

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Cirurgia
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

**ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 EM PELE DE RATOS SUBMETIDOS A
QUEIMADURA TÉRMICA**

FORTALEZA

2012

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

**ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 EM PELE DE RATOS SUBMETIDOS A
QUEIMADURA TÉRMICA**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

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

Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C196o Campelo, Ana Paula Bomfim Soares.
 Óleos ômega 9,6 e 3 em pele de ratos submetidos a queimadura térmica / Ana Paula Bomfim
Soares Campelo. – 2012.
 78 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Metabolismo e comportamento biocelular no estresse.

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

Co-orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Queimaduras. 2. Ácidos Graxos. 3. Ratos. 4. Alga marinha. I. Título.

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO

Óleos ômega 9, 6 e 3 em pele de ratos submetidos a
queimadura térmica”

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em 29/06/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.ª Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN

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

Ao meu esposo Marcio Wilker, pelo grande apoio, dedicação, companheirismo, amor e por suas palavras de incentivo nos momentos difíceis que passei, sempre ao meu lado, nunca permitindo que eu desistisse. Ao meu pequeno Marcio Victor que por inúmeras vezes não conseguia entender por mais que explicasse o que eu tanto fazia no laboratório, porém aceitando, a ponto de me pedir um “ratinho em uma coleira”.

À minha mãe Ana Maria Soares pela força, incentivo e amor durante toda minha vida, me ensinando a importância do estudo e trabalho.

Ao meu pai José Antônio Soares (em memória- Abril 2012) pelo exemplo de superação e amor a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todas as pessoas que contribuíram à elaboração deste estudo seria impossível. Portanto, gostaria de registrar as que tiveram uma participação mais direta à realização desta dissertação, aos quais agradeço:

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

À Professora Doutora RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO, co-orientadora desta dissertação, pesquisadora de valor e incentivadora deste trabalho, apoiando e acrescentando dados novos ao estudo, contribuindo desta forma a minha formação.

À Professora Doutora Silvia REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS, pesquisadora pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, agradeço pela parceria, apoio e ajuda, permitindo que realizássemos uma parte do estudo no laboratório de Biologia Molecular da UFRN.

À Professora Doutora GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, pela colaboração, assistência, apoio e parceria com o laboratório de morfologia da UFC.

Ao Professor Doutor ALEJANDRO PEDRO AYALA, pela colaboração e apoio e parceria com o Departamento de Física da UFC.

Aos professores da pós-graduação em cirurgia que contribuíram para minha formação neste curso, especialmente ao Professor Doutor FRANCISCO VAGNALDO FECHINNI JAMACARU, pelo apoio e presteza e participação deste estudo.

Ao Doutorando LEONAM GOMES COUTINHO da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo apoio e assistência na realização do

painel de citocinas (milliplex) realizado no laboratório de Biologia Molecular da UFRN.

Ao Doutorando MARCIO WILKER SOARES CAMPELO, pela grande apoio, ajuda e auxílio durante a realização dos experimentos, estatística e formatação deste estudo.

Aos alunos da Graduação BEATRICE NUTO NOBREGA e NELSON MATIAS pela ajuda na pesagem dos animais e na preparação da banca experimental.

À técnica de laboratório MARIA VILANI RODRIGUES BASTOS, pelo apoio e auxílio nas coletas de sangue do plexo orbitário dos animais nos experimentos.

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. 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 NUTRIMED e equipe de nutricionistas, principalmente à ALINE CUNHA, pelo apoio e preparação das misturas de óleos.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

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

ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 EM PELE DE RATOS SUBMETIDOS QUEIMADURA TÉRMICA.

ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO. Pós-Graduação *Stricto-Sensu* do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Junho, 2012. Orientador Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

No presente estudo foram utilizadas misturas de óleos em concentrações nutracêuticas com razão de $\omega 6:\omega 3$ baixa que favorece uma ação anti-inflamatória e a razão de $\omega 9:\omega 6$ alta com ação antioxidante. O objetivo do estudo foi estudar os efeitos das misturas de óleos de $\omega 9$, $\omega 6$ e $\omega 3$ na queimadura térmica e avaliar se as fontes de $\omega 3$ (ALA, EPA ou DHA) interferem nos efeitos das misturas na queimadura. Foram utilizados 36 ratos *Wistar*, distribuídos em 6 grupos: água, queimado + água [Q + água], queimado + isolipídico [Q + Iso], queimado + mistura de óleos 1 [ALA], queimado + mistura de óleos 2 [ALA+EPA+DHA de peixe] e queimado + mistura de óleos 3 [ALA+DHA de algas marinhas] com seis animais em cada grupo. Realizada queimadura por condução direta causando lesão de espessura total do dorso dos animais, em seguida administrada por via orogástrica as misturas de óleos por sete dias. Avaliada a lesão cutânea por macroscopia (planimetria digital), microscopia, imunohistoquímica (anti-Ki-67, anti-NF κ B, anti-HSP 27 e anti-HNEJ) e painel de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , INF-gama e CSF-GM). Na macroscopia os ratos que receberam a mistura 3 apresentaram menor área de lesão, assim como as misturas 1, 2 e isolipídica quando comparadas com a água. Na microscopia apenas os animais que receberam a mistura 3 (ALA+DHA de algas marinhas) apresentaram menor extensão da lesão em relação a água. Ao avaliar o Ki-67 a mistura 3 induziu aumento da proliferação celular em relação aos demais grupos. Apenas a mistura 3 foi capaz de inibir NF κ B. Não houve diferença entre os grupos em relação a HSP 27, HNEJ e painel de interleucina. A mistura de óleos $\omega 3$, na qual a fonte é ALA+DHA de algas marinhas, tem efeitos de: inibir o NF κ B, aumentar a proliferação celular, reduzir área de lesão e extensão da queimadura.

Descritores: Queimadura; ácidos graxos; ratos; algas marinhas.

ABSTRACT

Oils mixes Omega 9, 6 and 3 in rats subjected to thermal burn. ANA PAULA BOMFIM SOARES CAMPELO. Stricto Sensu post-graduation. Department of Surgery, Medicine Scholl, Federal University of Ceará (Degree of Master of Surgery). June, 2012. Advisor: PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

In the present study were used oil mixes at nutraceutical concentrations with low ratio of $\omega 6:\omega 3$ which promotes anti-inflammatory action and high ratio of $\omega 9:\omega 6$ leading to antioxidant action. The goal of the study was to examine the effects of the oil mixes, $\omega 9$ and $\omega 6$ and $\omega 3$ in rats subjected to thermal burn to assess whether the sources of $\omega 3$ (ALA, EPA or DHA) would interfere with the effect of such mixtures on the thermal injury. Thirty-six Wistar rats were used, distributed into six groups: water, burned + water [Q+water], burned + isolipid [Q+Iso], burned + oil mix 1 [ALA], burned + oil mix 2 [ALA + EPA + DHA of fish] and burned + oil mix 3 [ALA + DHA of seaweed]. Each group had six animals. The thermal injury was performed by direct conduction causing burn involving total thickness of the animals' skin. After induction of burns animals received the oil mixes oro-gastrically for seven days. Cutaneous lesions were evaluated by macroscopy changes (digital plan), tissue microscopy and immunohistochemistry (anti-Ki-67, anti-NF- κ B, anti-HSP 27 and anti-HNE-J) and by plasma cytokines' concentrations (IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, TNF-alpha, INF-gamma and GM-CSF). At macroscopy the rats that were administered with either isolipidic solution or mix 1 or mix 3, showed a decrease in injury area as compared to the injury of rats that received water. In animals recipients of mix 3 there was a decreased in thermal lesion as compared to those of rats that were supplemented with the isolipidic or mix 1. At microscopy, only animals that received the mix 3 (ALA + DHA of seaweed) showed a smaller extension of the thermal injury as compared to those that were supplemented with water. Expression of Ki-67 (cell proliferation marker) in injured tissue of rats recipients of Mix 3 increased as compared to all the other groups. Only animals supplemented with mix 3 were able to inhibit NF κ B in injured tissue. There was no difference among the groups in relation to tissue expression of HSP 27 and HNEJ, as well as regard to the plasma concentrations of interleukins. Rats recipient of the oil mix in which the source of $\omega 3$ was ALA+DHA of seaweed showed inhibition of injured tissue NF κ B, increase in cell proliferation, reduction the area and extension of thermal lesion as compared to injuries of rats recipients of other $\omega 3$ sources. Keywords: Burn; fatty acids; rat; seaweed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.	26
Figura 2	Metabolismo dos eicosanóides durante a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos por meio do ácido araquidónico (AA) e do ácido eicopentaenoico (EPA)	27
Figura 3	Soluções anestésicas utilizadas	34
Figura 4	Ato anestésico no membro pélvico direito/face mediana	34
Figura 5	Preparo do local a ser realizada a queimadura (dorso sendo epilado)	35
Figura 6	Demarcação de área. Molde vazado confeccionado e caneta dermatográfica	35
Figura 7	Antissepsia da pele com clorexidine 2%	36
Figura 8	Equipamento completo utilizado para realização da queimadura. Observar termômetro digital, termopar tipo K na ponta, estabilizador de corrente elétrica com termostato interno	37
Figura 9	Realização da queimadura por 9 segundos	37
Figura 10	Resfriamento da pele com Soro fisiológico 0,9%	38
Figura 11	Delimitação e cálculo da área de lesão	39
Figura 12	Imagem representativa da tela do sistema de análise morfológica (SAMM).	42
Figura 13	Imagem da tela do <i>Bio-plex manager</i> representativa da placa a ser analisadas.	45
Figura 14	Imagem representativa de um animal no primeiro dia (D1) sétimo dia (D7)	47
Figura 15	Imagem representativa da marcação por anti-Ki-67 de pele de um animal de cada grupo	51
Figura 16	Imagem representativa da marcação por anti-NF-κB de pele de um animal de cada grupo	52
Quadro 1	Classificação dos óleos ômega em estudo	23
Quadro 2	Divisão dos grupos e composição das misturas com suas respectivas fontes de ω-3	32

Quadro 3	Composição dos óleos e proporções de ω -9, ω -6 e ω -3 em cada mistura.	32
Quadro 4	Diluição da curva padrão	44
Gráfico 01	Área queimada em cm^2 distribuída por grupo no dia zero. Resultado apresentado como mediana (barra	48
Gráfico 02	Área queimada em cm^2 distribuída por grupo no sétimo dia. Resultado apresentado como média e desvio padrão	49
Gráfico 03	Extensão da queimadura em cm distribuída por grupo no sétimo dia, visualizado com microscópio óptico (magnificado 10x)	50
Gráfico 04	Percentagem de área marcada pelo anti-corpo Ki-67	51
Gráfico 05	Percentagem de área marcada pelo anti-corpo NF- κ B	52
Gráfico 06	Percentagem de área marcada pelo anti-corpo HNE	53
Gráfico 07	Percentagem de área marcada pelo anti-corpo HSP 27	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores mínimo, máximo, percentil 25% e percentil 75% da área queimada em (cm ²) de cada grupo	48
Tabela 2	Concentração de cada analito expressa em pg/mL	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AG – Ácidos graxos

AGPI- Ácido graxo poliinsaturado

AA – Ácido araquidônico

ALA – Alfa linolênico

AL- Ácido linoléico

BSA – Albumina sérica bovina

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

D - Dia

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EPA – Eicosapentaenóico

ETA - Ácido eicosatrienóico

Et al – e colaboradores

DHA – Docosahexaenóico

HE – Hematoxilina eosina

HNE (anti-HNE-J) – Anti-4-hidroxinonenal

HSP – Proteína de choque térmica

IFN – Interferon

IL - Interleucina

ω – Ômega

LT – Leucotrieno

LO – Lipoxigenase

M - Misturas

AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados

NF-KB – Fator nuclear Kappa B

PBS – Solução tamponada de fosfato

PG – Prostaglandina

P – Nível de significância estatística

Q + A – Queimado + água

Q + I – Queimado + isolipídico

Q + M1 – Queimado + mistura 1

Q + M2 – Queimado + mistura 2

Q + M3 – Queimado + mistura 3

SAMM – Sistema de análise morfológica

TX – Tromboxanos

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
2	Objetivo.....	30
3	Método.....	31
3.1	Aspectos Éticos.....	31
3.2	Animais.....	31
3.3	Delineamento Experimental.....	32
3.3.1	Fluxograma Experimental.....	33
3.3.2	Técnica Anestésica e Analgésica.....	33
3.3.3	Procedimentos Cirúrgicos.....	34
3.3.3.1	Realização das Queimaduras.....	36
3.3.3.2	Sacrifício dos Animais.....	38
3.4	Planimetria digital	38
3.4.1	Análise Macroscópica (D1 e D 7).....	38
3.4.2	Análise Microscópica.....	39
3.5	Protocolo da Imunohistoquímica.....	40
3.5.1	Imunohistoquímica para Ki-67 e NF- κ B.....	40
3.5.2	Imunohistoquímica para HNE-J e HSP 27.....	40
3.5.3	Aquisição e processamento das imagens	41
3.6	Imunoensaio simultâneo para IL-1B, IL-6, IL-10, IL-18.....	43
	TNF-α, INF-gama e GSF-GM	
3.7	Análise estatística.....	46
4	Resultados.....	47
5	Discussão.....	56
6	Conclusões.....	64
	Referências.....	65
	Apêndice – Curvas de calibração e validação do imunoensaio	
	de Citocinas	
	Anexo - Aprovação do comitê de ética	

1 INTRODUÇÃO

Queimaduras são lesões dos tecidos orgânicos 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).

Estima-se que em torno de 1 milhão de pessoas sejam acometidas por algum tipo de queimadura no Brasil a cada ano, dos quais 200 mil são atendidos em serviços de emergência e 40 mil demandam hospitalização (LOPES; VIDAL; SANCHES, 2005). Os acidentes por queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no país, perdendo apenas para os acidentes automobilísticos (PEREIMA, 2002; VALE, 2005).

As lesões por causas externas constituem, portanto, 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 (VANA; AGGIARO; SCHIOZER, 2007). 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 tem, 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 revestimentos, 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.

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 protéica 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, 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 epitelíócitos 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 (PANNIE; 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 linoléico.

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 mono (ω -9) ou poliinsaturados (ω -6 e ω -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: linoléico (ω -6), α -linolênico (ALA), eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) que são os ω -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 linoléico 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 ω -6, enquanto 1 a 2 % oriundas do ω -3.

Vários estudos experimentais em ratos tem sido realizados utilizando ácidos graxos poliinsaturados (LU *et al.*, 2003; ZHANG; 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, a literatura é escassa de trabalhos que envolvam a administração simultânea de ω -9, ω -6 e ω -3 (mistura dos três ácidos graxos) com concentrações, proporções e fontes do ω -3 (ALA, EPA e DHA) pré- estabelecidas em ratos submetidos à queimadura por condução térmica.

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 protéica é imediata (XU,

2004).

A destruição tecidual está relacionada ao tipo de fonte de calor, temperatura, 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 epitelíócitos e endotélio capilar (DEMLING; DENSANTI, 2005).

Atuam nestes processos, provavelmente, histamina, serotonina, íons H⁺, cininas e bradicininas, dentre outras substâncias. Esta fase de reação termo-bioquímica 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 a 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:

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

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).

Modelos experimentais de queimaduras

O direcionamento das pesquisas em queimaduras tem-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 10 de maio de 2012, utilizando as palavras-chave queimadura, pele e animal, revelaram apenas 505 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, derme, hipoderme) 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.

Os óleos: ômega 3 (docosahexaenóico , eicosapentaenóico e linolênico), ômega 6 (linoleico) e ômega 9 (oleico)

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 ω -6) é sintetizado a partir do ácido parental da classe ω -6, o ácido linoleico (18:2 ω -6). Contudo o AG de uma determinada classe não pode ser biologicamente convertido em outra classe, isto é, nenhum membro da família ω -9 (ácido oleico) pode ser convertido em ω -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 pêlo, 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 polinsaturados evidenciou menor resposta inflamatória e menor produção de radicais livres com fórmula rica em monoinsaturados (CURI *et al.*, 2002).

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

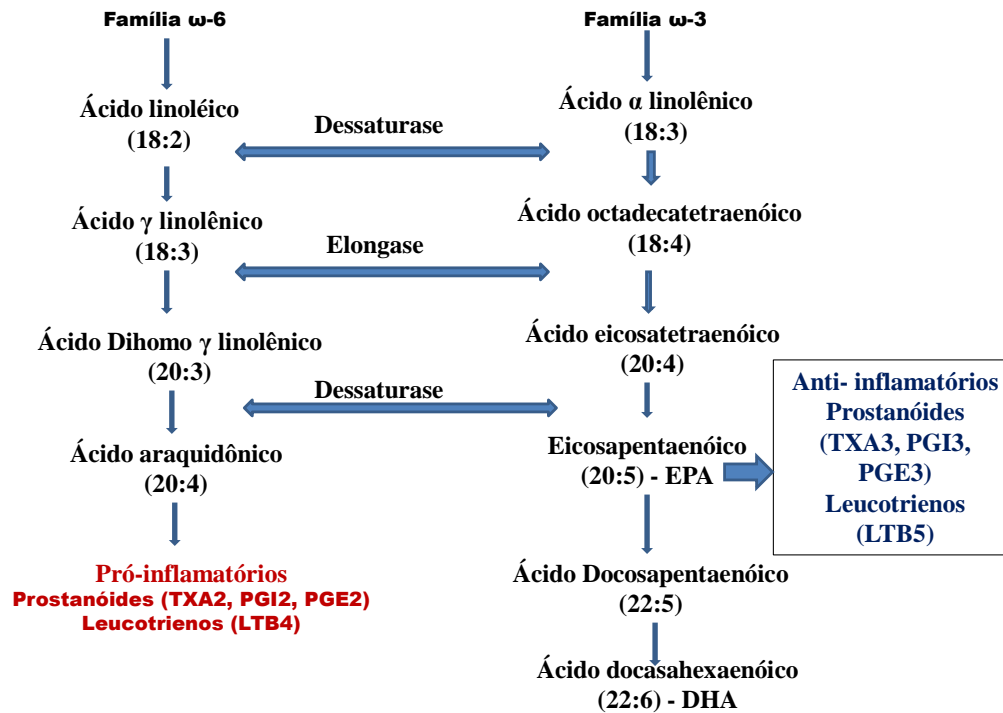


Figura 1 Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados. Adaptado de CALDER (2003).

O alto consumo de ácido linoleico (ω -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 2) (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).

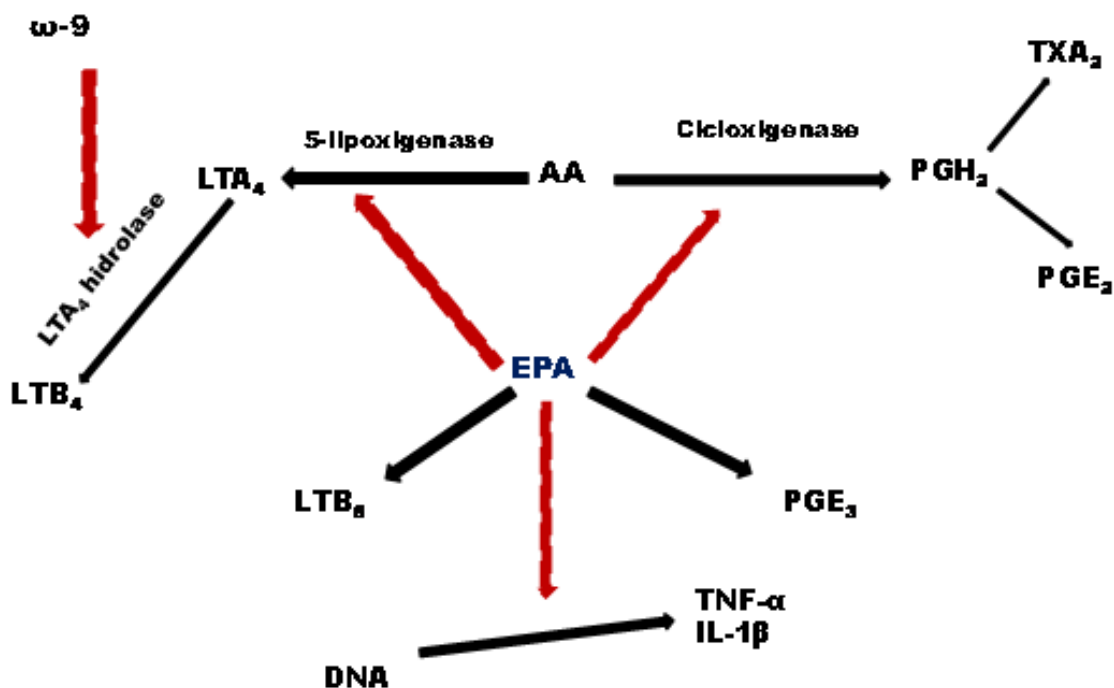


Figura 2. Metabolismo dos eicosanóides durante a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos por meio do ácido araquidônico (AA) e do ácido eicosapentaenoico (EPA). Setas preta = via de síntese; setas vermelhas = via inibitória

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 sanguíneo e a quimiotaxia dos leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e de TNFα, 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 1 e 2) (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, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, antígenos virais ou bacterianos.

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 (ω -6) e 1,6g e 1,1g/dia de ácido linolênico (ω -3) para homens e mulheres, respectivamente. Por falta de dados suficientes, o *Institute of Medicine* não estabeleceu AI ou RDA para AA, EPA ou DHA (WELCH *et al.*, 2010).

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Modelos experimentais de queimaduras em animais tem 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 ω 6: ω 3 baixa que favorece uma ação anti-inflamatória e a razão de ω 9: ω 6 alta com ação antioxidante conforme apresentado em outras situações biológicas (ALLAYEE; ROTH; HODIS, 2009; SIMOPOULOS 2002, 2008),

sendo este o primeiro trabalho em que as misturas de óleos são administradas em ratos queimados.

Considerando que essas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas, o balanço entre ω -3, ω -6 e ω -9 na dieta é de grande importância. O presente estudo foi desenhado para analisar os efeitos das misturas de óleos de ω -9, ω -6 e ω -3, avaliando a queimadura térmica e as fontes de ω -3 (ALA, EPA e DHA) no processo inflamatório e na reepitelização da pele de ratos queimados por condução direta.

2 Objetivo

Estudar os efeitos das misturas de óleos (ω -9, ω -6 e ω -3) sobre a inflamação, estresse oxidativo e a reepitelização da pele de ratos submetidos a queimadura térmica por condução direta.

Avaliar se as fontes de ω -3 (ALA, EPA e DHA) interferem nos efeitos das misturas de óleos.

3 Método

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi de caráter experimental, 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. Foi realizado em animais de laboratório, do Biotério do Departamento de Cirurgia, Secção de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pertencente à Universidade Federal do Ceará.

As condições, deste 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).

O modelo de estudo, assim como a revisão científica, foi avaliado pelo comitê de ética em investigação animal competente, da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado pelo protocolo número 37/10 em 09 de Setembro de 2010 (em anexo).

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 36 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

O peso médio dos animais foi de $267,91 \pm 10,56$ g.

Todos receberam ração padrão e água *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 36 animais divididos em seis grupos (água, queimado água [Q + água], queimado + isolipídico [Q + Iso], queimado + mistura de óleos 1 [Q + M 1], queimado + mistura de óleos 2 [Q + M 2] e queimado + mistura de óleos 3 [Q + M 3]) com seis animais em cada grupo, ver distribuição dos grupos na quadro 2 e proporções de ω -9, ω -6 e ω -3 na quadro 3.

Quadro 2. Divisão dos grupos e composição das misturas com suas respectivas fontes de ω -3.

Grupos	Composição	Fonte de ω-3
Água	Água	-
Q + Água	Água	-
Q + Iso	Isolipídica	
Q + M 1	ω -9 + ω -6 + ω -3	ALA
Q + M 2	ω -9 + ω -6 + ω -3	ALA + EPA + DHA
Q + M 3	ω -9 + ω -6 + ω -3	ALA + DHA

Abreviaturas: Q + Água = grupo queimado administrado água; Q + Iso = grupo queimado administrado isolipídico; Q + M 1 = grupo queimado administrado mistura 1; Q + M 2 = grupo queimado administrado mistura 2; Q + M 3= grupo queimado administrado mistura 3; ALA = ácido α -linolênico; EPA = ácido eicosapentaenóico; DHA = ácido docosahexaenóico.

Quadro 3. Composição dos óleos e proporções de ω -9, ω -6 e ω -3 em cada mistura.

Misturas	Óleos Utilizados	Proporções	
		ω -6: ω -3	ω -9: ω -6
Isolipidico	Milho e soja	8:1	0,4:1
M 1	Oliva, canola e linhaça	1,4:1	3,4:1
M 2	Oliva, canola e peixe	1,4:1	3,4:1
M 3	Oliva, canola, linhaça e DHA (algas marinhas)	1,4:1	3,4:1

A dose que foi ministrada de cada solução correspondem a 1,2g de mistura/Kg-dia da mistura, obedecendo à proporção de 3,4:1 (ω -9: ω -6) e 1,4:1 (ω -6: ω -3).

3.3.1 Fluxograma experimental

Inicialmente os animais foram pesados, anestesiados, epilados, delimitada área no dorso do animal com molde vazado confeccionado, utilizando caneta dermatográfica para demarcação da área, realizada antissepsia da pele com clorexidine 2%, em seguida submetidos a indução do procedimento cirúrgico (indução à queimadura), uma hora após o procedimento, iniciada a administração orogástrica.

Foram administrados, durante sete dias (D1, D2, D3, D4, D5, D6 e D7) consecutivos, sempre no mesmo horário no período da manhã, por via orogástrica, soluções descritas no quadro 1 conforme seus respectivos grupos.

No sétimo dia (D7), 1 h após administração da última dose (água ou mistura) conforme protocolo, os animais foram anestesiados, realizada coleta de sangue do plexo orbitário em tubo com EDTA, em seguida foram colhidas amostras de pele para análise histopatológica e imunohistoquímica.

3.3.2 Técnica Anestésica e Analgesia

Os animais foram anestesiados por associação de cloridrato de cetamina, a 5%, na dose de 90mg/kg, e cloridrato de xilasina a 2% (figura 3), na dose de 10mg/kg, administrados simultaneamente, por via intramuscular, na parte posterior do membro pélvico direito (figura 4). Os animais foram considerados anestesiados quando ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais, e retirada da pata ao estímulo doloroso por preensão.

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.

Analgesia foi administrada por via oral (água *ad libitum*) durante as primeiras 24h de pós-operatório. Utilizou-se 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.

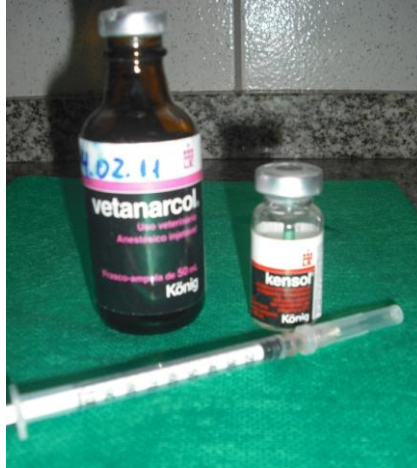


Figura 3. Soluções anestésicas utilizadas.



Figura 4. Ato anestésico no membro pélvico direito/face mediana.

3.3.3 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 epilado, incluindo flancos até a raiz da cauda, utilizando

barbeador elétrico (figura 5). 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 quatro 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 dermatográfica (Sanford, Fine Point, Permanent Marker) e de molde confeccionado com filme radiográfico (figura 6).

Em seguida realizou-se a antissepsia da pele (figura 7) com clorexidina a 2% (Riohed, Ind. Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) e secagem por compressa de gaze.



Figura 5. Preparo do local a ser realizada a queimadura (dorso sendo epilado)



Figura 6. Demarcação de área. Molde vazado confeccionado e caneta dermatográfica.



Figura 7. Antissepsia da pele com clorexidine 2%.

3.3.3.1 Realização das queimaduras

Para realização das queimaduras foi utilizado um ferro de soldar (Hikari 40 W) especialmente preparado (figura 8). 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 (solamente 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 (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 9), sendo os cabos sustentados pelo pesquisador. Imediatamente após cada queimadura a área foi resfriada por um minuto utilizando gaze umedecida em soro fisiológico 0,9% (SF) estéril à temperatura ambiente (figura 10).

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.* (2011).



Figura 8. Equipamento completo utilizado para realização da queimadura. Observar termômetro digital, termopar tipo K na ponta, estabilizador de corrente elétrica com termostato interno.



Figura 9. Realização da queimadura por 9 segundos.



Figura 10. Resfriamento da pele com Soro fisiológico 0,9%

3.3.4 Sacrifício dos animais

No sétimo dia os animais foram anestesiados novamente com ketamina mais xilasina e realizada planimetria digital (ver descrição do método abaixo) para quantificar o dano físico. Em seguida foram colhidas amostras de sangue conforme descrição anterior. Os animais foram sacrificados com infusão de doses letais dos anestésicos, sendo retirados dois fragmentos de pele (2 x 2 cm) incluindo a porção central de tecido contendo a ferida ou cicatriz circundada por tecido normal.

3.4 Planimetria digital

Imediatamente após as queimaduras no D1 e D7 os animais foram posicionados em decúbito ventral na mesa cirúrgica protegida por campo verde, a seguir foram fotografados para análise macroscópica. As fotografias (imagens) foram obtidas com câmera digital (Sony, Cyber-Shot, 14.1 Mega pixels, Brasil), montada no tripé com distância padronizada de 35 cm do dorso do animal.

3.4.1 Análise Macroscópica (D1 e D7)

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 já utilizado em outros trabalhos (CAMPELO et. al, 2011), ver figura 11.

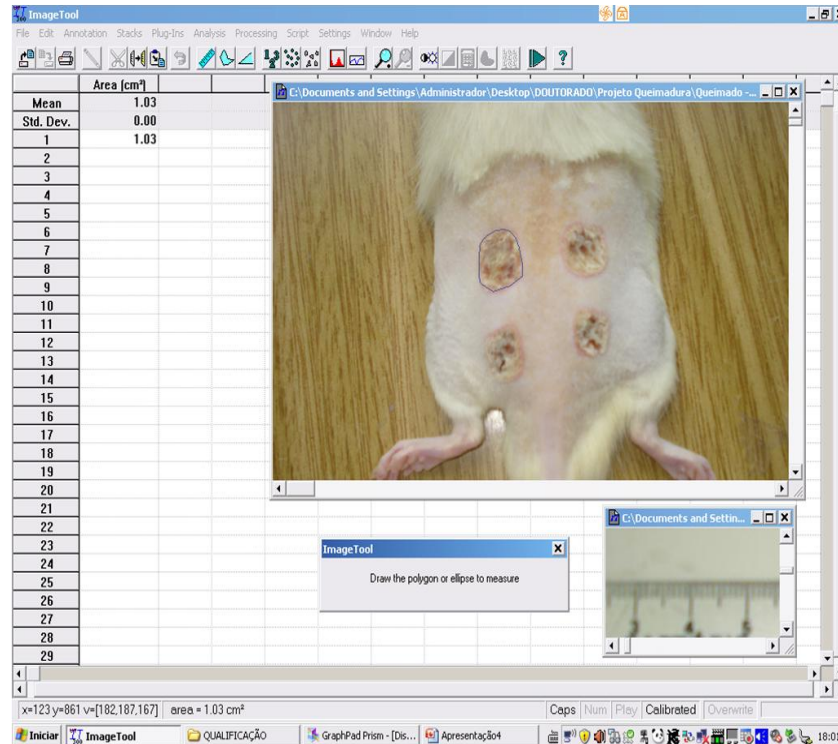


Figura 11. Delimitação e cálculo da área de lesão

3.4.2 Análise Microscópica

Na ocasião do sacrifício dos animais no D7, 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 10% 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 hematoxilina-eosina (HE) conforme técnica habitual para avaliar a lesão por planimetria digital medindo a extensão entre as duas bordas de reepitelização, resultando na extensão da queimadura.

3.5. Protocolo da Imunohistoquímica

3.5.1 Imunohistoquímica para Ki-67 e NF-κB p50 (NLS)

Imunohistoquímica para Ki-67 e NFκB p50 (NLS) foram realizadas utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os tecidos removidos e fixados em formol 10% por 24 h para inclusão em parafina e posteriormente confecção de lâminas apropriadas 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 (cinco de cada grupo) foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NFκB diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA) e outro conjunto de cortes (cinco de cada grupo) foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-Ki-67 diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotinilado anti-IgG de coelho, diluído 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, 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 e anti-Ki-67) foi substituído por PBS-BSA 5%.

3.5.2 Imunohistoquímica para HNE-J e HSP 27

Imunohistoquímica para HNE-J e HSP 27 foram realizadas utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981) com pequenas modificações. Os tecidos removidos e fixados em formol 10% por 24 h para inclusão em parafina e posteriormente confecção de lâminas apropriadas 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 18 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% (20 minutos). Depois lavados com PBS (10 minutos). Em seguida Incubado com o leite desnatado 10% (Leite desnatado 10g diluído em 100 ml de água destilada. 30 minutos a 37° C) para bloqueio de ligações inespecíficas , depois de lavado em PBS. Os cortes (cinco de cada grupo) foram incubados “overnight” (4° C) com anticorpo primário de camundongo anti-HSP 27 diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA) e outro conjunto de cortes (cinco de cada grupo) foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de cabra anti-HNE-J diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de camundongo ou cabra de acordo com o anti-corpo primário, diluído 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, 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), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. 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 foi substituído por PBS-BSA 5%.

3.5.3 Aquisição e processamento das imagens

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 varredura da peça, utilizando o

pequeno 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 magnificação de 100 vezes, foram capturadas imagens digitais coloridas das bordas. 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 especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas de interesse (bordas de 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), tanto 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 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 12

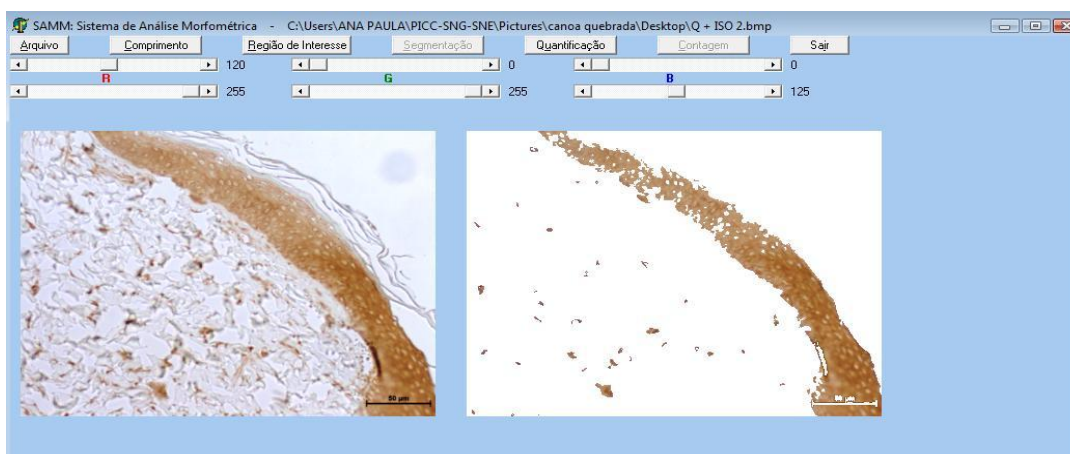


Figura 12 Imagem representativa da tela do sistema de análise morfológica (SAMM). A Esquerda imagem obtida por microscopia de luz com aumento de 100x marcada para anticorpo Ki-67. A direita mostrando a segmentação da imagem da esquerda que foi quantificada.

3.6 Imunoensaio simultâneo para IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , INF-Gama e GSF-GM

No D7 os animais foram anestesiados e coletadas amostras de sangue do plexo orbitário com capilar de vidro anti-coagulado com EDTA sendo adquirido um total de 1,5 ml de sangue coletados no tubo de eppendorf com EDTA (3 gotas). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 xg. O plasma foi removido e imediatamente estocado à -20°C.

3.6.1 Preparo dos reagentes para imunoensaio (MILLIPLEX MAP Kit)

3.6.1.2 Os anti-corpos imobilizado em *Beads*

Sonicar o frasco com os anti-corpos (anti-IL1, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-18, anti-TNF alpha, anti-INF-gama e anti-CSF-GM) imobilizado no *Beads* por 30 segundos e agitar vigorosamente por 1 minuto antes do uso. Adicionar 60 μ L da solução contendo de *Beads* em 2.58 mL de diluente para *Beads*.

3.6.1.2 O Controle de qualidade

Reconstituir Controle de qualidade 1 e 2 em 250 μ L de água deionizada.

3.6.1.3 Líquido de lavagem (*Wash Buffer*)

Diluir 30 mL de *Wash Buffer* (solução estoque 10x) em 270 mL de água deionizada.

3.6.1.4 Citocinas/quimiocinas para rato (disponível no kit)

Reconstituir o frasco Standard com 250 μ L água deionizada para uma concentração final de 20.000 pg/mL. Preparar 6 tubos de microcentrifugas com 120 μ L de *Assay Buffer* e adicionar solução Standard reconstituída conforme quadro 4 abaixo:

Quadro 4 Diluição da curva padrão

Solução Standard (Adicionar)	Vol. de Assay Buffer (Adiciononar)	Concentração Standard (pg/mL)
40 µL do original	120 µL	1:4
40 µL de 1:4	120 µL	1:16
40 µL de 1:16	120 µL	1:64
40 µL de 1:64	120 µL	1:256
40 µL de 1:256	120 µL	1:1.024
40 µL de 1:4.096	120 µL	1:4.096

3.6.2 Procedimento para imunoensaio

Descongeladas as amostras uma única vez, foi centrifugada a 3000xg por 5 minutos antes de iniciar as reações. As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 de soro diluente (disponível no kit).

Montada a placa de filtro com 200 µL de *Assay Buffer* em cada poço da placa. Selada e misturada no agitador para placa por 10 minutos na temperatura ambiente. Removido o *Assay Buffer* em câmara com vácuo, adicionado 25 µL de cada amostra padrão (Standard disponível no kit) ou controle de reação (disponível no kit) em cada poço apropriado (ver figura 13) Poço sem standard ou controle contendo *Assay Buffer* foi considerado como 0 pg/mL standard (Background).

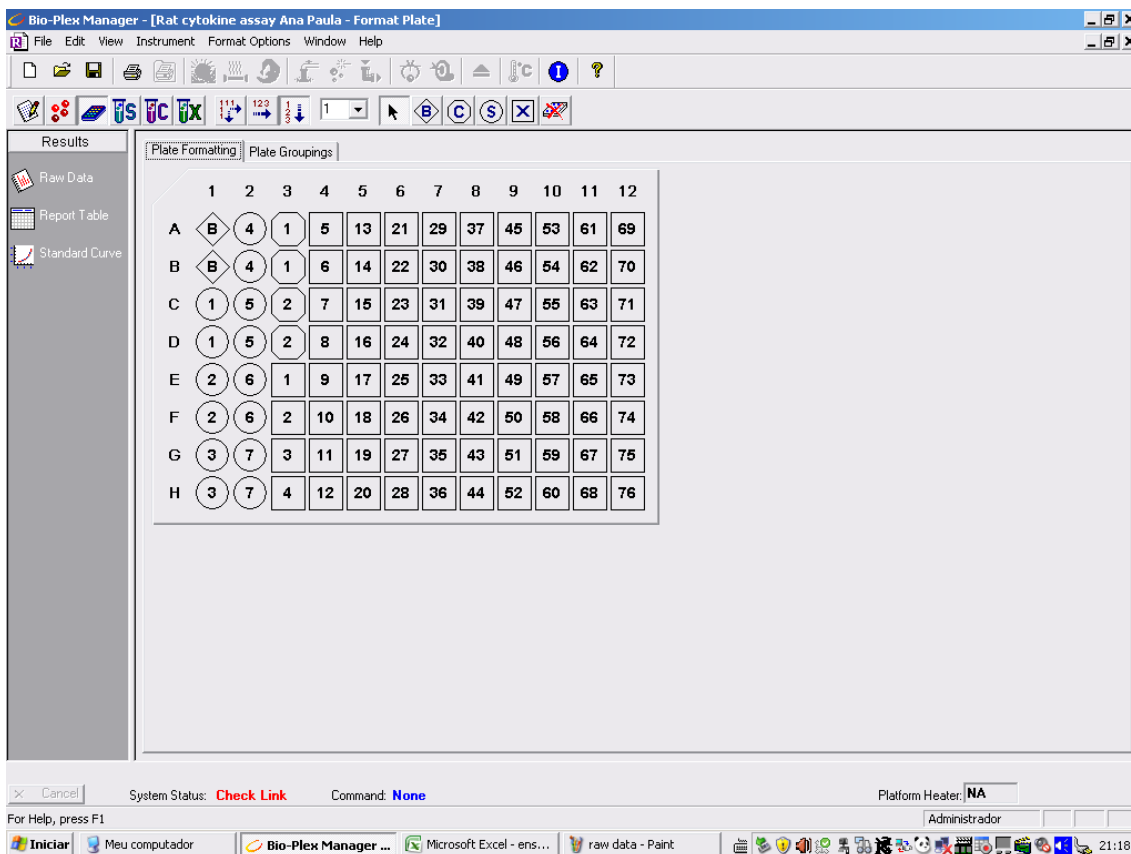


Figura 13 Imagem da tela do *Bio-plex manager* representativa da placa a ser analisadas. As figuras geométricas representam: Losângulo atribuído ao líquido de diluição; bolas representa posição da solução padrão (curva de calibração), octógono representa posição do controle da reação e quadrado representa as amostras a serem analisadas.

Foram adicionados 25 μL de *Assay Buffer* em todos os poços das amostras, colocado 25 μL da amostra diluída em cada poço correspondente. Acrescentado 25 μL de solução com Beads em cada poço. Foi vedada a placa e colocada em agitador para placas, deixando-a em incubação *overnight* por 18 horas. Removido o conteúdo líquido com vacuum e lavado a placa 2 vezes com 200 μL /poços de solução de lavagem apropriada, removido a solução de lavagem à vacuum. Foram adicionados 25 μL /poço de detector de anticorpo. Foram vedados e incubados em agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Acrescentado 25 μL /poço de Streptavidin-Phycoerythrin e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram removidos todo excesso a vacuum, lavada a placa 2 vezes com 200 μL /poço com líquido de lavagem, filtrado a vacuum em cada lavagem. Foram adicionados 150 μL /poço de solução contendo no kit denominado Sheath Fluid, reconstituindo os beads na placa

e agitando por 5 minutos.

A Leitura da placa foi realizada na plataforma Luminex 100TM v2.3 (Bio-Plex), sendo analisada a mediana da intensidade de fluorescência de cada analito usando o método de curva de calibração (parâmetro logaritmico).

3.7 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 a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Dados que obedeceram a curva de normalidade (macroscopia no D7; microscopia D7; imunohistoquímica) 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) em gráficos de barra. Os dados que não obedeceram a curva de normalidade (macroscopia D1, imunoenensaio de citocinas) foram analisados por meio de teste não paramétricos (Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn) e os resultados apresentados em mediana e intervalos interquartis. Sempre realizando comparações entre todos os grupos.

O nível de significância foi estabelecida em 5% para todos os casos.

4 Resultados

A seguir são apresentados os dados resultantes da análise macroscópica, microscópica, imunohistoquímica e painel de citocinas/quimiocinas (analistas – Miliplex).

4.1 Análise macroscópica

Não houve diferença estatisticamente significativa da mediana entre os grupos logo após a queimadura ($p > 0.05$), ver gráfico 01, tabela 01 e figura 14.

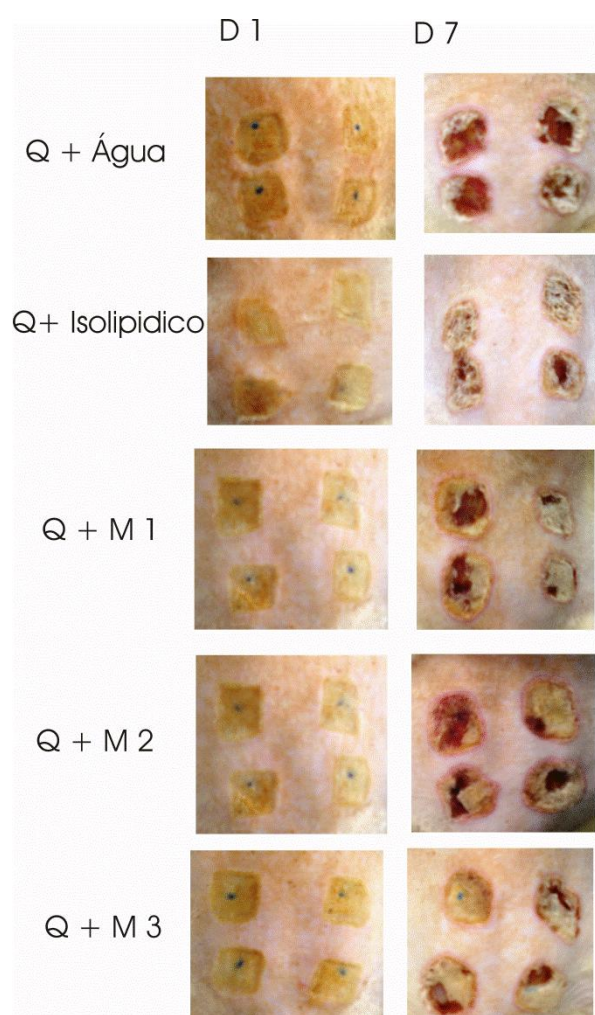


Figura 14. Imagem representativa de um animal no primeiro dia (D1) sétimo dia (D7). Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

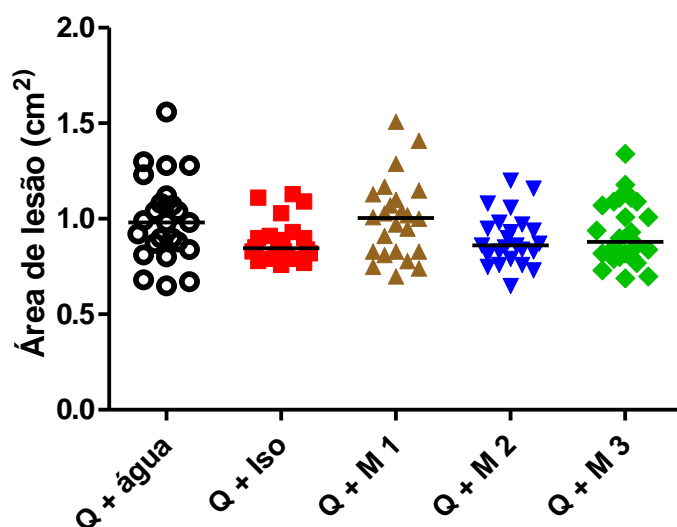


Gráfico 01. Área queimada em cm^2 distribuída por grupo no dia zero. Resultado apresentado como mediana. $p > 0.05$ (comparação entre todos os grupos) por meio de teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

Tabela 1. Valores mínimo, máximo, percentil 25% e percentil 75% da área queimada em (cm^2) de cada grupo. $p > 0.05$ (teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn).

	Água	Isolipídico	Mix 1	Mix 2	Mix 3
Mínimo	0.65	0.76	0.7	0.65	0.69
Percentil 25 %	0.8475	0.81	0.83	0.795	0.8
Mediana	0.98	0.845	1.005	0.86	0.88
Percentil 75%	1.11	0.9075	1.123	0.965	1.085
Máximo	1.56	1.13	1.51	1.2	1.34

No sétimo dia há maior lesão no grupo água em relação aos grupos isolipidico, Mistura 1 e Mistura 3 com diferença estatística significativa ($p < 0.05$). A mistura 3 apresenta menor área de lesão em relação aos grupos água, isolipidico, mistura 1 e mistura 2 com diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$), ver gráfico 02 e figura 14.

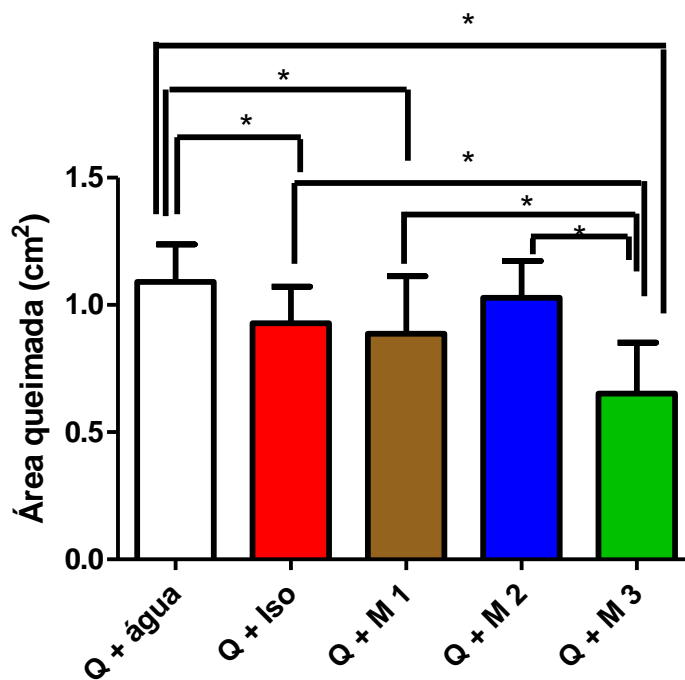


Gráfico 02. Área queimada em cm² distribuída por grupo no sétimo dia. Resultado apresentado como média e desvio padrão. * $p < 0.05$. Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.2 Análise microscópica

No sétimo dia houve maior extensão da lesão no grupo água em relação ao grupo Mistura 3 com diferença estatística significativa ($p < 0.05$), ver gráfico 03.

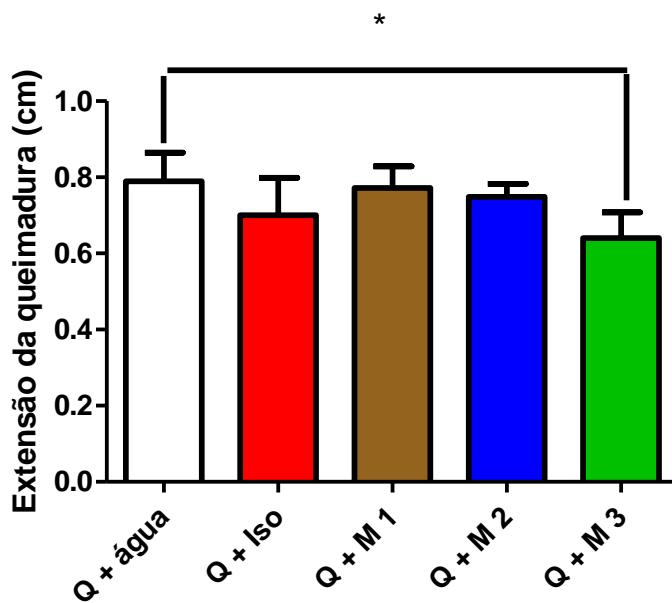


Gráfico 03. Extensão da queimadura em cm distribuída por grupo no sétimo dia, visualizado com microscópio óptico (magnificado 10x). Resultado apresentado como média e desvio padrão. * $p < 0.05$ (água vs. Mix 3). Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M 3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.3 Análise quantitativa de marcação por imunohistoquímica

4.3.1 Quantificação da proliferação celular (anti-corpo Ki-67)

Houve maior marcação pelo anti-corpo Ki-67 no grupo mistura 3, com diferença estatística significativa ($p < 0.05$) quando comparado com o grupo água. Não houve diferenças estatísticas significantes quando comparados com os demais grupos, ver gráfico 04 e figura 15.

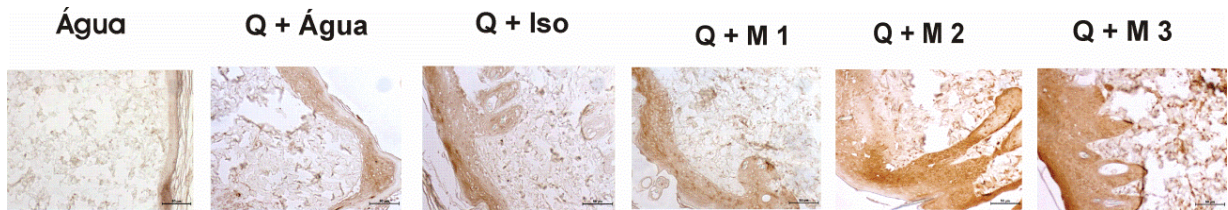


Figura 15. Imagem representativa da marcação por anti-Ki-67 de pele de um animal de cada grupo. Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

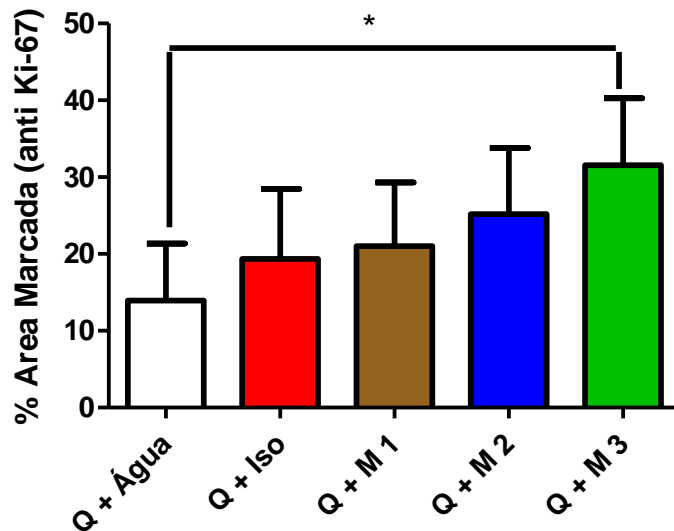


Gráfico 04. Percentagem de área marcada pelo anti-corpo Ki-67. Resultados apresentado como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ (Q + Água vs. Q + M 3); Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.3.2 Quantificação da marcação com anti-corpo NF- κ B

Houve menor marcação pelo anti-corpo NF- κ B no grupo Mistura 3, com diferença estatística significativa quando comparado com o grupo Água (* $p < 0.05$) e

grupo Mix2 ($*p<0.05$). Não houve diferenças estatísticas significantes quando realizada comparação entre os demais grupos, ver gráfico 05 e figura 16.

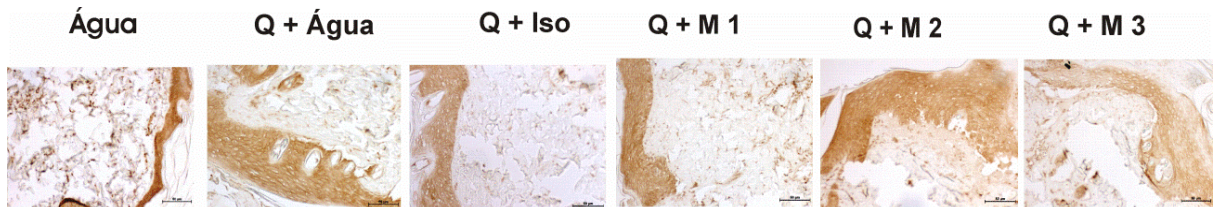


Figura 16. Imagem representativa da marcação por anti-NF-κB de pele de um animal de cada grupo. Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

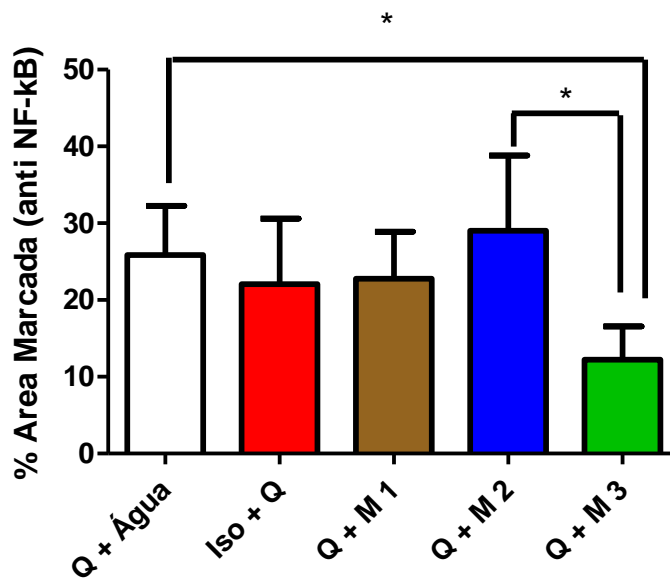


Gráfico 05. Percentagem de área marcada pelo anti-corpo NF-κB. Resultados apresentado como média \pm desvio padrão. $*p<0.05$. Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.3.3 Quantificação da peroxidação lipídica (anti-HNE)

Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0.05$). Ver figura 06.

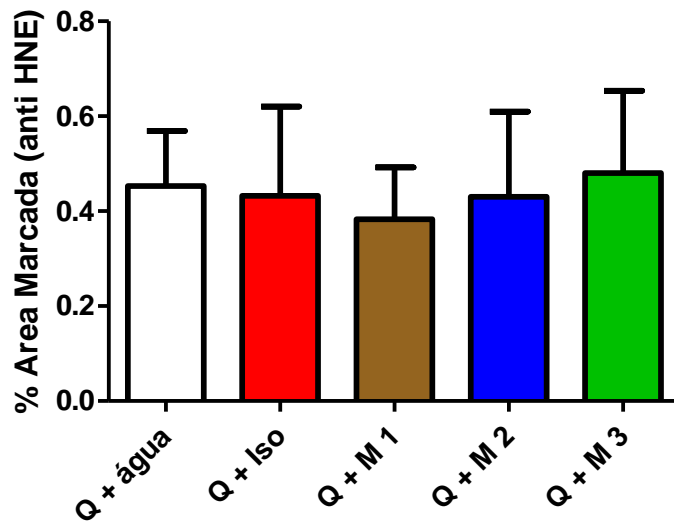


Gráfico 06. Percentagem de área marcada pelo anti-corpo HNE. Resultados apresentado como média \pm desvio padrão. $p>0.05$ (comparação inter-grupos). Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.3.4 Quantificação da marcação com anti-corpo HSP 27

Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0.05$). Ver gráfico 07.

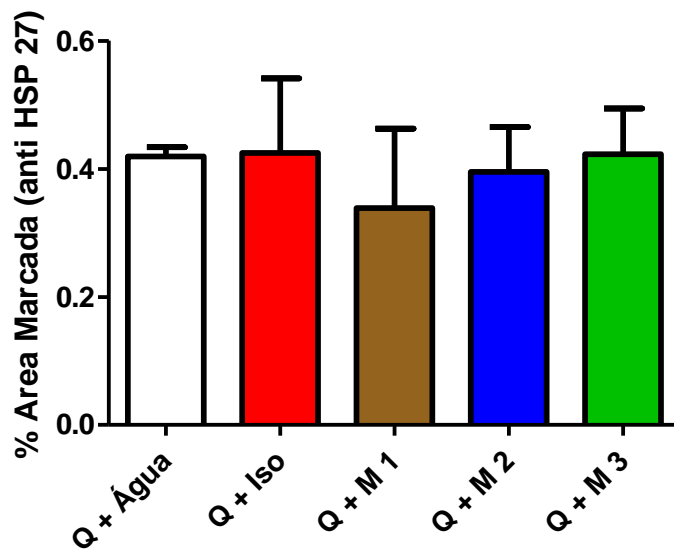


Gráfico 07. Percentagem de área marcada pelo anti-corpo HSP 27. Resultados apresentado como média \pm desvio padrão. $p > 0.05$ (comparação inter-grupos). Abreviaturas: Q + água = grupo queimado e administrado água; Q + Isolipídico = grupo queimado e administrado solução isolipídica; Q + M 1 = grupo queimado e administrado mistura 1 de óleos; Q + M 2 = grupo queimado e administrado mistura 2 de óleos; Q + M3 = grupo queimado e administrado mistura 3 de óleos.

4.4 Painel de citocinas/quimiocinas (analitos: IL 1 β , IL 6, IL 10, IL 18, GM-CSF , IFN-Gama e TNF- α).

Os analitos IL 1 β , IL 6, IL-18, GM-CSF e IFN-Gama quanto comparado os grupos entre si, não houve diferença significativa estatisticamente ($p > 0.05$) (ver tabela 2). Os valores dos analitos IL 10 e TNF- α apresentaram-se abaixo da curva padrão não sendo possível o cálculo da quantidade do mesmo.

Tabela 2. Concentração de cada analito expressa em pg/mL. Resultados apresentado em mediana e intervalo interquartil percentil 25 e 75.

Analito	Grupos					
	Água	Q + água	Q + Iso	Q + M 1	Q + M 2	Q + M 3
IL-1 β	11.95 (10.35-13.88)	9.080 (7.14-11.05)	8.945 (7.443-10.46)	12.68 (10.51-14.34)	11.23 (9.693-12.73)	11.77 (10.42-17.44)
IL-6	4400 (852.9-10216)	2508 (1253-5143)	1362 (428.2-13440)	2564 (833.1-3508)	1206 (198.2-43256)	5031 (2214-12570)
IL-10	<OR	<OR	<OR	<OR	<OR	<OR
IL-18	118.9 (66.48-385.1)	90.10 (34.66-121.6)	74.02 (44.77-227.0)	60.47 (53.11-432.0)	44.53 (28.25-208.9)	123.8 (65.91-154.6)
GM-CSF	8.945 (7.168-21.08)	5.72 (5.07-7.01)	1.810 (1.140-10.23)	7.01 (3.113-10.07)	7.015 (5.230-11.35)	9.590 (7.005-14.07)
INF- γ	251.30 (7.118-1036)	160.4 (52.32-317.40)	137.9 (35.72-509.0)	68.51 (21.07-145.5)	31.56 (4.89-3192)	373.0 (68.51-665.5)
TNF- α	<OR	<OR	<OR	<OR	<OR	<OR

Nota: Não houve diferenças estatísticas significantes ($p > 0.05$), por meio do teste estatístico Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn (comparação intergrupos); <OR = valor encontrado na amostra está abaixo do detectável pelo método.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenhado para analisar os efeitos das misturas de óleos de ω -9, ω -6 e ω -3, avaliando a queimadura térmica e as fontes de ω -3 (ALA, EPA e DHA) no processo inflamatório e na reepitelização da pele de ratos queimados por condução direta.

Modelos experimentais de queimaduras em animais tem 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 estudar a influência da administração de fármacos em resposta ao trauma (AULICK *et al.*, 1981).

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 contínua (200 °C) 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, foi utilizado no presente estudo devido sua reprodutibilidade e uniformidade das queimaduras (CAMPELO *et al.*, 2011).

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 mais utilizados como modelo de avaliação de vários tratamentos de queimaduras (LIVESEY *et al.*, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 1999; SRIVASTAVA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2003; DAVIDSON, 1998). De modo geral, pode-se considerar o rato um bom modelo para o presente experimento, uma vez que não foram constatadas mortes durante o experimento, nem 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) obtendo bem estar dos animais que foram evidenciados 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 sitio para as lesões 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).

O presente estudo representa a primeira demonstração de que misturas de óleos contendo baixa relação de ω -6 para ω -3 e alta relação de ω -9 para ω -6, avaliadas em modelo de queimadura por condução direta em ratos, em concentrações com ação nutracêutica, resultaram em maior reepitelização e diminuição da marcação do NF κ -B em uma das fontes de ω -3.

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 nutrientes com um foco específico pode melhorar os resultados finais por modular a resposta imune e/ou metabólica (ALEXANDER, 1988; STABLES; GILROY, 2011; LI, *et. al.*; 2012) . 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 ω -3 (EPA e DHA), glutamina, arginina e nucleotídeos (MARTINDALE; ZHOU, 2006).

As sociedades ocidentais têm uma dieta com uma razão ω -6: ω -3 entre 15:1 e 16,7:1 (SIMOPOULOS, 2002). Já 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 (GARÓFALLO *et al*, 2006). Entretanto a razão ω -6: ω -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 ω -3, principalmente na forma EPA e DHA (ALEXANDER *et al.*, 1998). Trabalhos mostram que uma razão ω -6 : ω -3 elevada, tal como as mencionadas no parágrafo acima, promovem várias doenças influenciando na produção de fatores inflamatórios (ALLAYEE; HOTH; HODIS, 2009). Por outro lado, o consumo de

quantidades aumentadas de ω -3 (ou seja, com uma razão ω -6: ω -3 diminuída), tem efeitos opostos.

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

No experimento em questão foram utilizadas misturas de óleos em concentrações nutracêuticas com razão de ω 6: ω 3 baixa que favorecesse uma ação anti-inflamatória e a razão de ω 9: ω 6 alta com ação antioxidante conforme apresentado em outras situações biológicas (ALLAYEE *et al.*, 2009; SIMOPOULOS, 2002, 2008), sendo este o primeiro trabalho em que essas razões de óleos são administrados em ratos queimados.

Sabe-se que o ácido graxo ômega 3 está presente em diferentes fontes, sendo assim, neste trabalho foram utilizadas três misturas de óleos com fontes de ômega 3 diferentes, com potencial nutracêutico, denominadas Misturas 1 (ALA), Mistura 2 (ALA+EPA+DHA de peixe), Mistura 3 (ALA+DHA de algas marinhas) e uma mistura de óleos isocalórica, mas sem potencial nutracêutico, denominada Isolipídica. Também foi constituído um grupo controle, que recebeu apenas água. Tanto a água quanto as misturas de óleos foram administradas por via orogástrica, por sete dias após indução das queimaduras.

No sétimo dia de administração das misturas de óleos os ratos queimados que receberam ômega-3 de algas marinhas – M 3 - (DHA) macroscopicamente apresentaram menor área de lesão em relação aos que receberam água e as demais misturas com fontes de ômega-3 diferentes (mistura 1 – ALA, mistura 2 – ALA + EPA + DHA proveniente de óleo de peixe) como também em relação a composição isolipídica. Além disso, macroscopicamente o grupo que recebeu composição isolipídica e o grupo com mistura de óleos contendo ALA (M 1) também apresentaram menor área de lesão quando comparadas com à água.

Por outro lado, ao avaliar a extensão da lesão microscopicamente, somente os animais que receberam a mistura de óleos M 3 (algas marinhas) apresentaram menor extensão da lesão em relação à água.

Essa divergência entre a macroscopia e a microscopia ocorre pelo fato que durante a aquisição das imagens, para cálculo da área de lesão, não foram removidas as crostas podendo conter tecido reepitelizado em baixo das crostas que não foram levados em consideração no cálculo da área macroscópica, podendo

distorcer os resultados. Entretanto, isto não ocorre na avaliação microscópica, pois nesta é avaliada a extensão real da queimadura considerando de borda a borda de reepitelização sem interferência da crosta, ficando claro que apenas a mistura de óleos com algas marinhas teve benefícios.

O fato de não terem sido removidas as crostas foi proposital, pois as crostas, quando em feridas não exsutativas, funcionam como curativo biológico fornecendo uma barreira provisória contra corpos estranhos e mantendo as margens das feridas próximas, facilitando a contração do leito, minimizando a perda de fluídos e proteínas, além de proteger o tecido de granulação (LIONELLI; LAWRENCE, 2003).

Ao estudar a proliferação celular, que proporciona demonstrar qual das misturas de óleos e fonte de ω -3 influenciaram na reepitelização aumentando a divisão celular, foi verificada de forma quantitativa a marcação (com anticorpo monoclonal) da proteína nuclear Ki-67.

Esta proteína está estruturalmente associada à cromatina para desenvolver função na proliferação celular e está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e ausente nas células quiescentes ou na fase G0. O anticorpo monoclonal contra a proteína Ki-67 foi obtido por Gerdes, Schwab e Lemke, (1983) no qual observaram que tal anticorpo só reagia com um antígeno nuclear de células em proliferação, sendo um marcador bem conhecido (URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005) e utilizado previamente em modelo experimental de queimadura mostrando a correlação entre proliferação celular e cicatrização em ratos queimados (KIMURA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, apenas o grupo tratado com mistura de óleos cuja fonte de ômega-3 é de algas marinhas apresentou aumento da proliferação celular (marcação pelo anticorpo Ki-67) em relação aos demais grupos, o que é coerente com os resultados encontrados na microscopia e confirma a menor lesão apresentada na macroscopia no referido grupo.

Na ocasião da avaliação imunohistoquímica, no presente estudo, optou-se por realizar de forma quantitativa utilizando um software desenvolvido especificamente para estudo morfométrico já utilizado em outros trabalhos semelhantes (MESQUITA *et al.*, 2010; CAMPELO *et al.*, 2011), sendo o método totalmente automatizado sem interferência do observador após aquisição das imagens como recomendado por FECHINE-JAMACARU (2006).

O uso das misturas com razão entre ω 6: ω 3 baixa apresenta efeitos anti-

inflamatórios em vários eventos biológicos (SIMOPOULOS, 2002, 2008; ALLAYEE; ROTH; HODIS, 2009), fato este observado no grupo cuja a fonte de ω 3 foi de algas marinhas que apresentou menor marcação imunohistoquímica para NF κ B em relação aos demais grupos.

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-KAISE; 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 (IKKB), fica limitada a quantidade de NF κ B livre que é translocada ao núcleo para iniciar a cascata inflamatória. Os ácidos graxos ω -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; CORNELL *et al.*, 2005). O EPA e do DHA tem como benefícios a resolução de inflamações e a produção de potentes moléculas anti-inflamatórias e resolvinas (SERHAN, 2005). Entretanto, no presente trabalho apenas o DHA oriundo de algas marinhas foi capaz de inibir o NF κ B.

As famílias de ω -3 e ω -6 utilizam o mesmo sistema enzimático, ocorrendo uma competição por cada enzima (DYEBERG, 1986). Esta competição altera todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como PG, TX e LT (FISCHER, 1989). Como já foi abordado na introdução deste trabalho, os eicosanóides oriundos do metabolismo de AGPIs ω -6 são mediadores inflamatórios, enquanto os oriundos do metabolismo de ω -3 são anti-inflamatórios. Alguns efeitos dos AGPIs sobre os sistemas imune e inflamatório são independentes da geração de eicosanóides e podem ser devidos, em parte, a alterações no metabolismo de glicose e glutamina (CURI *et al.*, 1999). Estudos enfatizam que os AGPIs da série ω -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 (CALDER, 1998; DE PABLO *et al.*, 2000).

Ao realizar a avaliação quantitativa da concentração plasmática, no sétimo dia pós-queimadura, de citocinas/quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , INF-gama e CSF-GM) não houve diferença entre os grupos deste estudo, deixando claro que no sétimo dia não houve alterações nos níveis destas citocinas/quimiocinas.

Orman, et al., (2011), utilizando o mesmo painel de citocinas em modelo de queimadura por escaldadura, mostraram que as citocinas/quimiocinas retornam aos níveis normais em 24h após queimadura com exceção da IL-18 que aumenta com seu pico máximo com 2h retornando a nível basal com 16h e em seguida aumentando novamente até as 24h do experimento, porém não há relatos da evolução desta interleucina após 24h se continuou aumentando ou se diminuiu. No presente estudo a IL-18 também não apresentou diferença entre os grupos em estudo.

Uma limitação deste trabalho foi o fato de ter sido coletado plasma apenas no sétimo dia e não nas primeiras horas ou primeiros dias. Foram coletados apenas no sétimo dia devido até a data da execução do experimento não haver na literatura trabalhos com painel de citocinas em ratos queimados mostrando a evolução com o tempo. No futuro, novos experimentos poderão ser realizados com as misturas de óleos em estudo coletando amostras plasmáticas nas horas iniciais pós-queimadura (2h a 24) para verificar se essas misturas podem ou não alterar a resposta inflamatória sistêmica em ratos submetido a queimadura cutânea por condução direta, visto que, a mistura com algas marinhas é capaz de inibir o NFkB no sétimo dia que está correlacionada com a síntese de citocinas/quimiocinas.

O ácido linolênico, o ácido graxo poliinsaturado mais encontrado na dieta ocidental, é metabolizado em ácido araquidônico por reações de dessaturação e alongação, e na via cicloxigenase, em prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e na via lipoxigenase, em leucotrienos da série 4 (CAPONE *et al.*, 1997; NAKAMURA, 2005). O ácido araquidônico (ω -6) e o EPA (ω -3) são ambos substratos da cicloxigenase e da lipoxigenase. Um aumento na disponibilidade do EPA age basicamente como inibidor competitivo, impedindo que o ácido araquidônico entre na cascata e gere produtos finais pró-inflamatórios (PGE2, TXA2, LTB4). O resultado final do metabolismo excessivo de ácidos graxos ω -6 é a produção de mediadores pró-inflamatórios, ocasionando imunossupressão, vasoconstricção, edema aumentado, aceleração da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, aumento da transdução dos sinais nucleares de citocinas pró-inflamatórias e da toxicidade tecidual local levando potencialmente a condições inflamatórias como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica e a síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos. Alterando-se a proporção de lipídios ω -6 para os ω -3 na dieta pode-se aperfeiçoar a provisão desses produtos pró-inflamatórios para a resposta

imune e de consolidação necessária e atenuar-se ao mesmo tempo o estado inflamatório excessivo. Isso foi comprovado em estudos experimentais com animais e em ensaios clínicos. Além de influenciar o estado inflamatório pela regulação de genes e a disponibilidade de substratos ao nível da ciclooxigenase, o produto final da cascata de EPA inibe o precursor do AA liberado pelos fosfolipídios da membrana, num mecanismo clássico de inibição por *feedback* (BAS *et al*, 2007; SIJBEN *et al*, 2007).

Neste estudo, foi utilizada uma mistura de óleos, denominada Mistura 1, cuja formulação é alta em ω -3 (ALA) e baixa em ω -6 (AL) esperando um efeito anti-inflamatório, entretanto no modelo experimental utilizando esta mistura não apresentou no sétimo dia um efeito biológico detectável pelo método. Da mesma forma, não houve efeito anti-inflamatório na Mistura 2, cuja formulação é rica em ω -3 (EPA + DHA proveniente de peixes). Por outro lado, a mistura 3, composta de ω -3 (DHA proveniente de algas marinhas), reduziu a ativação do fator de transcrição nuclear (NF κ B P50 NLS) que pode refletir uma ação anti-inflamatória, visto que o NF κ B é translocado ao núcleo para iniciar a cascata inflamatória. Porém, há necessidade de no futuro realizar dosagem de citocinas/quimiocinas com 12, 24, 48 horas pós-queimadura em ratos para verificar se haverá alterações nos níveis das citocinas/quimiocinas com a administração das misturas de óleos e correlacionar com resultados encontrados no presente estudo pela imunohistoquímica para NF κ B.

Para avaliar a ação antioxidante das misturas de óleos com alta relação de ômega 9 e baixa de ômega 6 com razão maior que 1 (M 1, M 2, M 3) e mistura isolípica utilizou-se a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-4-hidroxinonenal (Anti-HNE-J). Este anticorpo marca compostos químicos aldeídicos produzidos pela peroxidação lipídica como a 4-hidroxinonenal que é um dos mediadores da morte celular devido estresse oxidativo (LI *et al*, 2011; SMUDER *et al*, 2012). Não se encontrou no sétimo dia nenhuma diferença entre as misturas, o isolípico e a água neste trabalho. Provavelmente, assim como ocorreu nas citocinas, no sétimo dia não houve diferença entre os grupos, sendo assim não se pode afirmar que as misturas não apresentaram efeito antioxidante na queimadura, porque pode ser que este efeito tenha ocorrido nas primeiras horas ou dias e que no futuro novos experimentos serão realizados para esclarecer ou confirmar os resultados do sétimo dia.

Observações prévias mostraram que o pré-tratamento com o ômega 3 induziu as proteínas de choque térmico (MCGUINNESS *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2010). O aumento da expressão destas proteínas em modelos experimentais em sepse, choque, doença crítica, lesões térmicas (queimaduras) reduz a injúria ao órgão, atenua a resposta pró-inflamatória e melhora a sobrevida (ZIEGLER *et al.*, 2005; MOLONEY *et al.*, 2012).

Neste trabalho optou-se pela marcação Imunohistoquímica anti-HSP27, cuja expressão é induzida em resposta a uma variedade de estresse ambiental e celular. Esta proteína (HSP27) é capaz de evitar o acúmulo de agregados protéicos durante o estresse celular (LANNEAU *et al.*, 2010). Entretanto, no sétimo dia pós-queimadura não houve diferença entre os grupos estudados. Atualmente sabe-se que as proteínas de choque (HSP27 e HSP 70) tem seu nível mais alto após 24h da queimadura e retornam ao nível basal com 120 h da queimadura (correspondente ao quinto dia) como publicado em junho de 2012 por Moloney *et al.* Assim, há necessidade, no futuro, estudar esta proteína de choque em outros tempos experimentais.

Novos experimentos, no futuro, poderão ser realizados em ratos submetidos a queimaduras por condução direta para elucidar possíveis ações e mecanismos das misturas de óleos em vários tempos distintos após a queimadura e a administração das misturas de óleos (por exemplo 3 h, 6 h, 12 h, 24 e 3 dias). Por meio de técnicas de biologia molecular poderá analisar os tecidos coletados e as amostras de sangue estudando a expressão de genes envolvidos nos processos inflamatórios, estresse oxidativo e cicatrização.

6 Conclusão

Em pele de ratos queimados, por condução térmica direta, a mistura de óleos com baixa relação entre $\omega 6:\omega 3$ e alta relação entre $\omega 9:\omega 6$, sendo a fonte do óleo $\omega 3$ DHA proveniente de algas, aumenta a proliferação celular, inibe a expressão do fator nuclear NF κ B e diminui a extensão da lesão no sétimo dia.

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.

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

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.

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.

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.

BENSON, A.; DICKSON, W.A.; BOYCE, D.E. **ABC of wound healing- burns**. *BMJ*, v. 332, p.649-652, 2006.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, 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.

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.

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.

Dietary Reference Intakes: **The essential Guide to Nutrient Requirements**. 2006. Disponível em: <http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~//media/C5CD2DD7840544979A549EC47E56A02B.ashx>. Acessado em 12 de maio de 2012.

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.

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.

GOMES, D.R; MACIEIRA, JUNIOR, L.; SERRA, M.C. **Condutas 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.

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.; CARSON, 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.

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.

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

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

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

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

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.; MIDDAUGH, 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.

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.

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

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

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

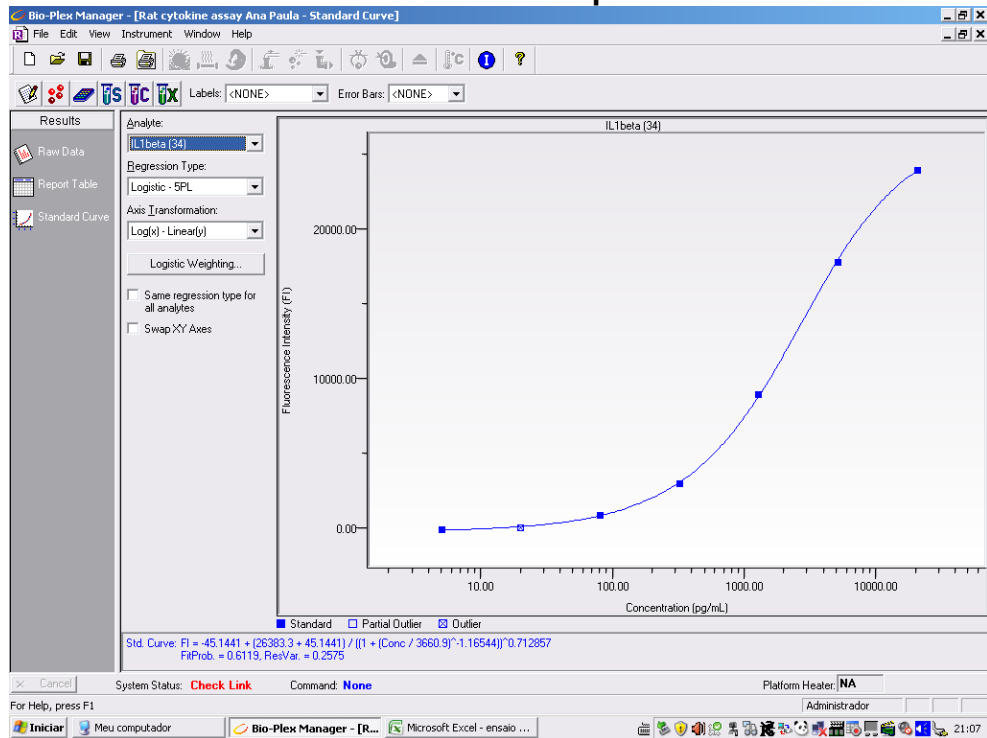
ZIEGLER, T.R.; OGDEN, L.G.; SINGLETON, K.D.; LUO, M.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; GRIFFITH, D.P.; GALLOWAY, J.R.; WISCHMEYER, P.E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically patients. **Intensive care med.**,v.31,p.1079-1086,2005.

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

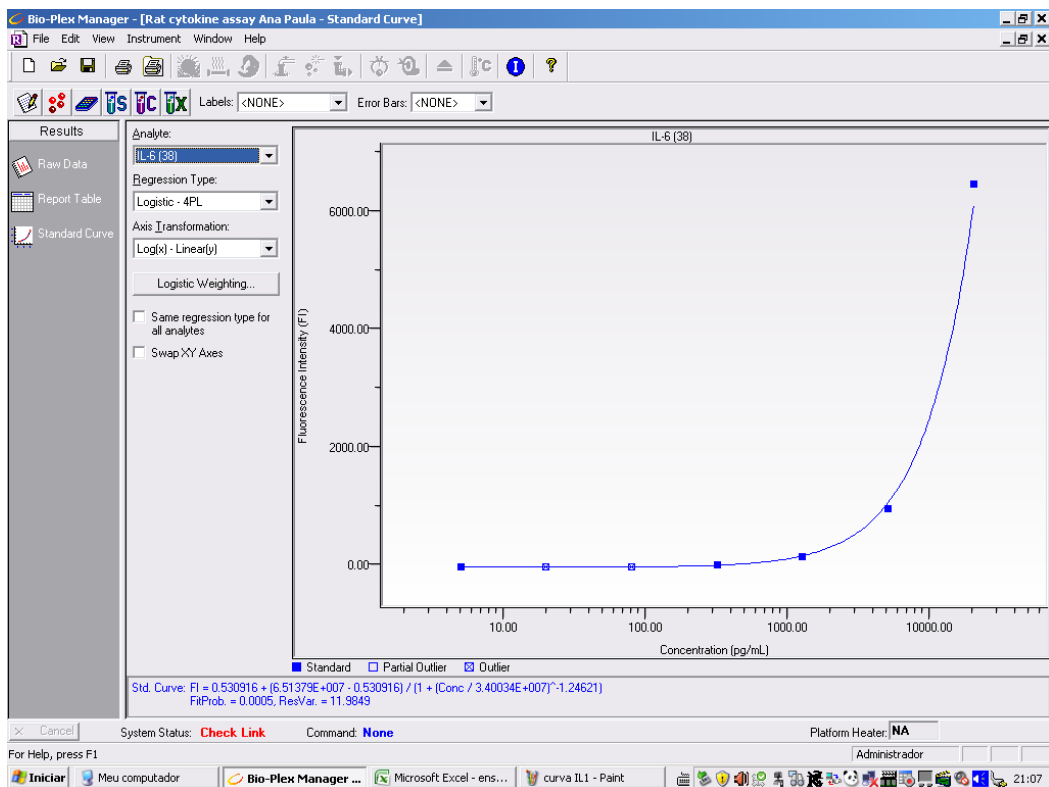
WELCH, A.A.; SHAKYA-SHRESTHA, S.; LENTJES, M.A.; WAREHAM, N.J.; KHAW, K.T. Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of alphaslinolenic acid to long-chain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

APENDICE – Curva de Calibração e Validação do imunoensaio das citocinas (Bioplex)

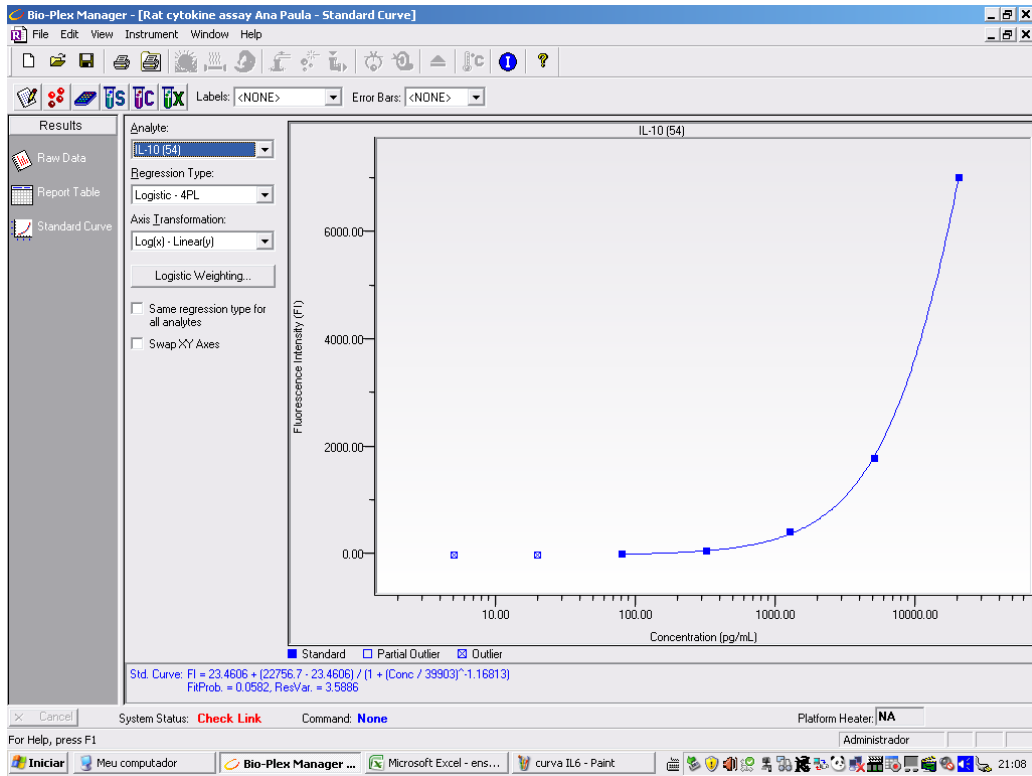
Interleucina 1 β



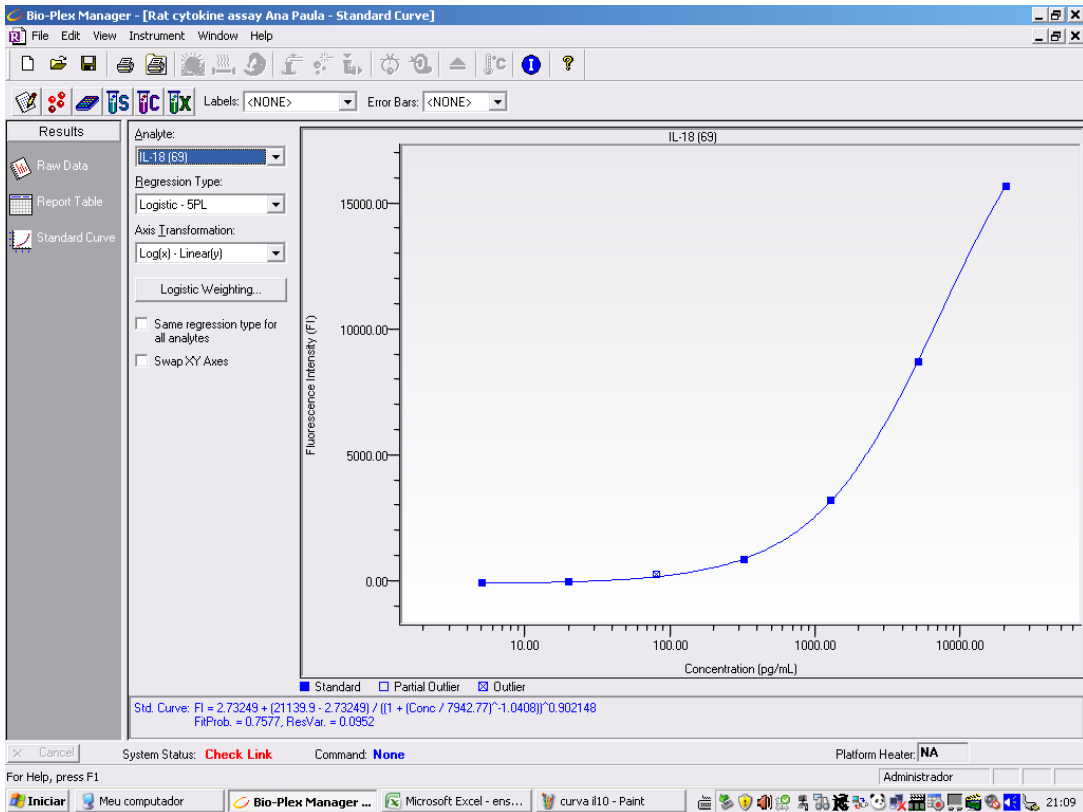
Interleucian 6



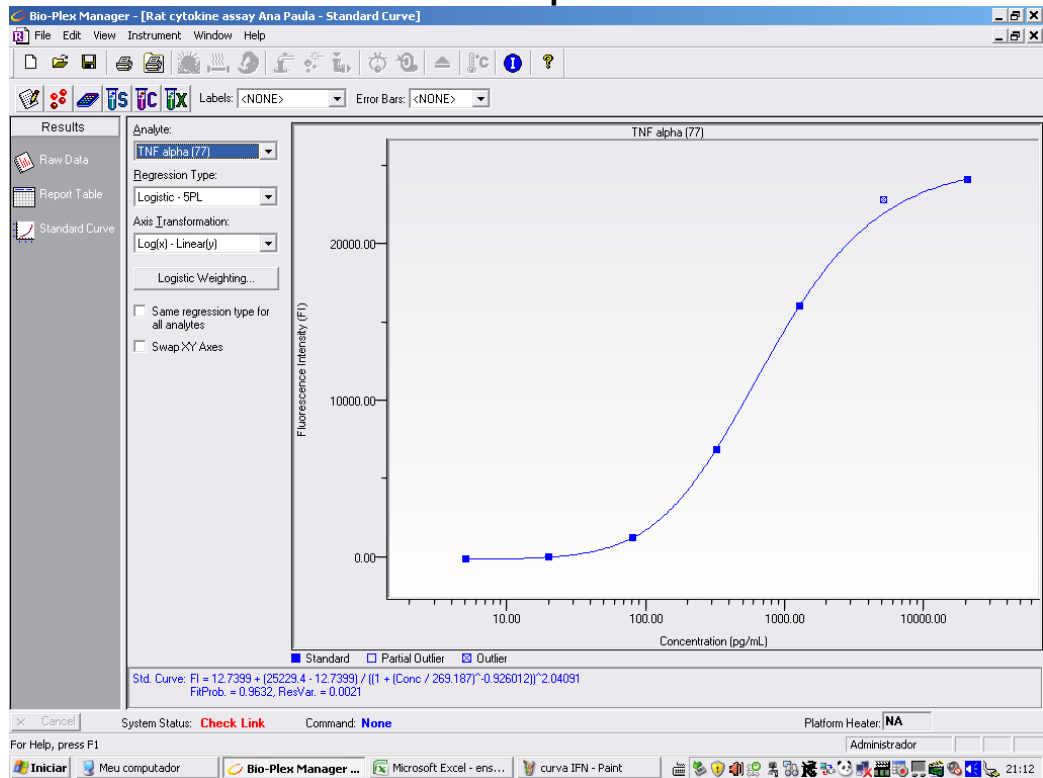
Interleucina 10



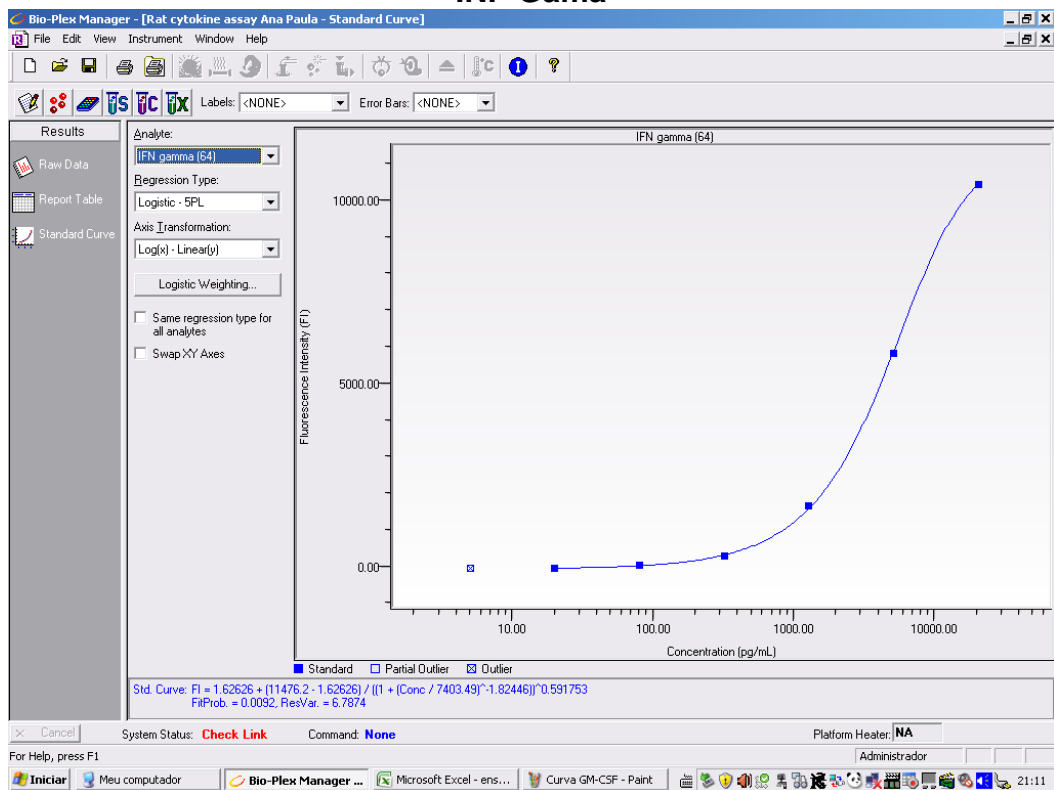
Interleucina 18



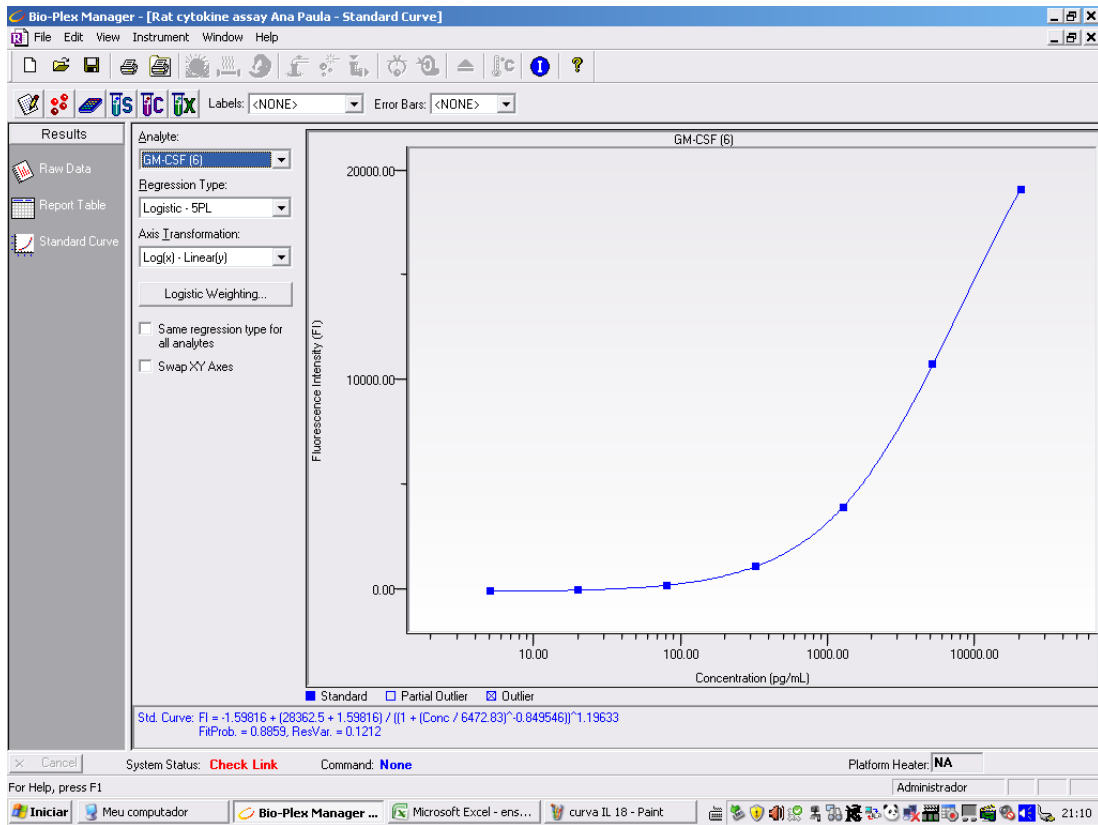
TNF-Alpha



INF-Gama



GM-CSF



ANEXO

Aprovação do comitê de ética

