.B. Barban, Ferraz D.B., et al.Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiology*, 216 (March (3)) (2011), pp. 409-415

CAVALCANTE, Beatriz Torres de Melo. Pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 na artrite aguda induzida por zymosan em ratos. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

CELI, P. O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39 (suplemento especial), p. 348-363, 2010.

Choi J, Kim R, Kim J, Jeong W, Park SW, Lee HW, Chung HY. Nicorandil reduces burn wound progression by enhancing skin blood flow. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018 Apr 12.

CLARK, J.A.; COOPERSMITH, C.M. Just the right amount of JNK – how NFkB and downstream mediators prevent burn-induced intestinal injury. *Crit Care Med. Crit Care Med*, v.35, n. 5, p.1433–1434, 2007.

COUDROY R, JAMET A, PEÑUELAS O, THILLE AW. Use of Type III procollagen

measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibro- proliferative therapy? *Intensive Care Med.* 2015;41(6):1159-60.

COVAS, M.I. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology.* v.16, n.5, p.216-218, 2008.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. Ácidos Graxos e Câncer. In: Curi, Rui. *Entendendo a Gordura: os ácidos graxos.* 1 ed. Manole, v. 37, p.523-538, São Paulo, 2002.

COUDROY R, JAMET A, PEÑUELAS O, THILLE AW. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibro- proliferative therapy? *Intensive Care Med.* 2015;41(6):1159-60.

DAHELE, M.A.X.; FEARON, C.H.K. Imunomodulação lipídica e câncer. In: WAITZBERG, D.L. *Dieta, nutrição e câncer.* 1 ed. Editora Atheneu, v.76, p.679-688, São Paulo, 2006.

DALLI J, SERHAN CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood.* 2012;120(15):e60–72.

DAPSON RW¹, FAGAN C, KIERNAN JA, WICKERSHAM TW. Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotech Histochem.* 2011 Jun;86(3):133-9. doi: 10.3109/10520295.2011.570277. Epub 2011 Mar 21.

DAVIDSON, J.M. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* V. 290 Suppl:S1-11, Review, Jul., 1998.

DEMELING, R.H.; DESANTI, T. Section II: Pathogenesis of burn injury (initial and delayed) in *Managing the burn wound.* Burnsurgery.org 2000-2005.

Disponível em: <http://www.burnsurgery.org/Modules/BurnWound%201/sect_II.htm>.

Acesso em: 18 de junho de 2012.

DEMLING RH, SEIGNE P. Metabolic management of patients with severe burns. *World J Surg.* 2000;17:673–680. doi: 10.1007/s002689910109.

DORSETT-MARTIN WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen.* 2004;12(6):591–599.

DYEBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, v. 44, n. 4, p. 125-135, 1986.

ENDRES, S; GHORBANI, R; KELLEY, VE. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med.*, v. 320, p. 265-271, 1989.

FECHINE-JAMACARU, F. V. Quantificação de angiogênese corneana in vivo através de processamento de imagens digitais. 2006. 292 f. Doutorado (Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERGUSON, M.W; WHITBY, D.J; SHAM, M.; ARMSTRONG, J.; SIEBERT, J.W.; LONGAKER, M.T. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 97, n. 4, p.854-60, 1996.

GALÁN-ARRIERO I, SERRANO-MUÑOZ D, GÓMEZ-SORIANO J, GOICOECHEA C, TAYLOR J, VELASCO A, ÁVILA-MARTÍN G. The role of Omega-3 and Omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma. *Biochim Biophys Acta.* 2017 Sep;1859(9 Pt B):1629-1635. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.05.003.

GALLAND L. Diet and inflammation. *Nutr Clin Pract* 25: 634–640.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation.

Int J Cancer, v.31, p.13-20, 1983.

GILLINGHAM LG, HARRIS-JANZ S, JONES PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*. 2011; 46: 209–228.

GOGIA, P. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003

GOMES, D.R; MACIEIRA, JUNIOR, L.; SERRA, M.C. Conduas atuais em queimaduras. Rio de Janeiro: Revinter, p.1-3, 2001.

GRIMBLE, R.F.; TAPPIA, P.S. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z Ernährungswiss*, v. 37, p.57–65, 1998.

GRIMBLE, R. Use of n-3 fatty acid-containing lipid emulsions in the Intensive Care Unit environment: the scientist's view. *Clin Nutr*, v. 21, p.15-21, 2002.

GRIMM KA, LAMONT LA, TRANQUILLI WJ, GREENE SA, ROBERTSON SA. *Veterinary anesthesia and analgesia*. 5ed. Wiley-Balckwell. Maio, 2015.

GOTTRUP, F.; AGREN, M.S; KARLSMARK, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and vivo adult soft tissue. *Wound Rep. Reg.*, v. 8, p.83-96, 2000.

GUEUGNIAUD, P.Y.; CARSIN, H.; BERTIN, M.M.; PETIT, P. Current advanced in the initial management of major thermal burns. *Intensive Care Med.*, v.26, p. 848-856, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. *Free Radicals in biology and medicine*, 3rd. ed., Oxford Science Publications: Oxford, 1998.

HANKENSON KD¹, WATKINS BA, SCHOENLEIN IA, ALLEN KG, TUREK JJ. Omega3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 Jan;223(1):88-

95.

HAYAKAWA, S.;YOSHIKAWA, D.; ISHII, H.; TANAKA, M.; KUMAGAI, S.; MATSUMOTO, M.; HAYASHI, M.; SUGIURA, T.; HAYASHI, K.; ANDO, H.; AMANO, T.; MUROHARA, T. Association of plasma omega-3 to omega-6 polyunsaturated Fatty Acid ratio with complexity of coronary artery lesion. Intern Med., v.51, n.9, p.1009-1014, 2012.

HAYATI F¹, GHAMSARI SM¹, DEHGHAN MM¹, ORYAN A². Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study. J Dermatolog Treat. 2018 Jan 23:1-7.

HELLMANN J, TANG Y, SPITE M. Proresolving lipid mediators and diabetic wound healing. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2012;19(2):104–8

HELTON, W. S.; ESPART, N. J. Defining Mechanism of W-3 Fatty-Acid Activy. Nutrition, v.17, p.674-687, 2001.

HERNDON DN, WILMORE DW, MASON AD Jr. Development and analysis of a small animal model simulating the human postburn hypermetabolic response. J Surg Res. 2001;17:394–403.

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. Pathophysiology and types of Burns. BMJ, v.(328), p.1427-1429, 2004.

HOSSAIN MS¹, HASHIMOTO M, GAMOH S, MASUMURA S. Antioxidative effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. J Neurochem. 1999 Mar;72(3):1133-8.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem, v. 29, n. 11, p.1349–1353, 1981.

<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/06/um-milhao-de-brasileiros-sofrem-queimaduras-por->

ano?TSPD_101_R0=4595e4ea3df30f9ae378fdb9a17bb276yy400000000000000000e
ec182b1ffff0005ab1556e00bd1e2cbd

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.;
TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 2003 Jul
15;189(1-2):21-39

INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res*, v. 30,
p.39-103, 1991.

INOUE Y, LIU YM, OTAWARA M, CHICO CALERO I, STEPHANIE NAM A, YU
YM, CHANG P, BUTLER KL¹, NAZARIAN RM⁷, GOVERMAN J¹, VAKOC
BJ⁵, IRIMIA D^{1,2}.

Resolvin D2 Limits Secondary Tissue Necrosis After Burn Wounds in Rats.

J Burn Care Res. 2018 Apr 20;39(3):423-432.

ISHAK WMW, KATAS H, YUEN NP, ABDULLAH MA, ZULFAKAR MH. Topical
application of omega-3-, omega-6-, and omega-9-rich oil emulsions for cutaneous
wound healing in rats. *Drug Deliv Transl Res*. 2018 Apr 17. doi: 10.1007/s13346-018-
0522-8. [Epub ahead of print]

ISHISE H¹, LARSON B², HIRATA Y³, FUJIWARA T¹, NISHIMOTO S¹, KUBO
T⁴, MATSUDA K⁴, KANAZAWA S⁴, SOTSUKA Y¹, FUJITA K¹, KAKIBUCHI
M¹, KAWAI K¹. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical
force transducer via NFκB activation. *Sci Rep*. 2015 Jun 25;5:11620. doi:
10.1038/srep11620.

IZAMIS ML, UYGUN K, UYGUN B, YARMUSH ML, BERTHIAUME F. Effects of burn
injury on markers of hypermetabolism in rats. *J Burn Care Res*. 2009;17:993–1001.
doi: 10.1097/BCR.0b013e3181bfb7b4

JAHANGIRI A¹, LEIFERT WR, KIND KL, MCMURCHIE EJ. Dietary fish oil alters

cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med.* 2006 May 1;40(9):1592-602. Epub 2006 Jan 18.

JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.*, v.71, p.343-348, 2000.

JI RR, XU ZZ, STRICHARTZ G, SERHAN CN. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci.* 2011;34(11):599–609

JIA Y, TUREK JJ. Polyenoic fatty acid ratios alter fibroblast collagen production via PGE₂ and PGE receptor subtype response. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jul;229(7):676-83.

JIANG, Z. et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–55.

JAUDSZUS, A. et al. Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. *J. Lipid. Res.*, v. 54, p. 923-935, 2013.

KAO, C.C; GARNER, W.L. Acute Burns. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 105, p.2482-2492, 2000.

KASHYAP, A.; BEEZHOLD, D.; WISEMAN, J.; BECK, W.C. Effect of povidine iodine dermatologic ointment on wound healing. *Am Surg.*, v.61, p.486-491, 1995.

KAUFMAN, T.; LUSTHAUS, S.N.; SAGHER, U.; WEXLER, M.R. Deep partial skin thickness burns: a reproducible animal model to study burn wound healing. *Burns*, V.16, n.1, p.13-16, 1990.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*. 2001; 17:669-73. Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res.*, v.30, p.39-103, 1991.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; KAWAHIRA, K.; SAKANAKA, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *Br J Pharmacol*, v.148(6), p.860-870. Jul., 2006.

KOHEN, R.; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. *Arch Gerontol Geriatr*. 1997 Mar-Apr;24(2):103-23.

KROKAN, H. E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G.; DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*. 1997 Jul 1;325 (Pt 1):1-16

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease structural and functional 7th. Editions, Saunders, 2004.

KVAM E, DAHLE J. Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-A-induced membrane damage. *J Invest Dermatol*. 2003 Sep;121(3):564-9.

LANNEAU, D.; WETTSTEIN, G.; BONNIAUD, P.; GARRIDO, C. Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. Mini-Review *The Scientific World Journal* , v. 3, p. 1543–1552, 2010

LARDINOIS, C.K. The role of omega 3 fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity. *Med Hypotheses*, v. 24, p.243–248, 1987.

LATREILLE J¹, KESSE-GUYOT E, MALVY D, ANDREEVA V, GALAN P, TSCHACHLER E, HERCBERG S, GUINOT C, EZZEDINE K. Dietary monounsaturated fatty acids intake and risk of skin photoaging. *PLoS One*. 2012;7(9):e44490

LEE, C.Y.; SIT, W.H.; FAN, S.T.; MAN, K.; JOR, I.W.; WONG, L.L.; WAN, M.L.; TAN-UN, K.C.; WAN, J.M. The cell cycle effects of docosahexaenoic acid on human

metastatic hepatocellular carcinoma proliferation. *Int J Oncol.*, v.36, n4, p.991-998, 2010.

LENHINGER, A.L. Princípios de bioquímica. Trad. de .LODI, W.R.; SIMÕES A. A. São Paulo: Ed. Sarvie. p. 725, 1986.

LI, J.; ZHANG, C.; XING, Y.; JANICKI, J.S.; YAMAMOTO, M.; WANG, X.L.; TANG, D.Q.; Cui T. *Up-regulation of p27kip1 contributes to Nrf2-mediated protection against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res.*, v. 90, p.315-24, 2011.

LI. H.L.; CHEN, L.P.; HU, Y.H.; QIN, Y.; LIANG, G.; XIONG, Y.X.; CHEN, Q.X. Crocodile Oil Enhances Cutaneous Burn Wound Healing and Reduces Scar Formation in Rats. *Academic Emergency Medicine*, v.19, p. 265-273, 2012.

LIONELLI, G.T.; LAWRENCE, W.T. Wound dressings. *Surg. Clin. N. Am.*, v. 83, p.617-638, 2003.

LIVESEY, A.S.; HERNDON, D.N.; HOLLYOAK, M.A.; MATALAS, S.L.; NELSON, G.S. Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplantation*, v.60, p.1-9, 1995.

LOPES, L.M.F.; VIDAL, M.A.; SANCHES, J.A. Epidemiologia do grande queimado de 2001 a 2003 atendido na UTQ da Faculdade de Medicina de Catanduva- SP. *Rev Bras. Queimaduras*, v. 51, p.28-34, 2005.

LOPEZ S., PACHECO Y.M., BERMUDEZ B., ABIA R., MUNRIANA F. Olive Oil and Cancer. Volume 55. *Grasas-Y-Acetes*; Sevilla, Spain: 2004. pp. 31–3

MACIEL, E.; SERRA, M.C. Tratado de queimaduras. São Paulo:Atheneu; p.15-31, 2004.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1,

p. 84-94, 2009.

MARTINDALE, R.; ZHOU, M. Terapia nutricional imunomoduladora. In: WAITZBERG, Dan Linetzky. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 4. ed. São Paulo: atheneu, 2009. Cap 119, p. 1987- 2006.

MARTINEZ RM¹, FATTORI V², SAITO P¹, MELO CBP¹, BORGHI SM², PINTO IC¹, BUSSMANN AJC², BARACAT MM¹, GEORGETTI SR¹, VERRI WA JR³, CASAGRANDE R⁴. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. J Dermatol Sci. 2018 Apr 27. pii: S0923-1811(18)30201-9.

MARSHALL AH, BROOKS NC, HIYAMA Y, QA'ATY N, AL-MOUSAWI A, FINNERTY CC, JESCHKE MG. Hepatic apoptosis postburn is mediated by c-Jun N-terminal kinase 2. Shock. 2013;39(2):183–188.

MATKOWSKYJ, K.A.; SCHONFELD, D.; BENYA, R.V. Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software photoshop and matlab. J Histochem Cytochem, v. 48, p.303-312, 2000.

MCGUINNESS, J.; NEILAN, T.G.; SHARKASI, A.; BOUCHIER-HAYES, D.; REDMOND, J.M. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action. J Thorac Cardiovasc Surg., v.1 32, p. 72-7, 2006.

MEDEIROS, A.C.; RAMOS, A.M.O.; DANTAS-FILHO, A.M.; AZEVEDO, R.C.F, ARAÚJO, F.L.F.B. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. Acta Cir Bras., v.14, 1999.

MELO, Radamés Bezerra. et al. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio omega- 9:omega-6 and low ratio omega-6:omega-3 after molar extraction in rats.

Acta cir. Bras., v. 29, n. 6, p. 371-375, june, 2014

MELO, Radamés Bezerra et al. Anti-inflammatory effect of a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction.

Archives of Oral. Biology, v. 74, p. 63-68, feb. 2017

MENON R¹, KRZYSZCZYK P¹, BERTHIAUME F¹. PRO-RESOLUTION POTENCY OF RESOLVINS D1, D2 AND E1 ON NEUTROPHIL MIGRATION AND IN DERMAL WOUND HEALING. Nano Life. 2017 Mar;7(1). pii: 1750002. doi: 10.1142/S1793984417500027.

MESQUITA, C.J.; LEITE, J.A.; FECHINE, F.V.; ROCHA, J.L.C.; LEITE, J.G; LEITE FILHO, J.A.; BARBOSA-FILHO, R.A. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. Burns, v. 36, p.97-108, Feb., 2010.

MEYER, T.N.; SILVA ,A.L.D.A. A standard burn model using rats. Acta Cir Bras, v.14, 1999.

Mesquita CJ, Guimarães SB, Leite Filho JA, Maciel FS, Rocha JL, Leite JA. Effect of propranolol on capsular reaction around silicone implants in guinea pigs. Acta Cir Bras. 2015 Jan;30(1):24-33.

MIAO S. et al. . Role of the cyclic AMP response element in rat fibronectin gene expression. Hepatology 17, 882–890 (1993).

MODAK N, TAMGADGE S, TAMGADGE A, BHALERAO S. Comparative Study of Clinical Staging of Oral Submucous Fibrosis with Qualitative Analysis of Collagen Fibers Under Polarized Microscopy. Iran J Pathol. 2015;10(2):111-9.

MOLONEY, T.C.; HOBAN, D.B.; BARRY, F.P.; HOWARD, L.; DOWD, E. Kinetics of thermally induced heat shock protein 27 and 70 expression by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Protein Sci.*, v. 21, p.904-909, 2012.

MOREIRA M, FAGUNDES DJ, DE JESUS SIMÕES M, DE OLIVEIRA MC, DOS SANTOS PREVIDELLI IT, MOREIRA AC. Zafirlukast pocket delivery impairs the capsule healing around textured implants in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2009 Jan;33(1):90-7. doi: 10.1007/s00266-008-9245-4.

MOZINGO, A.W.; AHRENHOLZ, D.H.; CUSICK-JOST, J.; WICHITA, K.S. Advanced burn life support course provider's manual, 2005.

MULVAD, G.; PEDERSEN, H.S.; HANSEN, J.C.; DEWAILLY, E.; JUL, E.; PEDERSEN, M.; DEGUCHI, Y.; NEWMAN, W.P.; MALCOM, G.T.; TRACY, R.E.; MIDDGAUGH, J.P.; BJERREGAARD, P. The Inuit diet. Fatty acids and antioxidants, their role in ischemic heart disease, and exposure to organochlorines and heavy metals. An international study. *Arctic Med Res.*, v. 55, p.20–24, 1996.

NAKAMURA, K. Influence of preoperative administration of w-3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. *Nutrition*, v.21, p. 639-649, 2005.

NICHIFOR MT, DINU D. 3-amino-1,2,4-triazole limits the oxidative damage in UVA-Irradiated Dysplastic Keratinocytes. *Biomed Res Int.* 2017;4872164.

OH YT¹, LEE JY, LEE J, KIM H, YOON KS, CHOE W, KANG I. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF-kappaB signaling pathways. *Neurosci Lett.* 2009 Oct 23;464(2):93-7. doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.040. Epub 2009 Aug 20.

ORMAN, M.A.; NGUYEN, T.T.; IERAPETRITOU, M.G.; BERTHIAUME, F.; ANDROULAKIS, I.P. Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection. *Cytokine*, v. 55, p. 362–371, 2011.

OLIVEIRA, F.D.E.; BEVILACQUA, L.R.; ANARUMA, C.A.; BOLDRINI, S.C.; LIBERTI, E.A. Morphological changes in distant muscle fibers following thermal injury in Wistar rats. *Acta Cir Bras.*, v. 25, p.525-528, 2010.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

PANNIER, M.; WASSERMANN, D. Surgery of burns. *Rev Prat.*, V. 15, p. 2244-8. Dez., 2002.

PEREIRA, M.J.L. Intensidade da resposta inflamatória em crianças queimadas: análise de 157 casos. *Rev Bras Queimaduras*, v.2(1), p.31-9, 2002.

PODDA, M.; ZOLLNER, T. M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M.; THIELE, J. J.; PACKER, L.; KAUFMANN, R. Activity of alpha-lipoic acid in the protection against oxidative stress in skin. *Curr Probl Dermatol*. 2001;29:43-51.

PORTOLÉS M. T., AINAGA M. J., PAGANI R. The induction of lipid peroxidation by *E. coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Nov 28;1158(3):287-92.

PRELACK K., M. DYLEWSKI, R.L. SHERIDAN. Practical guidelines for nutritional management of burn injury and recovery. *Burns*, 33 (1) (2007), pp. 14-24.

QING L., HUIYUAN Y. Antioxidant activities of olive oil. *Food Chem*. 2007;102:732–737. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.051.

QUILES JL, BARJA G, BATTINO M, MATAIX J, SOLFRIZZI V. Role of Olive Oil and

Monounsaturated Fatty Acids in Mitochondrial Oxidative Stress and Aging. *Nutrition Reviews*. 2010;64: S31–S39.

RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L.; OTONKOSKI, T.; LAPATTO, R. Dose- dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol*. 2002 Apr 1;63(7):1297-304.

RAVAGE, Z.B.; GOMEZ, H.F.; CZERMAK, B.J.; WATKINS, A.S.; TILL, G.O. Mediators of microvascular injury in dermal burn wounds. *Inflammation*, v.22, p.619-629, 1998.

REITER, R. J. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol*. 1997;38:103-17

RIZZO, D. C. *Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. Editora Cengage Learning, São Paulo, 2011.

ROBBINS, S. L. *Patologia estrutural e funcional*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991

ROBERT, O. Practical applications of fish oil (w-3 fatty acids) in primary care. *J Am Board Pract.*, v.18, p.28-36, 2005.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 96, p. 693-702, 1996.

RODRIGUES.H.G., M.A. VINOLO, J. MAGDALON, K. VITZEL, R.T. NACHBAR, A.F. PESSOA, et al. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol*, 132 (January (1))(2012), pp. 208-215.

SAPORITO F¹, SANDRI G¹, BONFERONI MC¹, ROSSI S¹, BOSELLI C¹, ICARO CORNAGLIA A², MANNUCCI B³, GRISOLI P¹, VIGANI B¹, FERRARI F¹. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *Int J Nanomedicine*. 2017 Dec

27;13:175-186.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. (Eds.). Dermatologia. Porto Alegre: Artes médicas, 2001.

SAYEED MM. Inflammatory/cardiovascular-metabolic responses in a rat model of burn injury with superimposed infection. Shock. 2005;24(Suppl 1):40–44.

SERGEEV, P. V.; UKHINA, T. V.; SHIMANOVSKIĬ, N. L. [Effect of steroid sex hormones on lipid peroxidation and antiperoxide system of glutathione in rat skin tissues]. Biull Eksp Biol Med. 1999 Dec;128(12):663-6

SERHAN CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature. 2014;510(7503):92–101.

SCOTT, R.C.; WALKER, M.; DUGARD, P.H. A comparison of the in vitro permeability properties of some common laboratory animal skins. Int J Cosmetic Sci, v. 2, p.189-194, 1986.

SHIH B., GARSIDE E., MCGROUTHER D.A., BAYAT A., SHIH B. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. Wound Repair Regen. 2010 Mar-Apr;18(2):139-53.

SILVA et al. Feridas: Fundamentos e atualizações em Enfermagem - 2 ed. São Caetano do Sul: Yendis Editora, p. 61,62, 2007.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother, v. 56, p.365-79, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med (Maywood), v. 2336, p.674-88, 2008.

SMUDER, A.J.; MIN, K.; HUDSON, M.B.; KAVAZIS, A.N.; KWON, O.S.; NELSON, W.B.; POWERS, S.K. *Endurance exercise attenuates ventilator-induced diaphragm*

dysfunction. J Appl Physiol., v. 112, p.501-10, 2012.

SRIVASTAVA, A.; JENNINGS, L.J.; HANUMADASS, M.; SETHI, S.; DESAGUN, E.; PAVLIS, N. Xenogeneic acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. *J Burn Care Rehabil*, v. 20, p.382-90, 1990.

SRIVASTAVA, A.; DESAGUN, E.Z.; JENNINGS, L.J.; SETHI, S.; PHUANGSAB, A.; HANUMADASS, M. Use of porcine dermal matrix as a dermal substitute in rats. *Ann Surg*, v. 233, p.400-8, 2001.

STABLES, M.J.; GILROY, D.W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res.* V. 50, n. 1, p. 35-51, 2011.

SVOBODOVA A. R., GALANDAKOVA A., SIANSKA J., D. Dolezal, J. Ulrichova, J.Vostalova. Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice. *Biol. Pharm. Bull*, 34 (2011), pp. 471-479

SYED H.O. Oleuropein in olive oil and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 2010;78:133–154. doi: 10.3797/scipharm.0912-18.

TANG Y, ZHANG MJ, HELLMANN J, KOSURI M, BHATNAGAR A, SPITE M. Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. *Diabetes*. 2013; 62(2):618–27.

TAO W¹, LI PS², SHEN Z³, SHU YS⁴, LIU S⁵. Effects of omega-3 fatty acid nutrition on mortality in septic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Anesthesiol*. 2016 Jul 18;16(1):39. doi: 10.1186/s12871-016-0200-7.

THANAA A. EL-KHOLY,^{1,*} MOHAMMAD ABU HILAL,² HATIM ALI AL-ABBADI,³ ABDULHALIM SALIM SERAFI,⁴ AHMAD K. AL-GHAMDI,⁵ HANAN M. SOBHAY,⁶ AND JOHN R. C. RICHARDSON⁷. The Effect of Extra Virgin Olive Oil and Soybean on DNA, Cytogenicity and Some Antioxidant Enzymes in Rats. *Nutrients*.

2014 Jun; 6(6): 2376–2386.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, J. G. *Veterinary Anesthesia: Anesthesia of wild, exotic, and laboratory animals*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996.686-735.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I.E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* , v.1, p.7212-20, 2005.

USDA, National nutrient database for standard reference. Disponível para download em: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=22113>. Acessado em: 11 de maio de 2012.

VALE, E.C.S. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. *An Bras Dermatol.*, v. 80, p.9-19, 2005.

VANA, L.P.; AGGIARO, A.; SCHIOZER, W. Algoritmo de tratamento cirúrgico do paciente queimado. *Rev Bras Queimaduras*, v.7, p.8-10, 2007.

VASCONCELOS, Camila. Pinho. Pessoa de. Pré-condicionamento e tratamento com misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9 sobre a inflamação e a reabsorção óssea na doença periodontal experimental. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em cirurgia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VASSILIOU, E.K.; GONZALEZ, A.; GARCIA, C.; TADROS, J.H.; CHAKRABORTY, G.; TONEY, J.H. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis.*, v.26, p.8-25, 2009. expression in Jurkat cells. *J. Nutr. Biochem.*, v. 15, p. 657- 665, 2004.

VERLENGIA, R; GORJAO, R; KANUNFRE, C. Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene expression in Jurkat cells. *J. Nutr. Biochem.*, v. 15,

p. 657- 665, 2004.

WILLIAMS FN, HERNDON DN, JESCHKE MG. The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clinics in plastic surgery*. 2009;36(4):583–596.

XU, R.X. *Burns regenerative medicine and therapy*. Switzerland: Karger. p. 1-156, 2004.

XU, Q.L.; CAI, C.; QI, W.W.; XIA, Z.G.; TANG, Y.Z. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids on inflammation-related parameters in lung tissue of rats with severe scald. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.*, v. 27. p. 358-62, 2011.

YAQOOB, P; CALDER, P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol.*, v. 163, p. 120-128, 1995.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K.L. Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPARgamma. *Br J Nutr.*, v. 91, p.733–739, 2004.

ZIBOH, V.A., MILLER, C.C., CHO, Y.,. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. 71, 361S–366S.

ZIEGLER, T.R.; OGDEN, L.G.; SINGLETON, K.D.; LUO, M.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; GRIFFITH, D.P.; GALLOWAY, J.R.; WISCHMEYER, P.E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically patients. *Intensive care med.*,v.31,p.1079-1086,2005.

WADE CE, BAER LA, WU X, SILLIMAN DT, WALTERS TJ, WOLF SE. Severe burn and disuse in the rat independently adversely impact body composition and adipokines. *Crit Care*. 2013 Oct 7;17(5):R225. doi: 10.1186/cc13048.

WAITZBERG, D.L. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 4a. Ed. S. Paulo, Atheneu. V. 1, p.1858, 2006.

WELCH, A.A.; SHAKYA-SHRESTHA, S.; LENTJES, M.A.; WAREHAM, N.J.; KHAW, K.T. Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of alpha-linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr.*, v.92, p.1040-51, 2010.