UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

ENY KIYOMI UEMURA MORIGUTI

Efeito da L-alanil-L-glutamina na forma de dipeptídeo e L-glutamina-L-alanina na
forma de aminoácido livre na evolução da necrose de lesão por queimaduras
em ratos

Ribeirão Preto

2017

ENY KIYOMI UEMURA MORIGUTI

Efeito da L-alanil-L-glutamina na forma de dipeptídeo e L-glutamina-L-alanina na forma de aminoácido livre na evolução da necrose de lesão por queimaduras em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Opção: Morfologia e Medicina Experimental

Orientador: Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moriguti, Eny Kiyomi Uemura

Efeito da L-alanil-L-glutamina na forma de dipeptídeo e L-glutamina-L-alanina na forma de aminoácido livre na evolução da necrose de lesão por queimaduras em rato.

Ribeirão Preto, 2017.
117 p.: il.; 30 cm.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Farina Jr., Jayme Adriano

1. Queimadura. 2. Necrose. 3. Glutamina. 4. Ratos.

Nome: MORIGUTI, Eny Kiyomi Uemura

Título: Efeito da L-alanil-L-glutamina na forma de dipeptídeo e L-glutamina-L-alanina na forma de aminoácido livre na evolução da necrose de lesão por queimaduras em rato.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: exemplos de honestidade, perseverança e humildade.

Ao meu marido Julio Cesar por ser o alicerce na formação de nossos filhos.

Aos meus filhos Livia e Vitor orgulho e razão do meu viver e da minha felicidade.

Aos meus irmãos e cunhados por fazerem parte da união e felicidade de nossa família.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz no caminhar de toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior, orientador desse trabalho, pela confiança e apoio; pela paciência e disposição em ensinar sempre que necessitei.

À Dra. Marina Junqueira Ferreira Rosique pelo ensinamento e ajuda em todas as fases desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora pela ajuda financeira.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli pelas análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Alceu Jordão Junior por disponibilizar seu laboratório para as análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Silvio Tucci Junior pelas aulas de fotografias, disponibilizando seu final de semana de descanso.

À Prof^a Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli por disponibilizar seu laboratório.

À Prof^a Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira pela colaboração.

À Paula Payão pela análise laboratorial.

À Sandra por me ensinar a preparar as lâminas para as análises histológicas.

À Juliana, Sandra, Guilherme e Larissa da secretaria da Clínica Cirurgica.

À Renata e Luana do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda na coleta de material para as análises.

Ao Fermino Neto pela paciência em ensinar as análises estatísticas.

À Ariane, Daniel, Paulo, Carlinhos e Paulão do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda nos procedimentos com os animais.

Ao Dr. Guilherme Augusto M. de Andrade, Dr. Vinicius Fernandes Cruzat e Dr. Romulo Cesar Costa Barbosa pelo apoio durante a elaboração desse trabalho.

À Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda do Brasil por ceder a glutamina (aminoácido livre) utilizada no trabalho.

Aos meus pais, irmãos e cunhados pela ausência nos encontros de família nos finais de semana.

Ao meu marido Julio Cesar Moriguti pela paciência nos meus momentos difíceis no decorrer desses anos.

Aos meus filhos pelo apoio e por entender a necessidade da minha ausência em alguns momentos no transcorrer desses anos.

À Marinella Bavaresco Molina pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas de trabalho pela amizade.

À todas as pessoas que me ajudaram de forma direta ou indireta nesse trabalho.

RESUMO

MORIGUTI, E. K. U. Efeito da L-alanil-L-glutamina na forma de dipeptídeo e L-glutamina-L-alanina na forma de aminoácido livre na evolução da necrose de lesão por queimaduras em rato. 2017. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Introdução: A classificação da gravidade da queimadura é determinada a partir da relação entre a superfície corporal queimada (SCQ) e a profundidade da lesão. Os fatores que influenciam a evolução da necrose na zona de estase que circunda a zona de necrose (coagulação) podem estar relacionados com a perfusão, inflamação e estresse oxidativo. No presente estudo avaliamos o efeito da glutamina, pois tem sido demonstrado ter papel importante na prevenção de lesão por isquemia e reperfusão, da inflamação e do estresse oxidativo. **Objetivo:** avaliar o efeito da glutamina na forma de aminoácido livre e dipeptídeo na evolução da necrose nos interespaços (zona de estase) da queimadura. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem *Wistar*. Em todos os animais foi feita a lesão por queimadura de terceiro grau com um pente de metal contendo quatro dentes e três interespaços pré aquecido em água à 98°C. O Grupo 1- Controle (n=10) recebeu 7,4ml/kg de peso, de solução fisiológica a 0,9%, o Grupo 2- Dipeptídeo, recebeu 7,4 ml do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (1g/kg de L-glutamina e 0,6g/kg de L-Alanina) e o Grupo 3- AA-livre recebeu 1g/kg de L-glutamina e 0,6g/kg de L-alanina na forma de aminoácido livre, por gavagem, por 7 dias após a lesão por queimadura. As análises avaliadas foram por meio de fotografia (no momento 48 horas e 7 dias) e histopatologia (no 7º dia após a lesão), para avaliar a extensão da necrose, alterações isquêmicas nos interespaços (zona de estase), além da alteração da Glutathione. **Resultado:** Na avaliação fotográfica, houve redução significativa da necrose especificamente no Grupo 3- AA-livre entre o momento 48 horas e sete dias ($P=0,04$). Na avaliação por histologia, globalmente houve redução da inflamação nos Grupos 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre quando comparados com o Grupo 1- Controle ($p < 0,01$). Ainda nos grupos tratados houve tendência a redução de necrose na derme dos interespaços (Grupo 1- Controle =0,95; Grupo 2- Dipeptídeo =0,73 e Grupo 3- AA-livre =0,8), mas essas diferenças

não foram significantes. Os grupos tratados também apresentaram aumento do número de fibroblastos quando comparados ao Grupo 1- Controle ($p < 0,05$). Na dosagem de Glutathione foi encontrado maior quantidade no Grupo 2- Dipeptídeo ($p < 0,05$) quando comparado com o Grupo 1- Controle. **Conclusão:** A redução das lesões histológicas, redução da inflamação, manutenção de maior extensão dos interespacos, a maior quantidade de fibroblastos e o aumento da glutathione, com a administração de glutamina, observados no presente estudo, podem ter beneficiado a manutenção ou redução da evolução da necrose de queimadura em ratos. a inflamação, acelerou a cicatrização e regrediu a evolução da necrose das zonas de estase das queimaduras em ratos.

Palavras-chave: Queimadura. Necrose. Glutamina. Ratos.

ABSTRACT

MORIGUTI, E. K. U. Effect of L-alanyl-L-glutamine as dipeptide and L-glutamine-L-alanine as free amino acid in the progression of necrosis of burn lesions in rats. 2017. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Introduction: The classification of burn severity is based on the relationship between the burned body surface (SCQ) and the depth of the lesion. Factors influencing the progression of necrosis in the stasis zone surrounding the area of necrosis (coagulation) may be related to perfusion, inflammation and oxidative stress. In the present study, we evaluated the effect of glutamine, as it has been shown to play an important role in the prevention of ischemia and reperfusion injury, inflammation and oxidative stress. **Objective:** to evaluate the effect of glutamine as a free amino acid and dipeptide on the progression of necrosis in the interspace (stasis zone) of the burn. **Materials and Methods:** Thirty male Wistar rats were used. In all animals a third degree burn injury was done with a metal comb containing four teeth and three interspaces preheated in water at 98°C. Group 1- Control (n = 10) received 7,4 ml of 0.9% saline solution, Group 2- Dipeptide received 7.4 ml of dipeptide solution L-alanyl-L-glutamine (1g/k L-glutamine and 0.6g/k L-Alanine) and Group 3- Free AA received 1g/k L-glutamine and 0,6g/kg L-alanine as free amino acid, by gavage, for 7 days after burn injury. The analyzes evaluated were by means of photograph (in the time 48 hours and 7 days) and histopathology (on the 7th day after the injury), to evaluate the extent of necrosis, ischemic changes in the interspaces (stasis zone), besides the alteration of Glutathione . **Results:** In the photographic evaluation, there was a significant reduction of necrosis specifically in the 3-AA-free group between 48 hours and 7 days ($P = 0.04$). Histologically, there was a reduction in inflammation in Groups 2- Dipeptide and 3-AA-free when compared to Group 1-Control ($p < 0.01$). Even in the treated groups there was a tendency to reduce necrosis in the interspaces dermis (Group 1-Control = 0.95, Group 2-Dipeptide = 0.73 and Group 3- AA-free = 0.8), but these differences were not significant. The treated groups also showed an increase in the number of fibroblasts when compared to Group 1- Control (p

<0.05). In the dosage of Glutathione, a greater amount was found in Group 2 - Dipeptide ($p < 0.05$) when compared to Group 1 - Control. **Conclusion:** The reduction of histological lesions, reduction of inflammation, maintenance of greater extension of the interspaces, the greater amount of fibroblasts and the increase of glutathione, with the administration of glutamine observed in the present study, may have benefited the maintenance or reduction of the evolution of necrosis of burn in rats.

Keywords: Burn. Necrosis. Glutamine. Rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise descritiva do peso dos animais no início do experimento, porcentagem de ganho de peso dos animais e consumo de ração, do início ao fim do experimento, dos grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	55
Tabela 2. Comparação do peso dos animais entre os grupos, no início do experimento.....	57
Tabela 3. Comparação da porcentagem de ganho de peso durante o experimento, entre os grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	58
Tabela 4. Comparação do consumo de ração entre os grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	59
Tabela 5. Análise descritiva da porcentagem de necrose no momento 48 horas e sete dias após a lesão, nos grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	59
Tabela 6. Comparação da evolução de necrose até 48 horas e até sete dias de tratamento entre os grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle e comparação da evolução da necrose no intervalo entre 48 horas e sete dias de tratamento em cada grupo.....	60
Tabela 7. Análise descritiva da porcentagem de necrose no intervalo do momento entre 48 horas e sete dias após a lesão, nos grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	61
Tabela 8. Comparação da evolução de necrose no intervalo entre o momento 48 horas e sete dias de tratamento entre os grupos AA-livre, Dipeptídeo e Controle.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As três zonas da queimadura.....	30
Figura 2. Síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase.....	34
Figura 3. Hidrólise de glutamina à glutamato pela enzima glutaminase. Modificado de Cruzat, 2014.....	35
Figura 4. Cronograma do experimento: no dia zero após a anestesia foi provocada a lesão por queimadura. Duas horas após a lesão e em todos os dias, até o sexto dia, os animais receberam tratamento. No momento 48 horas após a lesão os animais foram anestesiados e fotografados. No 7º dia foram anestesiados, fotografados, retirado a pele para análise histológica e morfométrica, coletado o sangue para dosagem da glutathione e em seguida foi realizado a eutanásia.....	42
Figura 5. Aquecimento do pente de metal em água aquecida com ebulidor a 98°C.....	43
Figura 6. Pente de metal utilizado para fazer as lesões de queimadura no rato..	44
Figura 7. Pente de metal aplicado perpendicularmente no dorso do animal.....	44
Figura 8. Lesão dos dois lados do dorso do animal, com a aplicação do pente de metal aquecido a 98°C.....	45
Figura 9. Modelo de gavagem em que se vê o rato não anestesiado e imobilizado, com sonda metálica de ponta arredondada, conectada a seringa plástica introduzida por via oral, para a administração das soluções utilizadas no experimento.....	47
Figura 10. Agulha curva com ponta arredondada utilizada para administrar os tratamentos por gavagem.....	47
Figura 11. Imagem da evolução da necrose nos interespaços 48 horas após a lesão. Foto de um animal do grupo controle.....	48
Figura 12. Imagem da evolução da necrose nos interespaços sete dias após a lesão, do mesmo animal da figura 10.....	49
Figura 13. Imagem dos interespaços da queimadura 48 horas após a lesão. Foto de um animal do grupo tratado.....	49
Figura 14. Imagem dos interespaços da queimadura sete dias após a lesão do mesmo animal da figura 12.....	50

Figura 15. Representação gráfica do peso dos animais do Grupo 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre, no início do experimento. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$).....	56
Figura 16. Representação gráfica mostrando a porcentagem de ganho de peso dos animais de cada grupo, durante o experimento Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$).....	57
Figura 17. Representação gráfica do consumo de ração pelos animais de cada grupo, durante o experimento. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$)...	58
Figura 18. Representação gráfica da porcentagem de evolução da necrose nos interespaços da queimadura, no momento 48 horas e sete dias após a lesão do Grupo 1- Controle, Grupo 2- Dipeptídeo e Grupo 3- AA-livre. Não se observou diferença ($P>0,05$).....	60
Figura 19. Representação gráfica da porcentagem de evolução da necrose nos interespaços da queimadura, no intervalo entre o momento 48 horas e sete dias após a lesão entre os Grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre. Não se observou diferença ($P>0,05$).....	62
Figura 20. Fotomicrografia do animal do Grupo 1- Controle onde são observados focos hemorrágicos na derme e hipoderme (setas). Vaso sanguíneo central (VS). Tricrômico de Masson; 400x.....	64
Figura 21. Fotomicrografia de animal do Grupo 2- Dipeptídeo com a presença de necrose em algumas regiões da derme (setas) logo abaixo da epiderme (E) e na hipoderme (setas abaixo a direita). Folículo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x.....	64
Figura 22. Fotomicrografia de animal do Grupo 3- AA-livre mostrando amplas regiões de edema na derme e hipoderme (setas). Folículo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x	65
Figura 23. Média após classificação (0, 1, 2 ou 3) das lesões histológicas (necrose, edema e focos hemorrágicos) na derme das regiões de queimaduras entre os grupos estudados (1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre). Diferença observada entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0064$) e 2 x 3 ($p=0,0012$).....	65
Figura 24. Média após classificação (0,1, 2 ou 3) das leões histológicas (necrose, edema e focos hemorrágicos) na hipoderme das regiões de queimaduras entre os grupos estudados (Controle, Dipep'tídeo e AA-livre).	

Diferença observada entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0031$) e 2 x 3 ($p=0,0007$).....	66
Figura 25. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle onde pode ser observados foco hemorrágico (FH) na hipoderme; assim como a presença de muitos neutrófilos (setas menores) no lúmen de um vaso sanguíneo (VS), alguns em diapedese através da sua parede (seta maior). As setas mais delgadas mostram pequeno infiltrado inflamatório intercelular. Giemsa; 400x.....	67
Figura 26. Fotomicrografia de animal do Grupo 3- AA-livre mostrando detalhe de um vaso sanguíneo (VS) na derme (D) com a presença de alguns neutrófilos característicos no seu lúmen (setas). Giemsa; 400x.....	68
Figura 27. Média após classificação (0, 1, 2, ou 3) da presença de infiltrado inflamatório no interior dos vasos sanguíneos nas regiões de queimaduras entre os grupos estudados (Controle, Dipeptídeo e AA-livre). Diferença observada entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0004$).....	69
Figura 28. Média após classificação (0, 1, 2, ou 3) da presença de infiltrado inflamatório no espaço intercelular dérmico e hipodérmico nas regiões de queimaduras entre os grupos estudados (1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre). Diferença observada entre os grupos 1 x 2 ($p=0,0048$) e 1 x 3 ($p=0,0065$).....	69
Figura 29. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle com a presença de necrose na região mais superior da derme (setas) logo abaixo da epiderme (E). Folículo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x.....	70
Figura 30. Média após classificação da área de necrose na derme (0, 1, 2, 3 ou 4) nas regiões de interespaços (RIE1, RIE2 e RIE3) entre os grupos estudados. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,1027$).....	71
Figura 31. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle mostrando área de transição entre uma região de tegumento normal com identificação da sua epiderme (E) e uma região de queimadura (RQ) com medida (em mm) mostrada pela linha preta. Tricrômico de Masson; 50x.....	72
Figura 32. Média do comprimento (em mm) das regiões de queimadura (RQ1 a 4) nas regiões de interespaços (RIE1, RIE2 e RIE3) entre os grupos estudados. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,1328$).....	73
Figura 33. Média do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa	

observada entre os Grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0052$) e 1- Controle x 3- AA-livre ($p=0,0111$).....	74
Figura 34. Fotomicrografia mostrando visão geral da derme com fibras colágenas coradas em azul pela técnica de Tricrômico de Masson; 100x. Folículo piloso (FP). Acima e a direita, detalhe da derme mostrando um vaso sanguíneo (VS) inferiormente e vários núcleos (setas) de fibroblastos entre as fibras colágenas da derme em rosa. Giemsa; 400x.....	75
Figura 35. Média da contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos intrespaços (RIE1 a 3) entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa observada entre os Grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0121$) e Grpo 1- Controle x 3- AA-livre ($p=0,0068$).....	76
Figura 36. Média da quantidade de glutathiona (em μM) no plasma entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa observada entre os Grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0418$).....	77

LISTA DE SIGLAS

AA-livre – Aminoácido livre

ADP – Adenosina difosfato

Ala - Alanina

Ala-Gln – L-Alanil L-Glutamina

ANOVA – Análise de variância

ATP – Trifosfato de adenosina

C - Campo

cm² - centímetro ao quadrado

D - Derme

DTNB - Reagente de Ellman (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico)

E - Epiderme

EDTA – Ácido etilenodiamino Tetra-Acético

FH – Foco hemorrágico

FP – Foliculo piloso

g – Gramas

GA – Glutaminase

GABA – Ácido gama-aminobutírico

Gln - Glutamina

Gly-Gln – L-Glycil L- glutamina

GS – Glutamina sintetase

GSH - Glutathiona

HSPs – Proteínas de choque térmico, heat shock protein

II – Infiltrado inflamatório

IL- 6 – Interleucina 6

kg – Kilograma

L - Litro

MDA - Malondealdeído

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mmol – Milimol

NADPH – Hidrogenio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm - Mamômetro

NF-Kb – Fator nuclear Kappa B, nuclear factor Kappa B

NH₃ – Amônia

pH – Potencial Hidrogeniônico

RIE – Região de interestespaço

RNS – Espécies reativas de nitrogênio, reactive nitrogen species

ROS – Espécies reativas de oxigênio, reactive oxygen species

Rpm – Rotações por minuto

RQ – Região de queimadura

SCQ – Superfície corpórea queimada

TBSA – Superfície corpórea total, total body surface area

TNF- α – Fator de necrose tumoral, tumor necrosis factor- α

VS – Vaso sanguíneo

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ M – Micrômetro

LISTA DE SIMBOLOS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIMBOLOS

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
	2.1 Queimadura.....	27
	2.1.1 Classificação das queimaduras.....	27
	2.1.2 Alterações metabólicas nas queimaduras.....	31
	2.1.3 Cicatrização das feridas.....	32
	2.2 Glutamina.....	33
	2.3 Glutamina e queimadura.....	36
3	OBJETIVOS.....	38
	3.1 Objetivo geral.....	39
	3.2 Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
	4.1 Animais.....	41
	4.2 Desenho experimental.....	41
	4.2.1 Modelo de lesão térmica (queimaduras).....	43
	4.2.2 Administração do tratamento por gavagem.....	45
	4.3 Medidas dos resultados.....	48
	4.3.1 Análise fotográfica.....	48
	4.3.2 Análise histológica.....	50
	4.3.2.1 Análise das regiões de queimadura (RQ1 A 4).....	51
	4.3.2.2 Análise das regiões de interespaços (RIE1 A3).....	51
	4.3.3 Análise morfológica.....	52
	4.3.3.1 Análise das regiões de queimaduras (RQ1 A 4) e dos interespaços (RIE1 a 3).....	52
	4.3.3.2 Contagem de fibroblastos na derme dos interespaços (RIE1 a 3).....	52
	4.3.4 Dosagem de glutathione no plasma.....	52
	4.3.5 Análise estatística.....	53

5	RESULTADOS.....	54
5.1	Pesos dos animais e consumo de ração.....	55
5.2	Análises fotográficas.....	59
5.3	Análise histológica.....	63
5.3.1	Análise das regiões de queimaduras (RQ1 a 4).....	63
5.3.2	Análise das regiões de interespacos (RIE1 a 3).....	70
5.4	Análise morfométrica.....	71
5.4.1	Medidas das regiões de queimaduras (RQ1 a 4).....	71
5.4.2	Medidas das regiões de interespacos (RIE1 a 3).....	73
5.4.3	Contagem de fibroblastos na derme dos interespacos (RIE1 a 3).....	74
5.5	Dosagem de glutathione no plasma.....	76
6	DISCUSSÃO.....	78
6.1	Modelo de lesão térmica (queimadura).....	79
6.2	Outros tipos de tratamento.....	80
6.3	Glutamina no estresse oxidativo.....	81
6.4	Glutamina na lesão de queimadura.....	81
7	CONCLUSÕES.....	88
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9	ANEXOS.....	99
	Anexo 1 Certificado de aprovação da Comissão de ética em experimentação animal.....	100
	Anexo 2 Classificação das lesões histológicas.....	101
	Anexo 3 Classificação da presença de infiltrado inflamatório.....	104
	Anexo 4 Classificação da zona de necrose (coagulação)	107
	Anexo 5 Medidas do comprimento das regiões de queimadura.....	109
	Anexo 6 Medidas do comprimento (em mm) das regiões de interespacos.....	112
	Anexo 7 Contagem de fibroblastos.....	115

1 INTRODUÇÃO

Queimadura é uma lesão, na maioria das vezes de origem térmica, mas que pode ser causada por diversos agentes por exposição ou contato com chama, frio extremo, produtos químicos, radiação, atrito, líquido ou superfície aquecida, além de eletricidade (Gomes, 1995).

A classificação da gravidade da queimadura é determinada pela relação da extensão em porcentagem da superfície corporal queimada (SCQ) e a profundidade da lesão, além de outros fatores (Prestes, 2008).

A lesão de primeiro grau acomete apenas a epiderme, a de 2º grau superficial a epiderme e a camada superficial da derme, a de 2º grau profundo a epiderme e a camada dérmica profunda e a de 3º grau acomete espessura total da pele, tanto da epiderme como a derme (Gomes; Cabral, 1995).

A porcentagem da superfície queimada é um dos principais fatores que determinam a sobrevivência após queimaduras (Wolfe, 1996). Além da extensão, a profundidade da queimadura influi no prognóstico. Queimaduras profundas apresentam maior morbidade e mortalidade em relação às superficiais (Farina; Rosique; Rosique, 2013).

A ferida da queimadura profunda apresenta-se com uma área central de necrose celular, circundada por uma zona adjacente de estase que pode ou não evoluir para necrose, aumentando ou não a área da queimadura de espessura total da pele (3º grau). Alguns fatores como perfusão, inflamação e estresse oxidativo podem influenciar na progressão da necrose da área queimada (Singer et al., 2011). Substâncias citotóxicas contribuem para a lesão celular e extensão da queimadura, dentre elas algumas citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (Horton, 2003; Parihar et al., 2008). O estresse oxidativo é consequência da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical hidroxil (OH-) e peróxido (OOH-) (Duran et al., 2000).

Acredita-se que a glutamina tenha importante papel no combate ao estresse oxidativo, o que poderia interferir positivamente na prevenção de necrose na zona de estase das queimaduras.

Os mecanismos dos efeitos benéficos da glutamina em pacientes críticos inclui proteção tecidual por fazer parte de várias etapas visando à sobrevivência

celular após estresse ou lesão; regula a expressão das proteínas de choque térmico (PCT) na sepsis, reduzindo a mortalidade, lesão de órgãos, apoptose celular e a inflamação mediada pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Adicionalmente, apresenta propriedade antioxidante por ser um importante precursor da glutathione atenuando a expressão do óxido nítrico sintetase (Wischmeyer, 2008).

A glutathione é um tripeptídeo formado por cisteína, ácido glutâmico e glicina (L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine) sintetizada principalmente no fígado (Pastore, 2003; Rover, 2001), está envolvida na defesa antioxidante celular (Pastore, 2003).

A glutamina desempenha funções metabólicas importantes em queimaduras graves. Atua preservando a massa muscular e por meio hormonal tem função anabólica e antioxidante. Auxilia na cicatrização e na resposta imune, inclusive prevenindo a translocação bacteriana (Demling; Seigne, 2000). Também foi demonstrado um efeito inibidor da biossíntese do óxido nítrico (Houdijk et al., 1998), minimizando a resposta inflamatória sistêmica nos pacientes queimados.

A glutamina na forma de aminoácido livre (L-glutamina) é de baixa solubilidade e instável em altas temperaturas, sendo por isso mais recomendada a suplementação na forma de dipeptídeo como glycyl-glutamina (Gly-Gln) ou L-alanyl-L-glutamina (Ala-Gln) (Barbosa et al., 2003).

Estudos em modelos animais submetidos a estresses metabólicos verificaram que tanto a suplementação com dipeptídeos de glutamina (L-alanyl-L-glutamina) quanto a L-glutamina livre mais a L-alanina livre atenuaram a redução da glutamina corporal (Cruzat; Tirapegui, 2009). Verificou-se também que a ação antioxidante mediada pela glutathione ou GSH (L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine) foi potencializada, o que influenciou a redução do processo lesivo inflamatório nos animais (Cruzat; Tirapegui, 2009; Cruzat; Rogero; Tirapegui, 2010).

Pesquisas têm sido realizadas com relação à ação da glutamina no processo de isquemia e reperfusão. No estudo de Maretta (2014), a administração de glutamina (Ala-Gln) melhorou a microcirculação intestinal, aumentando a densidade funcional capilar da parede do intestino e reduziu a ativação de leucócitos (Maretta, 2014). Zabet et al. (2014), encontraram que a glutamina reduziu a peroxidação lipídica, preservou a atividade superóxido dismutase e reduziu a expressão da

interleucina 6 (IL-6) e NF-kB no pulmão e intestino, sugerindo um papel protetor da glutamina na isquemia/reperfusão (Zabot et al., 2014).

Poucos estudos foram realizados para avaliar a glutamina na cicatrização de queimaduras. O seu papel na cicatrização ainda carece de certezas entre os pesquisadores (Chow; Barbul, 2014). Em um estudo com a oferta de 1g/kg de peso do animal de glutamina na forma de aminoácido livre por gavagem para avaliar a cicatrização de queimadura de segundo grau em ratos, foi encontrado efeito positivo e significativo (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011), sugerindo estudos para avaliar em qual estágio da cicatrização a suplementação afetaria.

Pesquisas têm sido realizadas para avaliar agentes que podem prevenir ou reduzir a conversão da zona de estase para necrose. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da L-glutamina na forma de aminoácido livre e na forma de dipeptídeo, (Ala-Gln), na evolução da necrose tecidual na queimadura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queimadura

A incidência de queimadura grave, no mundo, que necessitou intervenção médica foi em aproximadamente 11 milhões de pessoas em 2004. Apesar de a maioria das queimaduras não serem fatais, é causa de 300.000 mortes a cada ano, mundialmente (World Health Organization, 2008). Adicionalmente, as sequelas de queimaduras são frequentemente graves o suficiente para causar incapacidades permanentes (Peck, 2011).

O progresso no tratamento das queimaduras, destacando a reposição hídrica, definição da extensão e da profundidade da lesão, excisão e enxertia precoce, controle de infecção e suporte nutricional, contribuíram para a redução da mortalidade (Lee; Joory; Moiemmen, 2014).

A taxa de mortalidade em crianças com queimaduras de 45% da superfície corpórea era de cerca de 50%, na década de 50. Na década de 90, a mesma taxa de mortalidade foi observada em queimaduras de 98% da superfície corpórea (Medina Herrera; Pérez Barreto, 1997). Em adultos, observamos que, na década de 50, a taxa de mortalidade de 50% era verificada em pessoas com queimaduras de 30%, enquanto que, na década de 90, tal taxa de mortalidade foi atingida somente quando 75% de superfície corporal era queimada. Apesar de todo esse incremento no sucesso do tratamento, a queimadura continua sendo importante causa de morte (Deitch, 1990).

2.1.1 Classificação das queimaduras

A extensão da queimadura é calculada levando-se em consideração a porcentagem da lesão em relação à superfície corporal total do indivíduo. Um método prático para a utilização em emergência e avaliação inicial é a regra dos nove de Wallace, que é a divisão da superfície corporal em áreas que representam múltiplos de 9% do total, onde a cabeça representa 9%, cada membro superior 9%, o tórax anterior 18% e o posterior 18%, cada membro inferior 18% e o períneo e genitália 1% (Bastos; Freitas; Figueroa, 2002). Em crianças, a regra dos nove é modificada, pois, proporcionalmente, a cabeça das crianças é maior que as dos adultos e os membros inferiores, menores (Vale, 2005). Para pequenas áreas a

extensão pode ser determinada utilizando a superfície palmar da vítima que representa aproximadamente 1% da superfície corporal total (Berry; Evison; Roberts, 2001).

A profundidade da queimadura é classificada de acordo com o comprometimento das camadas constituintes da pele.

Queimaduras de primeiro grau - são lesões que atingem somente a camada epidérmica, mantendo a derme íntegra. Clinicamente, são caracterizadas por eritema, edema e dor decorrentes de uma vasodilatação capilar e irritação das terminações nervosas sensitivas no local da lesão. Normalmente são produzidas por líquidos pouco aquecidos, vapores ou exposição demasiada aos raios solares.

Queimaduras de segundo grau – são as que além de atingir a epiderme, comprometem também a camada dérmica em menor ou maior profundidade, sendo classificadas como superficiais ou profundas, respectivamente.

Na queimadura de segundo grau superficial ocorre destruição da epiderme e camada superficial da derme, mas mantém íntegra grande quantidade de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que são elementos importantes para a reepitelização da área atingida. Clinicamente são caracterizadas pela presença de flictenas, edema, eritema e dor. A base da flictena é avermelhada (com circulação mantida), o que determina a diferença da queimadura de segundo grau profundo. Normalmente são causadas por escaldadura de curta duração (ex: água quente) e não apresentam cicatrizes permanentes.

A queimadura de segundo grau profundo, além de ocorrer destruição da epiderme, grande parte da camada dérmica também é atingida, restando poucos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas para a reepitelização. Clinicamente, se caracterizam por edema, diminuição da sensibilidade dolorosa e flictena de base esbranquiçada (menor circulação sanguínea) com apresentação de fina escara. Normalmente são causadas por escaldadura de longa duração (ex: óleo quente), agentes inflamáveis como álcool e gasolina e resultam frequentemente em cicatrizes permanentes.

Queimaduras de terceiro grau – são lesões profundas, que envolvem toda a espessura da pele, mais graves, que necessitam tratamento precoce e

especializado. Causam destruição total da pele, podendo atingir subcutâneo, músculos e ossos, não restando o que permita uma reepitelização, a não ser a partir das bordas da ferida. Clinicamente, são caracterizadas por pele seca, coloração esbranquiçada ou escura, sem flictenas, indolor, edema, decorrentes de necrose e coagulação dos capilares, e total destruição das terminações nervosas sensitivas e escara necrótica mais espessa. Normalmente, são causadas por combustão de líquidos inflamáveis, queimaduras químicas e elétricas ou aquecidos em que a fonte de calor tem maior intensidade e duração (Gomes; Cabral, 1995). As queimaduras de 3º grau certamente resultam em cicatrizes permanentes.

A classificação da gravidade da queimadura é determinada a partir da relação entre a superfície corporal queimada (SCQ) e a profundidade da lesão.

Pequenas queimaduras são lesões de primeiro e segundo grau que atingem menos de 15% da SCQ em adultos ou menos de 10% em crianças ou de terceiro grau com SCQ menor que 2%.

Médias queimaduras são lesões de primeiro e segundo grau com SCQ entre 15% a 25% em adultos e entre 10 a 20% em crianças ou de terceiro grau que atingem menos que 10% da SCQ.

Grandes queimaduras são lesões de segundo grau que atingem SCQ maior que 25% em adultos e crianças, ou de terceiro grau atingindo acima de 10% da SCQ. (Prestes, 2008)

Os principais determinantes da sobrevivência após queimadura são: porcentagem da superfície queimada, a profundidade, a localização, o tipo do agente causal, lesões por inalação e queimaduras de vias aéreas, idade do paciente, estado nutricional e doenças metabólicas pré-existentes (Wolfe, 1996).

A ferida da queimadura é composta por três zonas tridimensionais (Figura 1):

- Zona de coagulação (necrose): o ponto central da queimadura onde ocorre a perda irreversível de tecido devido à coagulação do conteúdo proteico;

- Zona de estase: a área ao redor da zona de coagulação, caracterizada pela redução na perfusão tecidual. Esta zona pode evoluir para necrose ou não. A

evolução na progressão para necrose pode ser influenciada pela alteração na perfusão, inflamação e estresse oxidativo induzido por ROS (Singer et al., 2011).

- Zona de hiperemia: é a área ao redor da zona de estase, essa zona não evolui para necrose. (Jackson, 1953)

Figura 1. As três zonas clássicas da ferida de queimadura.

Por meio de estudos, pode ser observado que o comprometimento dessa zona de estase, com significativo comprometimento da vascularização, inicia 2 a 4 horas após a lesão sendo progressiva nas primeiras 24 horas, se não tratada (S. Noble; Robson; Krizek, 1977). Outros autores demonstraram que, na zona de estase, ocorre trombose venosa, arterial e capilar em resposta a lesão térmica, e que pode ser progressiva (Robb, 1967). Se considerarmos que esse é um evento inicial na morte do tecido queimado, a prevenção dessas tromboses poderia, possivelmente, recuperar essa zona de estase tecidual (S. Noble; Robson; Krizek, 1977).

Após a lesão há a formação de edema devido à vasodilatação, aumento da permeabilidade microvascular e aumento da atividade osmótica extravascular (Arturson; Mellander, 1964) (Arturson, 1979). Após essas alterações ocorre redução na perfusão, levando a isquemia tecidual e necrose (Zawacki, 1974).

2.1.2 Alterações metabólicas nas queimaduras

Metabolicamente, a queimadura é caracterizada por aumento da proteólise na musculatura esquelética, lipólise e gliconeogênese. O fígado capta os aminoácidos liberados pela musculatura, sendo utilizados na gliconeogênese. Essa glicose é metabolizada na área queimada por glicólise anaeróbica, gerando lactato, que será convertido em glicose, novamente, no fígado (ciclo de Cori). Nesse processo metabólico, grande parte da energia utilizada, origina da oxidação de lipídios (Deitch, 1990).

As queimaduras acarretam alterações metabólicas significantes, em consequência da combinação da liberação de mediadores inflamatórios e resposta hormonal induzida pelo estresse. O aumento nas citocinas pró-inflamatórias (interleucina-6, interleucina-8 e fator de necrose tumoral) associadas ao aumento dos hormônios catabólicos endógenos (cortisol, glucagon e catecolaminas) e redução dos hormônios anabólicos endógenos (hormônio do crescimento humano, insulina e testosterona) associados à atividade oxidante aumentada têm como consequência a degradação e a perda de proteínas importantes (Demling; Seigne, 2000).

O estresse oxidativo ocorre pela produção de ROS, que é um dos tipos de radicais livres derivados do oxigênio (Blebea et al., 1987). Os sequestradores de ROS, os inibidores da produção dos radicais livres e os antioxidantes são conhecidos como sistema antioxidante de defesa de moléculas agredidas pela oxidação, que são mecanismos endógenos dos seres vivos que reagem aos efeitos das ROS (Grace, 1994). Dentre os sequestradores de ROS, está a glutathione e glutathione peroxidase (Freeman; Crapo, 1982; Kirschner; Fantini, 1994). Em estudos, com modelos de lesão por isquemia e reperfusão hepática, são mostrados que as concentrações de antioxidantes endógenos reduzem durante a fase de reperfusão, apesar de os antioxidantes endógenos resistirem aos danos provocados por ROS, provavelmente em razão da degradação desses antioxidantes, causada pelo aumento da atividade da ROS (Marubayashi et al., 1984; Marubayashi et al., 1986).

As alterações metabólicas iniciam imediatamente após a lesão (Demling; Seigne, 2000). O estado de hipermetabolismo se mantém por até 9 a 12 meses após

o trauma, sendo de 6 a 9 meses após a completa cicatrização da ferida (Hart et al., 2000).

2.1.3 Cicatrização das feridas

A cicatrização de uma ferida pode ser didaticamente, dividida em três fases: a primeira é a inflamatória; a segunda é caracterizada por um processo proliferativo e por fim a terceira fase é o remodelamento.

Para que ocorra a cicatrização, há a necessidade da regulação dos diversos fatores de crescimento. Inicialmente, há a interrupção da circulação seguida pelo extravasamento do plasma que sinaliza para que haja a formação temporária do coágulo de fibrina com o objetivo de restabelecer a homeostasia e promova a agregação plaquetária. As plaquetas, por meio da secreção de mediadores químicos inflamatórios, caracterizados pelas citocinas, recrutam os macrófagos e neutrófilos que também secretam outros fatores específicos que culminará na reepitalização (Santoro; Gaudino, 2005).

A primeira fase do processo de cicatrização, denominada fase inflamatória, tem papel fundamental para o resultado final. Após os primeiros minutos de uma vasoconstrição reacional, ela é caracterizada pela permeabilidade capilar aumentada, secreção de citocinas, óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios que resultarão em vasodilatação e migração de células para a superfície da lesão. Nesta fase, os macrófagos além de controlarem a degradação do tecido conectivo por meio de liberação de enzimas proteolíticas e de fagocitose, também promovem a cicatrização com a produção essencial dos fatores de crescimento que atraem os fibroblastos para o local da ferida.

A próxima fase que é caracterizada por um processo proliferativo, se inicia em torno de cinco dias após a lesão e pode continuar por até duas semanas. O início ocorre quando o número de neutrófilos reduz e o de macrófagos e fibroblastos aumenta, resultando no processo de formação da matriz, incluindo a síntese de colágeno.

No remodelamento do colágeno, com a redução da vascularização, a cicatriz se torna menos hiperemiada. Ocorre uma organização progressiva e maturação cicatricial, levando ao aumento na força da cicatriz. (Steed, 1997)

2.2 Glutamina

A glutamina é o aminoácido de maior proporção no organismo correspondendo a 25% dos aminoácidos livres no sangue (Souba et al., 1990). No músculo corresponde a 60% dos aminoácidos (Bergstrom et al., 1974).

É considerado condicionalmente essencial em condições de estresse tais como sepse (Parry-Billings et al., 1991), infecções (Novak et al., 2002; Avenell, 2006), cirurgias (Hayashi et al., 2002), traumas (Flaring et al., 2003), queimaduras (Parry-Billings et al., 1990) e exercícios físicos prolongados e intensos (Cruzat; Tirapegui, 2009), pois o organismo não consegue suprir adequadamente a demanda nessas situações (Lacey; Wilmore, 1990). É um L- α -aminoácido com fórmula molecular $C_5H_{10}O_3N_2$, que pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (Curi, 2000; Newsholme et al., 2003).

Vários autores sugerem que a administração de L-glutamina pode atenuar a inflamação e ter papel protetor em uma variedade de danos celulares e teciduais, por ser um substrato chave para as células, tais como hepatócitos, enterócitos, músculo, e células do sistema imune (Garrett-Cox et al., 2009).

Um dos mecanismos de ação protetora da suplementação de glutamina inclui a propriedade antioxidante mediada pela glutathione (Flaring et al., 2003; Rodas et al., 2012), que é o mais importante antioxidante intracelular não enzimático que é dependente do fornecimento de glutamato advindo da glutamina (Rutten et al., 2005); e também específicos alvos moleculares como fatores de transcrição, principalmente NF- κ B (Brasse-Lagnel; Lavoinne; Husson, 2009).

Alguns autores demonstraram a importância da glutamina para o crescimento e manutenção celular. A glutamina é o aminoácido mais utilizado em cultura de células (Curi et al., 2005). Em estudos em que não foi utilizada a glutamina em meios de cultura, ocorreu degeneração seguida de morte celular da estrutura de

fibroblastos isolados de camundongos (Eagle et al., 1956). Outros autores demonstraram que em meios de cultura contendo a glutamina, pode haver aumento no desenvolvimento celular, como manutenção de estruturas e funções celulares, tais como células HeLa (Eagle, 1959), linfócitos (Ardawi; Newsholme, 1982), macrófagos (Ardawi; Newsholme, 1983; 1985) e enterócitos (Yamauchi et al., 2002). Assim, sugere-se que a glutamina pode estar relacionada com o equilíbrio oxidativo celular e na modulação da proliferação celular.

A glutamina ainda participa como precursora da síntese proteica; doa nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas, nucleotídeos e aminoácidos (Newsholme et al., 2003), sendo também uma precursora da glutatona (Flaring et al., 2003; Cruzat; Tirapegui, 2009). Pesquisadores também demonstraram a elevação da expressão de HSPs, que é relacionada à maior resistência à morte celular em situação de estresse (Singleton; Wischmeyer, 2007; Fan, 2016)).

Pesquisadores demonstraram que em ratos, a L-glutamina associada em dietas enterais teve potente efeito inibidor da biossíntese do óxido nítrico endotelial (Meininger e Wu, 1997; Houdijk et al., 1998). Assim sendo, a glutamina tem papel cardioprotetor durante isquemia e reperfusão, quando ocorre a produção excessiva de óxido nítrico (Khogali et al., 1998).

Por trabalho mais recente, concluiu-se que a suplementação com o dipeptídeo glicil-glutamina promoveu efeito benéfico na proteção miocárdica e função cardíaca em ratos com queimaduras graves, por melhorar o metabolismo energético do cardiomiócito, aumentando a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e glutatona (Yan et al., 2012; Zhang et al., 2013).

A síntese da glutamina é dependente de duas enzimas, a glutamina sintetase (GS) a partir do glutamato (Figura 2) e a glutaminase (GA) pela degradação do glutamato (Figura 3) (Neu; Shenoy; Chakrabarti, 1996).

Figura 2. Síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase. NH_3 (amônia); ATP (adenosina 5'-trifosfato); ADP (adenosina 5'-difosfato); P_i (fosfato).

Figura 3. Hidrólise de glutamina à glutamato pela enzima glutaminase.

A GS catalisa a conversão de glutamato em glutamina, utilizando como fonte de nitrogênio a amônia (NH_3) e com utilização de ATP (Figura 2).

A atividade da GS é regulada por diversos fatores, como hormônios tireoidianos (Curi, 2000), glicocorticoides (Santos; Caperuto; Costa Rosa, 2007), hormônio do crescimento, e insulina (Ardawi, 1990). É encontrada em células produtoras de glutamina, como o músculo esquelético e algumas células do pulmão (He et al., 2010), encéfalo (Solbu et al., 2010) e rins (Labow; Souba; Abcouwer, 2001). Nesses órgãos e tecidos a GS é encontrada no citosol (Labow; Souba; Abcouwer, 2001).

A GA catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (Figura 3). Está presente em concentrações elevadas nas células consumidoras de glutamina, como células da mucosa intestinal, leucócitos, cérebro e células do túbulo renal. Todavia, a sua forma mais ativa encontra-se principalmente nas mitocôndrias (Labow; Souba; Abcouwer, 2001). O fígado pode produzir ou consumir glutamina, de acordo com a necessidade de outros órgãos (Hall; Heel; Mccauley, 1996).

O fígado é o tecido com maior capacidade de síntese de glutamina. Porém, quantitativamente, o tecido muscular esquelético é o principal tecido de síntese, armazenamento e sua liberação, onde há alta concentração da GS (Van De Poll et al., 2004).

A glutamina na forma de aminoácido livre (L-glutamina) é de baixa solubilidade (36g/l), pouca estabilidade em pH baixo e altas temperaturas, não resistindo ao armazenamento prolongado e nem à esterilização pelo calor. Essas características têm estimulado estudos com a administração na forma de peptídeos, como a L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) ou L-glicil-L-glutamina (Gli-Gln) que têm alta

solubilidade (568g/l) e estabilidade durante o preparo, resiste à esterilização pelo calor, armazenamento e administração (Souba et al., 1990).

A glutamina na forma de dipeptídeo, como a Ala-Gln parece ser uma forma mais efetiva que a L-glutamina na forma livre. Os resultados obtidos utilizando a L-glutamina, por via oral, ainda são controversos (Rogerio et al., 2006). Há alguns trabalhos que demonstram o efeito benéfico da glutamina na forma livre em atletas, após exercício físico intenso, sobre a função imune (Castell; Newsholme, 1997; Lagranha et al., 2004; Lagranha et al., 2005), outros pesquisadores não observaram esse mesmo efeito (Rohde et al., 1998; Krzywkowski et al., 2001).

Apesar de trabalhos demonstrarem que a alanil-glutamina na forma de dipeptídeo e glutamina associada a alanina, ambas na forma de aminoácido livre, terem efeito antioxidante e anti-inflamatório, Li, et al (2014) observou que o uso da alanil-glutamina atenuou a expressão de TNF- α , os níveis de malondealdeído (MDA) e a atividade do superóxido dismutase (SOD), por outro lado, a alanina na forma de aminoácido livre não apresentou esse mesmo benefício, em ratos submetidos a isquemia e reperfusão.

A digestão das proteínas da dieta tem como produtos finais 40% de uma mistura de aminoácidos livres e 60% de pequenos dipeptídeos e tripeptídeos. Eficientes mecanismos de transportes para absorção desses dipeptídeos e tripeptídeos estão presentes nos enterócitos no lúmen intestinal (Caspary, 1992; Temple et al., 1998).

2.3 Glutamina e queimadura

Funções metabólicas de grande importância são desempenhadas pela glutamina após grandes queimaduras. Atua no transporte de nitrogênio, na síntese de ureia, na retirada de amônia, e na redução da proteólise, mantendo a massa muscular. Estimula a liberação do hormônio do crescimento humano, com funções anabólicas. Ainda apresenta importante função antioxidante por servir de substrato na síntese da glutatona que tem papel importante como antioxidante plasmático e celular. Age na cicatrização como combustível para macrófagos e fibroblastos. Adicionalmente, atua de modo importante na imunidade por ser o principal

combustível energético dos enterócitos preservando a integridade da mucosa intestinal prevenindo a translocação bacteriana, além de ser o substrato energético preferencial dos linfócitos e neutrófilos, melhorando a capacidade de eliminar as bactérias (Demling; Seigne, 2000).

A glutamina por via enteral em pacientes com queimaduras graves proporciona redução na mortalidade e complicações devido a bacteremia por gram-negativos (Lin, 2013). Reduz o tempo de cicatrização de queimaduras de segundo grau, em camundongos, quando ofertado a dose de 1g/kg de peso (Jalilimanesh, Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011).

No presente estudo, utilizamos a glutamina para avaliar a possível limitação na evolução da necrose da queimadura devido às múltiplas propriedades observadas, que também estão envolvidas no processo da evolução da necrose. Encontrar uma terapia para auxiliar o controle da progressão da lesão e limitar a conversão de queimaduras superficiais para queimaduras profundas, que normalmente acontece nos primeiros dias após a lesão, é um grande desafio no cuidado do paciente vítima de queimadura (Singer et al., 2011). Foi utilizado modelo de queimadura por meio de pente metálico aquecido que inclui áreas intercaladas não queimadas (interespaços) para se avaliar a progressão da necrose.

O uso da glutamina foi estudado em diversas doenças, porém a avaliação com o uso da glutamina na cicatrização em queimaduras ainda é restrita (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011; Kesici et al, 2013). Não encontramos trabalhos na literatura, até a presente data, em que tenha sido avaliado o efeito da glutamina, especificamente, na evolução da necrose em queimaduras.

Diante do exposto foi hipotetizado (Hipótese H0) que o grupo de ratos que recebeu a glutamina na forma de dipeptídeo, terá melhor estabilização ou redução da progressão da necrose na área de estase (interespaços).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da glutamina na progressão da área de necrose nos interespaços de queimaduras em modelo experimental de queimadura em ratos, em avaliação por fotografias, histologia e morfometria.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da oferta de glutamina na forma de L-glutamina e L-alanina na forma de aminoácido livre, e na forma de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, na evolução de necrose de queimadura, nos interespaços, por meio de fotografias;

- Avaliar os efeitos da oferta de glutamina na forma de L-glutamina e L-alanina na forma de aminoácido livre, e na forma de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, na evolução de necrose de queimadura, nos interespaços, por meio de histologia;

- Avaliar os efeitos da oferta de glutamina na forma de L-glutamina e L-alanina na forma de aminoácido livre, e na forma de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, na evolução de necrose de queimadura, por meio de morfometria;

- Avaliar os efeitos da oferta de glutamina na forma de L-glutamina e L-alanina na forma de aminoácido livre, e na forma de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, na evolução de necrose de queimadura, nos interespaços, por possível alteração de produto antioxidante, com a dosagem de glutathione no plasma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados trinta (30) ratos da linhagem Wistar, machos, adultos jovens, com peso médio de 245 g (peso mínimo = 216 g e peso máximo = 300 g), provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo-USP de Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22-25°C e ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Foram alimentados com ração comercial para roedores, composta por 54% de carboidrato, 22,5% de proteína e 4,3% de gordura (NUVILAB CR1, Quimtia S.A., Colombo, Brasil) e tiveram água à vontade, até o final do experimento.

Foram acondicionados individualmente em caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 17 cm, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável, forradas com maravalha e mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo número 44/2014) (Anexo 1).

4.2 Desenho experimental

Estudo experimental randomizado em ratos. Os animais foram divididos, por sorteio, em três grupos, classificados como: Grupo 1- Controle (n=10) que recebeu solução salina a 0,9%; Grupo 2- Dipeptídeo (n=10) que recebeu L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) na forma de dipeptídeo e Grupo 3- AA-livre (n=10) que receberam L-glutamina (Gln) + L-alanina (Ala) na forma de aminoácidos livres.

Todos os animais receberam os respectivos tratamentos por gavagem duas horas após a lesão e todos os dias subsequentes, no período da manhã, uma vez ao dia, até um dia antes da eutanásia.

Para a realização da queimadura, os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (50g/kg de peso) e Xilasina (10mg/kg de peso). Para verificar as alterações nos interespaços da lesão, ou seja, a evolução da zona de estase para necrose ou reperfusão, foi obtida imagens fotográficas imediatamente após a queimadura e após 48 horas e sete dias da lesão.

No sétimo dia os ratos foram novamente anestesiados, em seguida foi ressecada a pele contendo a área da queimadura para análise histológica, coletado o sangue para análise e posteriormente realizado eutanásia por meio de venosecção, conforme esquema abaixo (Figura 4).

Figura 4: Cronograma do experimento: no dia zero após anestesia foi provocada a lesão por queimadura. Duas horas após a lesão e em todos os dias, até o sexto dia, os animais receberam tratamento. No momento 48 horas após a lesão os animais foram anestesiados e fotografados. No 7º dia foram anestesiados, fotografados, retirado a pele para análise histológica e morfométrica, coletado o sangue para dosagem da glutathione e em seguida foi realizado a eutanásia.

4.2.1 Modelo de lesão térmica (queimadura)

Os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia da região dorsal em duas etapas, em um primeiro momento os pelos dos animais foram removidos com aparelho elétrico (Oster Golden A5) e em um segundo momento foi aplicado o creme depilatório (Veet, Reckitt Benckiser), deixando agir por cinco minutos e retirados com compressa úmida.

Seguindo modelo experimental descrito na literatura (Regas; Ehrlich, 1992; Choi; Ehrlich, 1993; Singer et al., 2011) para lesão de queimadura térmica por contato, um pente de metal pré-aquecido por três minutos em água fervente (98 °C) (Figura 5) foi aplicado no dorso de cada animal, durante 30 segundos. O pente apresenta quatro garras e três interespaços (Figura 6).

Figura 5. Aquecimento do pente de metal em água aquecida com ebulidor a 98° C.

Figura 6. Pente de metal utilizado para fazer as lesões de queimadura no rato.

O pente de metal foi aplicado perpendicularmente à pele, sem pressão, resultando em quatro queimaduras retangulares de 10 x 20 mm de espessura total separadas por três interespaços de 5 x 20 mm de pele não queimada (zona de estase) (Figura 7).

FIGURA 7. Pente de metal sendo aplicado perpendicularmente no dorso do animal.

Após o reaquecimento do pente de metal, ele foi aplicado no outro lado do dorso do rato, criando assim duas áreas de queimadura, uma em cada lado do dorso de cada animal (Figura 8), sem o animal apresentar sinais de dor ou estresse, resultando numa queimadura de terceiro grau, não letal, de espessura total da pele do dorso, indolor pela destruição das terminações cutâneas nervosas sensitivas (Moncrief, 1979). O total da área de queimadura foi de 16 cm² correspondendo a média de 4,16% da área da superfície corporal total do rato, considerando a fórmula de Meeh $TBSA=k.W^{2/3}$. No presente estudo utilizamos a adaptação de Gouma onde a constante foi calculada para ratos Wistar. A TBSA (total body surface area) é a área da superfície corpórea total em centímetros quadrado, k =constante (9,83) e W =peso do rato em gramas (Gouma et al., 2012).

FIGURA 8. Lesão nos dois lados do dorso do animal, com a aplicação do pente de metal aquecido a 98°C.

4.2.2 Administração do tratamento por gavagem

Os animais do Grupo 1- Controle receberam solução salina a 0,9%, no volume de 7,4 ml/kg de peso/dia.

Os animais do Grupo 2- Dipeptídeo receberam 7,4 ml/kg de peso/dia da solução de dipeptídeo, contendo 1g/kg de peso de L-glutamina e 0,6g/kg de peso de L-alanina.

Os animais do Grupo 3- AA-livre receberam L-glutamina na quantidade de 1g/kg de peso/dia e L-alanina na quantidade de 0,61 g/Kg de peso/dia, diluídos em 7,4 ml/Kg de peso/dia de solução salina.

Para calcular a quantidade dos tratamentos a serem, os ratos eram pesados diariamente.

Os animais receberam os tratamentos por gavagem, duas horas após a lesão térmica e nos dias seguintes no período da manhã, uma vez ao dia, diariamente até um dia antes da eutanásia. A gavagem foi realizada com o animal sob vigília, imobilizado por apreensão manual da parte superior do dorso (Figura 9), onde não havia lesão, utilizando sonda em aço inox de ponta em esfera (Figura 10), fabricada pela Insight Equipamentos Científicos conectada a seringa descartável de 3 ml contendo as soluções anteriormente descritas e introduzida por via oral para administração enteral das substâncias em estudo. O dipeptídeo L-alanil-Lglutamina (Diamin, fabricado por Cláris-Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda) foi fracionado e fornecido pela empresa Fórmula Medicinal – Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil. O aminoácido livre, L-glutamina foi fabricado e cedido pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil e L-alanina foi fabricada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil e fornecida pela Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.

FIGURA 9. Modelo da gavagem em que se vê o rato não anestesiado e imobilizado, com sonda metálica de ponta arredondada, conectada a seringa plástica introduzida por via oral, para administração das soluções utilizadas no experimento.

FIGURA 10. Agulha curva com ponta arredondada utilizada para administrar os tratamentos por gavagem.

4.3 Medidas dos resultados

4.3.1 Análise fotográfica

As feridas foram observadas e fotografadas com uma câmera Canon modelo EOS Kiss X7. No momento da foto foi colocada uma régua do lado do animal para padronização da unidade de área em centímetros, a fim de determinar a zona de necrose (coagulação) nos interespaços (espaços não queimados), 48 horas e sete dias após a lesão. Para determinar a área de necrose, foi utilizado o software ImageJ 1.46 (U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012).

Figura 11. Imagem da evolução da necrose nos interespaços 48 horas após a lesão. Foto de um animal do Grupo 1- Controle.

Figura 12. Imagem da evolução da necrose nos interespaços sete dias após a lesão, no mesmo animal da figura 11.

Na figura 11 observamos a evolução de necrose nos interespaços da queimadura de um dos animais do Grupo 1- Controle e na figura 12 observamos a evolução de necrose nos interespaços sete dias após a lesão, do mesmo animal da figura 11.

Figura 13. Imagem dos interespaços da queimadura 48 horas após a lesão. Foto de um animal do grupo tratado.

Figura 14. Imagem dos interespaços da queimadura sete dias após a lesão, do mesmo animal da figura 13.

4.3.2 Análise histológica

Após a coleta, as amostras do tegumento dos 10 animais de cada grupo (1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre), foram imersas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 em temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram submetidas à desidratação em bateria progressiva de álcool, seguida pela diafanização por imersão em álcool-xilol e xilol e por fim, a inclusão foi realizada em parafina fundida, mantida à temperatura ambiente por 24 horas. O material foi cortado a 5µm em micrótomo (Reichert Jung 2040) e corado pela técnica de *Tricrômico de Masson* (avaliação de necrose, edema e focos hemorrágicos) e pela técnica de *Giemsa* (avaliação do infiltrado inflamatório). As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio Zeiss® (modelo *Axioskop 2 plus*), em aumento de 50, 100 e 400 vezes. As imagens dos campos utilizados no estudo histológico foram registradas pela câmera (*Axio Cam Hrc* ®) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente, arquivadas pelo programa *Axio Vision 4.6*.

4.3.2.1 Análise das regiões de queimaduras (RQ1 a 4)

Após lesão de queimadura térmica por contato utilizando pente de metal no dorso direito e esquerdo de todos os animais dos grupos estudados, foram obtidos cortes de espessura total (tegumento) de toda a extensão da aplicação do pente de metal para avaliação. A avaliação histológica foi realizada nas quatro regiões de queimadura, para a caracterização histopatológica de necrose, edema e presença de focos hemorrágicos, a partir da técnica histológica de *Tricrômico de Masson*. Para a avaliação desses parâmetros histológicos foi utilizada classificação baseada no tipo de lesão avaliada: (0 – ausência de lesão no tecido; 1 – presença de necrose no tecido; 2 – presença de necrose e edema no tecido; 3 – presença de necrose, edema e focos hemorrágicos no tecido).

Também foi realizada a avaliação histológica da presença ou não de infiltrado inflamatório (II) no lúmen dos vasos sanguíneos e no tecido intercelular, a partir da técnica histológica de *Giemsa*. A partir da porcentagem desse tipo de achado nos vasos sanguíneos e/ou no tecido, foi utilizada a seguinte classificação: (0 – ausência de II nos vasos sanguíneos e no tecido; 1 – baixa porcentagem de II: menor que 25% da área do tecido e do número de vasos sanguíneos analisados; 2 – porcentagem moderada de II: entre 25% e 50% da área do tecido e do número de vasos sanguíneos analisados; 3- alta porcentagem de II: acima de 50% da área do tecido e do número de vasos sanguíneos analisados).

As duas avaliações histológicas descritas foram realizadas nas camadas mais profundas do tegumento: derme e hipoderme.

4.3.2.2 Análise das regiões de interespaços (RIE1 a 3)

A avaliação histológica também foi realizada nas três áreas de interespaços de pele não queimada. Assim, a partir da técnica histológica de *Tricrômico de Masson*, foi avaliado o grau de necrose na derme do dorso direito e esquerdo dos animais dos três grupos, classificado segundo o seguinte critério: (0 – ausência de necrose na derme; 1 – porcentagem muito baixa de necrose: menor que 10% da área da derme; 2 – porcentagem baixa de necrose: entre 10% e 25% da área da derme; 3 -

porcentagem moderada de necrose: entre 25% e 50% da área da derme; 4 – porcentagem alta de necrose: acima de 50% da área da derme).

4.3.3 Análise morfométrica

4.3.3.1 Medidas das regiões de queimaduras (RQ1 a 4) e dos interespaços (RIE1 a 3)

Na avaliação morfométrica foram medidas as regiões de lesão por queimadura (RQ1 a 4) presentes em cada pente de metal; assim como as medidas as regiões de interespaços (RIE1 a 3) de pele normal, em aumento de 50x. Essa avaliação foi realizada no dorso direito e esquerdo de todos os animais dos grupos em estudo.

4.3.3.2 Contagem de fibroblastos na derme dos interespaços (RIE1 a 3)

A partir da escolha de três campos (aumento de 400x) nas regiões de interespaços (RIE1 a 3): um campo central e dois campos nas regiões de transição com as áreas de queimaduras; foi realizada a contagem do número de fibroblastos na derme, após coloração das lâminas pela técnica de *Tricrômico de Masson*.

4.3.4 Dosagem de glutathiona no plasma

Após 7 dias da lesão e após anestesia, foi coletado o sangue do animal em tubo de tampa roxa contendo EDTA. Após foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos onde foi separado o plasma e em seguida armazenado em temperatura a 80°C negativo.

A dosagem da glutathiona foi realizada conforme a técnica padronizada por Elmman, 1959 e modificada por Hu, 1994.

Uma alíquota de 25 µL de soro fresco foi misturado com um mL de Tris-EDTA (0,25 mol/L Tris base, 0,20 mol/L EDTA, pH 8.2), e foi feito a leitura por absorbância de 412 nm. Logo após foi adicionado à solução, uma alíquota de 25 µL de DTNB (10mmol/L em metanol absoluto). Após 15 minutos em temperatura ambiente, a

leitura por absorbância foi feita outra vez.

A concentração dos grupos sulfidril foi calculada utilizando uma curva padrão de Glutathione reduzida, na unidade em mmol/L.

Para a análise foi utilizado um analisador bioquímico automático COBAS MIRA®Plus (Costa, 2006)

4.3.5 Análise Estatística

As comparações entre os grupos quanto às variáveis pesos inicial, ganho de peso e consumo de ração foram feitas através da análise de variância (ANOVA). Também foi utilizado o pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas (Montgomery, 2012).

Para as comparações entre grupos quanto ao percentual de necrose e mudança do % necrose foi utilizada o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida por rato) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (Schall, 1991).

As análises variáveis pesos inicial, ganho de peso e consumo de ração, comparações entre grupos quanto ao percentual de necrose e mudança do % necrose por fotografia, foram feitas através do software SAS® 9.2 e todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do software R, versão 3.1.1.

As análises histológicas, morfométricas e glutathione, foram feitas com o programa GraphPad Prism 7.0. As comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância *One Way Anova*, e o teste de Comparação Múltipla de *Tukey* (Montgomery, 2012). Os gráficos foram feitos utilizando o mesmo programa.

Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Pesos dos animais e consumo de ração

Segue abaixo as figuras e tabelas demonstrando a comparação do peso e consumo de ração entre os grupos estudados.

Tabela 1. Análise descritiva do peso dos animais no início do experimento, porcentagem de ganho de peso dos animais e consumo de ração, do início ao fim do experimento, dos grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Grupo	Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
Controle	peso inicial (g)	10	251,00	29,41	216,00	230,00	239,00	278,00	300,00
	% ganho de peso	10	12,24	4,17	5,93	8,16	13,20	16,52	17,46
	consumo ração (g)	10	33,4	3,4	29,3	30,0	33,4	35,7	39,3
Dipeptídeo	peso inicial (g)	10	239,00	10,12	218,00	236,00	238,00	246,00	254,00
	% ganho de peso	10	10,89	5,60	2,75	6,61	10,70	15,45	20,34
	consumo ração (g)	10	31,3	3,0	24,3	30,3	31,9	32,7	36
AA-livre	peso inicial (g)	10	247,00	8,34	238,00	238,00	246,00	252,00	264,00
	% ganho de peso	10	9,37	5,39	-2,52	8,94	9,97	11,81	18,49
	consumo ração (g)	10	32,8	4,0	24,3	30,3	33,3	35,0	38,3

No início do experimento, os animais do Grupo 1-Controle (solução fisiológica a 0,9%) apresentaram média de peso de 251 gramas o Grupo 2 - (Dipeptídeo) 239 gramas e o Grupo 3- aminoácido livre (AA-livre) 247 gramas (Tabela 1). Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela 2).

No final do experimento o grupo dos animais que recebeu solução fisiológica a 0,9% (Controle) apresentou porcentagem de ganho de peso de 12,24% em relação ao peso inicial, o grupo que recebeu a glutamina na forma de dipeptídeo (Dipeptídeo) apresentou porcentagem de ganho de peso de 10,89% em relação ao peso inicial e o grupo que recebeu glutamina na forma de aminoácido livre (AA-livre) apresentou uma porcentagem de ganho de peso de 9,37% em relação ao peso inicial, (Tabela 1). Não apresentando diferença entre os grupos($p>0.05$) (Tabela 3)

O consumo de ração por dia pelos Grupos 1, 2 e 3 foi de 33,4 gramas, 31,3 gramas e 32,8 gramas respectivamente, durante o experimento (Tabela 1). Não apresentando diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela 4)

Figura 15. Representação gráfica dos pesos dos animais, do Grupo 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre, no início do experimento. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$).

Tabela 2. Comparação do peso dos animais entre os grupos, no início do experimento.

Comparação	Diferença estimada	Intervalo de confiança simultâneo (95%)		Teste de Tukey
C- D	12,00	-8,62	32,62	S/D
C - AAL	4,00	-16,62	24,62	S/D
AAL - D	8,00	-12,62	28,62	S/D

C = Grupo 1- Controle; D = Grupo 2- Dipeptídeo e AAL = Grupo 3- AA-livre ; S/D = sem evidência de diferença.

A Figura 15 mostra a representação gráfica dos pesos dos animais no início do tratamento dos grupos estudados. Como pode ser observado na Tabela 2, quando foi comparado o peso dos animais no início do tratamento, não foi observado diferença entre os Grupos 1, 2 e 3.

Figura 16. Representação gráfica mostrando a porcentagem de ganho de peso dos animais de cada grupo, durante o experimento. Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 3. Comparação da porcentagem de ganho de peso durante o experimento, entre os grupos 1, 2 e 3.

Comparação	Diferença estimada	Intervalo de confiança simultâneo (95%)		Teste de Tukey
C - D	1,35	-4,30	6,99	S/D
C - AAL	2,86	-2,78	8,51	S/D
AAL - D	-1,52	-7,16	4,13	S/D

C = Grupo 1- Controle; D = Grupo 2- Dipeptídeo e AAL = Grupo 3- AA-livre; S/D = sem evidencia de diferença.

A Figura 16 mostra a representação gráfica das porcentagens de ganhos de pesos durante o experimento dos grupos estudados. Não foi observada diferença entre os grupos, quanto a porcentagem de ganho de peso entre os Grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre, entre o início e final do experimento, conforme demonstrado na Tabela 3.

Figura 17. Representação gráfica do consumo de ração pelos animais de cada grupo, durante o experimento. Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 4. Comparação do consumo de ração entre os grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Comparação	Diferença	Intervalo de confiança		Teste de Tukey
	estimada	simultâneo (95%)		
C - D	2,10	-1,78	5,98	S/D
C - AAL	0,53	-3,35	4,41	S/D
AAL - D	1,57	-2,31	5,45	S/D

C = Grupo 1- Controle; D = Grupo 2- Dipeptídeo e AAL = Grupo 3- AA-livre; S/D = sem evidência de diferença.

A Figura 17 mostra a representação gráfica do consumo de ração pelos animais dos grupos estudados, durante o experimento. Não foi observado diferença entre os Grupos 1, 2 e 3 ($P>0,05$), quanto ao consumo de ração, durante o experimento, conforme demonstrado na Tabela 4.

5.2 Análises fotográficas

A seguir estão apresentados os resultados obtidos pela análise fotográfica na forma de figuras e tabelas.

Tabela 5. Análise descritiva da porcentagem de necrose no momento 48 horas e sete dias após a lesão, nos Grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Grupo	Momento	Número de observações	Média	Desvio-padrão	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
Controle	48h	60	48,15	24,23	0,00	29,43	50,74	68,76	91,28
	7 dias	60	44,00	23,06	0,00	28,56	41,05	65,05	85,10
Dipeptídeo	48h	54	53,62	27,84	0,00	34,10	60,71	75,17	96,87
	7 dias	60	48,92	23,27	0,00	38,17	54,65	66,11	89,09
AA-livre	48h	60	47,07	24,30	0,00	27,91	45,31	69,31	89,58
	7 dias	60	40,60	21,27	10,87	23,18	35,53	57,28	82,09

Na tabela 5 observamos as porcentagens de necrose 48 horas e sete dias após a lesão. No Grupo 1- Controle, notamos que houve 48,15% de necrose 48 horas após a lesão e 44% de necrose, sete dias após a lesão. No grupo tratado com

glutamina na forma de dipeptídeo (Dipeptídeo), a porcentagem de necrose nos interespaços após 48 horas da lesão foi de 53,62% e de 48,92% após sete dias da lesão. Finalmente no grupo tratado com glutamina e alanina na forma de aminoácidos livres (AA-livre), no momento 48 horas a média da porcentagem de necrose foi de 47,07% e após sete dias foi de 40,6% da área total dos interespaços.

Figura 18: Representação gráfica da porcentagem de evolução da necrose nos interespaços da queimadura, no momento 48 horas e sete dias após a lesão do Grupo 1- Controle, Grupo 2-Dipeptídeo e Grupo 3- AA-livre. Não se observou diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 6: Comparação da evolução de necrose até 48 horas e até sete dias de tratamento entre os Grupos Controle, Dipeptídeo e AA-livre e comparação da evolução da necrose no intervalo entre 48 horas e sete dias de tratamento em cada grupo.

Comparação	Diferença estimada	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
48h (Controle - Dipeptídeo)	-4,96	-20,68	10,76	0,54
48h (Controle – AA-livre)	1,09	-14,51	16,68	0,89
48h (AA-livre - Dipeptídeo)	-6,05	-21,77	9,68	0,45
7 dias (Controle - Dipeptídeo)	-4,93	-20,52	10,67	0,53
7 dias (Controle – AA-livre)	3,40	-12,19	18,99	0,67
7 dias (AA-livre - Dipeptídeo)	-8,32	-23,92	7,27	0,29
Controle (48h - 7 dias)	-4,15	-10,47	2,16	0,20
Dipeptídeo (48h - 7 dias)	-4,19	-10,81	2,44	0,21
AA-livre (48h - 7 dias)	-6,47	-12,78	-0,16	0,04

Conforme demonstrado na Figura 18 e Tabela 6 não se observou diferença entre os grupos controle (Controle) e tratados com glutamina na forma de dipeptídeo (Dipeptídeo) e na forma de aminoácido livre (AA-livre) e na progressão para necrose dos interespaços, tanto no momento 48 horas como no sete dias ($p>0,05$). Quando se comparou dentro do mesmo grupo a evolução da necrose nos momentos 48 horas e sete dias, observou-se diferença estatística ($p<0,05$) apenas no Grupo 3- AA-livre. Portanto, a glutamina, na forma de aminoácido livre (AA-livre), demonstrou redução significativa da necrose no intervalo entre 48 horas e sete dias ($p=0,04$).

Nos Grupos 1- Controle e 2- Dipeptídeo não houve diferença estatística nesse intervalo entre os momentos 48 horas e sete dias ($p>0,05$).

Tabela 7. Análise descritiva da mudança da porcentagem de necrose no intervalo de tempo entre o momento 48 horas e sete dias após a lesão (sete dias – 48 horas), nos grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Grupo	Número de observações	Média	Desvio-padrão	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
Controle	60	-4,15	11,45	-34,33	-9,77	-4,85	1,34	33,00
Dipeptídeo	54	-4,19	11,67	-24,80	-10,87	-4,80	2,85	38,34
AA-livre	60	-6,47	11,91	-32,50	-13,97	-6,57	0,03	29,61

Na tabela 7 observamos as diferenças estimadas, em porcentagem, de necrose no intervalo entre 48 horas e sete dias após a lesão. No grupo 1- Controle observou-se média de -4,15%. No grupo 2 tratado com glutamina na forma de dipeptídeo (Dipeptídeo), a média foi de -4,09%. No Grupo 3 tratado com glutamina e alanina na forma de aminoácidos livres (AA-livre) a média estimada foi de -6,47%, ou seja, diferença entre os percentuais de necrose no momento sete dias comparados com o do momento 48 horas foi de -6,47. Não se observou diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).

Figura 19. Representação gráfica da porcentagem de evolução da necrose nos interespaços da queimadura, no intervalo entre o momento 48 horas e sete dias após a lesão entre os Grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre. Não se observou diferença ($P > 0,05$).

Tabela 8. Comparação da evolução de necrose no intervalo entre o momento 48 horas e sete dias de tratamento entre os Grupos 1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Comparação	Diferença estimada	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
Controle - Dipeptídeo	-0,07	-5,40	5,27	0,98
Controle – AA-livre	2,31	-2,88	7,51	0,38
AA-livre - Dipeptídeo	-2,38	-7,72	2,96	0,38

Conforme demonstrado na Figura 19 e na tabela 8, a avaliação no intervalo entre o momento 48 horas e sete dias de tratamento, a diferença estimada entre os Grupos 1- Controle e 2- Dipeptídeo a diferença foi de -0,07%, o Grupo 1- Controle e o Grupo 3- AA-livre foi de 2,31%. E finalmente entre os Grupos 3- AA-livre e 2- Dipeptídeo a diferença foi de -2,38%. Com esses resultados não se observou diferença entre os Grupos 1- Controle e tratados com glutamina na forma de aminoácido livre (AA-livre) e na forma de dipeptídeo (Dipeptídeo) na redução da

necrose nos interespaços. Não houve diferença na comparação entre os três grupos ($P>0,05$).

5.3 Análise histológica

5.3.1 Análise das regiões de queimaduras (RQ1 a 4)

A avaliação realizada nas quatro regiões de queimadura para a caracterização histopatológica mostrou que as alterações foram observadas nos três grupos estudados, sendo maior nos animais do Grupo 1- Controle (média: 2,714 na derme e média: 2,706 na hipoderme) e menor nos animais dos Grupos 2- Dipeptídeo (média: 2,197 na derme e média: 2,185 na hipoderme) e Grupo 3- AA-livre (média: 2,697 na derme e média: 2,657 na hipoderme). Muitos animais do Grupo 1- Controle mostraram alterações grau 3 na derme e hipoderme (Figuras 20 a 22 e anexo 1). Alterações histológicas também puderam ser observadas profundamente na camada muscular (Figuras 20 a 22 e anexo 2). Após avaliação dérmica, foi observada diferença entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0064$), em que o Grupo 1- Controle apresentou maior grau de necrose, edema e focos hemorrágicos e 2 x 3 ($p=0,0012$), onde o Grupo 2- Dipeptídeo apresentou menor alteração nessas avaliações em relação ao Grupo 3- AA-livre (*One Way Anova*, teste de Comparação Múltipla de *Tukey*) (Figura 23). A avaliação hipodérmica mostrou diferença entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0031$), onde o Grupo 1- Controle apresentou maior grau de necrose, edema e focos hemorrágicos e 2 x 3 ($p=0,0007$), em que o Grupo 2- Dipeptídeo apresentou menor grau de necrose, edema e focos hemorrágicos em relação ao Grupo 3- AA-livre e na comparação entre os Grupos 1 x 3 não houve diferença (Figura 24).

Figura 20. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle onde são observados focos hemorrágicos na derme e hipoderme (setas). Vaso sanguíneo central (VS). Tricrômico de Masson; 400x.

Figura 21. Fotomicrografia de animal do Grupo 2- Dipeptídeo com a presença de necrose em algumas regiões da derme (setas) logo abaixo da epiderme (E) e na hipoderme (setas abaixo a direita). Foliculo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x.

Figura 22. Fotomicrografia de animal do Grupo 3- AA-Livre mostrando amplas regiões de edema na derme e hipoderme (setas). Folículo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x.

Figura 23. Média após classificação (0, 1, 2 ou 3) das lesões histológicas (necrose, edema e focos hemorrágicos) na derme das regiões de queimaduras entre os grupos estudados (1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre). Diferença observada entre os Grupos 1 x 2 ($p=0,0064$) e 2 x 3 ($p=0,0012$).

Figura 24. Média após classificação (0, 1, 2 ou 3) das lesões histológicas (necrose, edema e focos hemorrágicos) na hipoderme das regiões de queimaduras entre os grupos estudados (Controle, Dipeptídeo e AA-livre). Diferença observada entre os grupos 1 x 2 ($p=0,0031$) e 2 x 3 ($p=0,0007$).

A avaliação histológica da presença ou não de infiltrado inflamatório (II) na derme e hipoderme mostrou que esse achado histológico foi maior nos animais do grupo 1- Controle (porcentagem com classificações 1, 2 e 3) quando comparado aos animais dos grupos 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre (porcentagem com classificações 1 e 2); sendo maior no lúmen dos vasos sanguíneos (grupo 1 com média 1,9; grupo 2- Dipeptídeo com média 1,12 e grupo 3- AA-livre com média 1,43) quando comparado ao tecido intercelular (Grupo 1- Controle com média 1,27; Grupo 2- Dipeptídeo com média 0,86 e Grupo 3- AA-livre com média 0,87) (Figuras 25 e 26 e anexo 3). Embora tenha sido observada ausência de II no tecido intercelular, principalmente em alguns animais dos Grupos 2- Dipeptídeo e 3- AA- livre; alguns animais do Grupo 1- Controle mostraram II com porcentagem de classificação 3 no tecido intercelular (anexo 3). A presença de II no lúmen dos vasos sanguíneos e no tecido intercelular não foi diferente nos animais dos Grupos 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre (médias 0,86 e 0,87 para os grupos 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre, respectivamente) (Figuras 25 e 26 e anexo 3).

Figura 25. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle onde pode ser observado foco hemorrágico (FH) na hipoderme; assim como a presença de muitos neutrófilos (setas menores) no lúmen de um vaso sanguíneo (VS), alguns em diapedese através da sua parede (seta maior). As setas mais delgadas mostram pequeno infiltrado inflamatório intercelular. Giemsa; 400x

Figura 26. Fotomicrografia de animal do Grupo 3- AA-livre mostrando detalhe de um vaso sanguíneo (VS) na derme (D) com a presença de alguns neutrófilos característicos no seu lúmen (setas). Giemsa; 400x.

A avaliação do infiltrado inflamatório no interior dos vasos sanguíneos, mostrou diferença entre os animais dos grupos 1 x 2 ($p=0,0004$) (Figura 27) em que o Grupo 1- Controle mostrou maior infiltrado inflamatório em relação ao Grupo 2- Dipeptídeo. Para a avaliação do infiltrado inflamatório intercelular, foi observada diferença entre os grupos 1 x 2 ($p=0,0048$) e 1 x 3 ($p=0,0065$) (Figura 28) onde o Grupo 1- Controle apresentou maior infiltrado inflamatório em relação aos Grupos tratados 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre.

Figura 27. Média após classificação (0, 1, 2 ou 3) da presença de infiltrado inflamatório no interior dos vasos sanguíneos nas regiões de queimaduras entre os grupos estudados (Controle, Dipeptídeo e AA-livre). Diferença observada entre os grupos 1 x 2 ($p=0.0004$).

Figura 28. Média após classificação (0, 1, 2 ou 3) da presença de infiltrado inflamatório no espaço intercelular dérmico e hipodérmico nas regiões de queimaduras entre os grupos estudados (1- Controle, 2- Dipeptídeo e 3- AA-livre). Diferença observada entre os grupos 1 x 2 ($p=0,0048$) e 1 x 3 ($p=0,0065$) .

5.3.2 Análise das regiões de interespaços (RIE1 a 3)

A avaliação histológica do grau de necrose na derme das três áreas de interespaços no dorso direito e esquerdo dos animais dos três grupos estudados, mostrou ser baixa nos três grupos estudados; porém, maior nos animais do Grupo 1- Controle (média 0,95) quando comparado aos animais do Grupo 2-Dipeptídeo (média 0,73) e Grupo 3- AA-livre (média 0,8). (Anexo 4 e Figura 29).

A maioria dos animais do grupo 1- Controle apresentou grau muito baixo de necrose (grau 1), sendo observado grau baixo de necrose (grau 2) em apenas três dos interespaços analisados (Anexo 4).

Figura 29. Fotomicrografia de animal do Grupo 1 (Controle) com a presença de necrose na região mais superior da derme (setas) logo abaixo da epiderme (E). Folículo piloso (FP). Tricrômico de Masson; 100x.

A avaliação da área de necrose nos interespaços não mostrou diferença entre os animais dos grupos estudados ($p=0,1027$) (Figura 30).

Figura 30. Média após classificação área de necrose na derme (0, 1, 2, 3 ou 4) nas regiões de interespaços (RIE1, RIE2 e RIE3) entre os grupos estudados. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,1027$).

5.4 Análise morfométrica

5.4.1 Medidas das regiões de queimaduras (RQ1 a 4)

A avaliação morfométrica das regiões de lesão por queimadura (RQ1 a 4) no dorso direito e esquerdo dos animais de todos os grupos em estudo mostrou que as medidas (em milímetros) (Figura 31) dos animais do Grupo 1- Controle foi de 81,78 mm no total (somado os valores dos 10 animais) e média de 1,022 mm (obtido pelo valor total: 81,78 mm dividido pelas 80 regiões de queimaduras medidas neste grupo) (anexo 5). Nos animais do Grupo 2- Dipeptídeo o valor total foi de 78,96 mm e média 0,987 mm e o Grupo 3- AA-livre o valor total foi de 79,55 mm e a média 0,994 mm (Anexo 5).

Figura 31. Fotomicrografia de animal do Grupo 1- Controle mostrando área de transição entre uma região de tegumento normal com identificação da sua epiderme (E) e uma região de queimadura (RQ) com medida (em mm) mostrada pela linha preta. Tricrômico de Masson; 50x.

A avaliação da medida da área de queimadura não mostrou diferença entre os animais dos grupos estudados ($p=0,1328$) (Figura 32).

Medida da área de Queimadura

Figura 32. Média do comprimento (em mm) das regiões de queimadura (RQ1 a 4) nas regiões de interespaços (RIE1, RIE2 e RIE3) entre os grupos estudados. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,1328$).

5.4.2 Medidas das regiões de interespaços (RIE1 a 3)

Quanto à avaliação morfométrica das regiões de interespaços (RIE1 a 3) no tegumento do dorso direito e esquerdo dos animais de todos os grupos em estudo, foi observado que nos animais do Grupo 1- Controle as medidas (em milímetros) do comprimento foi 35,6 mm no total (somado os valores dos 10 animais) e média de 0,593 mm (obtido pelo valor total: 35,6 mm dividido pelas 60 regiões de interespaços medidas neste grupo) (Anexo 6). Nos animais do Grupo 2- Dipeptídeo o valor total foi de 39,94 mm e a média 0,665 mm e no Grupo 3- AA-livre o valor total foi de 39,58 mm e a média 0,659 mm (Anexo 6).

A comparação entre os Grupos 1 x 2 das medidas do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) mostrou que o Grupo 2- Dipeptídeo apresentou maior comprimento dos interespaços em relação ao Grupo 1- Controle ($p=0,0052$), enquanto ao compararmos Grupo 1- Controle x 3- AA-livre foi observado que o Grupo 3- AA-livre apresentou maior comprimento dos interespaços em relação ao Grupo 1- Controle ($p=0,0111$) (Figura 33).

Figura 33. Média do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa observada entre os Grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0052$) e 1- Controle x 3- AA-livre ($p=0,0111$) .

5.4.3 Contagem de fibroblastos na derme dos interespaços (RIE1 a 3)

A contagem do número de fibroblastos (identificados pelos seus núcleos como indicado pelas setas na Figura 34) nos três campos escolhidos nas regiões de interespaços (RIE1 a 3) da derme do dorso direito e esquerdo dos animais, mostrou que o Grupo 3- AA-livre apresentou média de 44,93 os animais do Grupo 2- Dipeptídeo média de 46,22 e os animais do Grupo 1- Controle a média foi de 41,28 (Anexo 7 e Figura 34).

Vale ressaltar que o número de fibroblastos, nos três grupos estudados, sempre foi maior no campo central (Anexo 7 e Figura 34) quando comparado aos campos escolhidos nas regiões de transição com as áreas de queimaduras.

Figura 34. Fotomicrografia mostrando visão geral da derme com fibras colágenas coradas em azul pela técnica de Tricrômico de Masson; 100x. Folículo piloso (FP). Acima e a direita, detalhe da derme mostrando um vaso sanguíneo (VS) inferiormente e vários núcleos (setas) de fibroblastos entre as fibras colágenas da derme em rosa. Giemsa; 400x.

A avaliação da média da contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos interespaços (RIE1 a 3) mostrou que os animais do Grupo 2- Dipeptídeo apresentou maior número de fibroblastos em relação ao Grupo 1- Controle ($p=0,0121$). Nos animais do Grupo 3- AA-livre apresentou maior número de fibroblastos em relação ao Grupo 1- Controle ($p=0,0068$) (Figura 35).

Figura 35. Média da contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos interespaços (RIE1 a 3) entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa observada entre os Grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0121$) e Grupo 1- Controle x 3- AA-livre ($p=0,0068$).

5.5 Dosagem de glutathiona no plasma

A dosagem da glutathiona em μM mostrou que os animais do Grupo 3- AA-livre tiveram média de 9,734, os animais do Grupo 2- Dipeptídeo a média foi de 11,75 e os animais do Grupo 1- Controle apresentaram média de 8,828. (anexo 8)

A avaliação da média da quantidade de glutathiona mostrou que os animais do Grupo 2- Dipeptídeo apresentou maior quantidade em relação ao Grupo 1- Controle ($p=0,0418$) e não se observou diferença entre o Grupo 1- Controle x 3- AA-livre ($p>0,999$) (Figura 36).

Figura 36. Média da quantidade de glutathiona (em μM) no plasma entre os grupos estudados. Diferença estatisticamente significativa observada entre os grupos 1- Controle x 2- Dipeptídeo ($p=0,0418$).

6 DISCUSSÃO

O mecanismo da progressão da zona de estase para necrose, ainda não está bem estabelecido, no entanto, há indícios que a isquemia-reperfusão (I/R) e o estresse oxidativo são muito importantes nesse processo (Singh et al., 2007).

O dano celular e o aumento da extensão da queimadura podem ser agravados pela liberação de substâncias citotóxicas como espécies reativas ao oxigênio (ex: peróxido de hidrogênio), citocinas (ex: TNF- α) e espécies reativas ao nitrogênio (ex: óxido nítrico) (Arturson, 2000; Singh et al., 2007).

A glutamina é precursora da glutatona um importante antioxidante não enzimático (Freeman; Crapo, 1982; Kirschner; Fantini, 1994). Quando ofertada na forma de dipeptídeo parece ser transferida em maior quantidade do intestino para o plasma, em relação a glutamina na forma de aminoácido livre (Harris, et al., 2012).

Apesar de vários estudos com a glutamina em diversas doenças, a avaliação na cicatrização em queimaduras ainda é restrita (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011; Kesici et al, 2013). Não encontramos trabalhos na literatura, até a presente data, em que tenha sido avaliado o efeito da glutamina, especificamente, na evolução da necrose em queimaduras.

6.1 Modelo de lesão térmica (queimadura)

O modelo de pente usado para realizar a queimadura no animal produz de modo uniforme, múltiplas queimaduras de terceiro grau com intervalos com distância lateral representada pela zona de estase, que pode ser reproduzida de modo uniforme. A possibilidade de produzir uma lesão uniforme é necessária para avaliar a resposta fisiológica da queimadura e a eficácia da terapia utilizada para o tratamento. O modelo de pente de queimadura, já validado (Regas; Ehrlich, 1992) tem essas especificidades e desta forma, foi utilizado, no presente estudo.

O aquecimento do pente metálico ocorreu em água à 98°C (o máximo atingido por estarmos numa altitude acima do nível do mar), e aplicado por 30 segundos. Nos estudos já publicados por outros autores, a temperatura do pente metálico foi de 100°C (Singer et al., 2007; Singer et al., 2011) por 30 segundos. Essa diferença de 2°C para menos, não deixou de causar queimadura de terceiro grau no presente estudo.

Wu et al (2015) utilizou um disco de bronze aquecido a 80°C e aplicado por 20 segundos no dorso do rato para promover a lesão e conseguiu produzir, com estes parâmetros, queimadura de terceiro grau (Wu et al., 2015). Há que se observar que a temperatura e o tempo de exposição utilizados por este pesquisador foram menores se comparados ao nosso estudo.

6.2 Outros tipos de tratamento

Outros estudos utilizando esse modelo de queimadura já foram realizados utilizando outros tipos de tratamento.

Um dos estudos testou a Curcumina devido a sua ação em inúmeros efeitos biológico que auxiliam na cicatrização, como atividade antioxidante e proteção celular (Goel; Kunnumakkara; Aggarwal, 2008). Nesta ocasião, diferentes doses foram testadas e observou-se que a ação desta substância é dose dependente. A Curcumina foi capaz de reduzir os interespacos isquêmicos não queimados que evoluíram para necrose, quando administrado uma e duas horas após a lesão. O resultado obtido foi de 82% de progressão de necrose no grupo controle e na dose de 4µg/kg de peso, 10µg/kg de peso e 40µg/kg de peso, obteve resultado de progressão de necrose de 67%, 52% e 44%, respectivamente (Singer et al., 2011).

Em estudo prévio o mesmo autor observou que com o uso do mesmo tratamento, na quantidade de 100mg/kg por via oral por gavagem, houve progressão de necrose em 63% no grupo tratado e 95% no grupo controle (Singer et al., 2007).

Em outro estudo, o tratamento com Ibuprofeno neste modelo de queimadura restaurou a permeabilidade vascular e a perfusão dérmica. Foi verificado que a zona de estase levou à redução na circulação, relacionada ao preenchimento dos vasos

por trombos, prejudicando então a perfusão sanguínea, causando progressão da lesão tecidual, consequentemente aumentando a zona de necrose (coagulação) nos interespaços. Os autores concluíram que a restauração observada ocorreu, possivelmente, pelo fato do Ibuprofeno ter a propriedade de atuar na fibrinólise dos trombos (Regas; Ehrlich, 1992).

6.3 Glutamina no estresse oxidativo

No presente estudo foi utilizada a glutamina, por ser considerado um aminoácido condicionalmente essencial nas doenças críticas e nas lesões, por exemplo, queimaduras da pele. Vários estudos revelaram que a glutamina regula a função celular imunológica (Curi et al., 2005), melhora a imunidade humoral e atenua o estresse oxidativo induzido por lesão de queimadura (Yeh et al., 2003),

Na endotoxemia, manteve a microcirculação intestinal por aumentar a função da densidade capilar da parede intestinal e reduzir a ativação dos leucócitos (Lehmann et al., 2012) e atenuou o estresse oxidativo restabelecendo a quantidade de glutathione e a resposta pró-inflamatória atenuando a expressão de NF-kB (Cruzat et al., 2014).

Deve ser destacado a importância da glutamina no sistema antioxidante pois a glutamina é precursora do melhor antioxidante não enzimático, a glutathione (Freeman; Crapo, 1982; Kirschner; Fantini, 1994).

6.4 Glutamina na lesão de queimadura

No presente estudo, o resultado obtido por meio de fotografia, foi verificado que no Grupo 1- Controle houve 48,15% de necrose 48 horas após a lesão e 44% de necrose, sete dias após a lesão. No Grupo 2- Dipeptídeo, a porcentagem de necrose nos interespaços após 48 horas da lesão foi de 53,62% e após sete dias 48,92%. Finalmente, no Grupo 3- AA- livre, no momento 48 horas a média da porcentagem de necrose foi de 47,07% e após sete dias foi de 40,6% da área total dos interespaços. Quando comparado, dentro do mesmo grupo, a porcentagem de necrose no momento sete dias em relação a porcentagem de necrose no momento

48 horas, observou-se diferença ($p=0,04$) no grupo AA-livre, onde no momento sete dias foi menor em relação ao 48 horas. Essa diferença pode sugerir que a glutamina, na forma de aminoácido livre, teve efeito de prevenção na progressão da necrose.

No presente estudo não se observou, porém, diferença na comparação entre os grupos estudados quanto a porcentagem de necrose no momento 48 horas e sete dias.

A absorção intestinal da glutamina na forma de dipeptídeo, aparentemente, se dá de forma mais eficiente em relação ao aminoácido livre, tendo então maior biodisponibilidade (Rogerio et al., 2002).

Há de se considerar que uma das vias do metabolismo da glutamina é a conversão em citrulina e em seguida a citrulina é convertida, no rim, em arginina. Considerando ainda que a arginina é um substrato chave para a síntese do óxido nítrico (Barbul et al., 1990), possivelmente, o resultado será a produção excessiva de óxido nítrico, que levará a piora da necrose.

A possível explicação para o fato de obtermos diferença apenas no grupo AA-livre no presente estudo, poderia ser pelo fato de que a glutamina utilizada na forma de dipeptídeo nessa dose resultou em maior absorção pelo intestino levando a produção excessiva de óxido nítrico,

O óxido nítrico em baixas concentrações é benéfica, mas em altas concentrações leva a formação de peroxinitrito, que pode iniciar a injúria oxidante (nitração) (Szabo et al, 1999; Vo, et al., 2005) agravando os danos no tecido causados por isquemia e reperfusão (Giusti-Paiva; De Castro, 2002; Chabrier, et al., 1999). Age aumentando a vasodilatação periférica resultando em descompensação vascular e aumentando a produção de NF- κ B, ativando as citocinas inflamatórias (Szabo et al, 1999).

Utilizando o mesmo modelo de queimadura, prévios estudos obtiveram maior extensão da necrose (95% e 82%) em relação ao presente estudo (44%), no grupo controle. Essas informações sugerem que os nossos resultados poderiam ser mais expressivos, na avaliação fotográfica, se tivéssemos obtido uma maior porcentagem de necrose.

A dose de glutamina utilizada em nosso trabalho foi de 1g/kg de peso tanto na forma de aminoácido livre como de dipeptídeo. Utilizando camundongos e ratos respectivamente, prévios estudos (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011; Goswami, et al., 2016) utilizaram a mesma dose na forma de aminoácido livre e obtiveram redução no período de epitelação das feridas.

Outro ponto a ser destacado é a porcentagem da área queimada. Para que o ser humano seja considerado um grande queimado é necessário apresentar queimadura de terceiro grau em pelo menos 10% da superfície corpórea (Prestes, 2008), sugerindo que o nosso modelo corresponde a uma porcentagem muito pequena, contudo outro autor (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011) utilizando porcentagem menor (1,7%) ao nosso estudo, obteve epitelação consideravelmente ruim.

Em relação a dose de glutamina nós utilizamos 1g/kg de peso tanto na forma de dipeptídeo (G2-Dipeptídeo) como na forma de aminoácido livre (G3-AA-livre) com resultado de melhora na evolução da necrose entre o momento 48 horas e sete dias no grupo que recebeu a glutamina na forma de aminoácido livre, na avaliação por fotografia. Prévio estudo (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011) utilizando camundongo adotaram a mesma dose de glutamina (1g/kg) na forma de aminoácido livre e obteve redução significativa no período de epitelação de feridas a partir do 7º dia.

A ração ofertada em nosso estudo foi a ração comercial padrão para ratos com 22g de proteína/100g de ração (NUVILAB CR1, Quintia, S.A., Colombo, Brasil), conforme utilizado em trabalhos prévios (Zhang, et.al, 2013; Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari, 2011). O paciente com lesão por queimadura apresenta hipercatabolismo, tendo como maior destaque a maior necessidade de proteínas (Stein, M. H. S.; Bettinelli, R. D.; Vieira, B. M., 2013). A recomendação de proteína na ração para ratos é de 15,0g/100g de ração (National Research Council, 1995), portanto a ração ofertada é hiperprotéica.

Após a lesão ocorre a formação de edema devido à vasodilatação, aumento da atividade osmótica extra vascular (Arturson; Mellander, 1964) e aumento da permeabilidade microvascular (Arturson, 1979). Após essas alterações ocorre redução na perfusão, levando a isquemia tecidual e necrose (Zawacki, 1974).

No presente estudo observou-se por classificação da alteração histológica (necrose, edema e focos hemorrágicos) que na área queimada, o Grupo 2- Dipeptídeo apresentou menos alterações quando comparado com o Grupo 1- Controle ($p=0,0064$) e quando comparado com o Grupo 3- AA-livre ($p=0,0012$), (média do Grupo 1- Controle = 2,71, Grupo 2- Dipeptídeo = 2,2 e Grupo 3- AA- livre = 2,70). Na hipoderme (média do Grupo Controle 1- = 2,71, Grupo 2-Dipeptídeo = 2,2 e Grupo 3- AA-livre = 2,66) houve diferença quando comparado o Grupo 1- Controle com o Grupo 2- Dipeptídeo ($p=0,0031$) em que o Grupo 2- Dipeptídeo apresentou menor alteração quanto a necrose, edema e focos hemorrágicos e o Grupo 3- AA-livre apresentou maior alteração em relação ao Grupo 2- Dipeptídeo ($p=0,0007$), não havendo diferença entre o Grupo 1- Controle e 3- AA-livre.

Apesar de não ter ocorrido diferença significativa no grau de necrose nas áreas de interespaços (média do Grupo 1- Controle = 0,95, Grupo 2- Dipeptídeo = 0,73 e Grupo 3- AA-livre = 0,8), houve uma tendência a ser menor no Grupo 3- AA-livre e menor ainda no Grupo 2-Dipeptídeo.

Esse resultado vai ao encontro da pesquisa de Li, et al (2013) quando observou que a glutamina atenuou as alterações histopatológicas do pulmão, amenizando o edema pulmonar e melhorando a oxigenação pulmonar, após injúria de lesão por inalação de fumaça, possivelmente por a glutamina ter inibido a resposta inflamatória e aumentado a expressão de HSP (proteína do choque térmico). Essa proteína contribui para a sobrevivência de células expostas a várias formas de estresse.

Com esses resultados pode se inferir que a glutamina teve papel protetor amenizando as alterações na lesão, caracterizadas por redução do edema e de focos hemorrágicos no tecido. Esse resultado demonstra que apesar da área de lesão de terceiro grau não ser reversível, poderia ser amenizada com a ação da glutamina.

Na avaliação morfométrica, o uso da glutamina proporcionou diferença na manutenção de maior comprimento dos interespaços nos grupos tratados, tanto na forma de aminoácido livre ($p=0,0111$) como de dipeptídeo ($p=0,0052$) quando comparado com o Grupo 1- Controle que não recebeu o tratamento (média do Grupo 1- Controle = 0,593 mm, Grupo 2- Dipeptídeo = 0,665 mm e Grupo 3- AA-livre =

0,659 mm), podendo se inferir que a glutamina proporcionou benefício na estabilização da necrose nas áreas não queimadas.

Nosso resultado vai ao encontro do resultado de Jalilimanesh, Mozaffari-Khosvari, Azhdari (2011) que também encontrou benefício quando administrou glutamina na forma de aminoácido livre na dose de 1g/kilo de peso do animal, porém em estudo de cicatrização e não de progressão da necrose. O pesquisador observou diferença na redução da lesão por queimadura de segundo grau (superfície da ferida no dia 1 – superfície da ferida no dia a ser comparado) a partir do sétimo dia após a lesão no grupo tratado e a partir do 10º dia no grupo controle. Observou ainda que o grupo tratado obteve cicatrização total em 100% dos animais no dia 22 e o grupo controle obteve cicatrização total somente em 71,4% dos animais (Jalilimanesh; Mozaffari-Khosvari; Azhdari 2011).

Wu et al. (2015), observou em ratos com queimaduras profundas que quanto maior o tempo em que se mantém a escara da queimadura, maior é a inflamação. Em nosso trabalho, avaliamos as queimaduras mantendo a escara, o que prolongaria a inflamação, mas a glutamina proporcionou redução do infiltrado inflamatório, no tempo estudado (7 dias após a lesão). Mondello et al, 2010 observaram o mesmo benefício com o uso da glutamina na I/R intestinal, onde houve redução no infiltrado de neutrófilo no grupo tratado.

A diferença observada, quanto à classificação do infiltrado inflamatório no vaso sanguíneo (Grupo 1- Controle = 1,88, Grupo 2- Dipeptídeo = 1,13 e Grupo 3- AA-livre = 1,44), quando comparado o Grupo 1- Controle com o 2- Dipeptídeo ($p=0.004$) e não com o 3- AA-livre, pode se inferir que essa maior concentração se deve ao fato de ser na lesão aguda. Dessa forma, ainda não teve o tempo para migrar para o intercelular, uma vez que quando avaliado no intercelular, foi observado diferença quando comparado o Grupo 1- Controle com o Grupo 2- Dipeptídeo ($p=0,0048$) em que o Grupo 1- Controle apresentou maior infiltrado inflamatório em relação ao Grupo 2- Dipeptídeo assim como o Grupo 1- Controle com o Grupo 3- AA-livre ($p=0,0065$), em que o Grupo 1- Controle também apresentou maior classificação quanto ao infiltrado inflamatório em relação ao Grupo 3- AA-livre. Não houve diferença entre esses dois grupos tratados (média do Grupo 1- Controle = 1,28, Grupo 2- Dipeptídeo = 0,87 e Grupo 3- AA-livre = 0,88).

Conforme reproduzido no parágrafo prévio, a oferta de glutamina beneficiou a redução de infiltrado inflamatório tanto na forma de aminoácido livre quanto na forma de dipeptídeo.

Logo após a queimadura ocorre um acúmulo de neutrófilos em vários tecidos como mucosa gástrica, pulmão e fígado, o que poderia justificar a grande produção de ROS, decorrente da reação inflamatória sistêmica da lesão (Gurbuz, et al., 1997), pois os neutrófilos NADPH oxidases são os principais produtores celulares de ROS na I/R decorrente da queimadura (Cuzzocrea, et al., 1997; Parihar, et al., 2008). A produção exagerada de ROS coloca todos os tecidos vulneráveis a lesão oxidativa (Aust, et al., 1986). A persistência da inflamação retarda a reepitelização e aumenta a chance de contração da cicatriz (Wu, et al., 2015).

O organismo em estado sem estresse mantém o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e varredores de ROS, não ocorrendo acúmulo de ROS, mas quando ocorre um desequilíbrio na produção de ROS, ou seja, uma produção excessiva, como na queimadura, a quantidade de antioxidante como a glutathione reduz, não sendo suficiente para varrer as ROS e RNS e atenuar a lesão por queimadura (Parihar, et al., 2008).

Em nosso estudo, os grupos tratados apresentaram maior concentração da glutathione (média do Grupo 1- Controle = 8,83, Grupo 2- Dipeptídeo = 11,75 e Grupo 3- AA-livre = 9,73 micromoles). O aumento foi significativo quando comparado o Grupo 1- Controle e o Grupo 2- Dipeptídeo ($p=0,0418$) apresentando maior quantidade no Grupo 2- Dipeptídeo e apesar de não ter sido significativa a diferença entre o Grupo 1- Controle e o Grupo 3- AA livre houve uma tendência a ser maior no Grupo 3- AA-livre.

É de conhecimento que a glutamina é precursora da glutathione que por sua vez é um importante antioxidante. Segundo Singer et al, 2011, a zona de estase da queimadura pode evoluir ou não para necrose e essa evolução pode ser influenciada pela alteração na perfusão, inflamação e estresse oxidativo induzido por ROS. A maior concentração de glutathione pode ter amenizado a inflamação e o estresse oxidativo que ocorre após a queimadura, por ser um importante varredor de ROS, proporcionando a manutenção dos espaços do grupo tratado.

O aumento da glutathione observado em nosso estudo também foi encontrado por Yan et al (2012) e Zhang, et al. (2013) quando suplementaram ratos com queimadura grave (30% da superfície corpórea), com 1,5 g/kg do animal de glutamina e do dipeptídeo glicil-glutamina, respectivamente, por gavagem, e observaram proteção miocárdica e melhora na função cardíaca por melhorar o edema e o metabolismo energético dos cardiomiócitos, aumentando a síntese de ATP e glutathione.

A diferença na concentração da glutathione no grupo Dipeptídeo pode ter ocorrido pelo fato de os aminoácidos na forma de dipeptídeos serem transportados intactos através do epitélio intestinal por oligopeptídeos transportadores PepT-1, mostrando maior absorção para dipeptídeos em relação ao aminoácido livre (Adibi, S.A.; 1997). Rogero et al,(2004) verificaram maior concentração de glutamina no plasma e músculo quando suplementaram, por gavagem, glutamina na forma de dipeptídeo do que quando na forma de aminoácido livre, em ratos sedentários, possivelmente por grande parte da glutamina na forma de aminoácido livre ser consumida pelos enterócitos.

A preservação dos interespacos e a cicatrização mais acelerada com o uso da glutamina também pode ter sido beneficiada com o aumento do número de fibroblastos nos grupos tratados (média Grupo 1- Controle = 41, Grupo 2- Dipeptídeo = 46,22 Grupo 3- AA-livre = 44,93), sendo significativa a diferença entre o Grupo 1- Controle comparado com os grupos 2- Dipeptídeo ($p=0,0418$) assim como quando comparado com o Grupo 3- AA-livre ($p=0,0068$) A glutamina é a principal fonte de energia para os fibroblastos (Eagle et al., 1956).

Os fibroblastos favorecem a fase de proliferação e remodelamento da cicatrização, sintetizando o colágeno e liberando fator de crescimento que favorece a epitelização, angiogênese e granulação (Chow, O.; Barbul, A., 2014).

7 CONCLUSÕES

- 1- Na avaliação por fotografias, a glutamina na forma de aminoácido livre proporcionou benefício na redução ou na estabilização da evolução da necrose nos interespaços de queimadura em ratos, no intervalo entre 48 horas e sete dias;
- 2- Na avaliação por histologia, foi observado benefício no grupo que recebeu o aminoácido na forma de dipeptídeo, apresentando redução das lesões histológicas. Foi observada redução da inflamação tanto no grupo que recebeu o aminoácido na forma de aminoácido livre quanto na forma de dipeptídeo;
- 3- Na avaliação por morfometria, a glutamina tanto na forma de aminoácido livre como na forma de dipeptídeo, proporcionou benefício na redução ou na estabilização da evolução da necrose nos interespaços de queimadura em ratos. A contagem de fibroblastos foi maior tanto na forma de aminoácido livre quanto na forma de dipeptídeo.
- 4- A glutamina na forma de dipeptídeo proporcionou aumento do antioxidante glutathione.
- 5- A redução das lesões histológicas, redução da inflamação, manutenção de maior extensão dos interespaços, a maior quantidade de fibroblastos e o aumento da glutathione, com a administração de glutamina, observados no presente estudo, podem ter beneficiado a manutenção ou redução da evolução da necrose de queimadura em ratos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIBI, S. A.; The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 113, n. 1, p. 332-40, 1997.
- ARDAWI, M. S.; Glutamine-synthesizing activity in lungs of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. **Biochem J**, London, v. 270, n. 3, p. 829-32, 1990.
- ARDAWI, M. S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochem J**, London, v. 208, n. 3, p. 743-8, 1982.
- ARDAWI, M. S.; NELSHOLME, E. A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem J**, London, v. 212, n. 3, p. 835-42, 1983.
- ARDAWI, M. S.; NELSHOLME, E. A. Fuel utilization in colonocytes of the rat. **Biochem J**, London, v. 231, n. 3, p. 713-9, 1985.
- ARTURSON, G. Microvascular permeability to macromolecules in thermal injury. **Acta Physiol Scand**, Stockholm, v. 463, p. 111-22, 1979.
- ARTURSON, G. Forty years in burns research - the postburn inflammatory response. **Burns**, Amsterdam, v. 26, n. 7, p. 599-604, 2000.
- ARTURSON, G.; MELLANDER, S. Acute changes in capillary filtration and diffusion in experimental burn injury. **Acta Physiol Scand**, Stockholm, v. 62, p. 457-63, 1964.
- AUST, S.D., et al. Reactive oxygen and toxicity. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 197, p. 513-26, 1986.
- AVENELL, A. Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews. **Proc Nutr Soc**, Wallingford, v. 65, n. 3, p. 236-41, 2006.
- BARBOSA, R. C. C. et al. Metabolic effects of glutamine in rats subjected to scald burn. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 537-541, 2003.
- BARBUL, A. et al. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. **Surgery**, St. Louis, v. 108, n. 2, p. 331-6; discussion 336-7, 1990.
- BASTOS, J. A. V.; FREITAS, A. G. D.; FIGUEROA, G. E. G. Atendimento primário ao paciente queimado. In: MÉLEGA, J. M. (Ed.). **Cirurgia Plástica - Fundamentos e Arte - Princípios Gerais**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2002.
- BERGSTROM, J. et al. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 36, n. 6, p. 693-7, 1974.
- BERRY, M. G.; EVISON, D.; ROBERTS, A. H. The influence of body mass index on burn surface area estimated from the area of the hand. **Burns**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 591-4, 2001.
- BLEBEA, J. et al. Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 311-21, 1987.

- BRASSE-LAGNEL, C.; LAVOINNE, A.; HUSSON, A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. **FEBS J.**, Oxford, v. 276, p. 1826-44, 2009.
- CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 55, n. 1 Suppl, p. 299S-308S, 1992.
- CASTELL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition**, Los Angeles, v. 13, n. 7-8, p. 738-42, 1997.
- CHABRIER, P. E.; DEMERLE-PALLARDY, C.; AUGUET, M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategic strategies in neurological diseases. **Cell Mol Life Sci**, Boston, v. 55, n. 8-9, p. 1029-35, 1999.
- CHOI, M.; EHRLICH, H. P. U75412E, a lazaroid, prevents progressive burn ischemia in a rat burn model. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 142, n. 2, p. 519-28, 1993.
- CHOW, O.; BARBUL, A. Immunonutrition: role in wound healing and tissue regeneration. **Adv Wound Care**, New Rochelle, v. 3, n. 1, p. 46-53, 2014.
- COSTA, C. M.; SANTOS, R. C. C. ; LIMA, E. S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 345-350, 2006
- CRUZAT, V. F. et al. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. **Nutrition**, Burbank, v. 30, n. 5, p. 602-11, 2014.
- CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell Biochem Funct**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2010.
- CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, Burbank, v. 25, n. 4, p. 428-35, 2009.
- CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**, Rio de Janeiro, 2000, cap. 1, p. 15-16.
- CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, New York, v. 204, n. 2, p. 392-401, 2005.
- CUZZOCREA, S., et al. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Br J Pharmacol**, London, v. 121, n. 6, p. 1065-74, 1997.
- DAWSON, N. J. The surface-area-body-weight relationship in mice. **Aust J Biol Sci**, East Melbourne, v. 20, n. 3, p. 687-90, 1967.

- DEITCH, E. A. The management of burns. **N Engl J Med**, Boston, v. 323, n. 18, p. 1249-53, 1990.
- DEMLING, R. H.; SEIGNE, P. Metabolic management of patients with severe burns. **World J Surg**, New York, v. 24, n. 6, p. 673-80, 2000.
- DURAN, W. N. et al. Stimulation of NO production and of eNOS phosphorylation in the microcirculation in vivo. **Microvasc Res**, New York, v. 60, n. 2, p. 104-11, 2000.
- EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, New York, v. 130, n. 3373, p. 432-7, 1959.
- EAGLE, H. et al. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 218, n. 2, p. 607-16, 1956.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.
- FAN, J. et al. Effect of parenteral glutamine supplementation combined with enteral nutrition on Hsp90 expression and lymphoid organ apoptosis in severely burned rats. **Burns**, Amsterdam, v. 42, n. 7, p. 1494-506, 2016.
- FARINA, J. A.; ROSIQUE, M. J.; ROSIQUE, R. G. Curbing inflammation in burn patients. **Int J Inflam**, New York, p. 1-9, 2013.
- FLARING, U. B. et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clin Sci**, London, v. 104, p. 275-82, 2003.
- FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest**, Baltimore, v. 47, n. 5, p. 412-26, Nov 1982.
- GARRETT-COX, R. G. et al. Glutamine decreases inflammation in infant rat endotoxemia. **J Pediatr Surg**, New York, v. 44, p. 523-9, 2009.
- GIUSTI-PAIVA, A., et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, Philadelphia, v. 30, n. 6, p. 1306-10, 2002.
- GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- GOMES, D. R. Fisiologia e Fisiopatologia. In: GOMES, D. R.; SERRA, M. C. V. F., et al (Ed.). **Queimaduras**. Rio de Janeiro, v. 1, 1995. cap. 3, p.15-21.
- GOMES, D. R.; CABRAL, M. D. Avaliação pré-hospitalar. In: GOMES, D. R. (Ed.). **Queimaduras**. Rio de Janeiro, v. 1, 1995. cap. 2, p. 9-11.
- GOSWAMI, S. et al. Oral L-glutamine administration attenuated cutaneous wound healing in wistar rats. **Int Wound J**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 116-24, 2016.
- GOUMA, E. et al. A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rats. **Lab Anim**, London, v. 46, n. 1, p. 40-5, 2012.
- GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **Br J Surg**, Bristol, v. 81, n. 5, p. 637-47, 1994.

- GURBUZ, V. et al. Oxidative organ damage in a rat model of thermal injury: the effect of cyclosporin A. **Burns**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 37-42, 1997.
- HALL, J. C.; HEEL, K.; MCCAULEY, R. Glutamine. **Br J Surg**, Bristol, v. 83, n. 3, p. 305-12, 1996.
- HARRIS, R. C. et al. L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-Alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. **Nutr Res**, New York, v. 32, p. 272-77, 2012.
- HART, D. W. et al. Persistence of muscle catabolism after severe burn. **Surgery**, St. Louis, v. 128, p. 312-9, 2000.
- HAYASHI, Y. et al. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. **Circulation**, Hagerstown, v. 106, n. 20, p. 2601-7, 2002.
- HE, Y. et al. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification, **J Biol Chem**, Baltimore, v. 285, p. 9516-24, 2010.
- HORTON, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. **Toxicology**, Limerick, v. 189, p. 75-88, 2003.
- HOUDIJK, A. P. et al. Dietary glutamine supplementation reduces plasma nitrate levels in rats. **Clin Nutr**, Edinburgh, v. 17, n. 1, p. 11-4, 1998.
- HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymol**, New York, v. 233, p. 380-5, 1994.
- JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. **Br J Surg**, Bristol, v. 40, n. 164, p. 588-96, 1953.
- JALILIMANESH, M.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; AZHDARI, M. The effect of oral L-glutamine on the healing of second degree burns in mice. **Wounds**, King of Prussia, v. 23, n. 3, p. 53-58. 2011.
- KHOGALI, S. E. et al. Effects of L-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 30, n. 4, p. 819-27, 1998.
- KIRSCHNER, R. E.; FANTINI, G. A. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. **J Am Coll Surg**, Chicago, v. 179, n. 1, p. 103-17, 1994.
- KRZYWKOWSKI, K. et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 281, v.4, p. C1259-65, 2001.
- LABOW, B. I.; SOUBA, W. W.; ABCOUWER, S. F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. **J Nutr**, Springfield, v. 131, n. 9, p. 2467S-74S, 2001.
- LACEY, J. M.; WILMORE, D. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr Rev**, Washington, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.

LAGRANHA, C. J. et al. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. **Cell Biochem Funct**, Oxford, v. 23: p.101-7, 2005.

_____. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Med Sci Sports Exerc**. Hagerstown, v. 36, p. 210-7, 2004.

LEE, K.; JOORY, K.; MOIEMEN, N. History of burns: The past, present and the future. **Burns and Trauma**, Birmingham, v. 2, n. 4, p. 169-180, 2014.

LEHMANN, C. et al. Intravenous free and dipeptide-bound glutamine maintains intestinal microcirculation in experimental endotoxemia. **Nutrition**, Burbank, v. 28, n. 5, p. 588-93, 2012.

LI, W. et al. The therapeutic efficacy of glutamine for rats with smoking inhalation injury. **Int Immunopharmacol**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 248-53, 2013.

LI, Y. et al. Enteral supplementation of alanyl-glutamine attenuates the up-regulation of beta-defensin-2 protein in lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. **Int J Surg**, London, v. 12, n. 11, p. 1181-6, 2014.

LIN, J. J. et al. A meta-analysis of trials using the intention to treat principle for glutamine supplementation in critically ill patients with burn. **Burns**, Amsterdam, v. 39, p. 565-570, 2013.

MARETTA, M. et al. Impact of alanyl-glutamine dipeptide on proliferative and inflammatory changes in jejunal mucosa after acute mesenteric ischemia. **J Pediatr Surg**, Philadelphia, v. 49, n. 9, p. 1385-9, 2014.

MARUBAYASHI, S. et al. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. **Surgery**, St. Louis, v. 99, n. 2, p. 184-92, 1986.

_____. Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, alpha-tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 797, n. 1, p. 1-9, 1984.

MEDINA HERRERA, D.; PÉREZ BARRETO, F. Actualización en quemados. **Clínica Médica H.C.C.**, Caracas, v. 2, p. 79-91, 1997.

MEININGER, C. J.; WU, G. L-glutamine inhibits nitric oxide synthesis in bovine venular endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v. 281, n. 1, p. 448-53, 1997.

MONDELLO, S. et al. Glutamine treatment attenuates the development of ischemia/reperfusion injury of the gut. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 643, p. 304-315, 2010.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 8th Edition. 5. New York: 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. **Nutrient requirements of laboratory animals**. 4th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1995.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? **FASEB J**, Bethesda, v. 10, n. 8, p. 829-37, 1996.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 36, p. 153-63, 2003.

_____. Glutamine and glutamate their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochem Funct**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2003.

NOVAK, F. et al. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. **Crit Care Med**, Philadelphia, v. 30, n. 9, p. 2022-9, 2002.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 6-17, 2008.

PARRY-BILLINGS, M. et al. Effects of changes in cell volume on the rates of glutamine and alanine release from rat skeletal muscle in vitro. **Biochem J**, London, v. 276, p. 559-61, 1991.

_____. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? **Lancet**, London, v. 336, p. 523-5, 1990.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chem Acta**, Amsterdam, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. **Burns**, Amsterdam, v. 37, p. 1087-100, 2011.

PRESTES, M. A. Gravidade da lesão e indicadores para internação hospitalar. In: **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo**. São Paulo, 2008. p. 49-52.

RASBAND, W. S. ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/1997-2012.

REGAS, F. C.; EHRLICH, H. P. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. **J Trauma**, Baltimore, v. 32, n. 5, p. 557-63, 1992.

ROBB, H. J. Dynamics of the microcirculation during a burn. **Arch Surg**, Chicago, v. 94, n. 6, p. 776-80, 1967.

RODAS, P. C. et al. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. **Clin Sci**, London, v. 122, p. 591-7, 2012.

ROGERO, M. M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, Burbank, v. 22, p. 564-71, 2006.

_____. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Rev Bras Cienc Farma**, São Paulo, v. 38, n. 4, p.487-97, 2002.

_____. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutr Res**, New York, v. 24, n. 4, p. 261-70, 2004.

ROHDE, T. et al. Competitive sustained exercise in humans, lymphokine activated killer cell activity, and glutamine--an intervention study. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, Berlin, v. 78, n. 5, p. 448-53, 1998.

ROVER, L. J. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-9, 2001.

RUTTEN, E. P. et al. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, London, v. 8, p. 41-51, 2005.

S. NOBLE, H. G.; ROBSON, M. C.; KRIZEK, T. J. Dermal ischemia in the burn wound. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 117-125, 1977.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Exp Cell Res**, New York, v. 304, p. 274-86, 2005.

SANTOS, R. V.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sci**, Oxford, v. 80, n. 6, p. 573-8, 2007.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with heterogeneous random effects. **Biometrika**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 719-727, 1991.

SCHEPPACH, W. et al. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 107, p. 429-34, 1994.

SINGER, A. J. et al. Curcumin reduces burn progression in rats. **Acad Emerg Med**, Hoboken, v. 14, n. 12, p. 1125-9, 2007.

_____. Curcumin reduces injury progression in a rat comb burn model. **J Burn Care Res**, Hagerstown, v. 32, n. 1, p. 135-42, 2011.

SINGH, V. et al. The pathogenesis of burn wound conversion. **Ann Plast Surg**, Hagerstown, v. 59, n. 1, p. 109-15, 2007.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 292, p. R1839-45, 2007.

SOLBU, T. T. et al. SAT1, A glutamine transporter, is preferentially expressed in GABAergic neurons. **Front Neuroanat**, Lausanne, v. 4, p. 1, 2010.

SOUBA, W. W. et al. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **J Surg Res**. Philadelphia, v. 48, p. 383-91, 1990.

STEED, D. L. The role of growth factors in wound healing. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 575-586, 1997.

STEIN, M. H.S.; BETTINELLI, R. D.; VIEIRA, B. M. Terapia nutricional em pacientes grandes queimados. **Rev Bras Queimaduras**, Goiânia, v. 12, n. 4, p. 235-244, 2013.

- SZABO, C.; BILLIAR, T.R. Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. **Shock**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 1-9, 1999.
- TEMPLE, C. S. et al. Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 273, n. 1, p. 20-2, 1998.
- VALE, E. C. S. D. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 9-19, 2005.
- VAN DE POLL, M. C. et al. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 79, n. 2, p. 185-97, 2004.
- VO, P. A. et al. Autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 280, n. 8, p. 7236-43, 2005.
- WISCHMEYER, P. E. Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials. **Curr Opin Gastroenterol**, Philadelphia, v. 24, p. 190-7, 2008.
- WOLFE, R. R. Herman Award Lecture, 1996: relation of metabolic studies to clinical nutrition--the example of burn injury. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 64, n. 5, p. 800-8, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disease incidence, prevalence and disability. In: **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: WHO, 2008. part. 3, p. 27-37.
- WU, J. C. et al. Full-thickness thermal injury delays wound closure in a murine model. **Adv Wound Care**, New Rochelle, v. 4, n. 2, p. 83-91, 2015.
- YAMAUCHI, K. et al. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. **Nutrition**, Burbank, v. 18, p. 329-33, 2002.
- YAN, H. et al. Effects of glutamine treatment on myocardial damage and cardiac function in rats after severe burn injury. **Int J Clin Exp Pathol**, Madison, v. 5, n. 7, p. 651-9, 2012.
- YEH, S. L. et al. Effects of dietary glutamine on antioxidant enzyme activity and immune response in burned mice. **Nutrition**, Burbank, v. 19, n. 10, p. 880-5, 2003.
- ZABOT, G. P. et al. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion. **World J Gastroenterol**, Pleasanton, v. 20, n. 32, p. 11406-14, 2014.
- ZAWACKI, B. E. The natural history of reversible burn injury. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 139, n. 6, p. 867-72, 1974.
- ZHANG, Y. et al. Effects of glycyl-glutamine dipeptide supplementation on myocardial damage and cardiac function in rats after severe burn injury. **Int J Clin Exp Pathol**, Madison, v. 6, n. 5, p. 821-30, 2013.

ANEXO 1: Certificado de aprovação da Comissão de ética em experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 044/2014, sobre o projeto intitulado *“Eficácia da suplementação de glutamina por via oral e tópica em queimaduras. Modelo experimental em ratos”*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jayme Adriano Farina Junior** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de setembro de 2014.

We certify that the protocol nº 044/2014, entitled *“Effectiveness of glutamine supplementation by oral and topical administration in burns. Experimental model in rats”*, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 09/29/2014.

Ribeirão Preto, 29 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP

ANEXO 2

Classificação das lesões histológicas: necrose, edema e focos hemorrágicos (0, 1, 2 ou 3) na derme e hipoderme das regiões de queimaduras (RQ1 a 4) do dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo controle (1) .									
Grupo 1 (DD)					(DE)				
	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	Média- Total
Animal A6									
Derme	2	3	3	3	3	3	3	3	2.85 - 23
Hipoderme	2	3	3	3	3	3	2	3	2.75 - 22
Animal A7									
Derme	2	2	3	3	3	2	2	2	2.37 - 19
Hipoderme	2	2	3	3	3	2	2	2	2.37 - 19
Animal A8									
Derme	3	3	2	3	3	3	3	3	2.85 - 23
Hipoderme	3	3	2	3	3	2	3	3	2.75 - 22
Animal A9									
Derme	2	2	3	3	3	2	2	3	2.5 - 20
Hipoderme	2	2	3	3	3	2	3	3	2.62 - 21
Animal A19									
Derme	3	3	3	2	2	2	3	3	2.62 - 21
Hipoderme	3	3	3	2	2	2	3	3	2.62 - 21
Animal A22									
Derme	3	3	3	3	3	3	2	3	2.85 - 23
Hipoderme	3	3	3	3	3	3	2	3	2.85 - 23
Animal A24									
Derme	3	3	3	3	3	3	3	3	3.0 - 24
Hipoderme	3	3	3	3	3	3	3	3	3.0 - 24
Animal A29									
Derme	3	3	3	3	2	3	3	3	2.85 - 23
Hipoderme	3	3	3	3	2	3	3	3	2.85 - 23
Animal A33									
Derme	3	3	3	2	3	2	3	3	2.75 - 22
Hipoderme	3	3	3	2	3	2	3	3	2.75 - 22
Animal A34									
Derme	3	2	3	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Hipoderme	3	2	3	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Média do Grupo 1									
Derme	2.714								
Hipoderme	2.706								

Classificação das lesões histológicas: necrose, edema e focos hemorrágicos (0, 1, 2 ou 3) na derme e hipoderme das regiões de queimaduras (RQ1 a 4) do dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo AA livre (3).									
Grupo 3 (DD)					(DE)				
	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	Média- Total
Animal A10									
Derme	2	3	3	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Hipoderme	2	3	3	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Animal A13									
Derme	3	3	3	2	3	2	3	3	2.75 - 22
Hipoderme	2	3	3	2	3	2	2	3	2.5 - 20
Animal A18									
Derme	3	3	3	3	3	3	3	3	3.0 - 24
Hipoderme	3	3	2	3	3	3	3	3	2.85 - 23
Animal A21									
Derme	3	2	3	3	3	3	2	3	2.75 - 22
Hipoderme	3	2	3	3	3	3	2	3	2.75 - 22
Animal A23									
Derme	3	2	3	2	2	3	3	3	2.62 - 21
Hipoderme	3	2	3	2	2	3	3	3	2.62 - 21
Animal A27									
Derme	3	2	3	3	3	3	3	2	2.75 - 22
Hipoderme	3	2	3	3	3	3	3	2	2.75 - 22
Animal A30									
Derme	3	3	2	3	3	2	3	3	2.75 - 22
Hipoderme	3	3	2	3	3	2	3	3	2.75 - 22
Animal A32									
Derme	3	3	3	3	2	3	3	3	2.85 - 23
Hipoderme	3	3	3	3	2	3	3	3	2.85 - 23
Animal A35									
Derme	3	3	2	2	2	2	3	3	2.5 - 20
Hipoderme	3	3	2	2	2	2	3	3	2.5 - 20
Animal A36									
Derme	3	3	2	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Hipoderme	3	3	2	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Média do Grupo AA									
Derme	2.697								
Hipoderme	2.657								

Classificação das lesões histológicas: necrose, edema e focos hemorrágicos (0, 1, 2 ou 3) na derme e hipoderme das regiões de queimaduras (RQ1 a 4) do dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo dipeptídeo (2).									
Grupo 2 (DD)					(DE)				
	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	RQ1	RQ2	RQ3	RQ4	Média- Total
Animal A11									
Derme	1	3	1	2	1	3	2	2	1.87 - 15
Hipoderme	1	3	1	2	1	3	2	2	1.87 - 15
Animal A12									
Derme	3	1	2	2	3	2	3	1	2.12 - 17
Hipoderme	3	1	2	2	3	2	3	1	2.12 - 17
Animal A14									
Derme	2	2	2	3	2	3	2	2	2.25 - 18
Hipoderme	2	2	2	3	2	3	2	2	2.25 - 18
Animal A15									
Derme	3	2	2	2	2	2	2	3	2.25 - 18
Hipoderme	3	2	2	2	2	2	2	3	2.25 - 18
Animal A17									
Derme	2	2	3	3	2	3	3	2	2.5 - 20
Hipoderme	2	2	3	3	2	3	3	2	2.5 - 20
Animal A20									
Derme	3	2	2	1	3	2	2	2	2.12 - 17
Hipoderme	3	2	2	1	3	2	2	2	2.12 - 17
Animal A25									
Derme	1	3	3	2	3	2	1	3	2.25 - 18
Hipoderme	1	3	3	2	3	2	1	3	2.25 - 18
Animal A26									
Derme	3	2	2	2	2	3	3	2	2.37 - 19
Hipoderme	3	2	2	2	2	3	3	2	2.37 - 19
Animal A28									
Derme	2	1	2	1	2	1	2	2	1.62 - 13
Hipoderme	2	1	2	1	2	1	2	2	1.62 - 13
Animal A31									
Derme	3	3	2	3	3	3	2	2	2.62 - 21
Hipoderme	3	3	2	2	3	3	2	2	2.5 - 20
Média do Grupo DT									
Derme	2.197								
Hipoderme	2.185								

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

ANEXO 6

Medidas do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) do tegumento nos animais do Grupo controle (1)							
Grupo 1 (DD)				(DE)			
	RIE1	RIE2	RIE3	RIE1	RIE2	RIE3	Média- Total
Animal A6	0.52	0.88	0.27	0.64	0.58	0.53	0.57 - 3.42
Animal A7	0.59	0.48	0.72	0.36	0.65	0.69	0.58 - 3.49
Animal A8	0.32	0.64	0.67	0.58	0.73	0.6	0.59 - 3.54
Animal A9	0.41	0.83	0.81	0.55	0.62	0.42	0.60 - 3.64
Animal A19	0.63	0.43	0.74	0.44	0.65	0.78	0.61 - 3.67
Animal A22	0.76	0.59	0.66	0.74	0.42	0.68	0.64 - 3.85
Animal A24	0.58	0.71	0.73	0.66	0.57	0.45	0.61 - 3.7
Animal A29	0.79	0.42	0.54	0.36	0.76	0.61	0.58 - 3.48
Animal A33	0.49	0.73	0.55	0.57	0.48	0.79	0.60 - 3.61
Animal A34	0.86	0.54	0.19	0.63	0.65	0.33	0.53 - 3.2
Média do Grupo 1							35.6
0.593							

Medidas do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) do tegumento nos animais do Grupo AA livre (3)							
Grupo 3 (DD)				(DE)			
	RIE1	RIE2	RIE3	RIE1	RIE2	RIE3	Média- Total
Animal A10	0.67	0.53	0.77	0.7	0.64	0.61	0.65 - 3.92
Animal A13	0.62	0.48	0.72	0.44	0.74	0.75	0.63 - 3.75
Animal A18	0.52	0.68	0.66	0.73	0.7	0.61	0.65 - 3.9
Animal A21	0.52	0.83	0.81	0.63	0.62	0.55	0.66 - 3.96
Animal A23	0.67	0.61	0.74	0.48	0.65	0.78	0.65 - 3.93
Animal A27	0.75	0.64	0.78	0.71	0.56	0.68	0.64 - 4.12
Animal A30	0.62	0.75	0.69	0.76	0.65	0.54	0.66 - 4.01
Animal A32	0.67	0.47	0.58	0.71	0.6	0.54	0.59 - 3.59
Animal A35	0.87	0.75	0.59	0.77	0.82	0.88	0.78 - 4.68
Animal A36	0.51	0.56	0.65	0.57	0.74	0.69	0.62 - 3.72
Média do Grupo 3							39.58
0.659							

Medidas do comprimento (em mm) das regiões de interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) do tegumento nos animais do Grupo dipeptídeo (2)							
Grupo 2 (DD)				(DE)			
	RIE1	RIE2	RIE3	RIE1	RIE2	RIE3	Média- Total
Animal A11	0.59	0.51	0.62	0.7	0.64	0.55	0.60 - 3.61
Animal A12	0.88	0.63	0.73	0.57	0.85	0.77	0.73 - 4.43
Animal A14	0.65	0.7	0.74	0.79	0.63	0.72	0.7 - 4.23
Animal A15	0.55	0.78	0.74	0.71	0.67	0.62	0.67 - 4.07
Animal A17	0.72	0.59	0.67	0.57	0.72	0.76	0.67 - 4.03
Animal A20	0.65	0.74	0.56	0.67	0.6	0.53	0.62 - 3.75
Animal A25	0.7	0.77	0.64	0.81	0.65	0.67	0.7 - 4.24
Animal A26	0.64	0.53	0.54	0.69	0.62	0.46	0.58 - 3.48
Animal A28	0.71	0.67	0.55	0.62	0.74	0.72	0.66 - 4.01
Animal A31	0.63	0.69	0.73	0.65	0.61	0.78	0.62 - 4.09
Média do Grupo DT							39.94
0.665							

ANEXO 7

Contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo controle (1)							
Grupo 1 (DD)				(DE)			
	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	Média- Total
Animal A6	38/53/46	44/57/41	32/49/37	39/60/42	33/51/31	46/58/34	43.94 - 791
Animal A7	29/47/33	37/55/34	26/46/19	32/54/28	41/62/39	30/57/35	39.11 - 704
Animal A8	32/56/35	39/52/35	27/59/38	37/64/34	42/66/36	31/52/25	42.22 - 760
Animal A9	17/47/25	33/58/34	31/63/37	44/68/42	32/56/39	40/66/35	42.61 - 767
Animal A19	25/54/42	24/51/36	43/59/37	32/64/28	26/57/38	34/53/26	40.5 - 729
Animal A22	28/52/33	32/52/41	35/57/36	25/63/26	34/58/39	44/62/41	42.11 - 758
Animal A24	32/54/29	33/48/24	36/63/23	44/59/37	22/52/35	37/57/42	40.38 - 727
Animal A29	31/50/26	27/55/29	34/62/42	26/56/21	36/57/33	30/58/41	39.66 - 714
Animal A33	43/57/39	34/64/27	37/56/34	32/58/46	38/65/42	44/62/49	45.94 - 827
Animal A34	18/47/25	33/56/24	18/61/28	38/52/23	36/55/27	25/56/32	36.33 - 654
Média do Grupo 1							
41.28							

Contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo AA livre (3)							
Grupo 3 (DD)				(DE)			
	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	Média- Total
Animal A10	34/69/43	40/67/36	38/59/33	32/68/41	34/66/27	42/69/31	46.05 - 829
Animal A13	37/63/38	44/65/35	31/66/34	30/63/32	28/60/35	36/59/42	44.33 - 798
Animal A18	24/67/37	35/64/38	33/55/23	31/68/42	40/72/37	36/61/32	44.16 - 795
Animal A21	42/65/29	32/62/37	39/71/45	35/64/38	31/56/42	27/64/38	45.38 - 817
Animal A23	33/62/35	34/64/28	31/66/38	30/62/37	32/64/32	38/58/32	43.11 - 776
Animal A27	43/71/35	37/58/32	45/68/31	36/74/43	38/65/41	25/60/34	46.44 - 836
Animal A30	38/57/33	43/66/34	32/69/45	31/62/35	42/67/32	26/55/35	44.55 - 802
Animal A32	34/65/36	36/51/33	39/77/41	29/59/34	44/67/38	35/64/32	45.22 - 814
Animal A35	33/65/31	42/68/35	24/59/26	34/66/32	46/75/37	32/65/31	44.5 - 801
Animal A36	42/67/36	31/63/43	26/56/33	34/76/39	31/62/35	42/68/37	45.61 - 821
Média do Grupo 3							
44.93							

Contagem de fibroblastos em três campos (C1 a 3) da derme dos interespaços (RIE1 a 3) no dorso direito (DD) e esquerdo (DE) dos animais do Grupo dipeptídeo (2)							
Grupo 2 (DD)				(DE)			
	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	RIE1 C1 C2 C3	RIE2 C1 C2 C3	RIE3 C1 C2 C3	Média- Total
Animal A11	21/74/35	34/89/23	31/69/39	44/65/32	38/79/29	35/94/42	48.5 - 873
Animal A12	43/67/32	41/83/37	45/77/32	26/81/44	42/78/31	43/75/32	50.5 - 909
Animal A14	28/63/42	37/69/31	39/76/38	35/61/33	28/57/34	37/59/31	44.33 - 798
Animal A15	32/77/46	36/68/31	38/75/34	27/54/32	37/65/44	36/94/43	48.27 - 869
Animal A17	27/58/33	37/69/38	35/64/24	34/71/35	30/91/38	34/63/36	45.38 - 817
Animal A20	46/99/31	35/67/38	36/57/28	34/88/33	31/69/32	35/63/23	42.11 - 758
Animal A25	41/76/39	36/61/44	34/56/25	29/69/33	27/68/35	37/85/42	46.5 - 837
Animal A26	36/61/25	33/72/45	38/65/31	34/62/35	26/65/32	43/95/31	46.05 - 829
Animal A28	30/61/34	29/63/31	38/66/41	32/56/37	40/69/35	37/55/34	43.77 - 788
Animal A31	42/82/35	34/62/38	36/64/37	38/65/31	36/66/39	32/65/42	46.88 - 844
Média do Grupo 2							
46.22							