

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Efeitos da L-Arginina na cicatrização de feridas operatórias de camundongos  
imunossuprimidos, obesos e diabéticos**

Márcio Sousa Jerônimo

Brasília – DF

2010

## Ficha Catalográfica

Jerônimo, Márcio Sousa

Efeitos da L-Arginina na cicatrização de feridas operatória de camundongos imunossuprimidos, obesos e diabéticos.

Márcio Sousa Jerônimo. – Brasília, 2010.

Orientador: Anamélia Lorenzetti Bocca

Dissertação de Mestrado (Patologia Molecular), Faculdade de Medicina,

Universidade de Brasília – UNB.

1. Cicatrização, L-Arginina, Imunologia, ferida, citocinas.



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Efeitos da L-Arginina na cicatrização de feridas operatórias de camundongos  
imunossuprimidos, obesos e diabéticos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Área de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular (Imunologia Aplicada).

**Márcio Sousa Jerônimo**

**Orientador:** Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

**Brasília – DF**

**Agosto de 2010**

## **Banca examinadora**

Titulares:

Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro

Prof. Dra. Cecília Beatriz Fiúza Favali

Orientador:

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Trabalho desenvolvido no laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade de Brasília sob orientação do Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca.

"Dizia ele estou indo pra Brasília  
Neste país lugar melhor não há"

**Renato Russo**

## **Agradecimentos**

A Deus, arquiteto do Universo, que me trouxe até aqui e ajudou a passar por todos os caminhos tortuosos por onde andei.

Aos meus pais Marcílio e Mirtor, responsáveis por tudo e aos meus irmãos Marcelo, Júnior e Mariana.

Ao meu tio Helder, que me acolheu em Brasília no meu primeiro ano de mestrado na UnB.

Aos professores que participaram direta ou indiretamente da construção desse trabalho. Em especial a professora Maria de Fátima Borim e professor Rivadávio Amorim.

Aos meus amigos de trabalho Ana Camila, Yanna Nóbrega, Isaque Medeiros, Alice, André e todos do Laboratório de Interação Parasita Hospedeiro.

Aos PIBICS que seguiram ao meu lado durante dois anos de mestrado e colocaram “seu tijolo” nessa construção: Ádria (hoje mestranda), Érika, Marina Linzmayer, Fabíola Severiano, Nathalia Lobão, Nathalia Vasconcelos e Pedro Saavedra.

A professora Anamélia Lorenzetti Bocca que me instruiu no intrincado mundo da imunologia.

Obrigado a todos

## **Resumo**

A cicatrização de ferida é um mecanismo coordenado e regulado por que envolve mediadores solúveis e insolúveis da resposta imunitária. Certas condições são conhecidamente comprometedoras desse mecanismo. A obesidade, diabetes e a imunossupressão interferem em mecanismos chaves do reparo e fazem que este seja comprometido no final.

Animais sadios, imunossuprimidos, diabéticos ou obesos foram submetidos a confecção de uma ferida de primeira e segunda intenção no dorso e tratados com L-Arginine topicamente durante 5, 7 e 10 dias pós operação. O tecido foi retirado e feito análises histopatológicas e RT-PCR em tempo real para se determinar o quadro de evolução da ferida. A análise estatística foi feita pelo teste T.

Nosso trabalho revelou que o uso tópico da L-Arginina em feridas de primeira e segunda intenção melhorou o processo de cicatrização por aumentar a produção de TGF- $\beta$  e citocinas da fase inflamatória TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ .

A L-Arginina parece ser uma boa alternativa para o auxílio no reparo de feridas em condições que mecanismos de cicatrização está comprometida. Nosso trabalho abre perspectivas para estudos que envolvam novas formulações e associações que tenham como base esse aminoácido.

## **Abstract**

The wound healing is a coordinated and regulated mechanism that involves soluble mediators and insoluble immune response. Certain conditions are known to compromising the mechanism. Obesity, diabetes and immunosuppression interfere in key mechanisms of repair and do it to be compromised in the end. Healthy animals, immunosuppressed, diabetic or obese underwent construction of a wound from the first and second intention in the back and treated with L-Arginine topically during 5, 7 and 10 days post operation.

The tissue was removed and was the histopathological analysis and RT-PCR in real time to determine the framework of evolution of the wound. Statistical analysis was performed by the test T.

Our work showed that the topical use of L-arginine in wounds of first and second intention improved the healing process by increasing the production of TGF- $\beta$  and cytokines in the inflammatory TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$ .

L-Arginine appears to be a good alternative to aid in wound repair mechanisms in conditions that healing is compromised. Our work opens up perspectives for studies involving new formulations and associations that are based on this amino acid.

## **Lista de figuras e tabelas**

Tabela 1 – Tabela dos primers utilizados para qRT-PCR

Figura 1 – HE de ferida de primeira e segunda intenção dos animais saudios

Figura 2 – Imunohistoquímica dos animais saudios

Figura 3 – Taxa de sobrevivência dos animais imunossuprimidos

Figura 4 – Taxa de sobrevivência em função do tempo dos animais tratados com estreptozotocina

Figura 5 – Imunohistoquímica dos animais imunossuprimidos

Tabela 2 – Fold dos animais saudios e imunossuprimidos tratados com L-Arginina nos tempos de 5 e 7 DPO.

Tabela 3 – Fold dos animais saudios tratados e imunossuprimidos tratados com L-Arginina nos tempos de 5 e 7 DPO.

Tabela 4 – Fold dos animais saudios sem tratamento comparado aos animais imunocompetentes tratados com L-Arginina, imunossuprimidos sem tratamento e imunossuprimidos controles

Tabela 5 – Fold dos animais imunossuprimidos sem tratamento comparado ao imunossuprimidos tratados.

Figura 6 – Taxa glicêmica dos animais diabéticos e normoglicêmicos

Figura 7 – Taxa de sobrevivência dos animais diabéticos

Figura 8 – Taxa de sobrevivência dos animais normais ou diabéticos após o tratamento com estreptozotocina

Figura 9 – HE de animal diabético

Figura 10 – Gráfico do ganho de pesos dos animais obesos

Figura 11 – Taxa de sobrevivência dos animais obesos

Figura 12 – HE, TM e Picro Sírío dos animais obesos

### **Lista de abreviações**

Ácido desoxirribonucléico (DNA)

Ácido ribonucléico (RNA)

Ácido ribonucléico mensageiro (mRNA)

Arginase (ARG)

Cálcio (Ca)

Célula Dendrítica (DC)

Células Matadoras Naturais (NK)

Ciclo Limiar (CT)

Comitê Brasileiro de Ética Animal (COBEA)

Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA/UnB)

Dias Pós-Operatório (DPO)

Faculdade de Medicina (FM)

Faculdade de Saúde (FS)

Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF)

Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

Fator de Crescimento Transformado Beta (TGF- $\beta$ )

Fator de Crescimento Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

Fator de Crescimento Vascular Endotelial (FGVE)

Fator Nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B)

Gramas (g)

Graus Célsius ( $^{\circ}$ C)

Hematoxilina-Eosina (HE)

Horas (H)

Interferon (IFN)

Interleucina (IL)

Matriz extracelular (MEC)

Matriz Metaloproteinases (MMPs)

Microlitro ( $\mu\text{L}$ )

Miligramas (mg)

Milímetros (mm)

Molar (M)

Monofosfato de Guanosina Cíclica (mGMP)

Organização Mundial da Saúde (OMS)

Óxido Nítrico (NO)

Óxido Nítrico Sintase (NOS)

Peptídeo Ativador de Neutrófilo (NAP)

Potencial hidrogeniônico (pH)

Quilocalorias (Kcal)

Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa (RT-PCR)

Temperatura de dissociação ( $T_m$ )

Tricrômio da Masson (TM)

## Sumário

1 – Introdução	1
1.1 – Regeneração dos tecidos	1
1.2 – L-Arginina e Óxido Nítrico na cicatrização de feridas	6
1.3 – Fatores que interferem na cicatrização	9
2 – Objetivos	12
3 – Material e método	13
3.1 – Animais	13
3.2 – Grupos experimentais	13
3.3 – Indução da Obesidade	14
3.4 – Indução da Imunossupressão	14
3.5 – Indução da Diabetes Mellitus	15
3.6 – Produção da cicatrização de primeira intenção	15
3.7 – Produção da cicatrização de segunda intenção	15
3.8 – Tratamento e sacrifício	16
3.9 – Histopatologia	16
3.10 – Imunohistoquímica	16
3.11 – Análise estatística	17
3.11 – RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)	18
4 – Resultados	21
4.1 – Análise da cicatrização em indivíduos saudáveis	21
4.2 – Análise da cicatrização em animais imunossuprimidos	24
4.3 – Análise da cicatrização em animais diabéticos	31
4.4 – Análise da cicatrização em animais obesos	34
5 – Discussão	37
6 – Considerações finais	48
7 – Perspectivas	44
8 – Referências Bibliográficas	46
9 – Anexos	52

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 Reparo dos tecidos

O reparo de tecidos é um processo que envolve a substituição do tecido lesionado por células do mesmo tipo parenquimatoso ou por um tecido cicatricial conectivo. Após a lesão tecidual, ocorrem vários eventos intra e intercelulares que são ativados coordenadamente para promover a homeostase e o reparo de maneira eficiente. A cicatrização faz parte da fase do reparo tecidual, onde se observa a proliferação do tecido conjuntivo fibroso, sendo esta fase, um dos mais complexos processos patológicos. (GURTNER *et al*, 2008). As células do sistema imunológico são importantes para o mecanismo de reparo de feridas, exercendo diversas funções. O fechamento da ferida operatória pode ser de primeira ou de segunda intenção, dependendo da área lesionada.

O reparo deste tecido lesionado pode ser dividido em quatro fases: a fase de homeostasia, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase remodeladora ou de cicatrização (WILGUS, 2008). Um balanço dinâmico entre células endoteliais, trombócitos, coágulo e reguladores da coagulação virão influenciar o progresso do processo reparativo (VELNAR *et al*, 2009).

A *fase de coagulação ou hemostasia* representa os primeiros eventos do reparo tecidual, com início logo após a injúria local, com a cascata de coagulação, agregação plaquetária e formação da rede de fibrina além do reflexo de vaso constricção. A rede de fibrina vem logo representar uma matriz de sustentação para as células do sistema imunológico que migram para essa região (TSIROGIANNI *et al*, 2006). A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular seguem-se, possivelmente como resultado do lançamento de histamina por plaquetas ativadas (WILLIAMSON & HARDING, 2004).

A segunda fase da cicatrização compreende a *inflamação*, que é ativada por uma variedade de mediadores relacionados à injúria tecidual e capilar, fator plaquetário e citocinas (STRODTBECK, 2001). Iniciada logo após a coagulação, nesse estágio, alguns eventos moleculares e celulares ocorrem promovendo a infiltração no sítio de reparo por neutrófilos, aumentando o processo de fagocitose, destruindo e removendo bactérias da área lesionada (VELNAR *et al*, 2009). O sistema imunológico participa ativamente destes mecanismos, sendo os neutrófilos, macrófagos e linfócitos as principais células que participam da cicatrização de feridas. Essas células migram em diferentes períodos após a fase de inflamação. As primeiras a surgirem são os neutrófilos, aproximadamente 24 horas após a lesão. Os macrófagos migram para ferida num intervalo de 48 e 96 horas e ficam como células predominantes no local até serem substituídos pelos fibroblastos. Além de apoiar os neutrófilos na fagocitose os macrófagos também secretam citocinas e fatores de crescimento. Essas citocinas atuam de maneira parácrina recrutando novas células para o local de reparo. As metaloproteinases da matrix (MMPs) são induzidas durante esta fase e são importantes para regulação imunológica, angiogênese e remodelação tecidual. A regulação da MMPs necessita ser hermeticamente controlada para evitar a destruição tecidual (HO *et al*, 2008). Elas participam da digestão do tecido fibroso cicatricial e na melhora da migração e diferenciação celular (WANG *et al*, 2009), essa migração, fundamental no processo de reparo, ocorre juntamente com a produção de citocinas. As MMPs digerem a matriz extracelular (MEC) e integrinas enquanto o TGF- $\beta$  induz a migração e proliferação celular (JOO & SEOMUN, 2008).

A *fase de proliferação* tem início em torno de 3 dias e dura em média entre 2 e 4 semanas após o trauma e é caracterizada pela migração de fibroblastos, deposição da matriz extracelular e formação do tecido de granulação. A epitelização da cicatriz representa a fase

final do processo de cicatrização (ENOCH & LEAPER, 2007). Os fibroblastos são as principais células envolvidas no mecanismo de síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular. Eles são recrutados do tecido conectivo da região lesionada por fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) ou de citocinas derivadas de macrófagos e de outras células do sistema imunológico, como o Fator de Crescimento Transformado beta (TGF- $\beta$ ) (WILLIAMSON & HARDING, 2004).

Nessa fase também se observa a formação do principal componente da cicatriz, o tecido de granulação. Neste tecido neoformado ocorre o aparecimento de vasos sanguíneos, caracterizado por brotamentos de alças anastomosadas de capilares arteriais e venosos, que se exteriorizam sob a forma de saliências avermelhadas (broto carnudo) na área lesionada (MICHALANY, 2000). Este processo é crítico para angiogênese e modelação da fase proliferativa. A síntese de colágeno se faz mais evidente nessa fase. O colágeno, sintetizado por fibroblastos do tecido de granulação, atua como uma base para matriz extracelular dentro da ferida. A derme não cicatrizada contém 25% do colágeno tipo 3 enquanto que o tecido de granulação expressa 40% desse tipo de colágeno (VELNAR *et al*, 2009).

O controle e o final da fase proliferativa ocorrem com o início da formação do epitélio com morte das células do sistema imunológico (GREENHALGH, 1998).

A última etapa do processo de reparo é a *fase de remodelação*, aqui se observa a formação do novo epitélio e tecido cicatricial final. Esse processo é regulado por vários fatores, entre os quais o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) e o TGF- $\beta$ , com a cura da ferida a densidade dos macrófagos e dos fibroblastos é reduzida ainda mais por apoptose. Com o tempo o crescimento dos capilares pára, o fluxo sanguíneo diminui e a atividade metabólica declina.

O resultado final é uma cicatriz completamente madura com uma baixa densidade celular e de vasos e altamente tensa em termos de colágeno (VELNAR *et al*, 2009).

A cicatriz pode ser classificada de acordo com o tipo de ferimento em 2 categorias; *cicatriz de primeira intenção*, ocorre quando a ferida tem suas bordas aproximadas diretamente com auxílio de fio de sutura, cola cirúrgica ou dispositivos mecânicos diversos ou a *cicatriz de segunda intenção*, quando as bordas estão distantes (STRODTBECK, 2001). No primeiro tipo de ferida há um balanço entre todas as fases da regeneração do tecido (ENOCH & LEAPER, 2007) e observa-se a morte de um número limitado de células e tecido conectivo porque a área lesionada é pequena, permitindo um rápido processo de reparo. A boa cicatrização das feridas operatórias constitui um dos principais passos para a recuperação no período pós-operatório. A barreira que a pele íntegra forma contra agentes infecciosos é uma das ferramentas da resposta imune inata, por isso a preservação de sua fisiologia e integridade deve ser posta como ponto chave para se evitar complicações. Os eventos complexos que estão envolvidos no reparo tecidual de feridas cirúrgicas exigem uma integração minuciosa das diversas fases desse evento; hemostasia, inflamação, migração e proliferação celular, síntese de proteínas, contração e remodelação formam a cadeia cuidadosamente regulada da reconstituição da pele lesada num processo cirúrgico (MONACO & LAURENCE, 2003). A intervenção cirúrgica, por si só, já constitui um evento traumatizante para o indivíduo. Independente da patologia que tenha provocado sua realização e, se ainda levarmos em conta esse processo instalado, teremos um quadro que fatalmente afetaria o desenvolvimento natural do reparo tecidual. Considerando a formação do tecido de granulação como primordial nesse caso, e que este se relaciona a pontos de controle da inflamação, perceberemos que há ainda grandes e complexos mecanismos ocultos na cicatrização de feridas (NATHAN, 1992). A *cicatrização de segunda intenção*

ocorre em feridas onde a área apresenta uma perda tecidual bastante acentuada, é visto geralmente em condições de trauma. Os miofibroblastos, nesse tipo de cicatriz, apresentam um papel chave no mecanismo de reparo. Cicatrização por segunda intenção são mais lentas podendo levar a contratura (particularmente sobre junções) e restrições funcionais (ENOCH & LEAPER, 2007).

Neste tipo de cicatrização, também se observa os complexos eventos que estão envolvidos no reparo tecidual de feridas cirúrgicas.

A despeito dos mediadores inflamatórios desse processo, observa-se que eles aparecem em todas as fases do reparo tecidual. As plaquetas são os primeiros tipos celulares a responder a injúria através de mediadores solúveis no meio para o estabelecimento inicial da cicatrização. É sabido que logo após a lesão estabelecida, moléculas pró-angiogênicas produzidas pelas plaquetas como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) estão presentes na região afetada (WILGUS, 2008). As citocinas também estão presentes nesta fase do reparo tecidual. Um aspecto importante do papel das citocinas é que elas podem promover diferentes respostas em vários tipos celulares. Isto é, mesmo pertencentes a diferentes classes podem promover a mesma resposta em um tipo de célula. A proliferação de fibroblasto é estimulada pelo TGF- $\beta$  e pela Interleucina (IL) – 1, a angiogênese é estimulada pelo Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e pela IL-8 e a infiltração de neutrófilos na ferida é disparada pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF) –  $\alpha$  e pelo Peptídeo Ativador de Neutrófilo (NAP) – 2. Toda essa redundância de ativação cria um ambiente homeostático perfeito para o reparo tecidual (HENRY & GARNER, 2003).

## 1.2 - L-Arginina e óxido nítrico na cicatrização de ferida

Avanços recentes na terapia nutricional de pacientes críticos levaram ao estabelecimento de que certos aminoácidos participam na manutenção da homeostase de proteínas teciduais. Anteriormente os aminoácidos eram classificados como não essenciais (dispensáveis) ou essenciais (não dispensáveis). Porém, com a melhor compreensão dos eventos bioquímicos que envolvem os aminoácidos *in vivo*, Young & El-Khoure (1995) e Laidlaw & Kopple (1987) propuseram uma classificação alternativa que redefine os critérios que condicionavam anteriormente os aminoácidos como não essenciais para indispensáveis condicionalmente (WITTE & BARBUL, 2003).

Terapias nutricionais modernas que utilizam especificamente a suplementação da L-Arginina na síntese de proteína, sinalização celular por meio da produção de óxido nítrico (NO) e proliferação celular através de seus metabólitos à ornitina e poliaminas. A L-Arginina era classificada como um aminoácido não essencial que chega a ser substrato essencialmente importante em algumas condições de trauma (STENCHMILLER *et al*, 2005), e esta condição, por sua vez, está associada com um decréscimo de aproximadamente 50% da arginina circulante e uma diminuição global na geração de ornitina. Essa diminuição dos níveis de arginina é restaurada apenas com a suplementação desse aminoácido em concentrações supra fisiológicas (BASAL & OCHOA, 2003).

A L-Arginina inicia vários mecanismos biológicos importantes, entre eles a regulação de linfócitos T (RODRIGUES *et al*, 2007). Duas enzimas são fundamentais no metabolismo desse aminoácido – a Arginase (ARG) e a Óxido Nítrico Sintase (NOS) – ambas, separadamente ou conjuntamente participam do mecanismo de ativação e proliferação de linfócitos, esse mecanismo vai depender de qual delas prevalece (BRONTE & ZAVONELLO, 2005). Acredita-se que a L-Arginina possa restaurar o tecido lesionado

em algumas condições patológicas, porém, ainda é necessário estudar a melhor forma de administração desse aminoácido nessas condições (WITTE *et al*, 2002). Há três isoformas de NOS: NOS1, NOS2 e NOS3. A isoforma NOS1 foi primeiramente descoberta em neurônios, a NOS2, descrita como induzível e encontrada em macrófagos, e a NOS3 em células endoteliais. Ambas, NOS2 e NOS3 são Cálcio (Ca) dependentes e expressadas abundantemente em resposta a mudanças imunológicas (WU *et al*, 2009). Sabe-se hoje que o NO é produzido por uma grande variedade de células do sistema imunológico como células dendríticas (DC), células matadoras naturais (NK), mastócitos e células fagocíticas como monócitos, micróglia, células de Kupffer, eosinófilos, e neutrófilos, bem como outras células envolvidas na defesa do hospedeiro (células endoteliais, epiteliais, células da musculatura lisa, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann). Ambos têm sido encontrados em linhagens celulares, clones, hidridomas, e tumores de células B e T originalmente, mas ainda não está claro se linfócitos expressam alguma das duas isoformas (PERAZONI *et al*, 2008). Quando o NO foi descrito inicialmente na cena da imunologia, entre 1985 e 1990, seu mecanismo foi simplesmente descrito como o produto de macrófagos ativados por citocinas, produtos mitocondriais ou ambos, é um derivado do aminoácido L-Arginina, que funcionaria como uma molécula tumoricida e microbicida *in vitro* e *in vivo* (NATHAN, 1992).

O NO atua por diferentes e múltiplos mecanismos. Um desses mecanismos está relacionado à sua reação química com oxigênio elevando a formação de espécies de radicais livres. Outro está relacionado com sua afinidade com o heme ou metais contidos em enzimas com ferro. Tem se mostrado o NO como molécula citostática para diferentes tipos celulares como hepatócitos e fibroblasto. Dependendo do tipo celular o efeito pode ser dependente ou independente de monofosfato de guanosina cíclica (cGMP). Vários estudos

têm apontado para o efeito proliferativo do NO quando em pequenas concentrações (WITTE & BARBUL, 2002), outros sugerem que ele pode reduzir a proliferação por inibir a atividade da ornitina-carboxilase, enzima limitante da formação das poliaminas, em células mielóides supressoras (BRONTE & ZAVONELLO, 2005).

A produção de mediadores envolvidos na reação inflamatória, pelos macrófagos, em respostas aos mais diferentes estímulos deve ser finamente regulada, de forma a promover uma resposta imunológica efetiva, porém sem ser danosa ao hospedeiro (CORREA *et al*, 2003). Moléculas como lipopolissacarídeos e algumas citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  levam à ativação dos macrófagos, estimulando a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios e aumentando a expressão da enzima iNOS e, conseqüentemente, de NO. Citocinas de padrão Th2 e glicocorticóides, por sua vez, levam à ativação alternativa dos macrófagos, aumentando a atividade de arginase-1 e aumentando a expressão de receptores *scavengers* e antagonistas do receptor de IL-1 (CHANG *et al*, 1998; MORRISON & CORRELL, 2002). Munder e colaboradores (1999; 1998) demonstraram que a expressão de L-arginase é induzida em macrófagos por citocinas Th2 e que o equilíbrio entre iNOS e arginase correlaciona-se com o balanço entre as atividades Th1/Th2. Assim, os efeitos antiinflamatórios e antifibróticos das respostas Th1 são marcadamente dependentes de iNOS e as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4/IL-13 apresentam inibição das atividades de arginase e iNOS, respectivamente. Macrófagos estimulados com citocinas Th2 produzem prolina, um importante precursor de colágeno, sobre o estrito controle de arginase (MUNDER *et al*, 1999; 1998). Outros grupos apresentaram que a indução da expressão de arginase em modelos de ativação de macrófagos induz a formação de granuloma. Além disso, a via metabólica alternativa de L-arginina é consistente com a ativação diferencial de

macrófagos, e sugere uma possível explicação para a associação entre inflamação do tipo Th2 com o aumento de fibrose (GORDON, 2003).

### 1.3 – Fatores que interferem na cicatrização

A cicatrização de feridas requer uma integração bem orquestrada de mecanismos biológicos, moleculares, de migração e proliferação celular e de deposição de matriz extracelular (FALANGA, 2005). Todos esses fatores devem estar sincronicamente interligados e algumas condições patológicas podem interferir em um desses passos fazendo, assim, que o reparo tecidual seja imperfeito ou mesmo insuficiente para reconstruir a área afetada.

A *imunossupressão induzida farmacologicamente* é observada em pacientes em utilização de medicamentos imunossupressores, como nos casos de transplantes e em casos de doenças autoimunes (ZDANOWICZ, 2009). Os corticosteróides, nos quais se enquadram os glicocorticóides, são amplamente utilizados como imunossupressores devido a sua atividade nas células T, inibindo a produção de citocinas como a IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$ , as quais são essenciais para o sucesso da resposta de linfócitos e macrófagos (MURKHERJEE & MURKHERJEE, 2009). Além de afetar a sinalização por via de citocinas, os glicocorticóides também promovem inibição da proliferação de várias células, dentre as quais se enquadram os fibroblastos (De CASTRO, 2005). Como consequência dos efeitos antiproliferativos, tem-se comprometimentos no decurso da cicatrização de feridas como, por exemplo, atrofia cutânea e eritema; bem como a inibição da síntese de colágeno e de metaloproteases de matriz, fundamentais na reparação da ferida (RHEN & CIDLOWKI, 2005).

Outra condição em que o processo de reparo está comprometido é no caso da diabetes mellitus tipo I, também chamada de diabetes juvenil ou diabetes insulino dependente, doença crônica caracterizada por uma desordem auto-imune que se inicia por fatores ambientais ainda pouco definidos. O sistema imunitário do corpo ataca células- $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas, destruindo ou comprometendo sua capacidade de produzir insulina. Quando mais de 80 ou 90% das células- $\beta$  são destruídas a produção de glucagon pelas células- $\alpha$  é ativada. As consequências metabólicas da escassez de insulina e excesso de glucagon são a hiperglicemia e a cetoacidose. A diabetes mellitus tipo 1 diferencia-se do tipo 2 por apresentar auto-antígenos, ligação genética, dependência por insulina e insulite – destruição de células- $\beta$  e linfócitos T ativados (VAN BELLE *et al*, 2009).

As feridas de indivíduos diabéticos não apresentam a cascata de eventos que caracteriza o processo normal de cicatrização, ao contrário o processo inflamatório parece ser mais prolongado. Embora o influxo de células inflamatórias ao sítio de lesão inicialmente pareça pequeno e inadequado estas células produzem potentes citocinas pró-inflamatórias aparentemente exclusivas do comportamento do estado diabético e uma desregulação do mecanismo da formação do tecido de granulação e da produção das MMPs (ACOSTA *et al*, 2008). Outro aspecto negativo encontrado no reparo de feridas em diabéticos é o comprometimento da microvasculatura. A densidade capilar da pele de pacientes diabéticos não é diferente dos indivíduos saudáveis, a mudança mais proeminente na microvasculatura dos diabéticos é o espessamento da membrana basal de sua microcirculação e diminuição do tamanho capilar. O primeiro passo para que haja o espessamento da membrana basal capilar é o aumento da pressão hidrostática com o cisalhamento de forças na microcirculação. Estes eventos promovem uma resposta

inflamatória no endotélio microvascular com subsequente lançamento de proteínas extravascular da matriz. A incapacidade da microcirculação em diabéticos de vaso dilatar em resposta a lesão resulta em uma isquemia funcional. A microcirculação alterada em pés diabéticos têm sido descritos como características de fraca cicatrização associada com ulceração em diabéticos crônicos (SCHRAMM *et al*, 2006). Confirmou-se recentemente que macrófagos tem sua função prejudicada em feridas de indivíduos diabéticos (KHANNA *et al*, 2010) e que sua migração ao local da lesão também fica comprometida nessa condição (HARDMAN *et al*, 2005).

Outro fator associado ao comprometimento do reparo tecidual é a obesidade. Em vários países a prevalência da obesidade já passa de 15%, ponto que a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerar epidemia nutricional. Vários fatores associados à obesidade danosos à saúde são conhecidos, entre eles condições metabólicas que envolvem síntese de proteínas, que iniciam mecanismos centrais para manutenção da glicose, lipídeos, energia e homeostase vascular que constituírem passos chave na melhora dos processos como inflamação e cicatrização (CHALDAKOV *et al*, 2007). A condição de obesidade mórbida exerce uma série de fatores negativos no sistema imunológico – susceptibilidade a infecções, câncer além de prolongar o tempo de recuperação de feridas operatórias. A resposta imunológica pode ser profundamente afetada durante a obesidade envolvendo tanto a resposta humoral quanto a celular (MUÑOS *et al*, 2004).

Complicações pós-operatórias na cicatrização também são bastante comuns em pacientes obesos. Arthurs *et al* (2007) mostraram que pacientes obesos apresentavam três vezes mais chances de complicações que pacientes eutróficos. A avaliação da perfusão de tecidos é o fator de maior interesse nesses casos (WILSON & CLARK, 2003). Obesidade, diabetes e inflamação são algumas condições patológicas que interferem na angiogênese. O

crescimento de vasos a partir de outros vasos já pré-existentes são condições fundamentais em processos de reparo tecidual (QUTUB *et al*, 2009).

As complicações existentes de uma boa condição para o mecanismos de reparo tecidual são variáveis, mas observa-se que em sua grande maioria, a correlação com uma boa atividade do sistema imunológico aparece como fator essencial nesse quadro. Patologias que de alguma maneira interferem no percurso da cicatrização de feridas em geral comprometem o desenvolvimento da resposta imunitária de forma efetiva, independente da fase da cicatrização.

## **2 - OBJETIVOS**

Avaliar o efeito da L-Arginina na concentração de 10% aplicada topicamente na cicatrização de feridas de primeira e de segunda intenção.

### 2.1 - Metas para atingir o objetivo proposto

2.1.1 - Avaliar o efeito da L-Arginina em feridas de camundongo normais, imunossuprimidos, obesos e diabéticos.

2.1.2 – Analisar a característica morfológica da cicatrização das feridas dos animais tratados com L-Arginina em diferentes condições patológicas que conhecidamente interfere no reparo tecidual.

2.1.3 – Analisar as características imunológicas das feridas dos animais tratados com L-Arginina através da quantificação de citocinas importantes no processo de cicatrização em condições experimentais que conhecidamente comprometem esse processo.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos swiss, e C57Bl/6, com diferentes idades, mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina/Faculdade de Saúde (FM/FS) da Universidade de Brasília (UnB), com alimentação e água *ad libidum* e ciclo de claro e escuro ( $\pm 24$  horas). Para os ensaios de cicatrização de primeira ou segunda intenção, os procedimentos estão descritos a seguir. Para eutanásia, os animais foram inicialmente anestesiados com éter e em seguida sacrificados por deslocamento cervical.

Os procedimentos realizados estão de acordo com os procedimentos aceitos pelo Comitê Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA/UnB) desta universidade (**anexo I**).

#### 3.2 - Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 10 grupos experimentais que receberam L-Arginina topicamente na concentração de 10% ou o veículo da formulação - Glicerina:

Grupo 1 – Camundongos Swiss sadios que receberam tratamento com o veículo (n=5).

Grupo 2 - Camundongos Swiss sadios que receberam tratamento com a L-arginina (n=5).

Grupo 3 - Camundongos Swiss obesos que receberam tratamento com o veículo (n=5).

Grupo 4 - Camundongos Swiss obesos que receberam tratamento com a L- arginina (n=5).

Grupo 5 - Camundongos Swiss imunossuprimidos receberam tratamento com o veículo (n=5).

Grupo 6 - Camundongos Swiss imunossuprimidos que receberam tratamento com a L-arginina (n=5).

Grupo 7 – Camundongos C57Bl/6 normais que receberam tratamento com o veículo (n=5).

Grupo 8 - Camundongos C57Bl/6 normais que receberam tratamento com a L- arginina (n=5).

Grupo 9 – Camundongos C57Bl/6 diabéticos que receberam tratamento com o veículo (n=5).

Grupo 10 – Camundongos C57Bl/6 diabéticos que receberam tratamento com a L-arginina (n=5).

### 3.3 - Indução da obesidade

Os camundongos da linhagem Swiss, com 28 dias de idade foram utilizados para este grupo experimental. Os animais foram separados por sexo e os machos passaram a receber uma ração hipercalórica (NASCIMENTO *et al*, 2008) composta por farelo de ração Purina® como base, Amendoim, óleo, leite condensado e bolacha wafer de chocolate e suplemento vitamínico CENTRUM® durante um mês. Este protocolo induz um aumento de 16.920,25 Kcal e um ganho de peso 33,5% em relação ao grupo controle (**anexo II**).

### 3.4 - Indução da imunossupressão

Camundongos machos Swiss, com 8 semanas de idade e pesando aproximadamente 30 g, receberam durante 2 dias consecutivos 2,5 ml de hidrocortisona 25 mg/kg por via intraperitoneal (BODINET *et al*, 2002). A imunossupressão foi confirmada através da

contagem de leucócitos através de um estirado do sangue periférico sem anticoagulante dos animais numa lâmina corado com Giemsa.

### 3.5 - Indução do Diabetes Mellitus

Camundongos machos C57Bl/6, com 8 semanas de idade e pesando aproximadamente 25 g, receberam Estreptozotocina na concentração de 60 mg/kg dissolvida em tampão citrato de sódio 0.025 M, pH 4 (Sigma®), por via intraperitonealmente, em volume final de 100 µl/animal. Os animais passaram por um período de jejum de 24h antes da indução e continuaram com restrição alimentar por mais 12 horas, conforme protocolo proposto por Gallagher *et al* (2007). Os animais tiveram sua glicemia dosada 12 horas antes da realização dos procedimentos.

### 3.6 - Produção de cicatrização de primeira intenção

Os animais foram anestesiados, pela via intramuscular, com Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (20 mg/ml) em volume final de 50 µl. Foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm do dorso dos animais e suturada com um fio de polipropileno 7-0, ponto individuais. No período pós-operatório os animais foram colocados em gaiolas individuais com ração *ad libidum* além de receber uma solução de Dipirona sódica (60gotas/100ml de água) durante 24 horas para analgesia.

### 3.7 - Produção da cicatrização de segunda intenção

Para se avaliar a cicatrização da ferida de segunda intenção foram feitas duas lesões laterais no dorso superior dos animais com o auxílio de um *punch* para biópsia com

diâmetro de 5 mm. As mesmas precauções de anestesia e assepsia adotadas na realização da ferida com cicatrização de primeira intenção foram repetidas nesse segundo tipo de ferida.

### 3. 8 - Tratamento e Sacrifício

Os animais receberam o tratamento tópico, diariamente, com glicerina L-arginina na concentração de 10%. Para os animais selecionadas para as feridas de primeira intenção ou feridas operatórias os animais foram sacrificados no 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias pós-operação (DPO). Na ferida de segunda intenção, os animais foram sacrificados no 7<sup>o</sup> dia após o procedimento. Após o sacrifício, a área da cicatriz foi retirada e foi processada para as análises histopatológicas, imunohistoquímica e/ou reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.

### 3. 9 Análise Macroscópica

Durante o experimento foi observado a evolução macroscópica dos grupos experimentais, nessa análise os parâmetros escolhidos foram edema, vermelhidão e epitelização.

### 3. 10 – Histopatologia

Os fragmentos da área em processo de cicatrização foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina e os cortes consecutivos de 4 mm foram obtidos para as análises histopatológicas. Para a análise das lesões, os cortes foram corados: i) pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para a identificação dos tecidos de granulação e ii) pela técnica do Tricrômio de Masson (TM) e Picro Sírius para a identificação de colágeno.

### 3. 10 – Imunohistoquímica

A partir de tecidos incluídos em parafina, cortes com 5 µM de espessura foram recolhidos em lâminas de vidro revestidas de gelatina, as amostras foram imersas em 3 mM tampão citrato (pH 6,0) por 10 minutos a 120 ° C para a recuperação antigênica. Posteriormente, os cortes foram incubados em 3% de soro normal e depois com um dos seguintes anticorpos contra iNOS clone SC-651 (1:100); CD31 (1: 100) e TGF-β (1:100) clone SC-146. Todos os anticorpos foram fornecidos a partir da Santa Cruz biotechnology. As seções foram incubadas com anticorpos biotinizado por 20 minutos e depois com complexo avidina-biotina (Kit LSAB-HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca). Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

Para contagem das células marcadas positivamente foi utilizado um microscópio óptico binocular (AxiolabZeiss) associado a ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede (Carl Zeiss-474068000000-Netzmikrometer 12,5). Serão analisados 10 campos da ferida cicatrizada. Todas as amostras serão examinadas sob objetiva de 100X utilizando óleo de imersão: A área ocupada pelo retículo neste aumento corresponde a 0, 015625 mm<sup>2</sup>. Os valores obtidos foram demonstrados como a média do número de células marcadas.

### 3. 11 - RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

O material coletado da ferida em cicatrização foi coletado e macerado em solução de TRI Reagent (Applied Biosystems)®, depois foi feita a extração do RNA com fenol/clorofórmio e seguiu-se o tratamento do material com DNase da Promega® na

presença de um inibidor de RNase (Promega, cat#M6101; Lote#262753) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação de DNA genômico conforme o protocolo.

Quantidades iguais de RNA (0,4µg) foram submetidas à transcrição reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystem).

A RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada empregando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). As amplificações das seqüências de cDNA foram realizadas utilizando o kit PCR Master Mix (Applied Biosystem) contendo o agente intercalante SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Após a desnaturação inicial a 95 ° C por 15 segundos, seguidos por 60 ° C por 1 minuto. A fim de se confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nessa curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* (*T<sub>m</sub>*) de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um *T<sub>m</sub>* específico, o que permite a diferenciação dos produtos resultantes.

O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* (LIVAK *et al*, 2001) utilizando o gene constitutivo do macrófago Rps9 para normalização, foi empregado para a avaliação da variação de expressão do (*fold-change*) de cada gene de interesse. O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo é amplificado e atinge o limiar da fluorescência emitida ou *threshold* definido pelo pesquisador. O limiar deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou *background*.

O método de comparação do CT tem como base o cálculo a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  onde  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ experimento} - \Delta CT \text{ controle})$ , sendo que  $\Delta CT \text{ do experimento} = CT \text{ do gene de interesse no experimento} - CT \text{ do gene constitutivo - gene constitutivo no controle}$ . A equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas Boletim do usuário Applied Biosystem N° 2 P/N 4303859 e Livak *et al* (2001). Para a análise de expressão gênica foi considerado modulado positivamente valores iguais ou acima de 2,0 e modulados negativamente valores iguais ou abaixo de 0,5 e entre esses valores, considerou-se que não houve alteração. As reações foram feitas em triplicata, para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados baseando-se nas seqüências obtidas da base de dados do transcriptoma de camundongos (<http://www.informatics.jax.org>) utilizando o primer Express software (Applied Biosystem) e estão listados na **tabela 1**.

**Tabela 1-** Genes o óligos utilizados na qRT-PCR

<b>Genes</b>	<b>Oligos</b>
<b>RPS</b>	<b>5' rps CGCCAGAAGCTGGGTTTGT 3'</b> <b>5' rps CGAGACGGCGACTTCTCGA3'</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>5' tnf GTACCTTCTCTACTCCCAGGTTCTTCT 3'</b> <b>5' tnf AGGCTTTCGCGGTTCACTAGTTTCCC 3'</b>
<b>IL1-<math>\beta</math></b>	<b>5' il1 CTCTTCTTGCGTCGTGTGA 3'</b> <b>5' il1 AACAAACCAGCCCCATGGA 3'</b>
<b>CCR5</b>	<b>5' ccr5 AGCGCTTGGTCCCGAAGA 3'</b> <b>5' ccr5 GATCCCAGAGGAGATGGT 3'</b>

### 3.12 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas desse trabalho foram feitas utilizando o teste T de Student ou ANOVA two-away com post teste de Bonferroni.

## 4. RESULTADOS

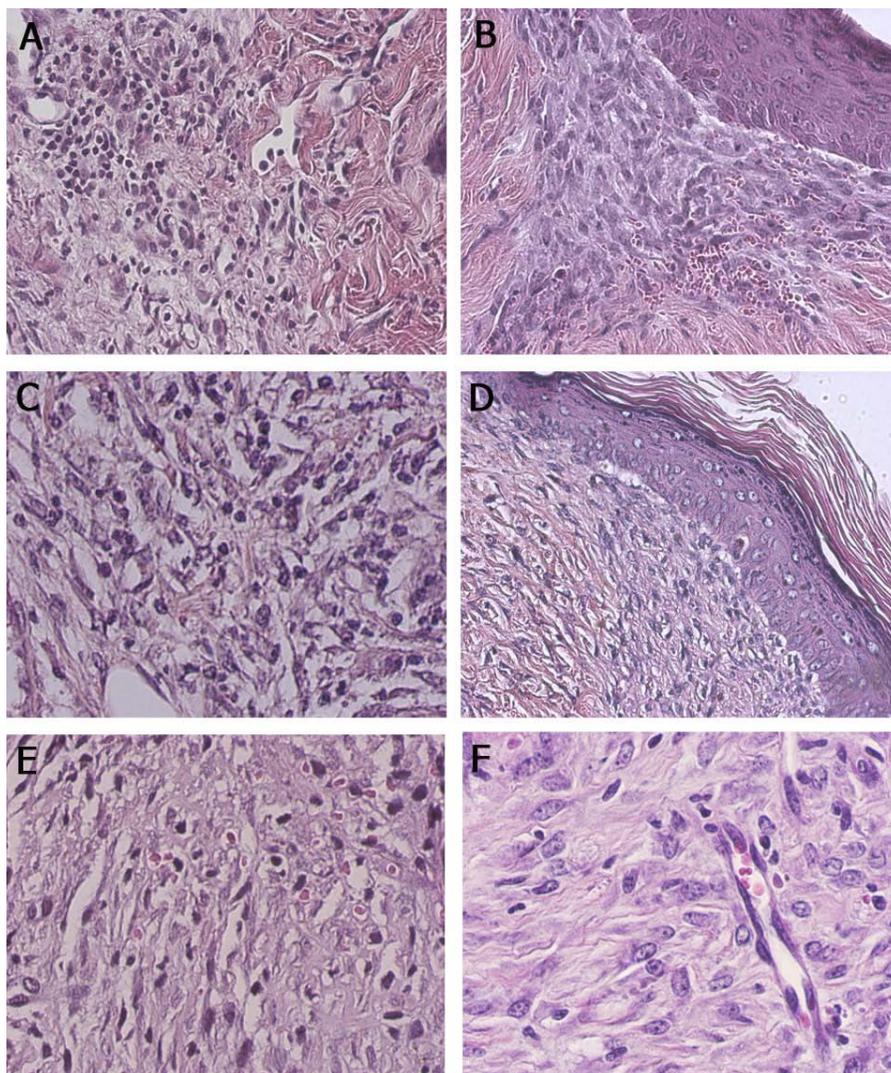
Para analisar a participação da L-Arginina no processo de cicatrização de feridas de primeira ou de segunda intenção, em diferentes situações patológicas, foram construído quatro grupos experimentais distintos: indivíduos saudáveis, imunossuprimidos, obesos ou diabéticos.

### 4.1 Análise da cicatrização em indivíduos saudáveis.

Camundongos saudáveis, livres de patologias, normoglicêmicos e com peso normal foram analisados com relação à cinética de cicatrização tanto da ferida de primeira intenção como da ferida de segunda intenção, submetidos ou não ao tratamento com L-arginina. No 3 DPO, a ferida de primeira intenção dos animais submetidos ou não ao tratamento apresentaram vermelhidão, edema e epitelização. No 5 DPO essas características diminuíram igualmente entre os grupos e no 7 DPO as feridas já mostraram as bordas unidas sem sinal macroscópico de inflamação, porém a epitelização foi maior no grupo tratado. No 10 DPO o tecido já estava totalmente recuperado em ambos os grupos.

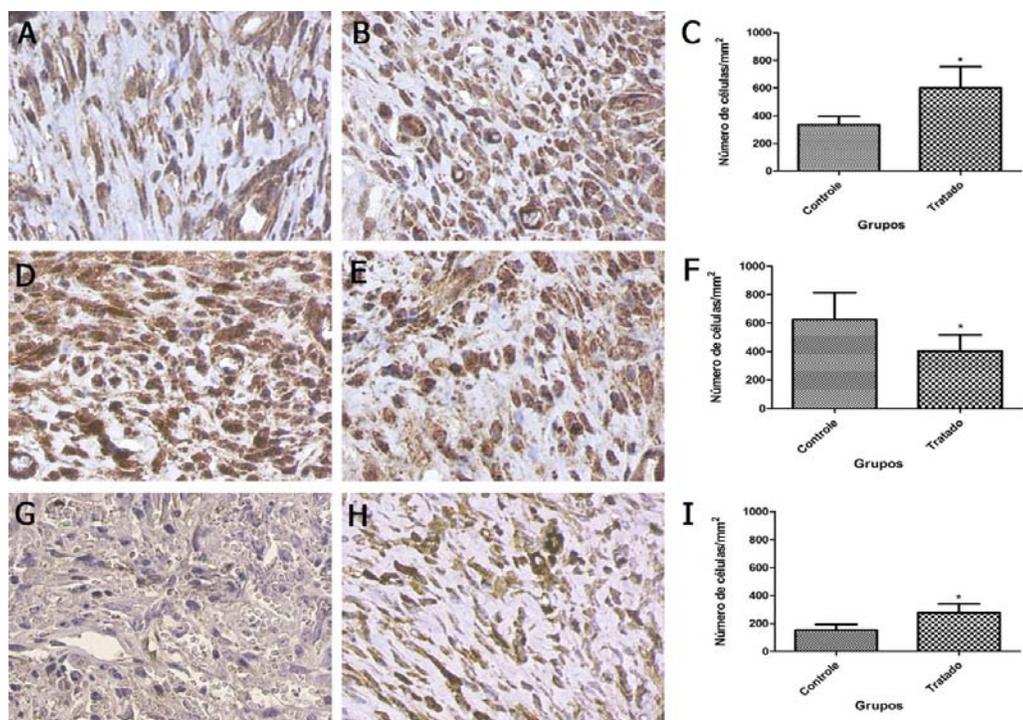
Microscopicamente não foi vista diferença no padrão de infiltrado inflamatório no 5 DPO entre os grupos controle (Figura 1 A) e tratado (Figura 1 C) com predominância de mononucleares no local da cicatriz. No grupo tratado, o tecido de granulação foi mais denso, com maior quantidade de vasos e fibroblastos. No 7 DPO o grupo tratado (Figura 1 D) apresentou menor quantidade de células inflamatórias e uma densidade de fibroblastos e de vasos maior que o grupo controle no mesmo período (Figura 1 B).

As feridas confeccionadas com punch nos animais sadios aos 7 DPO mostraram, microscopicamente, que o grupo tratado com L-Arginina (Figura 1 F) apresentou maior epitelização, menor quantidade de células inflamatórias e maior densidade de vasos quando comparado ao grupo sem tratamento com L-Arginina (Figura 1 E).



**Figura 1** - Ferida operatória de animal sadio sem tratamento aos 5 DPO (A) HE 400x e aos 7 DPO (B) HE 200x. Ferida operatória de animal sadio tratado com L-Arginina aos 5 DPO (C) HE 400x e aos 7 DPO (D) HE 200x. Ferida de segunda intenção aos 7 DPO de animal sadio sem tratamento (E) e tratado com L-Arginina (F) HE 200x.

A imunohistoquímica para iNOS dos animais sadios (Figura 2), mostrou que o tratamento com L-arginina reduziu significativamente os níveis de expressão da enzima nos animais do grupo controle ( $625,6 \pm 42$ ) (Figura 2 D) quando comparado com o grupo tratado ( $404,8 \pm 25,3$ ) (Figura 2 E). A expressão do TGF- $\beta$  na ferida operatória dos animais sadios mostrou que houve aumento da expressão desta citocina, induzida pelo tratamento com a L-arginina no grupo tratado ( $600 \pm 34,85$ ) (Figura 2 B) quando comparado ao grupo controle ( $336 \pm 13,63$ ) (Figura 2 A). A expressão de CD31 nos animais sadios do grupo tratados com L-Arginina foi significativamente maior ( $277,6 \pm 13,9$ ) (Figura 2 H) que no grupo controle ( $152,8 \pm 9,3$ ) (Figura 2 G).

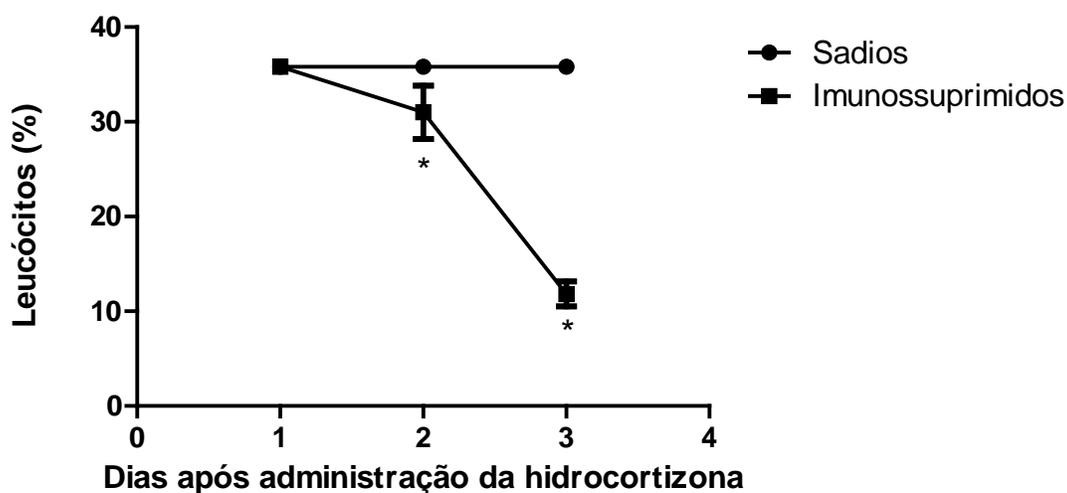


**Figura 2** – Imunohistoquímica da ferida de segunda intenção aos 7 DPO dos animais sadios. Expressão de TGF- $\beta$  do animal controle (A) e animal tratado com L-Arginina (B), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para essa citocina (C). Expressão de iNOS no animal controle (D) e animal tratado com L-Arginina (E), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para essa enzima (E). Expressão de CD 31 do animal controle (G) e animal tratado com L-Arginina (H), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para esse marcador (I). Diferença significativa para  $p < 0,001$ , teste T de Student.

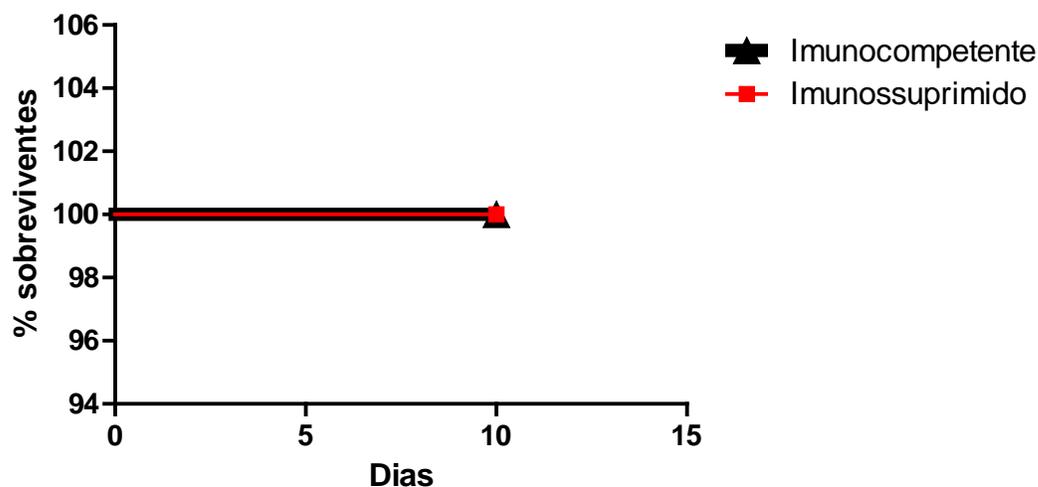
#### 4. 2 Análise da cicatrização em animais imunossuprimidos

Para comprovar a importância da arginina no processo de cicatrização na imunossupressão, camundongos Swiss foram tratados com 2,5 ml de hidrocortisona (25 mg/kg) por via intraperitoneal durante 2 dias consecutivos (BODINET *et al*, 2002). Para confirmar a eficácia do método, no dia da cirurgia, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos do sangue circulante dos animais (Figura 2). Os animais que apresentaram uma redução na taxa de leucócitos maior que 30% foram selecionados para fazer parte do grupo imunossuprimido. Os animais que não atingiram esta taxa mínima de redução (2 animais), não foram incluídos neste grupo experimental e foram sacrificados.

A análise taxa de mortalidade nos animais selecionados para este grupo demonstrou que todos sobreviveram durante a execução dos experimentos (Figura 3).



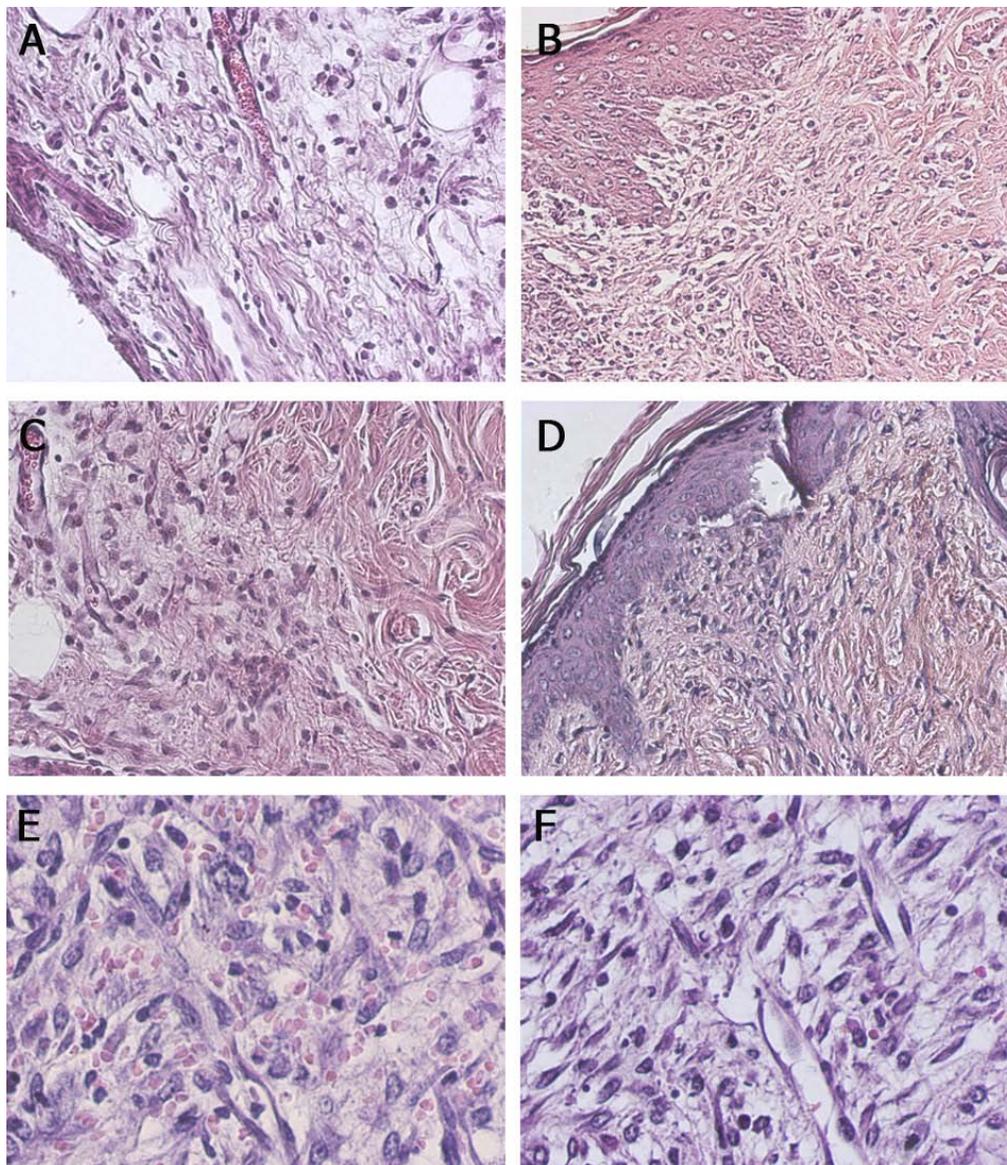
**Figura 3** – Relação leucócito em função do tempo dos animais tratados com hidrocortisona 2,5 ml de 25 mg/kg por via intraperitoneal ( $p < 0,001$ ).



**Figura 4** – Taxa de sobrevivência em função do tempo dos animais tratados com 25 mg/kg por via hidrocortisona intraperitoneal 2,5ml.

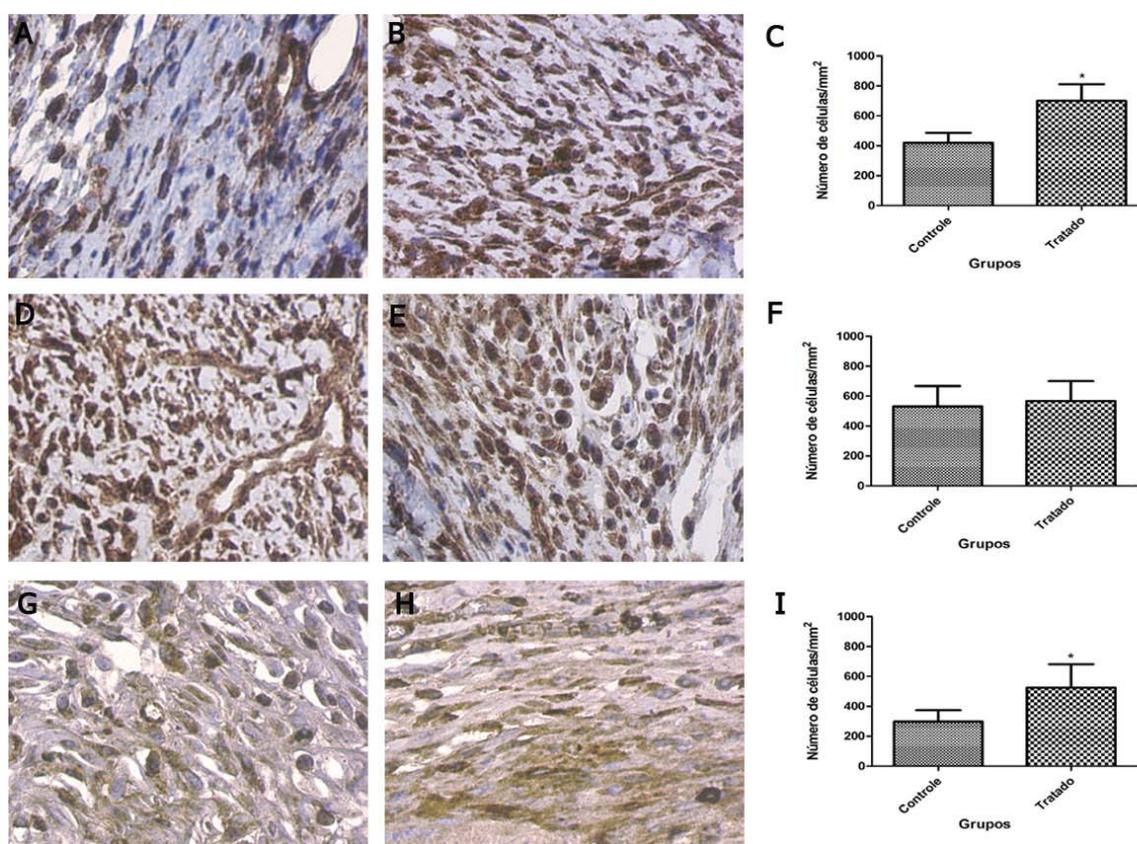
A análise macroscópica das feridas cirúrgicas, no 5 DPO, mostrou que o grupo imunossuprimido, que não recebeu tratamento com a L-arginina apresentou um edema maior, vermelhidão e epitelização menos desenvolvida quando comparado com o grupo que recebeu o tratamento com a L-arginina. No 7 DPO o grupo tratado com L-Arginina apresentou uma ferida mais contraída, sem sinal de edema e com um quadro de reparo bem mais desenvolvido que o grupo que não recebeu o tratamento. A análise microscópica do tecido de granulação da ferida cirúrgica dos animais imunossuprimidos tratados com L-Arginina no 5 DPO (Figura 5 C) não mostrou diferença no padrão do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo sem tratamento (Figura 5 A) no mesmo período. No 7 DPO o tecido de granulação da ferida operatória do grupo tratado (Figura 5 D) apresentou uma menor quantidade de células inflamatórias e maior densidade de fibroblastos e vasos neoformados que o grupo sem tratamento (Figura 5 B).

No 7 DPO da ferida com punch dos animais imunossuprimidos que não receberam tratamento com L-Arginina (Figura 5 E) foi observado células inflamatórias, densidade de vasos neoformados e fibroblastos em menor quantidade quando comparado com os animais tratados (Figura 5 F).



**Figura 5** - Ferida operatória de animal imunossuprimido sem tratamento aos 5 DPO (A) HE 400x e aos 7 DPO (B) HE 200x. Ferida operatória de animal imunossuprimido tratado com L-Arginina aos 5 DPO (C) HE 400x e aos 7 DPO (D) HE 200x. Ferida de segunda intenção aos 7 DPO de animal imunossuprimido sem tratamento (E) e tratado com L-Arginina (F) HE 200x.

A expressão de iNOS nos animais imunossuprimidos não apresentou diferença significativa entre o grupo tratado com L-Arginina ( $567,2 \pm 29,83$ ) (Figura 6 E) e o grupo controle ( $531,2 \pm 30,46$ ) (Figura 6 D). A expressão de TGF- $\beta$  no grupo tratado com L-Arginina (Figura 6 B) aumentou significativamente ( $700 \pm 24,78$ ) quando comparado ao grupo controle ( $420,8 \pm 14,64$ ) (Figura 6 A). A expressão de CD 31 foi maior no grupo que recebeu tratamento com L-Arginina ( $525,6 \pm 34,75$ ) (Figura 6 H) que no grupo controle ( $297,6 \pm 13,92$ ) (Figura 6 G)  $p < 0,05$ .



**Figura 6** – Imunohistoquímica da ferida de segunda intenção aos 7 DPO dos animais imunossuprimido. Expressão de TGF- $\beta$  do animal controle (A) e animal tratado com L-Arginina (B), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para essa citocina (C). Expressão de iNOS no animal controle (D) e animal tratado com L-Arginina (E), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para essa enzima (F). Expressão de CD 31 do animal controle (G) e animal tratado com L-Arginina (H), gráfico mostrando a quantificação de células marcadas para esse marcador (I). Diferença significativa para  $p < 0,001$ , teste T de Student.

Para avaliar a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CCR5 na ferida operatória dos animais normais e imunossuprimidos, tratados ou não com a L-arginina, o tecido foi macerado e a presença de mRNA foi analisado por qRT-PCR. Comparado com a expressão do gene constitutivo dos animais normais não tratado observou-se que o tratamento aumentou a expressão de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  nos animais normais no 5DPO. Com 7DPO observou-se uma repressão da expressão destes genes (tabela 2). A expressão dos genes para TNF - $\alpha$  e CCR-5 dos animais imunossuprimidos e tratados com a L-arginina não foi alterada no tempo de 5DPO, porém com 7DPO houve aumento da sua expressão. A expressão do gene da IL1 $\beta$  apresentou-se reprimido com 5DPO e teve sua expressão normalizada no 7DPO (tabela 2).

**Tabela 2** – Fold dos animais sadios e imunossuprimidos tratados com L-Arginina nos tempos de 5 e 7 DPO.

<b>Genes</b>	<b>Sadios tratados 5DPO</b>	<b>Sadios tratados 7DPO</b>	<b>Imunossuprimidos tratados 5DPO</b>	<b>Imunossuprimidos tratados 7DPO</b>
TNF - $\alpha$	2,05 $\pm$ 0,3	0,20 $\pm$ 0,1	0,99 $\pm$ 0,08	4,04 $\pm$ 0,3
IL1- $\beta$	6,20 $\pm$ 2,9	0,13 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,009	0,61 $\pm$ 0,14
CCR5	1,56 $\pm$ 0,3	0,44 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,61

Quando comparamos a expressão destes genes entre os animais normais tratados com a L-arginina e os animais imunossuprimidos tratados com a L-arginina, observamos

que no 5DPO, os animais imunossuprimidos apresentaram uma expressão reduzida de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  e uma expressão normal de CCR5. No 7DPO observamos que os animais imunossuprimidos aumentaram a expressão de todos os genes, quando comparados com os animais sadios tratados com a L-arginina no mesmo tempo. (tabela 3).

**Tabela 3** – Fold dos animais sadios tratados e imunossuprimidos tratados com L-Arginina nos tempos de 5 e 7 DPO.

<b>Genes</b>	<b>Imunossuprimidos tratados 5DPO</b>	<b>Imunossuprimidos tratados 7DPO</b>
TNF- $\alpha$	0,43 $\pm$ 0,06	12,6 $\pm$ 0,8
IL1 $\beta$	0,08 $\pm$ 0,005	4,03 $\pm$ 0,4
CCR5	0,59 $\pm$ 0,14	5,31 $\pm$ 0,7

Analisando a expressão destes genes nas feridas de segunda intenção, observamos que todos eles estão reprimidos, após 7 dias de cicatrização, independentemente da condição imunológica do animal ou do tratamento com L-arginina (tabela 4). A comparação entre os animais sadios mostra um aumento na expressão dos genes de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  e o gene para CCR5 fica suprimido (tabela 5).

**Tabela 4** – Fold dos animais sadios sem tratamento comparado aos animais imunocompetentes tratados com L-Arginina, imunossuprimidos sem tratamento e imunossuprimidos controles

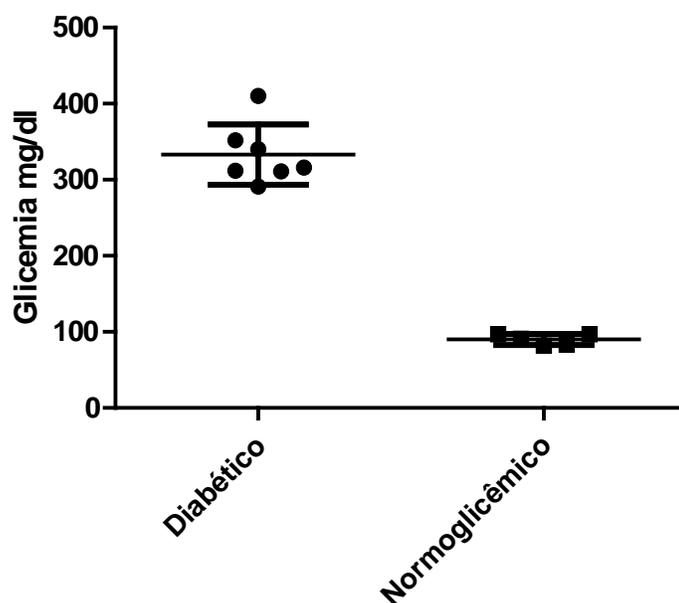
<b>Genes</b>	<b>Sadios tratados com L-Arginina</b>	<b>Imunossuprimidos sem tratamento</b>	<b>Imunossuprimidos tratados com L-Arginina</b>
TNF- $\alpha$	0,24 $\pm$ 0,5	0,36 $\pm$ 0,3	0,49 $\pm$ 0,2
IL1- $\beta$	0,24 $\pm$ 0,5	0,009 $\pm$ 0,001	0,046 $\pm$ 0,008
CCR5	0,06 $\pm$ 0,2	0,08 $\pm$ 0,01	0,062 $\pm$ 0,01

**Tabela 5** – Fold dos animais imunossuprimidos sem tratamento comparado ao imunossuprimidos tratados.

<b>Genes</b>	<b>Sadios tratados com L-Arginina</b>	<b>Imunossuprimidos sem tratamento</b>	<b>Imunossuprimidos tratados com L-Arginina</b>
TNF- $\alpha$	0,24 $\pm$ 0,5	0,36 $\pm$ 0,3	0,49 $\pm$ 0,2
IL1 $\beta$	0,24 $\pm$ 0,5	0,009 $\pm$ 0,001	0,046 $\pm$ 0,008
CCR5	0,06 $\pm$ 0,2	0,08 $\pm$ 0,01	0,062 $\pm$ 0,01

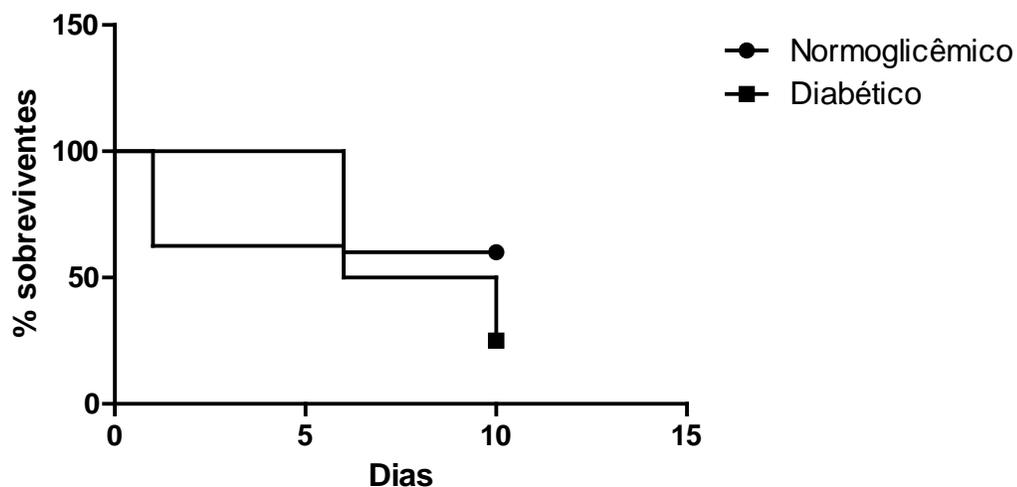
### 4.3 Análise da cicatrização dos animais diabéticos

Para comprovar a influência do diabetes no processo de cicatrização, camundongos C57Bl/6 foram tratados com estreptozotocina por via intraperitoneal (Gallagher *et al*, 2007). Para confirmar a condição de diabetes, no dia da cirurgia, foi realizada determinação da glicemia por glicosímetro e selecionados os animais que apresentaram glicemia superior a 150 mg/dl para serem incluídos no grupo diabético (Figura 6).



**Figura 7** – Gráfico representado as taxas de glicose dos animais normais ou diabéticos após o tratamento com estreptozotocina. A determinação da glicose foi realizada no dia dos procedimentos cirúrgicos e foram considerados diabéticos os animais com glicemia > 150 mg/dl.

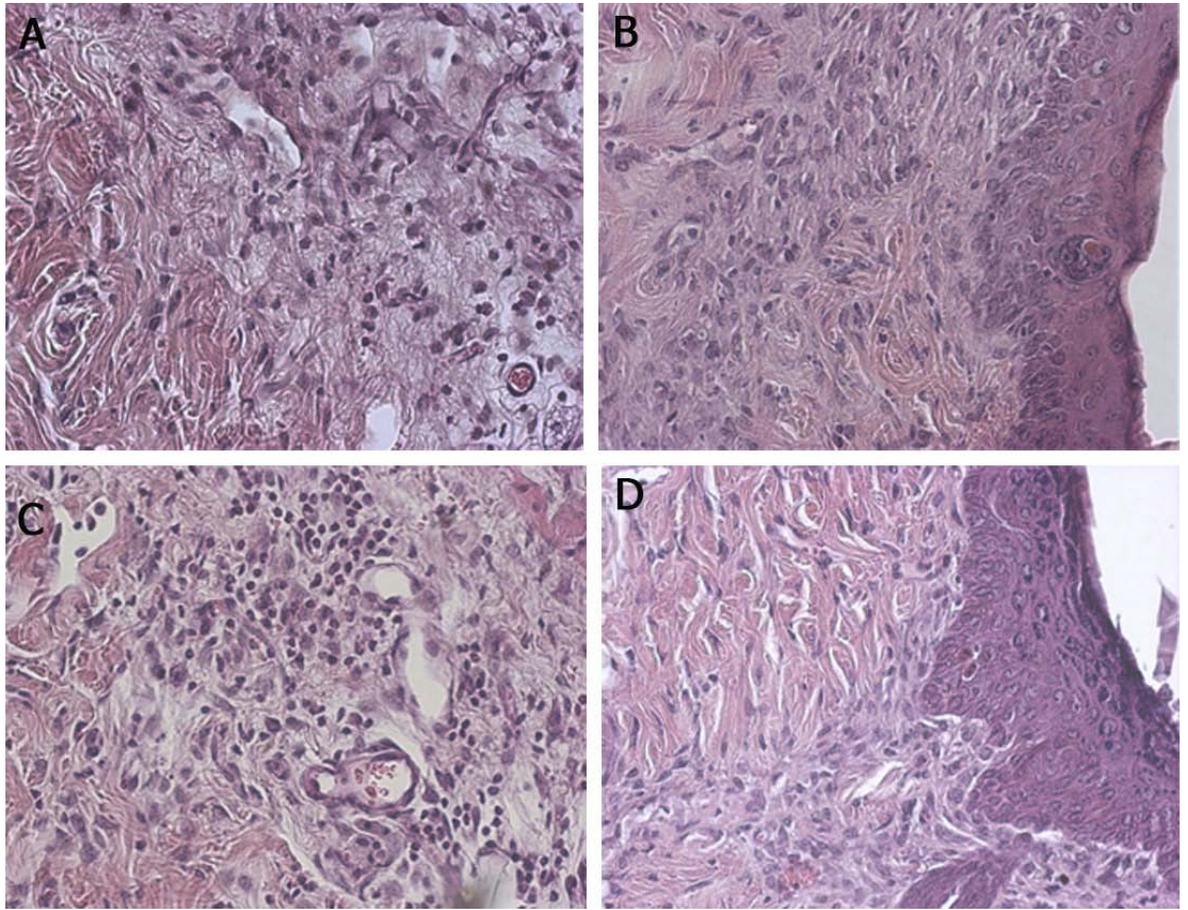
A taxa de sobrevivência dos animais foi de apenas 25%, comparando-se com os animais sadios. O período avaliado foi desde a indução até o dia o sacrifício (Figura 7).



**Figura 8** – Taxa de sobrevivência dos animais normais ou diabéticos após o tratamento com estreptozotocina.

A análise macroscópica da ferida operatória dos animais diabéticos mostrou que a ferida dos animais tratados apresentou menor edema, vermelhidão, maior contração e melhor quadro de reparo quando comparado com os animais tratados no 5 DPO. No grupo não tratado, alguns animais apresentaram focos hemorrágicos indicando um processo de reparo retardado e incompleto no 7 DPO. Em nenhum dos grupos foi observado processo infeccioso por bactérias.

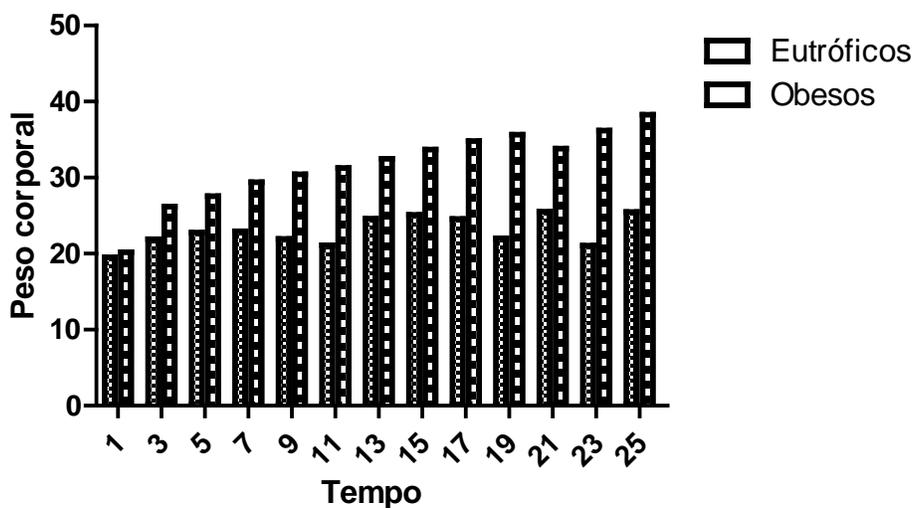
No grupo diabético tratado 5 DPO (Figura 9 C) a análise microscópica mostrou haver uma maior epitelização e neovascularização, tecido de granulação similar com mesmas características de infiltrado celular (Figura 9 A). No 7 DPO a ferida operatória dos animais diabéticos sem tratamento (Figura 9 B) apresentaram um tecido de granulação menos denso, com menor quantidade de vasos e fibroblastos quando comparados ao grupo tratado e uma epitelização menos desenvolvida (Figura 9 D).



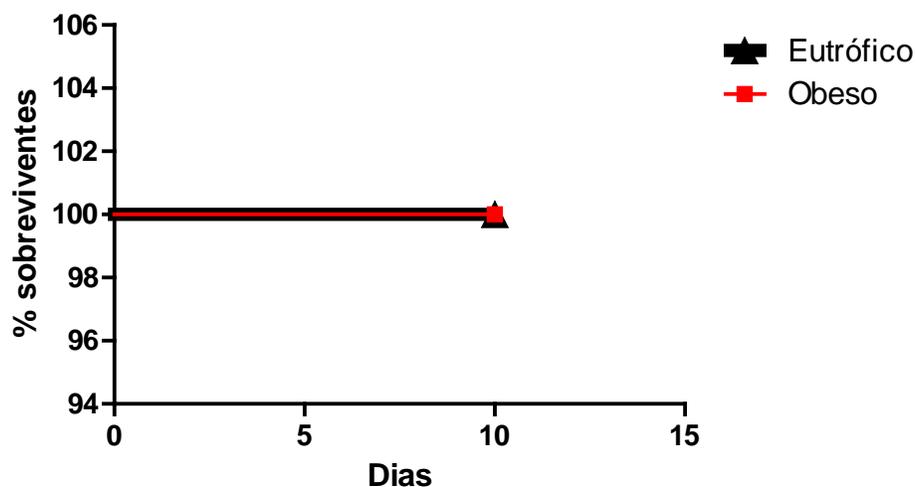
**Figura 9** – Tecido de granulação de ferida cirúrgica de animal diabético sem tratamento aos 5 DPO (A) e aos 7 DPO HE 400x. Tecido de granulação de animal diabético tratado com L-Arginina aos 5 DPO e aos 7 DPO HE 400x

#### 4. 4 Análise da cicatrização dos animais obesos

A partir do desmame os animais selecionados para fazer parte do grupo obeso passaram a receber a ração hipercalórica individualmente e seus pesos foram aferido regularmente, de 2 em 2 dias, durante um mês e os indivíduos que apresentaram peso superior a 38.28 g foram incluídos no grupo obeso (peso máximo dos animais eutróficos 25.52 g  $p < 0.001$ ) (Figura 10). Durante o experimento não se observou morte no grupo obeso e no seu controle (Figura 11).

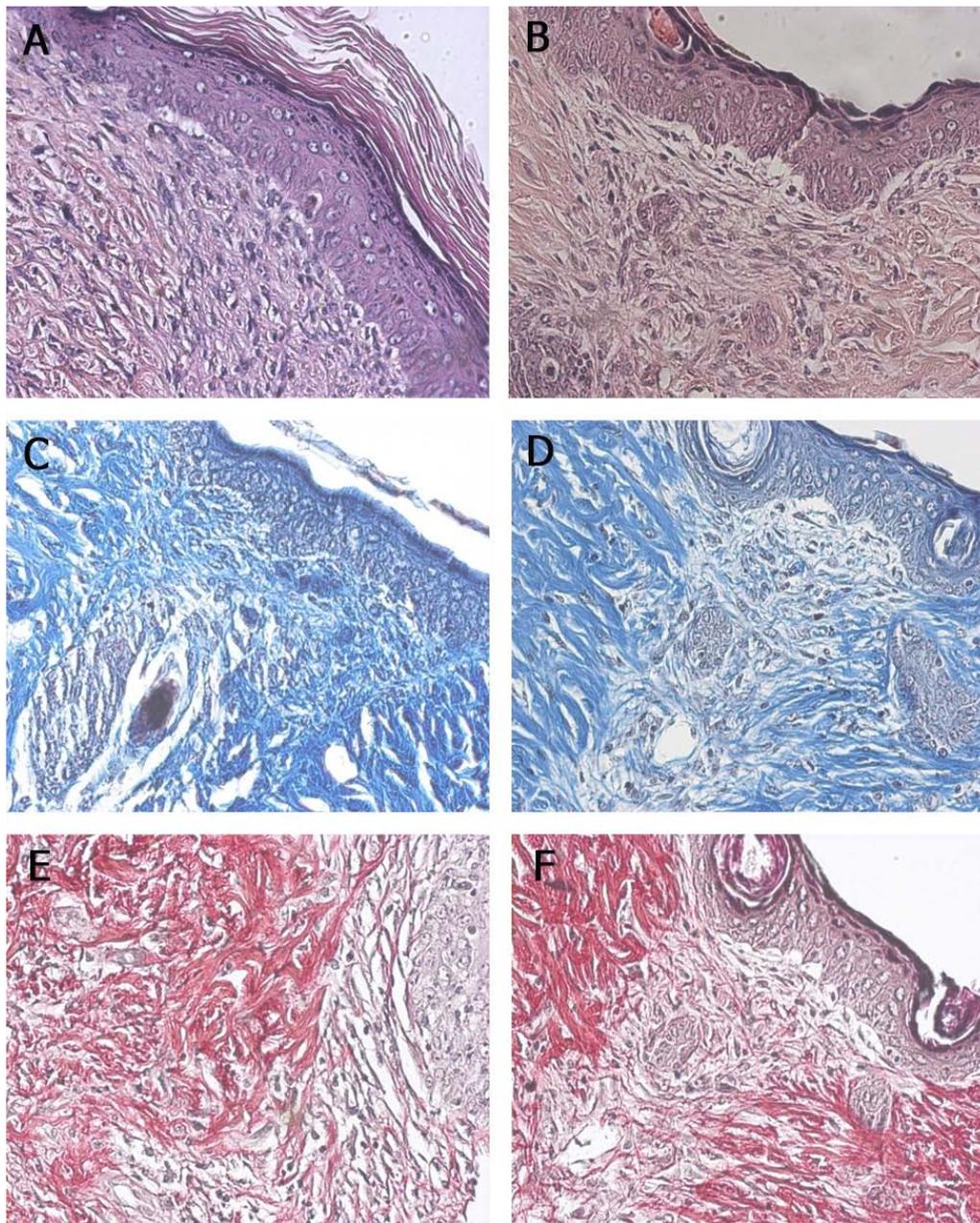


**Figura 10** - Gráfico do ganho de peso em função do tempo dos animais que receberam a ração hipercalórica em relação ao controle, animais que receberam ração Purina. Diferença estatística significativa após 25 dias da dieta.



**Figura 11** – Taxa de sobrevivência dos animais obesos e eutróficos em função do tempo durante o período de tratamento com a ração hipercalórica até o dia do sacrifício.

A análise macroscópica do grupo obeso mostrou que houve um processo de reparo mais rápido no grupo tratado com L-Arginina. No sétimo dia nos animais tratados não se observavam edema ou vermelhidão. A análise microscópica do grupo obeso tratado com L-Arginina, no 7 DPO (Figura 12 A), mostrou um epitélio moderadamente mais desenvolvido, tecido de granulação bem constituído e uma quantidade maior de fibras colágenas (Figura 12 B e C) além infiltrado celular misto, apresentando também reduzido número de polimorfonucleares.



**Figura 12** – Tecido de granulação aos 7 DPO de ferida operatória de animal sadio tratado (A) e obeso tratado (B) HE 400x. Animal sadio tratado (C) e obeso tratado (D) TM 400x e animal sadio tratado (E) e obeso tratado com L-Arginina (F) Picro Sírius 400x.

## 5. DISCUSSÃO

A lesão tecidual inicia um ciclo de inflamação, migração celular, replicação e deposição de tecido conectivo para restaurar a integridade da área lesionada. Está bem definido que linfócitos T iniciam o mecanismo modulatório que na cicatrização de feridas através de uma variedade de mecanismos ainda não totalmente elucidados (SHÄFFER & BARBUL, 1998).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que se segue a lesão e é orquestrada por uma série de mediadores inflamatórios que modulam células do sistema imunitário com a finalidade de reparar a área lesionada. Algumas situações comprometem esse mecanismo e podem acarretar em complicações mais sérias (MENKE, 2006). Os aminoácidos vêm sendo apontados como importantes fontes de substrato para o sistema imunológico, assim um ótimo balanço na dieta e a circulação deles são cruciais para que a manutenção, o crescimento e a proliferação das células daquele sistema (WU, 2009). O metabolismo da arginina é determinado pela iNOS e pelas isoformas da arginase (isoformas I e II). A iNOS é induzida por citocinas da resposta imunológica de padrão Th1 (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) enquanto a arginase é induzida por citocinas da resposta Th2 ou outros reguladores imunológicos como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  e prostaglandinas E2 (BANSAL & OCHOA, 2003; MUNDER, 2009). Modelos *in vitro* têm demonstrado que a presença da L-Arginina em meios de cultura aumenta expressão de linfócitos T CD3 $\zeta$  e que na ausência desse aminoácido há uma produção reduzida de IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10 (ZEA *et al*, 2004) a L-Arginina também aumenta a resposta de linfócitos T CD 8<sup>+</sup> na apresentação de antígenos (OCHOA, 2001).

Em nossos dados, a redução dos níveis da iNOS no grupo sadio tratado com L-Arginina e o respectivo aumento da produção de TGF- $\beta$  mostraram que o tratamento melhora a condição de cicatrização da ferida (Figura 6A e 6C). O TGF- $\beta$  é um regulador crucial na deposição da matriz extracelular, colágeno e fibronectina (SCHILLER, 2004). A supressão dos genes para TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , CCR5 no 7 DPO dos animais saudáveis tratados mostrou que o processo inflamatório nessa condição encontra-se em um estágio mais brando, numa fase de resolução final do reparo. A IL-1 e o TNF- $\alpha$  são citocinas essenciais para o início da fase inflamatória do processo de reparo tecidual (TSIROGIANN, 2006). No grupo sadio tratado com L-Arginina, os animais também apresentaram na análise histológica um tecido de granulação mais consistente com vasos em maior quantidade, fato corroborado com o aumento da expressão de CD 31.

A imunossupressão provocada pela administração da hidrocortisona compromete a cicatrização por interferir na inflamação (ALBERT *et al* 2008), sobretudo na produção de citocinas importantes nessa fase. Em nosso estudo os genes do TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  (Tabela 2) ainda estavam suprimidos e o gene para CCR5 não apresentou mudança na sua expressão no 5 DPO, porém no 7 DPO esses genes mostraram-se ativados. Ishida *et al.* (2006) descreveu a importância da família da IL-1 e o seu mecanismos, junto ao TGF- $\beta$  na cicatrização de feridas. O aumento de TGF-  $\beta$  também foi observado no grupo imunocomprometido tratado (Figura. 6D), assim como a expressão de CD 31 (Figura. 6F) mostram que o tratamento com a L-Arginina nessa condição atua de maneira a recuperar a condição fisiológica das células envolvidas na cicatrização uma vez que a histologia não mostrou diferença quanto ao tipo de infiltrado inflamatório e celular de ferida operatória do grupo controle e grupo experimental tratado com L-Arginina no 5 DPO, mas no 7 DPO as

células inflamatórias dos animais tratados já estavam em menor quantidade e o tecido de granulação apresentou uma consistência mais densa, com maior quantidade de vasos e fibroblasto, além de uma maior quantidade de colágeno (Figura. 4). Além de estar envolvido no recrutamento de outras células do sistema imunológico ao local da lesão, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  participam do processo de reepitelização e formação de novos vasos (HENRY & GARNER, 2003).

O quadro de reparo cicatricial de indivíduos diabéticos tem o agravante de apresentar complicações características como uma migração menor de linfócitos e polimorfonucleares ao sítio de reparo (HALLORAN & SLAVIN, 2002), além de um estágio inflamatório mais prolongado que de indivíduos saudáveis (ACOSTA *et al*, 2008). Nossos resultados da análise histopatológica apontam para um processo de reparo mais adiantado no grupo tratado com L-Arginina. Shi e Barbul (2003) descreveram que a suplementação sistêmica de L-Arginina melhora a cicatrização em camundongos diabéticos pelo aumento na deposição e na expressão de genes para colágeno tipo I e III, além de promover a maior produção de NO que atuaria direta e indiretamente na expressão de vários fatores, entre eles o NF- $\kappa$ B, que por sua vez regulariam a produção e liberação de citocinas e mediadores que melhoram o quadro de reparo. Estudos apontam que doadores exógenos de NO seriam as melhores opções no tratamento da ferida em diabéticos uma vez que na hiperglicemia, esse radical estaria diminuído na área da lesão (WITTE *et al*, 2002). A migração celular na diabetes é um fenômeno correlato ao da produção de componentes da matriz extracelular, e o TGF- $\beta$  é um dos vários componentes de um complexo mecanismo que são necessários para esse processo (JOO & SEOMUN, 2010). Em trabalho envolvendo camundongos diabéticos Witte *et al* (2002) relataram o comprometimento da

produção de NO e aumento da produção de ornitina, nesse trabalho não se avaliou a arginase, outra enzima fundamental no metabolismo da L-Arginina que também tem um mecanismo desconhecido no caso de reparo de feridas em indivíduos com hiperglicemia.

A obesidade tem sido apontada com um dos fatores que comprometem a cicatrização. O excesso de tecido adiposo pode influenciar nesse mecanismo devido ao aumento da produção de mediadores inflamatórios que desregulariam o reparo tecidual prolongando a fase inflamatória (BIONDO-SIMÕES *et al*, 2010). O comprometimento da microcirculação cutânea é outro fator modificado na obesidade que implica numa cicatrização imperfeita (YOSIPOVITCH *et al*, 2007). Nossos resultados apontam para uma melhora do processo de cicatrização do grupo tratado com L-Arginina (Fig. 12). A característica do infiltrado celular encontrado no tecido de granulação no grupo tratado a partir do 5 DPO sugere que a arginina estaria agindo no sentido de estimular a produção de mediadores inflamatórios que alterariam a migração celular na área lesionada. Nishimura *et al* (2009) já relataram as modificações celulares que ocorrem no tecido inflamado de indivíduos obesos. Apesar de ainda não estar claro o mecanismo de modulação dos macrófagos do tecido adiposo em pró-inflamatórios (M1) ou antiinflamatórios (M2) na obesidade, há uma tendência em se acreditar que eles tenham uma característica M1 (com produção aumentada de IL-1, IL-6 e CCR1), porém por se tratar de uma célula com grande plasticidade, poderia haver uma conversão dos mesmos para M2 sob estímulo do TGF- $\beta$  (FUENTES *et al*, 2010). A L-arginina estimulou a produção de TGF- $\beta$  nas feridas de animais saudáveis (Fig. 6C), é possível que o mesmo mecanismo tenha sido observado nos animais obesos.

A expressão de várias citocinas em modelos de ferida em cicatrização de camundongos apóia a idéia de que esse fenômeno se trata de um processo bastante

complexo por envolver o recrutamento de leucócitos e a ativação no sítio de inflamação de outras células do sistema imunológico. As citocinas são conhecidas por seu envolvimento no tráfego de vários tipos celulares, incluindo células mielóides, células linfóides, melanócitos, queratinócitos e células endoteliais. A IL-1 $\beta$  é secretada em tecidos não traumatizados em pequenas quantidades. Nas feridas em processo de cicatrização sua secreção atinge o pico em 12 horas após a injúria. A expressão de TGF- $\beta$  também é aumentada no reparo de feridas de ratos e porcos. A expressão regulada positivamente dessas citocinas, e a de outras já descritas na literatura MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 mostram a importância de células como o macrófago na fase inflamatória da cicatrização (BRYAN *et al*, 2005).

Os macrófagos e os neutrófilos são as principais células que lançam mediadores pró-inflamatórios na fase inflamatória da cicatrização. A ausência de neutrófilos e a presença de macrófagos é o principal indicativo de que a fase inflamatória está completa e que a fase proliferativa está se iniciando. Mesmo se tratando de um citocina de efeito muito pleiotrófico, se aceita que o TGF- $\beta$  estaria relacionado a uma fase resolutive do processo de cicatrização (ZHOU *et al*, 2010).

A fase inflamatória estimula as fases seguintes da cicatrização: fase proliferativa e de remodelação. Na fase proliferativa ocorre a síntese e deposição de colágeno além da angiogênese. O NO tem sido indicado como fator regulador de todas as fases. Já foi confirmada a habilidade do NO para modular citocinas quimiotáticas com IL-1, IL-6, IL-8 e TGF- $\beta$  além do controle da síntese de colágeno, angiogênese, proliferação celular e apoptose (AMADEU *et al*, 2010).

A proliferação, a síntese de colágeno e a remodelação da matriz apresentam funções chaves e cruciais da cicatrização de feridas. O NO participa da modulação dessas fases junto ao fibroblasto. Shi *et al* (2001) descreveu a importância da proliferação e da expansão clonal como essenciais para a função do fibroblasto após a migração celular.

Os mastócitos são células muito importantes na fase inicial do reparo tecidual devido a sua localização e aos produtos por ele secretados (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e PDGF). Mastócitos humanos lançam VEGF, TGF- $\beta$  e outros fatores de crescimento, além de serina proteases que degradam a matriz extracelular e assim prepara o entorno da área lesionada para o processo de angiogênese (NG, 2010).

Muitos linfócitos são capazes de modular a replicação de fibroblastos *in vitro*. Alguns fatores como o TGF- $\beta$  ou IFN- $\gamma$  são bem caracterizados, porém muitos outros mediadores que podem interferir na atividade de fibroblastos *in vitro* ainda têm sua atividade incompletamente caracterizada (SHÄFFER & BARBUL, 1998).

Os macrófagos não expressam altos níveis de citocinas e fatores de crescimento constitutivamente em seu estado não ativado, porém eles são altamente sensíveis as variações do microambiente ao seu redor e trazem em sua superfície numerosos receptores que ativam esses mediadores da resposta inflamatória, uma vez ativados os macrófagos ativam fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, resultando a ativação da inflamação. Em contra partida, em conjunto com o TLR2, 4, 7 e 9, a adenosina muda a expressão do macrófago para um perfil antiinflamatório reprimindo a expressão de citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-12 e MIP-1 $\alpha$  e sinergicamente regulando a expressão de VEGF para promover um perfil de resolução da ferida (MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

O processo inflamatório é acompanhado de uma sobrecarga de fluido secretado por células do sistema imunológico que resulta em uma resposta linfagiogênica em várias condições fisiológicas e patológicas. Na cicatrização de feridas em particular, esse mecanismo ainda não está muito bem esclarecido, embora a expressão de VEGF seja bem esclarecida durante a inflamação (SAARITO *et al*, 2006).

Este trabalho mostra que a utilização de moduladores imunológicos no reparo tecidual aplicados topicamente podem ser uma alternativa no reparo de feridas em condições que a mesma encontra-se comprometidas. Nesse contexto, novos ensaios com formulações mais estáveis devem ser aplicados no sentido de se melhorar a eficácia da L-Arginina na cicatrização de feridas em indivíduos obesos, diabéticos e imunossuprimidos.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- A utilização de imunomoduladores na cicatrização de feridas vem sendo apontada como uma alternativa em condições patológicas em que o reparo está comprometido. O uso do aminoácido L-Arginina parece ser uma opção boa, tendo em vista sua baixa toxicidade e boa metabolização pelo organismo
- A L-Arginina é um bom imunomodulador, embora sua via metabólica ainda não esteja totalmente elucidada em condições em que o reparo tecidual esteja comprometido como no caso da diabetes, imunossupressão e obesidade.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Aprofundar o estudo da via metabólica e da regulação imunológica da L-Arginina em condições quem o reparo de feridas está comprometido e assim propor a utilização sistemática desse aminoácido como alternativa farmacológica nessas condições.
- Desenvolver formulações mais sustentáveis de administração da L-Arginina topicamente para que esse produto alcance maior eficiência farmacológica.
- Avaliar a eficácia da L-Arginina no reparo tecidual em outras condições patológicas que promovam síndromes sistêmicas como o câncer ou desnutrição.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\*ABNT/NBR 14724, Agosto 2008

ACOSTA, J. B.; Del BARCO, D. G.; VERA, D. C.; SAVIGNE, W.; LOPEZ-SAURA, P.; NIETO, G. G.; SCHULTZ, G. S. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. **International Wounds Journal**. Vol. 5, n. 4, p. 530 – 539, out. 2008.

ALBERTI, L. R.; VASCONCELLOS, L.; PETROYANU, A. Resistência cicatricial sob efeitos de hidrocortisona local ou sistêmica em distintos períodos pós-operatórios. **Einstein**. Vol. 6, n. 3, p. 269 – 273, maio, 2008.

AMADEU, T. P.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Nitric Oxide donor improves healing IF applied on inflammatory and proliferative phase. **J Surg Res**. Vol. 149, n. 1, p. 84 – 93, set. 2008.

ARTHURS, Z. M.; CUADRADO, D.; SOHN, V.; WOLCOTT, K.; CARTER, P.; SEBESTA, J. Post-bariatric panniculectomy: pre-panniculectomy body mass index impact the complication profile. **Am J Surg**. Vol. 193, n. 5, p. 567 – 570, maio. 2007.

BASAL, V.; OCHOA, J. B. Arginine availability, arginase, and the immune response. **Curr Opin Clin Metab Care**. Vol. 6, n.2, p. 223 – 228, mar. 2003.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ZAMMAR, G. R.; FERNANDES, R. S.; BIONDO-SIMÕES, R.; MELLO, F. S. R.; NORONHA, L. Obesity and abdominal wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Vol. 25, n. 1, p. 86 – 92, jan/fev, 2010.

BODINET, C.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHEN, E.; FREUDENSTEIN, J. Effect of orally applied herbal immunomodulator on cytokine induction and antibody response in normal and immunosuppressed mice. **Phytomedicine**. Vol. 9, n. 7, p. 606 - 613, out. 2002.

BRONTE, V.; ZAVONELLO, P. Regulation of immune responses by L-Arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology**. Vol. 5, n. 8, p. 641 – 654, ago. 2005.

BRYAN, D.; WALKER, K. B.; FERGUSON, M.; THORPE, R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. **Cytokine**. Vol, 31, n. 6, p. 429 – 438, set. 2005.

CHALDAKOV, G. N.; FIORE, M.; DIMITROV, D.; PANCHEVA, R.; RANCIC, G.; ALOE, L. Homo obesus: a metabotrophin-deficient species. Pharmacology and nutrition insight. **Curr Pharm Des**. Vol. 13, n. 21, p. 2176 – 2179. 2007.

CHANG, C. I.; LIAO, J. C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am J Physiol**. Vol. 274 (pt 1/2), p. 342 – 348, jan. 1998.

CORREA, G.; SOTOMAYOR, C.E.; AOKI, M. P.; MALDONADO, C. A.; RABINOVICH, G. A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**. Vol.13, n.2, p. 119- 128, fev. 2003.

DE CASTRO, M. Efeito antiinflamatório e antiproliferativo dos glicocorticóides: Discordância ou concordância. **Arq Bras Endocrinologia e Metab.** Vol. 49, n. 3, p. 1 – 3, jun. 2005.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery(Oxford).** Vol. 26, n. 2, p. 31 – 37, fev. 2007.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet.** Vol. 366, n. 9498, p. 1736 – 1743, nov. 2005.

FUENTES, L.; RÖSZER, T.; RICOTE, M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: Role of Nuclear Receptor Signaling in macrophages. **Mediators Inflammatory.** Vol. 2010, p. 1 – 10, março, 2010.

GALLAGHER, K. A.; LIU, Z.; XIAO, M.; CHEN, H.; GOLDSTEIN, L. J. BUERK, D. G.; NEDEAU, A.; THOM, S. R.; VELAZQUEZ, O. C. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 $\alpha$ . **The Journal of Clinical Investigation.** Vol. 117, n. 5, p. 1249 – 1259, maio. 2007.

GORDO, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** Vol. 3, n. 1, p. 23 – 35, jan. 2003.

GREENHALGH, D. The role of apoptosis in wound healing. **The Int J Biochem Cell Biol.** Vol. 30, n. 9, p. 1019 – 1030, set. 1998.

GURTER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature.** Vol. 453, n. 453, p. 314-321, maio. 2008.

HALLORAN, C.; SLAVIN, J. P. Pathophysiology of wound healing. **Surgery (Oxford).** Vol. 5, n. 1, p. i – v, maio, 2002

HARDMAN, M. J.; WAITE, A.; ZEEF, L.; BUROW, M.; NAKAYAMA, T.; ASHCROFT, G. Macrophage migration inhibitory factor A central Regulator of wound healing. **American Journal of Pathology.** Vol. 167, n. 6, p. 1561 – 1574, dez. 2005.

HENRY, G.; GARNER, W. Inflammatory mediator in wound healing. **Surgical Clinic North America.** Vol. 83, n. 3, p. 483 – 507, jun. 2003.

HO, H.; ANTONOV, T.; JI, J.; IVASHIKIV, L. Lipopolysaccharide-induced expression of MMPs in human monocytes is suppressed by IFN- $\gamma$  via superinduction of ATF-3 and suppression of AP-1 proteins. **J Immunology.** Vol. 181. n. 7, p. 5089 – 5097, out. 2008.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; KIMURA, A.; MATSUSHIMA, K.; MUDAIDA, N. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF- $\kappa$ B activation and a reciprocal suppression of TGF- $\beta$  signal pathway. **J Immunol.** Vol. 176, n. 9, p. 5598-5606, maio. 2006.

JOO, C. K.; SEOMUN, Y. Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF $\beta$ 1-stimulates cell migration in skin and cornea wound healing. **Cell Adh Migr.** Vol.2, n. 4, p. 252 – 255, out. 2008.

KHANNA, S.; BISWAS, S.; SHANG, Y.; COLLARD, E.; KAUH, C.; BHASKER, V.; GORDILLO, G. M.; SEN, C. K.; ROY, S. Macrophages dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetics mice. **Plos ONE.** Vol. 5, n. 3, p. 1 -12, mar. 2010.

- LIDLAW, S. A.; KOPPLE J. D.; Newer concepts of the indispensable amino acids. **Am J Clin Nutr.** Vol. 46, n. 4 p. 593 – 605, out. 1987.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGER T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** Vol. 25, n. 4, p. 402 -408, dez. 2001.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **TRENDS in Cell Biology.** Vol. 15, n. 11, p. 599 – 607, nov. 2005.
- MICHALANY, J. Cura das Feridas e Tecido de Granulação. Adiposidade. Capítulo 40, p. 271. *In: Anatomia Patológica Geral na Prática Médico-Cirúrgica.* 2<sup>o</sup> Edição, Artes Médicas, 2000.
- MONACO, J. L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing an overview. **Clin Plastic Surg.** Vol. 30, n. 1, p. 1-12, jan. 2003.
- MORRISON, A. C.; CORRELL, P. H. Activation of the stem cell-derived tyrosine kinase/ROK receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein results in the induction of arginase activity in murine peritoneal macrophages . **J Immunol.** Vol. 168, n. 2, p. 853 – 860, jan. 2002.
- MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **Br J Pharmacol.** Vol. 158, n. 3, p. 638 – 651, out. 2009. Revisão.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORÁN, J. M.; CENTERO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunology.** Vol. 163, n. 7, p. 3371 – 3377, out. 1999.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J Immunol.** Vol. 160, n. 11, p. 5347 – 5354, jun. 1998.
- MUÑOS, M.; MAZURE, R. A.; CULEBRAS, J. M. Obesity and the immune system. **Nutr Hosp.** Vol. 19, n. 6, p. 319 – 324, Nov/dez. 2004.
- MURKHERJEE S. & MURKHERJEE. U. A comprehensive review of immunosuppression used for liver transplantation. **Journal of Transplantation.** Vol. 9, n.16, p. 1 – 20, jul. 2009.
- NASCIMENTO, A. F.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. S.; LUVIZZOTO, L. A. M.; NOGUEIRA, C. R.; CICOONA, A. C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metab.** Vol. 56. n. 6, p. 968 - 977, ago. 2008.
- NATHAN MENKE & ROBERT DIELGELMANN Biochemical Pathways of Wound Healing: Implication for Development of Disease-Specific Diagnostics. Capítulo 41, p. 167 – 187. *In: Advances in Clinical Chemistry.* 1<sup>o</sup> Edição, Elsevier. 2006.
- NATHAN, C. Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** Vol. 6, n. 12, p. 3051 – 3064, set. 1992.
- NG, M. F. The role of mast cells in wound healing. **Int Wound J.** Vol. 7, n. 1, p. 55 – 61, fev. 2010.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M.; ETO, K.; YAMASHITA, H.; OHSUGI, M.; OTSU, M.; HARA, K.; UEKI, K.; SUGIURA, S.; YOSHIMURA, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R. CD 8<sup>+</sup> effector T cell contribute to macrophages recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**. Vol. 15, n. 8, p. 914 – 920, ago, 2009.

OCHOA, J. B.; STRANGE, J.; KEARNEY, P.; GELLIN, G.; ENDEAN, E.; FITZPATRICK, E. Effects of L-Arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**. Vol. 25, n. 1, p. 23 – 29, jan/fev. 2001.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Sur**. Vol. 187, n. 5, p. 11 – 16, 2004. Revisão.

PERAZONI, E.; MARIGO, I.; DOLCETTI, L.; UGEL, S.; SONDA, N.; TASCHIN, E.; MANTELLI, B.; BRONTE, V.; ZAVONELLO, P. Role of arginine in immunity and immunopathology. **Immunobiology**. Vol. 212, n. 9, p. 795 – 812, nov. 2008.

QUTUB, A. A.; MAC GABHANN, F.; KARAGIANNIS, E. D.; VEMPATI, P.; POPEL, A. S. Multiscale model of angiogenesis. **IEEE Eng Med Biol Mag**. Vol. 28, n. 2, p. 14 – 31, mar/abr. 2009.

RHEN T. & CIDLOWSKY. Antiinflammatory action of glucocorticoids new mechanisms for old drugs. **N Eng J Med**. Vol. 353, n. 16, p. 1711 – 1723, out. 2005.

ROBSON, M. C. Cytokine manipulation of the wound. **Clin Plasti Surg**. Vol. 30, n. 1, p. 57 – 65, jan. 2003.

RODRIGUES, P. C.; QUICENE, D. G.; OCHOA, A. C. L-Arginine availability regulates T-lymphocytes cell-cycle progression. **Blood**. Vol. 109, n. 4, p. 1568 – 1573, fev. 2007.

SAARITO, A.; TAMMELA, T.; FÄRKKILÄ, A.; KÄRKKÄINEN,.; SOUMINEN, E.; YLA-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Vascular Endothelial Growth Factor-C accelerates diabetic wound healing. **Am J Pathol**. Vol. 169, n. 3, p. 1080 – 1087, set. 2006.

SCHÄFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **Br J Surg**. Vol. 85, n. 4, p. 444 – 460, abr. 1998.

SCHILLER, M.; JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. **J Dermatol Sci**. Vol. 35, n. 2, p. 83 – 92, ago. 2004. Revisão.

SCHRAMM, J. C.; DINH, T.; VEVES, A. Microvascular changes in the diabetic foot. **Int Low Extrem Wounds**. Vol. 5, n. 3, p. 149 – 159, set. 2006.

SHI, H. P.; EFRON, D. T.; MOST, D.; BARBUL, A. The role of iNOS in wound healing. **Surgery**. Vol. 130, n. 2, p. 225 – 229, ago, 2001.

SHI, H. P.; MOST, D.; EFRON, D. T.; WITTE, M. B.; BARBUL, A. Supplemental L-Arginine enhances wound healing in diabetic rats. **Wound Repair Regen**. Vol. 11, n. 3, p. 198 – 203, maio/jun. 2003.

STECHMILLER, J. K.; CHILDRESS, B.; COWAN, L. Arginine supplementation and wound healing. **Nutr Clin Pract**. Vol. 20, n. 52, p. 52 – 61, fev. 2005.

STRODTBECK, F. Physiology of wound healing. **Newborn and Infant Nursing Review**. Vol. 1, n. 1 p. 43-52, mar. 2001.

TSIROGIANN, A. K.; MOUSTSOPOULOS, N. M.; MOUSTSOPOULOS H. M. Wound healing: Immunological aspects. **Injuri, Int. Journal Care Injured**. Vol. 37, n. 1, p. 5-12, abr. 2006. Suplemento.

VAN BELLE, T. L., TAYLOR, P.; VON HERRATH, M. G. Mouse model for type I diabetes. **Drug Discov Today Dis Model**. Vol. 6, n. 2, p. 41 – 45, verão, 2009.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ; V. The wound healing progress: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res**. Vol. 37, n. 5, p. 1528 – 1542, out. 2009.

WANG, W.; PAN, H.; MURRAY, K.; JEFFERSON, B.; LI, Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. **Am J Pathol**. Vol. 174, n. 2, p. 541 – 549, fev. 2009.

WILGUS, T. A.; Immune cell in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacol Res**. Vol. 58, n. 2, p. 112-116, ago. 2008.

WILLIAMSON, D.; HARDING, K. Wound healing. **Medicine**. Vol. 32, n. 12, p. 4 – 7, dez. 2004.

WILSON, J. A. & CLARK J. J. Obesity: impediment to wound healing. **Critical Care Nurs Q**. Vol. 26, n. 2, p. 119 – 132, abr/jun. 2003.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Arginine physiology and its implication for wound healing. **Wound Repair Regen**. Vol. 11, n. 6, p. 419- 423, nov/dez. 2003.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound healing. **Am J Surg**. Vol. 183, n. 4, p. 406 – 412, abr. 2002

WITTE, M. B.; KIYAMA, T.; BARBUL. A. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. **Br J Surg**. Vol, 89, n. 12, p. 1594 – 1601, dez. 2002.

WITTE, M. B.; THORNTON, F. J.; TANTRY, U.; BARBUL, A. L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: Involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. **Metabolism**. Vol. 52, n. 10, p. 1269 – 1273, out, 2002.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions and nutrition. **Amoni Acids**. Vol. 37, n. 3, p. 1 – 17, março, 2009.

WU, G.; BAZER, F. W.; DAVIS, T. A.; KIM, S. W.; LI, P.; RHOADS, J. M.; SATTERFIELD, M. C. SMITH, S. B.; SPENCER, T. E.; YIN, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**. Vol. 37, n. 1, p. 153 – 168, maio. 2009.

YOSIPOVITCH, G.; DeVORE, A.; DAWN, A. Obesity and the skin: physiology and manifestations of obesity. **J Am Acad Dermatol**. Vol. 56, n. 6, p. 901 – 916, jun. 2007.

YOUNG, V. R.; EL-KHOURE, A. The notion of the nutritional essentiality of amino acids, revisited, with a note on the indispensable amino acids requirements in adults. *In: Amino acids metabolism and therapy in health and disease*. p. 267 – 308. Boca Raton. 1995.

ZDANOWICK, M. M. The Pharmacology of immunosuppression. **Am J Pharmaceutical Edu.** Vol. 73, n. 8, p. 1 – 10, dez. 2009.

ZHOU, Q.; YANG, L.; WANG, Y.; QU, M.; CHEN, P.; WANG, Y.; XIE, L.; ZHAO, J.; WANG, Y. TGF- $\beta$  mediates transition of corneal fibroblasts from a proinflammatory state to a profibrotic state through modulation of histone acetylation. **J Cell Physiol.** Vol, 224, n. 1, p. 135 – 143, jul. 2010.

## **Anexos**

<b>Quantidade por porção 30g (4 ½ biscoitos)</b>		<b>%VD(*)</b>
<b>Valor energético</b>	160 Kcal = 672 Kj	8%
<b>Carboidrato</b>	18g	6%
<b>Proteína</b>	1,4g	2%
<b>Gorduras totais</b>	9,0g	16%
<b>Gordura saturada</b>	4,8g	21%
<b>Gorduras trans</b>	Não contém	**
<b>Fibras alimentares</b>	0,8g	3%
<b>Sódio</b>	41mg	2%

## **Anexo II**

### **Informação nutricional - Bolacha Wafe Bono®**

<b>Porção 20g</b>		<b>%VD(*)</b>
<b>Valor energético</b>	145 Kcal	7%
<b>Carboidrato</b>	3,1g	1%
<b>Proteína</b>	7,2g	10%
<b>Gorduras totais</b>	11g	20%
<b>Gordura saturada</b>	2,4g	11%
<b>Gorduras trans</b>	Não contém	**
<b>Gorduras monoinsaturadas</b>	Não contém	**
<b>Sódio</b>	89 mg	4%

**Informação nutricional - Amendoim Yoki com pele®**

<b>Quantidade por porção 100g</b>		<b>%VD(*)</b>
<b>Valor energético</b>	65Kcal=273kJ	3%
<b>Carboidrato</b>	11g	4%
<b>Proteína</b>	1,4g	2%
<b>Gorduras totais</b>	1,6g	3%
<b>Gordura saturada</b>	1,0g	5%
<b>Gorduras trans</b>	Não contém	**
<b>Fibras alimentares</b>	0g	0%
<b>Sódio</b>	20mg	1%
<b>Cálcio</b>	52mg	5%

**Informação Nutricional – Leite Moça®**

### Informação Nutricional - Óleo de soja Soya®

Porção 13g (1 colher de sopa)		%VD(*)
<b>Valor energético</b>	108 Kcal = 454 Kj	5%
<b>Carboidrato</b>	0g	0%
<b>Proteína</b>	0g	0%
<b>Gorduras totais</b>	12g	22%
<b>Gordura saturada</b>	2g	9%
<b>Gorduras trans</b>	Não contém	**
<b>Gorduras monoinsaturadas</b>	3g	**
<b>Sódio</b>	0mg	0%
<b>Vitamina E</b>	2,8mg	28%

% Valor diário de referência com base em uma dieta de 2.000kJ ou 8.400Kj. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo se suas necessidades energéticas. \*\* VD não estabelecido.

### Composição centesimal da ração para roedores Labina®

Valor Calórico	275cal
Proteína Bruta	23g
Extrato etéreo (Lipídeos)	4g
Fibra	5g
Cálcio	1500mg
Fósforo	850mg
Cinzas	10g
Arginina	1,5g
Isoleucina	1000mg
Lisina	1400mg
Metionina	400mg
Cistina + metionina	800mg
Treonina	900mg
Triptofano	300mg
Vitamina A	750mcg RE
Vitamina D3	10mcg
Vitamina E	8mg $\alpha$ -TE
Menadiona	0,64mg
Colina	280mg
Niacina	22mg
Pantotenato de cálcio	9mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	1,2mg
Vitamina B12	4mcg
Biotina	0,02mg
Ácido fólico	1,3mg
Piridoxina	1,1mg
Vitamina B1 (Tiamina)	1,1mg
Magnésio	0,35mg
Sódio	200mg
Ferro	18mg
Cobalto	0,2mg
Cobre	3mg
Iodo	100mcg
Manganês	11mg
Zinco	11mg
Selênio	20mcg

**Composição centesimal do comprimido Centrum®**

<b>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL</b>		
<b>Porção de 1,495g (1 comprimido)</b>		
<b>Quantidade por porção</b>		<b>% VD (*)</b>
Carboidratos	0 g, dos quais:	0%
Açúcares	0 g	**
Vitamina A	400 mcg	67%
Vitamina D	5,0 mcg	100%
Vitamina C	45 mg	100%
Vitamina E	6,7 mg	67%
Tiamina	1,2 mg	100%
Riboflavina	1,3 mg	100%
Nicotinamida	16 mg	100%
Vitamina B6	1,3 mg	100%
Ácido Fólico	240 mcg	100%
Vitamina B12	2,4 mcg	100%
Biotina	30 mcg	100%
Ácido pantotênico	5,0 mg	100%
Vitamina K	65 mcg	100%
Cálcio	250 mg	25%
Ferro	8,1 mg	58%
Magnésio	100 mg	38%
Zinco	7,0 mg	100%
Iodo	33 mcg	25%
Cobre	450 mcg	50%
Selênio	20 mcg	59%
Molibdênio	23 mcg	51%
Cromo	18 mcg	51%
Manganês	1,2 mg	52%
*Não contém quantidade significativa de valor energético, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio*		

\* % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

\*\* Valor diário não estabelecido