

Influência do teor protéico da dieta sobre a gênese do tecido de reparo em ratos

M.C.F. Arruda Veiga¹, C.H. Tambeli¹, A.C. Santa² e J.L. José¹

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo verificar se o teor protéico da dieta, afeta a gênese dos tecidos de reparo em ratos que sofreram implante de esponja de policlorovinil (PVC), como também analisar através da histofotometria, as possíveis alterações na síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos). Foram utilizados 45 ratos machos wistar, com 21 dias de idade, subdivididos em 3 grupos experimentais, submetidos durante 69 dias a dietas contendo respectivamente 6%, 15% e 40% de proteína. Os animais submetidos à dieta hipoprotéica, contendo 6% de proteína, apresentaram uma inibição na evolução e maturação do tecido de granulação principalmente aos 4, 7 e 10 dias após o implante da esponja de PVC, apresentando menor infiltração de células inflamatórias, menor proliferação de fibroblastos, redução da formação de fibras colágenas, neovascularização diminuída e inibição da síntese de mucopolissacarídeos ácidos.

SUMMARY. Effect of protein dietary level on repair tissue genesis in growing rats. The objective of this study was to verify if the diet protein level affects the genesis of the repair tissue in rats submitted to a polychlorovinyl (PVC) sponge implantation, as well as to analyse the possible alterations in the synthesis of the mucopolysaccharides acids (glucosaminoglicans) by the histophotometry technique. Forty five Wistar weanling male rats, at 21 days of age, were divided into three experimental groups; the groups were fed diets at 6%, 15% and 40% protein level from casein source, during at 69 days period. The animals which received the low protein diet (6%) presented an inhibition in the evolution and maturation of the granulation tissue mainly in the 4th, 7th and 10th days after the sponge PVC implantation. It was also observed that there was less infiltration of the inflammatory cells, less fiberblasts proliferation, reduction of othe collagen fibers synthesis, neovascularization decreased and an inhibition of the mucopolysaccharide acids synthesis.

INTRODUÇÃO

A subnutrição protéico-calórica, no período de crescimento, causa uma drástica redução do peso corporal, da quantidade de ADN, ARN e proteínas, reduzindo o tamanho e o número de células. Essas alterações podem refletir indiretamente um suprimento inadequado de aminoácidos disponíveis para o metabolismo proteico normal, induzindo a modificações bioquímicas na síntese de ADN e proteínas (1).

Crianças com Kwashiorkor apresentam uma deficiência imunológica secundária com um aumento da susceptibilidade a infecções e alterações a nível celular, humoral e na função fagocitária (2).

Ratos com depleção protéico-calórica apresentam sinais bioquímicos e imunológicos de subnutrição, com diminuição de neutrófilos e aumento de mortalidade por infecção. A deficiência de fibronectina contribui para a depressão do sistema imunológico durante a subnutrição (13).

Anemia e várias alterações hematológicas relacionadas à subnutrição protéica, têm sido descritas por vários autores (6, 7, 8 e 9). Como também, uma série de alterações hormonais ocorrem durante a restrição protéico-calórica (10, 11 e 12).

A quantidade de proteína da dieta afeta a liberação de insulina e ratos subnutridos apresentam uma redução no

1. Departamento de Ciências Fisiológicas, FOP UNICAMP.
2. Área de Nutrição, Humana e Alimentos, E.S.A. «Luiz de Queiroz», USP

nível de insulina circulante (11).

A insulina é essencial para o desenvolvimento normal do processo de cicatrização, e ratos submetidos à restrição protéica apresentam uma deficiente cicatrização semelhante àquela apresentada pelos animais diabéticos (12).

Este trabalho teve por objetivo verificar se o teor protéico da dieta, afeta a gênese dos tecidos de reparo em ratos que sofreram implante de esponja de policlorovinil (PVC), como também analisar através da histofotometria,

as possíveis alterações na síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 45 ratos machos (Wistar), com 21 dias de idade distribuídos em 3 grupos experimentais: IA, dieta normoprotéica contendo 15% de proteína, IB, dieta hipoprotéica contendo 6% de proteína e grupo IC, dieta hiperprotéica contendo 40% de proteína (Tabela 1).

TABELA 1
COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS (1000 G)

	Dieta Normoprotéica Teor Protéico (15%) g	Dieta Hipoprotéica Teor Protéico (6%) g	Dieta Hiperprotéica Teor Protéico (40%) g
Caseína	184	74	491
Oleo	80	80	80
Mistura salina	40	40	40
Mistura vitamínica	10	10	10
Maizena	646	756	339
Fibra	40	40	40

Cada 100 g de caseína fornecem 81,6 g de proteína

Após 69 dias de manutenção nas gaiolas (metabólicas), com suas respectivas dietas, os animais foram anestesiados para implantação subcutânea, na região dorsal das esponjas de Policlorovinil (PVC). Três animais de cada grupo foram sacrificados aos 4, 7, 10, 15 e 20 dias após o implante, sendo retiradas as esponjas, fixadas em formol, incluídas segundo a técnica histológica de rotina, cortadas na espessura de 7 u e coradas com Hematoxilina-Eosina.

Foi empregado a técnica da Reação Metacromática do Azul de Toluidina, segundo Lison (13) para se obter uma evidência histoquímica dos compostos mucopolissacarídeos ácidos. Utilizando-se o histofotômetro, foram realizadas 30 medidas, em absordância para cada lâmina. Os valores médios destas medidas, por animal e por grupo, em cada período de estudo, foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do tecido de granulação, induzido artificialmente pelo implante sub-cutâneo de esponjas de PVC, inicia-se entre o 3º e 4º dia após o implante, através da migração de células fibrogenéticas e totipotentes. Essas células são originárias da cápsula fibrosa reacional e proliferam-se até por volta do 15º ao 20º dia, quando então, a fase proliferativa propriamente dita chega ao final, restabelecendo-se a organização e maturação do tecido (14).

Os parâmetros utilizados para tais avaliações prendem-se à quantidade de células fibroblásticas e mesenquimais, à síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos) e à neoformação de capilares sanguíneos.

Ao analisarmos a proliferação dos tecidos de granulação apresentados pelos animais do grupo B, submetidos à dieta hipoprotéica, pudemos verificar que a deficiência protéica

provoca uma inibição na evolução e maturação do tecido de granulação principalmente nos períodos de 4, 7 e 10 dias após o implante da esponja de PVC. Os animais deste grupo apresentaram um retardo acentuado no processo de reparo, quando comparados aos animais submetidos à dieta

normoprotéica. Essas diferenças foram observadas, particularmente quanto à proliferação de fibroblastos. Provavelmente essa deficiência proliferativa tem como causa, alterações metabólicas consequentes da subnutrição protéica (Figuras 1 e 2).

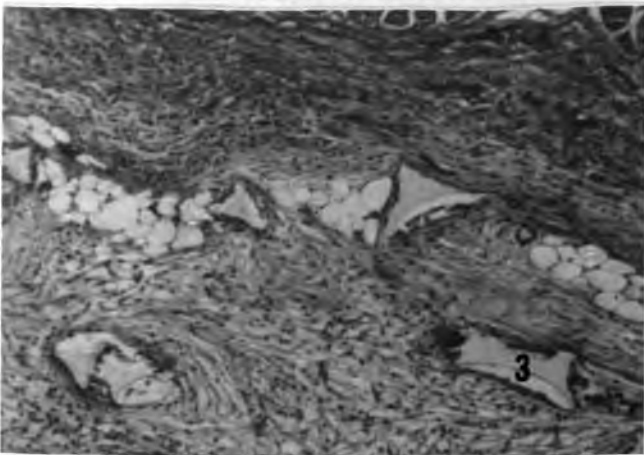
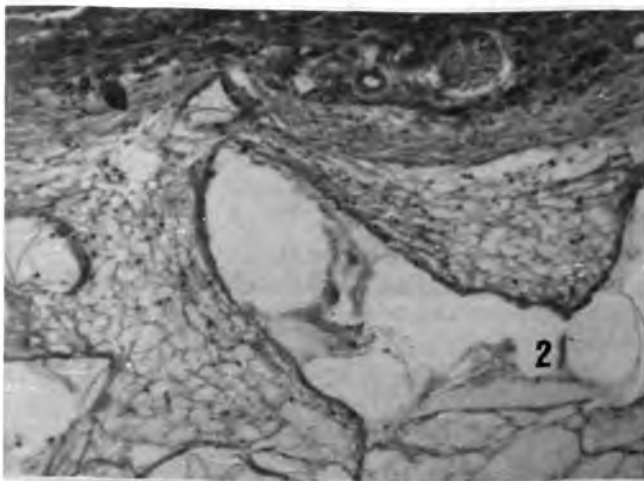
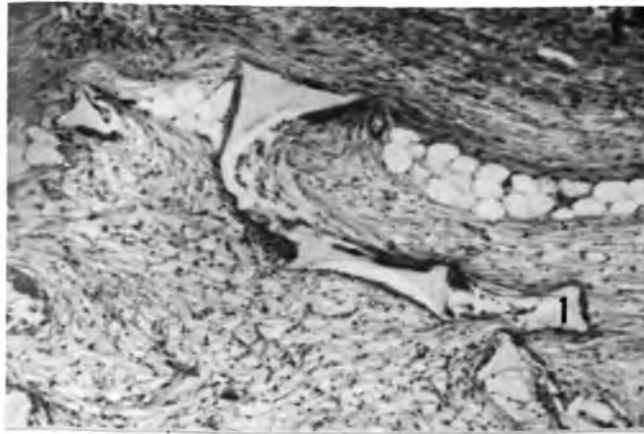


FIGURA 1. - Microfotografias dos tecidos de granulação obtidas dos diferentes grupos de animais, aos 7 dias de desenvolvimento (aumento original; 2,5 x 1,25 x 10): 1) Grupo A (Dieta Normoprotéica), 2) Grupo B (Dieta Hipoprotéica) e 3) Grupo C (Dieta Hiperprotéica).

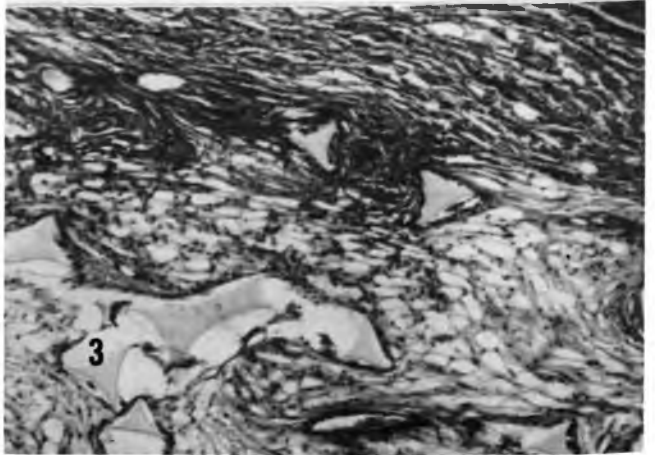
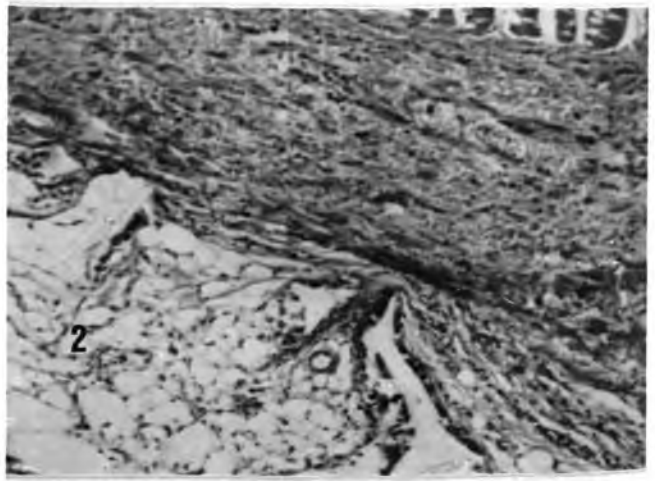
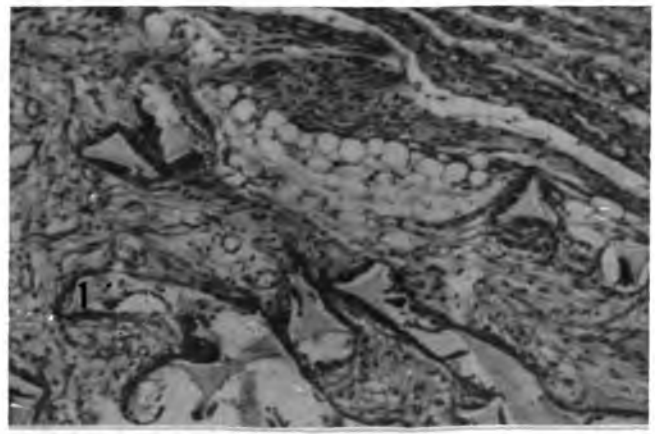


FIGURA 2. - Microfotografias dos tecidos de granulação obtidas dos diferentes grupos de animais, aos 10 dias de desenvolvimento (aumento original: 2,5 x 1,25 x 10): 1) Grupo A (Dieta Normoprotéica), 2) Grupo B (Dieta Hipoprotéica) e 3) Grupo C (Dieta Hiperprotéica).

Um outro aspecto no desenvolvimento do tecido de reparo é a neo-formação de capilares sanguíneos. Nos tecidos apresentados pelos animais do Grupo A (Dieta Normoprotéica), esta formação é bastante evidenciada durante os primeiros 10 dias de desenvolvimento. Entretanto no Grupo B, a neovascularização, mostrou-se inibida. A análise histológica do tecido de granulação proveniente dos animais do Grupo C, submetidos a dieta hiperprotéica, apresentou fenômenos proliferativos da resposta inflamatória bastante semelhante àqueles encontrados nos animais do Grupo A, sendo que apenas nos 2 primeiros períodos de 4 e 7 dias, notou-se uma proliferação de fibroblastos e de fibras colágenas levemente aumentadas.

Através das leituras histofotométricas, foi possível mostrar que a síntese de mucopolissacarídeos ácidos (MPA) aumentou gradativamente, atingindo a fase mais ativa aos

10 dias após o início do processo, reduzindo-se posteriormente. Estes compostos encontram-se presentes no tecido de granulação desde os primeiros instantes de sua formação, e aumentam bastante durante a fase de proliferação de fibroblastos que os produzem, sendo indispensáveis ao processo de agregação das fibrilas de colágeno (15).

Analisando-se os diferentes grupos entre si, agrupando-os por período de sacrificio, o teste de Tukey mostrou que: nos períodos de 4, 7 e 10 dias de desenvolvimento, o tecido de granulação dos animais dos Grupos A (Dieta normoprotéica) e C (Dieta hiperprotéica), apresentaram a média das medidas histofotométricas significativamente maior que a média das medidas histofotométricas obtidas dos tecidos de granulação dos animais do Grupo B (Dieta Hiperprotéica) (Tabela 2 e Gráfico 1).

TABELA 2
MÉDIAS DAS MEDIDAS HISTOFOTOMÉTRICAS, EM ABSORBÂNCIA, RELATIVAS ÀS
LÂMINAS HISTOPATOLÓGICAS, EM CADA PERÍODO EXPERIMENTAL.

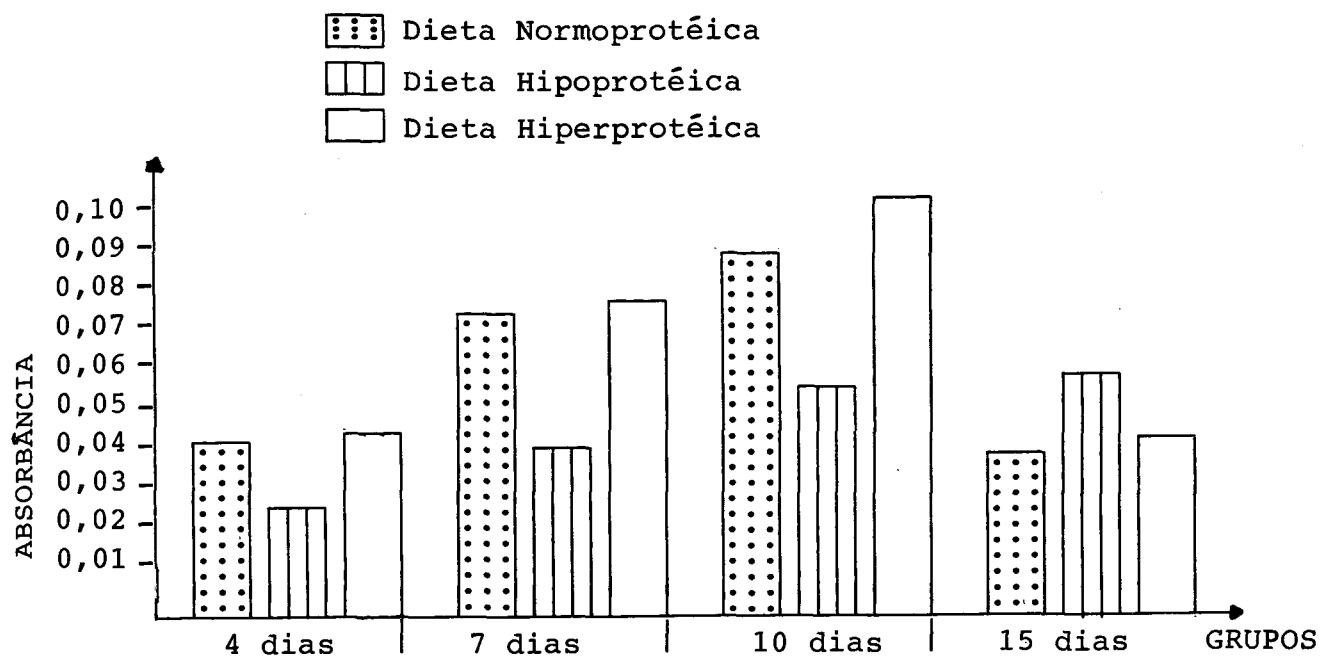
Período	Grupos		
	D. Normoprotéica	D. Hipoprotéica	D. Hiperprotéica
04	0,043 cA	0,029 cB	0,044 cA
07	0,071 bA	0,041 bB	0,075 bA
10	0,093 aA	0,055 aB	0,103 aA
15	0,039 cB	0,058 aA	0,041 cB
20	0,031 dA	0,028 cA	0,032 dA

Os tratamentos seguidos de letras minúsculas distintas, diferem significativamente ao nível de 5% entre os animais do mesmo grupo.

Os tratamentos seguidos de letras maiúsculas distintas, diferem significativamente ao nível de 5% entre os 3 grupos experimentais.

GRÁFICO 1.

Histograma relacionando as médias das medidas histofotométricas, em absorbância de luz, e os grupos de animais: normoprotéica, hipoprotéica e hiperprotéica, nos períodos de 4, 7, 10 e 15 dias de desenvolvimento do tecido de granulação.



Por outro lado, aos 15 dias de desenvolvimento, a média das medidas histofotométricas apresentada pelos animais do Grupo B (Dieta hipoprotéica) foi significativamente maior que aquela apresentada pelos animais dos Grupos C e A.

A deficiência protéica induz em ratos uma série de alterações: redução do tamanho e número de células em diversos órgãos e modificações bioquímicas na síntese de ADN, ARN e proteínas (1); aumento de mortalidade por infecção e deficiência de fibronectina (3) e uma deficiente cicatrização (12).

Neste trabalho verificamos que a deficiência protéica alimentar causou um significativo retardo no desenvolvimento do tecido de granulação, apresentando menor infiltração de células inflamatórias, menor proliferação de fibroblastos, redução da formação de fibras colágenas, neovascularização diminuída e inibição da síntese de mucopolissacarídeos ácidos. Por outro lado, os animais do Grupo C, submetidos à dieta contendo 40% de proteína, não apresentaram alterações significativas no desenvolvimento do tecido de granulação e na síntese de MPA quando comparados aos animais do Grupo A, submetidos à dieta com 15% de proteína. De forma que podemos concluir, que a ingestão protéica normal (em torno de 15%) é importante para a evolução de reparação tecidual, mas o aumento da porcentagem de proteína na dieta parece não influenciar significativamente esse processo.

REFERÊNCIAS

1. Tirapegui, J.O. & De Angelis, R.C. Marginal protein deficiency in pregnant rats. Changes in offspring body composition. *Arq. Gastroenterol.*, **22**: 82, 1985.
2. Good, R.A.; West, A & Fernández, G. Nutritional modulation of immune responses. *Fed. Proc.*, **39**: 3098-3104, 1980.
3. Nwankwo, M.U.; Schuit, K.E. & Glew, R.H. Effects of maternal protein deprivation on the nutritional status and neutrophil function of suckling neonatal rats. *J. Infect. Dis.*, **151**: 23-32, 1985.
4. Pereira, S.M. & Baker, S. Hematological studies in Kwashiokor. *Am. J. Clin. Nutr.*, **18**: 413-420, 1966.
5. Adams, E.B.; Scragg, J.N.; Naidoo, B.T. & Liljesteand, S.K. Observation on the etiology and treatment of anemia in Kwashiokor. *Br. Med. J.*, **3**: 451-457, 1967.
6. Viteri, F.E.; Alvarado, J.; Luthringer, D.G. & Wood, R.P. Hematological changes in protein-calorie malnutrition. *Vitam. Horu.*, **26**: 573-615, 1968.
7. Sharma, A.; Sharma, S.K.; Grover, A.K.; Tewari, A.D. & Abrol Pankaj. Anemia in protein-energy malnutrition. *Indian Pediatrics.*, **22**: 841-844, 1985.
8. Abraham, J.; Saitaurin, M.A.; Christides, J.P.; Bomsel Helmreich, O. & Ngoc Huyen, L.V. Effects of protein and lysine deficient diets on puberty and beginning of gestation in rats. *Nutrition Reports International*, **32**: 1425-1433, 1985.
9. Schalch, D.S.; Burstein, P.J.; Tewel, S.J.; Draznin, B. & Emler, C.A. The effects of renal impairment on growth in the

- rat. Relationship to malnutrition and serum somatomedin levels. *Endocrinology*, 108: 1683-1689, 1981.
10. Isley, W.L.; Underwood, L.E. & Clemmons, D.R. Dietary components the regulate serum somatomedin-C levels in humans. *J. Clin. Invest.*, 71: 175-182, 1983.
 11. Bhutani, V.; Kumar, V. % Misra, V.K. Effects of inadequate dietary protein on pancreatic insulin and camp levels in rats. *Nutrition Reports International*, 32: 1413-1420, 1984.
 12. Irvin; T.T. Effects of malnutrition and hyperalimentation on wound healing. *Surg Gynecol Obstet.*, 146: 33-37, 1978.
 13. Lison, L. *Histochimie et cytochimie animals: principes et méthodes*. Paris. Gauthier-Villars.,1: 280-281, 1960.
 14. Vizioli, M.R. Dynamics of fibrilar components in rat sponge induced granulation tissue. *Acta. Anat.*, 85: 368-377, 1973.
 15. Vizioli, M.R.; Blumen, S. & El-Guindy, M.M. Granulation tissue-histophotometric and radioautographic observations on glicosaminoglicans and collagen sinthesis and their relation with alkaline phosphatase. *Ann. Histochem (Paris)*, 21: 237-245, 1976.