

*Instit
1995*

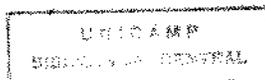
**INFLUÊNCIA DO TEOR PROTÉICO DA DIETA
NA GÊNESE DO TECIDO DE REPARO EM
ANIMAIS DIABÉTICOS**

SILVANA LANDI BERNARDES BENETTON

*Este trabalho foi
apresentado em 1995
na Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, 01 de Junho de 1995.
M. Benetton*

**Trabalho apresentado à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências na área de Fisiologia e Biofísica
do Sistema Estomatognático.**

**PIRACICABA- SP
1995**



1995

**INFLUÊNCIA DO TEOR PROTÉICO DA DIETA
NA GÊNESE DO TECIDO DE REPARO EM
ANIMAIS DIABÉTICOS**

SILVANA LANDI BERNARDES BENETTON

Trabalho apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático.

Orientadora:

Dra. Maria Cecília F. de A. Veiga

**PIRACICABA- SP
1995**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

**À Professora Dra. Maria Cecília F. de A. Veiga,
pela amizade, estímulo e constante disponibilidade
sem os quais não seria possível a realização desse
trabalho.**

**A meus pais, que me ensinaram
a caminhar com meus próprios
passos.**

**Ao meu pai, pelo incentivo e pela
paciência na revisão redacional
deste trabalho.**

**Ao meu marido LUIZ e as minhas filhas
MARINA e JULIANA, pela compreensão
nos dias de impaciência, muito obrigada.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Martins Filho, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas pelo seu empenho em melhorar a qualidade de ensino e pesquisa.

Ao Professor Dr. José Ranali, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela dedicação na administração desta Faculdade.

Ao Professor Dr. Frab Norberto Boscolo, Coordenador Geral dos cursos de Pós-Graduação da FOP- UNICAMP pela seriedade com que conduz seu trabalho.

Ao Professor Dr. Alcides Guimarães, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, pela dedicação e incentivo no decorrer do trabalho

À equipe de Professores do Curso de Mestrado em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, meu muito obrigada.

Ao Professor Dr. Norair Salviano dos Reis, pelo auxílio nas interpretações histológicas.

À Professora Marinéia de Lara Haddad, pela realização e orientação no tratamento estatístico dos dados e nas análises estatísticas.

À CAPES, pelos recursos financeiros cedidos.

À Sra. Shirley Rosana Sbravatti Moreto, pela atenção e colaboração no decorrer do curso.

Ao técnico Sr. Carlos Alberto Aparecido Feliciano, pelo apoio incansável na realização do experimento.

À Sra. Miris Cristina Recchia, pela colaboração e ajuda dispensada.

À Sra. Suely Duarte de Oliveira Soliani, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

Aos alunos do Curso de Mestrado em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, pela amizade e apoio oferecidos.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISTA DA LITERATURA	12
2.1- Diabetes e Nutrição Protéica	12
2.2- Tecido de Reparo e Diabetes	24
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1- FORMULAÇÕES das DIETAS	37
4.1.1- Dieta Hipoprotéica	37
4.1.2- Dieta Normoprotéica	38
4.1.3- Dieta Hiperprotéica	39
4.1.4- Composição da Mistura Salina	40
4.1.5- Composição da Mistura Vitamínica	41
4.2- INDUÇÃO DO DIABETES	42
4.3- TESTE DE CICATRIZAÇÃO	43
4.4- SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	43
4.5- DOSAGENS GLICÊMICAS	44
4.6- HISTOMETRIA	44
4.7- TRATAMENTO ESTATÍSTICO	45
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	78
8. RESUMO	80

9. SUMMARY	82
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
11. APÊNDICE	

1.- INTRODUÇÃO

O tema desnutrição energético-protéica tem sido estudado sob vários pontos de vista, particularmente nos dias atuais em que a fome se acentua em todas as partes do mundo.

Na América Latina, a desnutrição protéica é responsável pela elevada taxa de mortalidade e morbidade em crianças abaixo de 5 anos de idade. Através de relatórios verificou-se que a mortalidade, nesta faixa etária, é de 10 a 33 vezes maior do que nos países desenvolvidos.

COZZOLINO et al (1974) relataram que o assunto é de suma importância, visto que uma grande porcentagem da população é vulnerável à desnutrição energético-protéica, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde a alimentação é composta basicamente de arroz e feijão, mistura esta deficiente em cálcio, vitamina A e proteína de baixo valor biológico.

A utilização de nutrientes pode ser influenciada pela quantidade e qualidade da dieta, bem como pelas condições fisiológicas dos animais.

Tem sido descrito vários tipos de alterações fisiológicas em animais com depleção energético-protéica. MUNRO & CRIM (1980) relataram uma alteração da função tireoideana, com diminuição no peso da tireóide e um aumento do

hormônio de crescimento; SCANES et al (1981) descreveram uma redução da concentração plasmática de IGF-I (fator crescimento semelhante à insulina); ABRAHAM et al (1985) observaram distúrbios na evolução sexual de ratas jovens; NWANKWO et al (1985) relataram alterações bioquímicas e imunológicas, com diminuição de neutrófilos e um significativo aumento de mortalidade por infecção e SHARMA et al (1985) verificaram alterações hematológicas, como a redução da hemoglobina, do ferro e microcitose.

Segundo EIZIRIK & MIGLIORINI (1985), animais submetidos a dieta hiperprotéica apresentam menor susceptibilidade à ação diabetogênica da aloxana e uma subsequente melhora do estado diabético induzido. O alto teor protéico da dieta induziu a redução da severidade do diabetes em termos de glicose sanguínea, glicosúria e insulina sérica e pancreática.

De acordo com BHUTANI et al (1985), o nível de proteína da dieta afetou a liberação de insulina, sendo que os animais submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram um nível de insulina pancreática significativamente maior, um aumento de glicemia e uma redução no nível de insulina circulante.

KATSUMI et al (1986), examinando o efeito do nível de proteína da dieta sobre o consumo energético, verificaram que ratos submetidos a dieta hiperprotéica (30% de proteína), apresentaram uma elevada eficiência energética, e que esta se reduzia quando se aumentava ou quando se diminuía o nível de proteína da dieta. Maior quantidade de energia era utilizada para o crescimento de animais submetidos à dieta hipoprotéica (6% de proteína), entretanto a eficiência

energética diminuía, o que indicava que a redução do nível protéico resultava em ineficiente utilização energética.

Por outro lado, o diabetes melito é uma doença complexa, caracterizada por alterações no substrato metabólico e hormonal, causando profundas alterações no organismo.

Muitas das complicações crônicas dos diabéticos evoluem para anormalidades no tecido conjuntivo, incluindo modificações qualitativas e quantitativas na produção de colágeno.

Pouco se conhece sobre os mediadores em potencial, responsáveis pela alteração na produção de colágeno em diabéticos, sendo isto relacionado a fatores metabólicos, hormonais e nutricionais.

Dependendo da severidade do diabetes, há um comprometimento do estado nutricional, de forma que esta patologia tem sido relacionada em alguns casos à subnutrição.

2.- REVISTA DA LITERATURA

2.1.- DIABETES E NUTRIÇÃO PROTÉICA

O Diabetes tem sido relacionado, primordialmente, a um comprometimento do metabolismo de carboidratos. Entretanto, os hormônios que regulam e influenciam o metabolismo de carboidratos apresentam também uma interrelação significativa com o metabolismo de proteínas e gorduras.

Numerosos trabalhos têm procurado relacionar o estado nutricional ao diabetes. Tem sido sugerido que a dieta é um importante fator na manifestação e no controle da doença.

Conforme os estudos de HEARD (1966), anormalidades na tolerância à glicose têm sido associada à restrição protéica. A síntese de insulina pode ser gradualmente diminuída em pacientes com depleção protéica, levando à exaustão pancreática do estoque de insulina e predisposição ao diabetes. Crianças com kwashiokor apresentam anormalidades na utilização de glicose, que têm sido atribuídas à deficiente secreção de insulina.

Um dos enigmas do diabetes inicial adulto é a constatação de hiperglicemia em indivíduos que apresentam níveis séricos de insulina normais ou acima do normal. Nesses indivíduos, a insulina circulante é efetiva no tecido adiposo em termos de aumento da lipogênese e diminuição da concentração de ácidos graxos livres, mas, em graus variáveis, é ineficiente no transporte de glicose em alguns tecidos, principalmente no muscular (SEYFFERT et al, 1966).

Por outro lado, BERGER & VONGARAYA (1966) demonstrou que certos aminoácidos e proteínas são potentes estimuladores da liberação de insulina, que se mostrou, em resposta à dieta hiperprotéica, extremamente rápida.

ESTRICH et al (1967) estudaram a variação do nível glicêmico e de insulina plasmática em pacientes diabéticos não insulino-dependentes, submetidos aos seguintes tipos de dietas: contendo só carboidratos, carboidratos + proteínas, carboidratos + gorduras e carboidratos + proteínas + gorduras. Observaram que os indivíduos que se alimentaram de carboidratos e proteínas apresentaram um aumento do nível de insulina plasmática em relação ao grupo que ingeriu só carboidratos, sendo que a combinação de carboidratos + proteínas + gorduras, também potencializou a liberação de insulina. A partir desses dados, eles concluíram a importância de se incluir altos teores de proteína na dieta desses pacientes e que a ingestão de carboidratos deve ser sempre acompanhada de proteína e/ou gordura, uma vez que a gordura pode retardar a absorção de glicose e a proteína potencializar a liberação de insulina.

Segundo HEARD & TURNER (1967), animais experimentais submetidos à restrição protéica desenvolveram, marcadamente, uma redução na tolerância à glicose.

BECKER et al (1971) relataram que a má nutrição protéico-calórica diminuiu a liberação de insulina em resposta à administração de glicose.

MILNER et al (1971a) observaram em crianças subnutridas uma redução do nível circulante de insulina e um aumento de hormônio do crescimento, e que a permanência de secreção subnormal de insulina pode potencializar a predisposição ao diabetes na vida adulta.

Segundo outros autores, achados similares têm sido reportados em crianças e adultos com subnutrição severa e moderada. HEARD & STEWART(1971), RAO & RAGHURAMULU (1972) comentaram que o nível de insulina plasmática pós-prandial e a liberação de insulina em resposta à glicose são significativamente reduzidas nesses indivíduos. MILNER (1971b) relatou que as respostas a outros agentes insulínotropicos, como o glucagon e aminoácidos, estão também diminuídas.

Nos estudos de BECKER et al (1971) essas anormalidades, na maioria das vezes, podiam ser revertidas rapidamente por uma alimentação adequada, enquanto em alguns casos permaneciam por um período de até 10 anos após completa normalização de todos os parâmetros nutricionais.

Analisando um grupo de 54 crianças com deficiência protéico - calórica, BECKER et al (1972) demonstraram uma resposta anormal de secreção de insulina após sobrecarga de glicose. O nível de insulina imunorreativa permaneceu elevado 120 minutos após injeção intravenosa, não voltando espontaneamente aos níveis basais. Entretanto, quantitativamente, a taxa de secreção de insulina foi significativamente menor quando comparada à de indivíduos normais, apresentando um pico de 40 a 50 uU/ml contra 90 a 100 uU/ml encontrados no grupo controle. Segundo os autores essa secreção mantida pode ser explicada pela presença de resistência periférica à insulina, relacionada ou ao comprometimento a nível de membrana ou de enzimas intracelulares e de excesso de antagonistas circulantes, sendo estes decorrentes da depleção protéica.

Segundo FRANK et al (1984), a utilização de dietas hiperprotéicas tem um efeito benéfico em pacientes diabéticos tipo II (não insulino dependente), no controle da liberação de insulina. A ingestão de proteínas estimula a secreção de insulina nesses indivíduos e quando ingerida simultaneamente com carboidratos reduz o efeito hiperglicêmico da dieta. Sugeriram os autores que a ingestão de carboidratos para esse tipo de paciente, deve ser acompanhada de ingestão protéica.

Com relação às alterações histológicas do pâncreas endócrino em indivíduos subnutridos, os dados são muito contraditórios. Tem sido observado tanto aumento como diminuição do número e tamanho das ilhotas pancreáticas, que podem estar relacionados ao fato de que as crianças subnutridas passam por uma fase inicial de

hiperinsulinemia e em estágio mais avançado de subnutrição, por uma fase de hipoinsulinemia.

HEARD & STEWART (1971) observaram em porcos, que a deficiência protéica leva a uma diminuição do número de grânulos nas células β e da proporção de células β em ilhotas individuais.

Segundo MILNER (1972), o pâncreas exócrino também é significativamente afetado pela subnutrição, ocorrendo desorganização e atrofia acinar com redução de grânulos zimogênicos, mitocôndrias e retículo endoplasmático, sendo que estas alterações antecedem ao comprometimento da parte endócrina. A diminuição de fatores gastrointestinais decorrentes da atrofia gastrointestinal pode afetar a sensibilidade das células β .

A diminuição da liberação de insulina pelas ilhotas em ratos com deficiência protéica pode ser atribuída a uma redução quantitativa dos sítios de ligação de glicose nas células β (GRODSKY, 1972). O autor demonstrou que ilhotas pancreáticas isoladas de animais subnutridos, quando em presença de glucagon (5ug/ml), apresentam uma liberação de insulina significativamente maior do que na presença de glicose (300 mg/dl), indicando que a diminuição da secreção de insulina pelas ilhotas de animais com deficiência protéica pode não estar relacionada a uma diminuição da quantidade de insulina armazenada.

Entretanto, altos níveis de insulina e resposta exagerada à glicose também têm sido observados em crianças subnutridas. Segundo LUNN et al (1973), isto

pode ser explicado pelo fato de que crianças expostas à má nutrição passam por uma fase inicial de hiperinsulinemia. HEARD et al (1977) apresentaram resultados similares em animais experimentais.

Em estudos de microscopia eletrônica, WEINKOVE et al (1974) demonstraram um predomínio de grânulos pálidos nas células β de ratos subnutridos, que foi relacionado a um menor conteúdo de insulina. Posteriormente, PIMSTONE (1976) relatou uma diminuição do volume total de ilhotas em ratos com depleção protéica.

Por outro lado, WEINKOVE et al (1976) associaram a deficiente liberação de insulina apresentada por ratos com desnutrição protéica à imaturidade da função pancreática, incluindo alterações a nível de receptor, diminuindo a sensibilidade da célula β em resposta à glicose plasmática, uma vez que encontraram nesses animais uma quantidade de insulina pancreática maior do que no controle.

Posteriormente, WEINKOVE et al (1977) observaram que em ratos com deficiência protéica, o nível de somatostatina pancreática por unidade de peso é maior que nos controles, e que esta, tendo um efeito inibitório na secreção de insulina, pode estar envolvida na menor liberação de insulina apresentada por esses animais.

A subnutrição crônica pode reduzir significativamente a função da célula β e este comprometimento pode ser permanente em alguns casos, mesmo após a reabilitação nutricional, aumentando a predisposição ao diabetes. Duas outras

hipóteses podem ser avaliadas: uma é que a subnutrição pode precipitar o diabetes em indivíduos geneticamente predispostos e outra que a subnutrição poderia atuar indiretamente por aumentar a vulnerabilidade da célula β a influências betacitotóxicas, como viroses e toxinas alimentares (KARAM, 1982).

Tem sido descrito dois tipos básicos de diabetes, tipo I (insulino dependente) e tipo II (não insulino dependente). Entretanto, segundo RAO (1984) são encontradas 3 formas atípicas de diabetes em indivíduos com depleção protéica: a primeira é a cetose resistente, insulino-dependente e se manifesta dos 20 aos 40 anos, requerendo quantidades elevadas de insulina por apresentar uma relativa insulino resistência, conhecida como tipo J; a segunda forma está relacionada à calcificação pancreática, se manifesta em indivíduos mais jovens, também é insulino dependente, porém requerendo quantidades menores de insulina, apresenta pancreatite associada e não é revertida pela reabilitação alimentar; e um terceiro tipo de diabetes se manifesta em indivíduos mais velhos, em geral acima de 60 anos, não é insulino dependente e apresenta hiperglicemia moderada e sensível aos hipoglicemiantes orais, que pode ser revertida pela alimentação adequada, sendo encontrada principalmente nas classes sócio econômicas mais baixas.

O efeito do teor protéico da dieta sobre o pâncreas endócrino em ratos diabéticos induzidos pelo estreptozotocina (STZ) foi investigado através de análises morfométricas por SCHWARTING et al (1988), os quais observaram que a redução de densidade do tecido endócrino e das células β é significativamente menor nos animais submetidos à dieta hiperprotéica.

Tem sido demonstrado também que o teor protéico da dieta interfere na evolução do diabetes induzido e do diabetes espontâneo em animais experimentais.

Segundo NAKHOODA et al (1978), nos ratos Wistar (BB), linhagem que desenvolve espontaneamente o diabetes, houve uma completa destruição de células β 1 a 3 semanas após o início da glicosúria, evoluindo rapidamente para o diabetes severo e que a dieta poderia ser um fator importante na evolução da doença.

SIEGEL et al (1980) analisaram o efeito do teor protéico da dieta no desenvolvimento do diabetes induzido por STZ, demonstrando que ratos adaptados à dieta hiperprotéica apresentaram uma menor susceptibilidade à ação diabetogênica da droga.

SCHMIDT et al (1980) também demonstraram que ratos alimentados com dieta hiperprotéica, 2 dias após a administração de STZ, reduziram a severidade do diabetes, apresentando diminuição da glicemia e glicosúria e aumento dos níveis de insulina plasmática e pancreática, quando comparados aos animais submetidos à dieta normoprotéica.

Segundo SEINO et al (1983) e ELLIOT & MARTIN (1984), o aumento de insulina plasmática e pancreática induzido por dietas com altos teores protéicos, em casos de diabetes também tem sido observado em humanos.

GOOD et al (1984) relataram que a dieta pode ter um efeito dramático sobre o sistema imune o qual é extremamente sensível a variedades nutricionais, podendo desta forma interferir na imunorregulação de linfócitos T.

Posteriormente, esta hipótese foi confirmada por SCOTT et al (1985), que demonstraram que a dieta semipurificada (AIN-76) podia prevenir o desenvolvimento do diabetes espontâneo em ratos Wistar (BB). Utilizando esta dieta, eles conseguiram reduzir drasticamente a incidência do diabetes nesse tipo de animal e apresentaram aumento do timo e de leucócitos, principalmente linfócitos T . Os autores concluíram que a dieta poderia ser um importante fator que influenciaria o desenvolvimento do diabetes em ratos Wistar (BB), por alterar a susceptibilidade das células T imunossupressoras.

EIZIRIK & MIGLIORNI (1985) também relataram os efeitos benéficos da dieta hiperprotéica na indução do diabetes em ratos. Inicialmente, uma proteção contra a ação diabetogênica da droga e, posteriormente, uma melhora dos padrões metabólicos do estado diabético induzido.

No estudo de EIZIRIK et al (1986), a dieta com níveis protéicos variáveis foi administrada após indução do diabetes, buscando assim a melhora do estado diabético, que parece ser independente da proteção inicial da dieta contra o efeito β citotóxico do STZ. Os autores analisaram, também, o efeito do teor protéico da dieta sobre a evolução do diabetes em ratos Wistar (BB). Observaram que nestes animais a dieta hiperprotéica também melhora o estado diabético, diminuindo as necessidades de insulina, a frequência de descompensação metabólica, a glicemia e

a glicosúria, mas não apresentaram aumento de peso e da quantidade de insulina pancreática, o que pode estar relacionado ao fato de não apresentarem número residual de células β viáveis para se beneficiarem do efeito restaurador da dieta.

Entretanto, apesar de não apresentarem um aumento do conteúdo de insulina pancreática, as necessidades de insulina e a glicose sanguínea e urinária foram significativamente reduzidas quando comparadas aos grupos submetidos à dieta hipoprotéica, como também verificou-se uma menor incidência de episódios de cetoacidose. Considerando a virtual ausência de reserva pancreática de insulina nesses animais, os autores concluíram que a ação benéfica da dieta hiperprotéica se deve a efeitos metabólicos, atuando independentemente da célula β .

Por outro lado, a relação entre a insuficiência renal progressiva e a dieta também tem sido amplamente discutida, uma vez que a hipertrofia renal está associada ao aumento de ingestão protéica, que induz a um acúmulo de toxinas urêmicas.

Segundo FRIEND et al (1978), a evolução da insuficiência renal progressiva (IRP) poderia ser modificada pela manipulação apropriada da dieta. A restrição protéica diminui a deposição de complexos imunes na membrana basal glomerular e o comprometimento mesangial. Entretanto, o aumento da ingestão protéica acelerou as alterações histológicas e a redução da função renal em ratos com IRP. O comprometimento da função renal, por sua vez, levou a um aumento de metabólitos protéicos nefrotóxicos e o aumento da ingestão protéica, necessariamente, aumentou o nível de toxinas plasmáticas, causando uma redução

adicional da função renal, formando assim um círculo vicioso que poderia ser amenizado pela restrição protéica alimentar.

HOSTETTER et al (1981) e CHRISTIANSEN (1984) relataram que o aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) e a hipertrofia de nefrons foram evidentes nos primeiros estágios de diabetes insulino dependente em humanos e em animais experimentais.

Ingestão excessiva de proteína tem sido associada a um agravamento das lesões glomerulares em ratos diabéticos, e a hiperfiltração induzida pela dieta hiperprotéica poderia resultar numa aceleração da progressão da glomeruloesclerose diabética. Por outro lado, BRENNER (1985) observou que uma marcada restrição de proteína na dieta poderia prevenir ou retardar o desenvolvimento da glomeruloesclerose. As anormalidades glomerulares se manifestaram 3 a 6 meses após a indução do diabetes em ratos, envolvendo hipertrofia renal e glomerular, expansão mesangial, espessamento da membrana basal e aumento da TFG e fluxo sanguíneo renal (FSR). Já SUNG-FENG et al (1985) analisaram o efeito da restrição protéica sobre parâmetros da fisiologia renal e da histopatologia, observando que a diminuição da ingestão protéica reduziu significativamente a TFG e FSR e que esta redução estava associada a uma diminuição da albuminúria, devido à hipofiltração glomerular e hipoperfusão.

WARREN et al (1987) demonstraram que o aumento do fluxo plasmático renal e da TFG associado à alta ingestão de proteína foram significativamente diminuídos após uma semana de normalização da dieta protéica, tanto nos

pacientes normais como nos diabéticos. De forma que as anormalidades da fisiologia renal nos estágios iniciais do diabetes melito insulino dependente podem, em parte, estarem associadas ao excesso de ingestão protéica e que uma restrição protéica moderada pode ser um tratamento adicional para a hiperfiltração em estágios iniciais do diabetes.

Apesar dessas evidências clínicas de que a progressão da insuficiência renal (IR) pode ser retardada pela restrição protéica, esta tem sido indicada com certa relutância em pacientes diabéticos com IR.

Entretanto, PINTO et al (1991) consideraram benéfica a restrição protéica, que pode restaurar a função renal de indivíduos diabéticos com nefropatia, principalmente, por reduzir de forma significativa a albuminúria desses pacientes.

Tem sido também descrito na literatura um relacionamento entre os distúrbios metabólicos de mães diabéticas e malformações congênitas.

MILLS (1982) e MENUTTI (1985), demonstraram que o risco de malformações congênitas é significativo em pacientes diabéticos e que um rígido controle metabólico durante a gravidez reduziu a porcentagem de patologias neonatais.

Numerosos estudos têm procurado elucidar os fatores metabólicos relacionados aos efeitos teratogênicos. Segundo ERIKSSON (1988), a elevação da glicose plasmática não aumentou a incidência de malformações. Outros fatores

como cetoácidos, inibidores de somatostatinas e acúmulo de sorbitol têm sido relacionados.

Recentemente, a dieta tem sido relacionada como um possível fator teratogênico na gravidez de animais diabéticos. GIAVINI et al (1991), estudando o efeito do teor protéico da dieta na incidência de malformações congênitas em ratos diabéticos, induzidos por STZ, verificaram que 46,4% dos fetos provenientes de ratos diabéticos submetidos à dieta normoprotéica (19%) purificada, mostraram malformações, enquanto que o grupo diabético submetido à dieta hiperprotéica (50%) apresentou um índice de apenas 14% e concluíram que o baixo índice de embriotoxicidade deste grupo parece estar associado ao elevado teor protéico da dieta. Desta forma, este pode ser um fator de considerável importância na embriotoxicidade de animais diabéticos.

2.2. - Tecido de reparo e diabetes

A evolução do processo de reparação tecidual tem sido intensivamente estudada sob os mais variados aspectos. Numerosas são as pesquisas realizadas, objetivando o estudo da morfologia do colágeno, sua cronologia de síntese, bem como os aspectos bioquímicos e fisiológicos dos componentes estruturais que, direta e indiretamente, participam do processo de cicatrização.

Sabe-se que o diabetes melito apresenta uma série de alterações metabólicas, hormonais e nutricionais, que estão relacionadas a um retardo do processo de cicatrização e a vários outros tipos de complicações.

GOLUB et al (1977) induzindo uma resposta inflamatória pela injeção de complexo antígeno-anticorpo em gengiva de ratos normais e diabéticos, demonstraram que o diabetes experimental induzido pela aloxana aumentou a excreção urinária de hidroxiprolina e diminuiu o conteúdo de colágeno solúvel, sugerindo uma menor capacidade de remodelação do colágeno nos estágios iniciais da lesão inflamatória, levando a um aumento da estabilidade do colágeno e, conseqüentemente a um retardo no processo de reparação tecidual.

O colágeno normalmente sofre progressivas variações em função da idade, caracterizada por decréscimo na solubilidade, endurecimento e resistência à digestão enzimática (KOHN 1978).

KOHN & HAMLIN (1978) sugeriram que muitas complicações que afetam os indivíduos diabéticos, como aterosclerose, enrijecimento prematuro dos grandes vasos e espessamento difuso das membranas basais dos capilares, são semelhantes à debilidade em função da idade e ocorrem em tecidos ricos em colágeno. Possivelmente, essas alterações estão relacionadas a um envelhecimento precoce do colágeno.

As alterações metabólicas do diabetes podem causar alterações secundárias do colágeno, acelerando o processo de envelhecimento. A hiperglicemia do



diabético leva provavelmente a um aumento da glicosilação não enzimática de proteínas, havendo um aumento da glicosilação do colágeno insolúvel (DAY et al 1979).

Também tem sido demonstrado aumento da glicosilação de frações de colágeno isoladas da membrana basal glomerular de indivíduos diabéticos (UITTO et al 1980) e de ratos com hiperglicemia induzida pela estreptozotocina (COHEN et al 1980).

TENNI et al (1980) sugeriram uma síntese anormal de colágeno nos indivíduos diabéticos. Eles observaram que fibroblastos de indivíduos diabéticos secretam "in vitro" moléculas anormais de protocógeno, que são excessivamente solúveis por apresentarem ligações covalentes anormais, que inibem a proteólise normal do protocógeno.

CHANG et al (1980), estudaram o colágeno extraído de tecido de granulação induzido artificialmente em animais diabéticos e observaram que o colágeno tipo I e a fração de colágeno solúvel apresentaram uma redução de 50% em relação aos valores obtidos nos animais controles. Os autores sugeriram que o decréscimo do colágeno solúvel nos animais diabéticos se deve a um aumento de ligações cruzadas associadas à alterações na atividade enzimática.

Segundo SCHNIDER & KOHN (1981) é possível que as alterações metabólicas do diabetes proliferem certa linhagem de fibroblastos, que normalmente estão presentes em pequeno número, sendo que estes fibroblastos

podem sintetizar moléculas anormais de colágeno. Os autores verificaram que estes indivíduos diabéticos jovens apresentaram componentes de colágeno extraído enzimaticamente de maior peso molecular que indivíduos normais, sendo este colágeno mais resistente à desnaturação e redução, possivelmente por apresentar interações covalentes anormais ou maior número de ligações covalentes normais.

Por outro lado, VILJANTO et al (1981) demonstraram que a biossíntese de glicoproteínas tem um papel importante na formação da matriz extracelular durante o processo de cicatrização. Nas fases iniciais de síntese e reabsorção do tecido de granulação há um aumento significativo da concentração de glicoproteínas solúveis, que provavelmente está relacionado ao aumento da síntese de enzimas envolvidas na degradação do tecido neoformado e que a síntese de glicoproteínas atinge atividade máxima em 24 horas após o início da lesão, antecedendo à síntese de colágeno que só atinge o máximo após 7 dias.

Segundo BEHERA & PATNAIK (1981), a estabilidade do colágeno é intensamente aumentada tanto no diabetes melito como no diabetes induzido por STZ e aloxana, acelerando o processo de envelhecimento do colágeno e que estas alterações estão diretamente relacionadas ao nível glicêmico. Eles observaram que concomitantemente ao retorno da glicemia aos valores normais, as características do colágeno da pele de animais diabéticos se apresentaram semelhantes às dos controles, de forma que o aumento do número de ligações cruzadas do colágeno proveniente de animais diabéticos aloxânicos ou induzidos pela estreptozotocina (STZ) podiam ser formados temporariamente e revertidos pela normalização da glicemia.

LEHRER (1981) demonstrou que o diabetes induzido, tanto em ratos convencionais como em "germ free", estimulou a produção de enzimas colagenolíticas em cultura de tecido gengival.

Segundo SELLERS & MURPHY (1981), a colagenase é de grande importância no processo de degradação do colágeno, inicialmente por remover as ligações cruzadas e, posteriormente, por participar da quebra final dos peptídeos.

KAPLAN et al (1982) relataram um aumento da atividade colagenolítica "in vitro", em fragmentos de gengiva e em amostras de fluido gengival obtidos de indivíduos diabéticos, sendo que este aumento pode ser um importante fator no desenvolvimento de severa periodontite em indivíduos diabéticos insulino dependentes.

MILNER & RODHES (1982) observaram que indivíduos com diabetes melito não controlado apresentaram diminuição de colágeno e da resistência elástica dos tecidos neoformados, como também maior atividade da colagenase e de proteases e um significativo aumento de glicosilação de proteínas em relação aos indivíduos normais.

RAMAMURTHY & GOLUB (1983) demonstraram que esse aumento da atividade enzimática apresentada pelos indivíduos diabéticos podia estar relacionada a um maior índice de conversão da colagenase inativa em ativa.

Por outro lado, a glicose e outros açúcares inibem a formação de fibras colágenas "in vitro". LIEN et al (1984) estudaram a relação entre a inibição da formação de fibras colágenas e a concentração de glicose e observaram que o efeito inibitório já era visto com 5mMol de glicose e que a inibição máxima era obtida com uma concentração de 50m Mol, demonstrando também que o grau de redução da formação de fibras estava relacionado com a perda da capacidade do colágeno em servir de substrato para a enzima lisiloxidase.

BERTONE et al (1985) demonstraram "in vitro" que a insulina estimulou a secreção de inibidores da collagenase, aumentou a produção de colágeno e que o papel da insulina em acelerar o processo de cicatrização podia não estar relacionado somente ao controle da glicemia.

Os autores SHARMA et al (1985) utilizaram fucose radioativa para determinar a síntese de glicoproteínas durante o processo inflamatório e observaram que ela é formada precocemente durante a inflamação e marcadamente reduzida nos ratos diabéticos induzidos pelo STZ, provavelmente devido a uma disfunção do sistema enzimático envolvido no processo de reparação tecidual.

Segundo BOWERSOX (1986), houve aumento da atividade proteolítica da collagenase em tecidos de granulação provenientes de camundongos diabéticos e esses animais apresentaram maior susceptibilidade à glicosilação extracelular não enzimática de proteínas devido à hiperglicemia.

ANDREASSEN & OXLUND(1987), observaram que camundongos diabéticos hiperglicêmicos apresentaram uma diminuição da concentração de hidroxiprolina em todos os estágios de reparação tecidual quando comparados com animais normais ou diabéticos insulino dependentes controlados.

Segundo BERNSTEIN (1987), a glicosilação não enzimática de proteínas ocorre em 2 fases: a glicose liga-se de forma reversível a um grupo amina, formando uma base de Schiff e após período de semanas a meses esta base sofre um rearranjo (via Amadori) não reversível, formando um endoproduto glicosilado (AGE). Esses endoprodutos são formados durante meses e anos em indivíduos diabéticos antes do diagnóstico e tratamento, cujo processo afeta a vida média das proteínas nas quais os AGE podem ser acumulados e estão associados a ligações cruzadas anormais das proteínas, com subsequente alteração das propriedades físicas do tecido afetado. Segundo os autores, o aumento da glicosilação do colágeno neoformado em animais hiperglicêmicos estaria associado a um aumento da colagenase e à diminuição do conteúdo de colágeno e que a taxa de catabolismo protéico nos tecidos neoformados estaria diretamente relacionada ao grau de glicosilação, concluindo que o aumento do catabolismo de proteínas, estruturalmente anormais, seria o responsável pela deficiente cicatrização observada nos indivíduos diabéticos não controlados.

KIMURA et al (1987) desenvolveram um método de induzir granuloma em camundongos, utilizando adjuvante de Freund, contendo óleo de cróton, sendo um ótimo modelo para estudos experimentais de tecido de granulação envolvendo neovascularização. Os autores utilizaram essa técnica para investigar os efeitos da

insulina na formação de granuloma e na angiogênese no estado diabético e observaram que os camundongos diabéticos são mais resistentes a formação do granuloma. A aplicação tópica de insulina intensifica a formação de granuloma e a angiogênese, efeito este mais acentuado nos animais diabéticos e parece ser independente do nível glicêmico, podendo a insulina ter uma ação direta na proliferação celular independente da secreção metabólica.

HENNESSEY (1989) observaram que a fase de maturação do colágeno durante o processo de cicatrização envolve um aumento de produção do colágeno tipo I, um aumento da degradação do tipo III e uma diminuição da degradação do tipo I, resultando, desta forma, um aumento do tipo I e uma redução do tipo III em relação ao colágeno total e que o comprometimento do processo de cicatrização apresentado por animais diabéticos parece estar relacionado principalmente a alterações nessa fase de maturação do colágeno.

Segundo HENNESSEY et al (1990a), em tecidos neoformados induzidos pela implantação subcutânea de cilindros de politetrafluoretileno (PTFE) em ratos normais e diabéticos, houve um aumento de 14% na atividade da colagenase e 48% na glicosilação do colágeno nos ratos diabéticos, enquanto o conteúdo de hidroxiprolina foi reduzido em 39% em relação aos controles.

HENNESSEY et al (1990b) demonstraram também que uma única aplicação tópica de insulina é suficiente para normalizar a atividade da colagenase e o decréscimo do colágeno tipo III, restabelecendo a taxa normal de produção de colágeno total, sendo que esse aumento na produção de colágeno poderia ser

associado a uma inibição temporária da atividade proteolítica, direcionando ao colágeno tipo I.

Nas alterações nutricionais envolvendo deficiência protéica, também há um comprometimento do processo de cicatrização, caracterizado por uma diminuição da produção de colágeno onde o defeito básico parece estar relacionado a uma deficiente produção de hidroxiprolina.

Entretanto, ANASUYA & NARASINGA (1970) relataram que a excreção de hidroxiprolina em ratos com depleção protéica era marcadamente aumentada, sugerindo uma redução na síntese e no catabolismo do colágeno. Eles determinaram o nível de colágeno de vários tecidos pela técnica do nitrogênio total e verificaram que os ratos com depleção protéica apresentaram uma brusca redução de colágeno na pele, sem alterações no colágeno do esqueleto e que a redução da excreção de hidroxiprolina se deve em grande parte às alterações do metabolismo do colágeno da pele.

Segundo VASANTHA (1970), o metabolismo do colágeno é alterado tanto na deficiência protéica como na calórica e que as alterações são similares em ambas as condições e associadas ao retardo do crescimento, sendo que as alterações quantitativas do colágeno solúvel ocorrem mais precocemente que as do colágeno insolúvel. Como o solúvel é o precursor do colágeno maduro, sua redução juntamente com a do colágeno total pode ser interpretada como indicativo da redução da síntese de colágeno. O autor relatou que essas alterações quantitativas no processo de maturação do colágeno da pele poderiam ter um

importante papel na sua estabilidade estrutural em casos de dermatose resultantes de má nutrição protéico-calórica.

PHILLIPS & UNTERMAN (1984) demonstraram que as alterações do estado nutricional dos ratos diabéticos eram fatores de considerável importância envolvidos no comprometimento da produção de colágeno; observaram que animais subnutridos apresentaram uma significativa redução de insulina circulante e do nível de IGF-I, alterações estas que também ocorreram em animais diabéticos induzidos por STZ. A redução de IGF-I ocorreu paralelamente às variações da produção de colágeno, tanto em animais diabéticos como em animais subnutridos, sugerindo que a redução de IGF-I circulante poderia contribuir para o decréscimo na produção de colágeno apresentada por estes animais, podendo ser um ótimo indicador dessas alterações.

KAUFMAN et al (1985) relataram que pacientes diabéticos insulino dependentes não controlados apresentaram um retardo no processo de reepitelização, contração do ferimento e na síntese de colágeno, sendo o estado nutricional considerado um fator relevante no processo de cicatrização de indivíduos diabéticos.

Os autores UMPIERREZ et al (1989) determinaram "in vitro" a produção de colágeno em tecido cartilaginoso de ratos pela incorporação de hidroxiprolina marcada, e observaram que os animais com diabetes severo e alimentação "ad libitum" apresentaram uma redução de 45% do colágeno produzido em relação ao controle. Entretanto, os animais diabéticos submetidos à restrição alimentar

apresentaram uma redução de 85% em relação aos controles, de forma que as alterações nutricionais comprometeram ainda mais a produção de colágeno em animais diabéticos.

3.- PROPOSIÇÃO

Considerando que:

- o teor protéico da dieta interfere na evolução do diabetes induzido e do diabetes espontâneo em animais experimentais;
- animais adaptados a dieta hiperprotéica apresentam proteção contra a ação diabetogênica da droga (Aloxana) e, posteriormente uma melhora dos padrões metabólicos do estado diabético induzido;
- animais experimentais submetidos à restrição protéica desenvolvem redução na tolerância à glicose e resposta anormal de secreção de insulina;
- ocorre envelhecimento prematuro do colágeno em indivíduos diabéticos e
- a deficiência protéica compromete a produção do colágeno e consequentemente o processo de cicatrização,

propõe-se verificar, no presente trabalho, a influência do teor protéico da dieta na gênese do tecido de reparo em animais diabéticos, utilizando-se da histometria para contagem de fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras colágenas.

4.- MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram utilizados 80 ratos machos, da linhagem Wistar (*rattus norvegicus*, var. albino, rodentia, mammalia), com 30 dias de idade, pesando em média 110g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (animais mantidos sob barreira de qualidade sanitária).

Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais, localizadas em laboratório mantido à temperatura de 20 a 26°C, com 14h de iluminação e 10h de obscuridade. Esses animais foram distribuídos em 4 grupos de 20 animais cada e por um período de 30 dias, submetidos às seguintes dietas:

Grupo I	dieta normoprotéica	15% de proteína	controle
Grupo II	dieta normoprotéica	15% de proteína	diabéticos
Grupo III	dieta hipoprotéica	6% de proteína	diabéticos
Grupo IV	dieta hiperprotéica	35% de proteína	diabéticos

Foram oferecidos diariamente 15g de dieta por animal e água "ad libitum", sendo o controle da ingestão alimentar realizado 3 vezes por semana no período matutino, onde os comedouros eram pesados, a diferença acrescentada e a dieta correspondente, complementada. O controle do peso dos animais foi realizado uma vez por semana, também no período matutino.

4.1.- Formulações das dietas

Para elaboração das dietas hipoprotéica e hiperprotéica foi utilizada caseína comercial. Cada 100g de caseína fornecem 81,6 de proteína.

4.1.1.- Dieta hipoprotéica

A dieta hipoprotéica foi composta de 6% de proteína e constou de

1. Caseína	7,4%
2. Óleo	8,0%
3. Mistura Salina	4,0%
4. Mistura Vitamínica	1,0%
5. Fibra	4,0%
6. Maizena	q.s.p. 100%

A dieta foi devidamente pesada em balança com aproximação centesimal, peneirada e misturada para melhor homogeneização dos componentes e acondicionada em saco plástico comum e guardada sob refrigeração.

4.1.2.- Dieta Normoprotéica

A dieta normoprotéica utilizada foi a Labina, da Purina Nutrimento Ltda, ração para ratos, camundongos e hamsters.

A ração utilizada é composta de milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farinha de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcio, sal, pré mix, sendo o teor protéico de 15%. A referida ração era enriquecida em cada quilograma por:

Vitamina A	20.000UI
Vitamina D3	6.600UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6,0mg
Vitamina B12	10,0mg
Vitamina B2	8,0mg
Pantotenato Ca	24,0mg
Niacina	95,0mg
Tiamina	4,0mg
Colina	2.000mg
Piridoxina	6,0mg
Biotina	0,1mg
Ácido fólico	0,5mg
Manganês	50,0mg
Iodo	2,0mg
Ferro	65,0mg

4.1.3.- Dieta hiperprotéica

Esta dieta foi composta de 35% de proteína e constou de

1. Caseína	42,9%
2. Mistura Salina	4,0%
3. Mistura Vitamínica	1,0%
4. Fibra	4,0%
5. Óleo	8,0%
6. Maizena	q.s.p. 100%

O modo de preparo e de acondicionamento foram iguais ao da dieta hipoprotéica.

4.1.4.-Composição da mistura salina

SUBSTÂNCIA	gramas
01. Cloreto de sódio	139,452
02. Iodeto de potássio	0,79
03. Potássio fosfato monobásico	389
04. Sulfato de magnésio	57,3
05. Carbonato de cálcio	381,4
06. Sulfeto ferroso	27
07. Sulfeto de manganês	4,01
08. Sulfato cúprico	0,477
09. Sulfato de zinco	0,548
10. Cloreto de cobalto	0,023

Fonte: Association of official Agriculture Chemists. Official methods of analysis association of official agriculture chemists. 12 ed. Washigton, AOAC, 1975. 1018p.

4.1.5.- Mistura vitamínica

A mistura vitamínica foi obtida em uma farmácia de manipulação, baseada nos relatos da AOAC (1975) e descrita abaixo:

SUBSTÂNCIA	gramas
01. Vitamina A seca e desidratada	1,0
02. Vitamina D seca e desidratada	1,0
03. Vitamina E seca e desidratada	0,001
04. Menadiona	0,5
05. Ácido P-aminobenzóico	10
06. Inositol	10
07. Niacina	4,0
08. D-Pantotenato de cálcio	4,0
09. Riboflavina	0,8
10. Tiamina HCl	0,5
11. Piridoxina HCl	0,5
12. Ácido fólico	0,2
13. Biotina	0,04
14. B-12	0,003
15. Dextrose	q.s.p. 1000

Fonte: Association of official Agriculture Chemists. Official methods of analysis association of official agriculture chemists. 12 ed. Washington, AOAC, 1975. 1018p.

Na mistura vitamínica a colina deve ser adicionada separadamente na dieta. Para cada 10 gramas de mistura vitamínica adiciona-se 2 gramas de colina em uma reação inversa para o cálculo.

4.2.- Indução do diabetes

Os animais foram mantidos com suas respectivas dietas por um período de 30 dias, portanto até completarem 60 dias de idade.

A indução do diabetes com aloxana foi realizada segundo Arruda Veiga et al (1989). Consistiu na administração intraperitoneal de uma dose única de aloxana*, na concentração de 130mg/kg para os animais do grupo III (hipoprotéico) e 150mg/kg para os animais dos grupos II e IV (normoprotéico e hiperprotéico) em um volume nunca superior a 0,5ml. A aloxana foi dissolvida em solução fisiológica (p/v) acrescentada de HCl 0,1N para ajustar o pH em torno de 5,0, sendo administrada após os ratos terem permanecido em jejum por 24 horas.

Em seguida à injeção de aloxana, a alimentação foi restituída aos animais, e para prevenir eventuais quadros de hipoglicemias foi colocada à disposição dos mesmos uma solução de glicose a 5% durante 24 horas subsequentes.

Dois dias após a administração da aloxana, a glicosúria foi determinada pelo

* Alloxan (5,6 - Dioxyuracil) Monohydrate (Sigma)

método da glicofita (Lilly) e os animais que apresentaram nível de glicose na urina superior a 1/2%, receberam, via subcutânea, uma dose de 2U de insulina**.

4.3.- Teste de cicatrização

Uma semana após a administração da aloxana, os animais diabéticos foram anestesiados com éter etílico e colocados em uma mesa cirúrgica, sendo depilados na região lombar a fim de executar-se uma incisão lateral esquerda na pele, com bisturi, provocando uma lesão com dimensão de 1,0x1,5cm e com profundidade suficiente para expor o tecido muscular. A seguir, os animais foram recolocados em suas gaiolas individuais e alimentados com suas respectivas dietas.

Os animais do grupo controle (não diabéticos) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico.

4.4.- Sacrifício dos animais

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados aos 3,7,11 e 14 dias após a incisão lateral da pele, sendo previamente anestesiados com éter etílico. A Pele do abdomen e tórax foi divulsionada e a artéria braquial dissecada, sendo adicionada duas gotas de heparina antes de ser seccionada para coleta de sangue e posteriores

** Insulina NPH - Bovina e Suína purificada (Iolin - Biobrás)

dosagens glicêmicas. O sangue foi coletado com pipeta Pasteur e acondicionado em tubos de Eppendor próprios para centrifuga.

Dessa forma, os animais foram sacrificados por hipovolemia e a seguir o tecido de cicatrização cuidadosamente divulsionado, retirado e colocado em vidros apropriados, sendo submetidos ao congelamento antes da fixação em formol a 10%.

Após a fixação, os tecidos foram incluídos segundo a técnica histológica de rotina, cortados na espessura de 7u e corados com HE para posterior análise histométrica e histológica.

4.5.- Dosagens glicêmicas

As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma coletado. A determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose enzimática (Celm). Através dessas análises, foram selecionados os animais diabéticos que apresentaram valores glicêmicos acima de 250mg%.

4.6.- Histometria

Para análise histométrica foi utilizado o método de HENNING(1958). Os cortes histológicos foram levados ao microscópio óptico, dotado de ocular

integradora Zeiss Kpl-W10x, com divisão para 25 hits. Para cada animal foram contados fibroblastos, vasos e fibras colágenas correspondentes a 500 hits.

Dessa forma, foram histometrados um total de 10.000 hits por grupo, sendo 2.500 hits em cada período de 3,7,11,14 dias após a lesão (cinco animais por período).

Os valores médios destas medidas, por animal e por grupo, em cada período de tempo, foram submetidos a análise estatística.

4.7.- Tratamento estatístico

Para análise estatística foram utilizados os esquemas de análise de variância de ensaios inteiramente casualizados.

A comparação das médias foi feita através da aplicação do teste de Tukey ao nível de 5%

5.- RESULTADOS

5.1. - Análise de crescimento

O crescimento dos animais dos grupos I (controle - normoprotéico), II (diabético - normoprotéico), III (diabético - hipoprotéico) e IV (diabético - hiperprotéico) foi avaliado pelos pesos inicial e final, tendo dessa forma como variável o ganho de peso.

O quadro 1 e gráfico 1 mostram os valores médios do ganho de peso dos animais dos grupos I, II, III e IV, sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão e a tabela 1 a respectiva análise de variância. Para análise estatística dos valores médios do ganho de peso foi utilizado o teste de Tukey com significância ao nível de 5%, e pelos resultados obtidos, pode-se observar que os animais do grupo III apresentaram uma redução significativa do ganho de peso em relação aos outros grupos. Os animais do grupo II diferem significativamente ao nível de 5% dos grupos I e IV, somente no período de 14 dias. O mesmo ocorrendo com os animais do grupo IV em relação aos grupos I e II.

Os valores comparativos de peso inicial e peso final dos respectivos grupos e dias (tabela 6 do apêndice) e o teste de Tukey para médias de grupo dentro do fator dia encontram-se expressos nos quadros 6, 7, 8, 9 do apêndice.

Quadro 1 - Média do ganho de peso (gramas) dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos dias	I	II	III	IV
3	100.54 a	69.62 a	7.26 b	78.58 a
7	99.38 a	78.80 a	20.40 b	65.20 a
11	134.28 a	100.40 ab	14.52 c	87.70 b
14	146.52 a	66.20 c	9.70 d	107.80 b

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

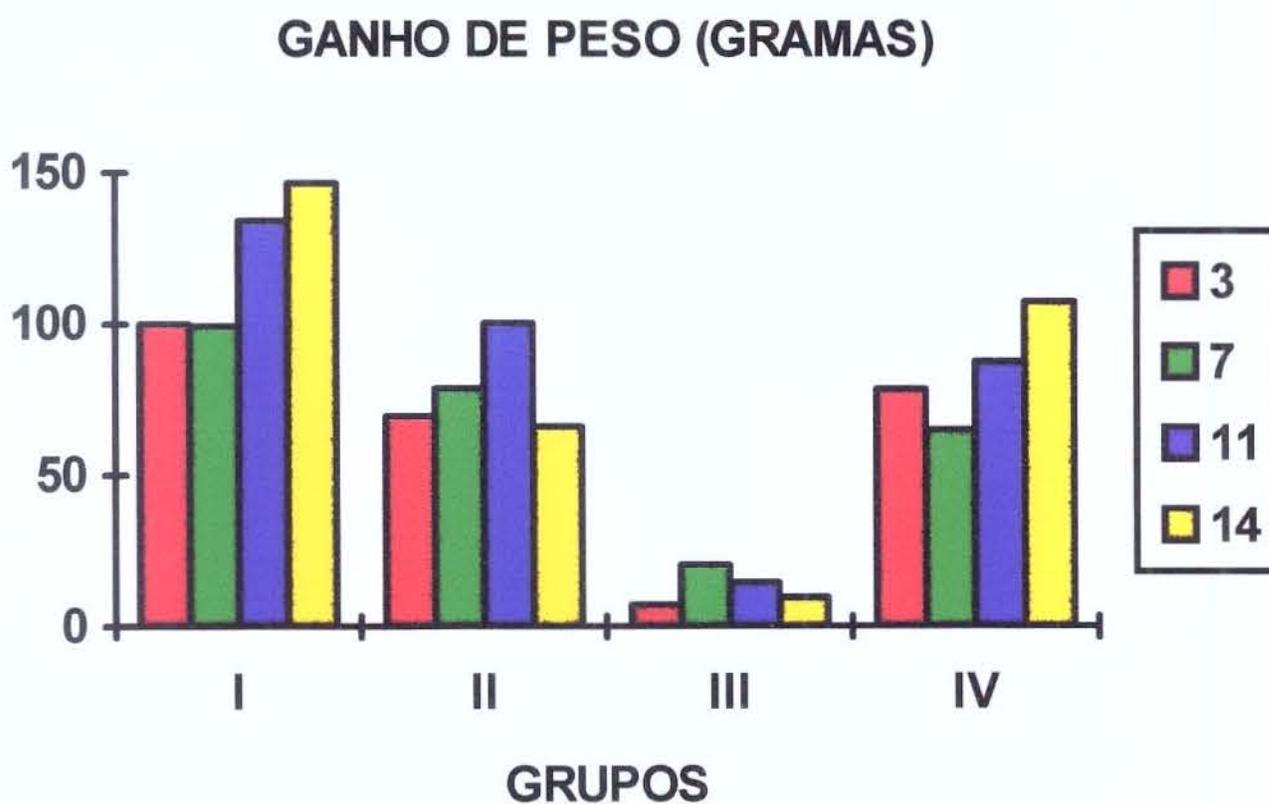


Gráfico 1 - Valores médios do ganho de peso dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

Tabela 1 - Análise de variância do ganho de peso dos animais.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F.	PROB.>F
DIAS	3	6846.057	2282.02	4.90	0.00426
GRUPO	3	119966.41	39988.80	85.97	0.00001
DIA*GRU	9	10550.47	1172.27	2.52	0.01534
RESÍDUO	64	29769.74	465.15		
TOTAL	79	167132.68			

significante ao nível de 5%

Média geral = 74.17

Coefficiente de variação = 29.077%

G.L. = Graus de liberdade

S.Q. = soma dos quadrados

Q.M. = Quadrado das médias

V.F. = Valor fatorial

5.2.- Análise da glicemia

Os dados referentes à média dos valores glicêmicos em mg% encontram-se expressos no quadro 2 e gráfico 2 e a respectiva análise de variância na tabela 2. Os valores glicêmicos individuais e suas respectivas análises estatísticas encontram-se nos quadros 10, 11, 12, 13 do apêndice.

Quadro 2 - Média dos valores glicêmicos (mg%) dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos dias	I	II	III	IV
3	195.68 b	554.50 a	468.00 a	505.54 a
7	127.48 c	390.46 b	717.10 a	581.86 b
11	157.24 c	462.22 a	342.70 ab	270.06 bc
14	184.42 b	398.08 a	362.82 a	343.60 ab

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

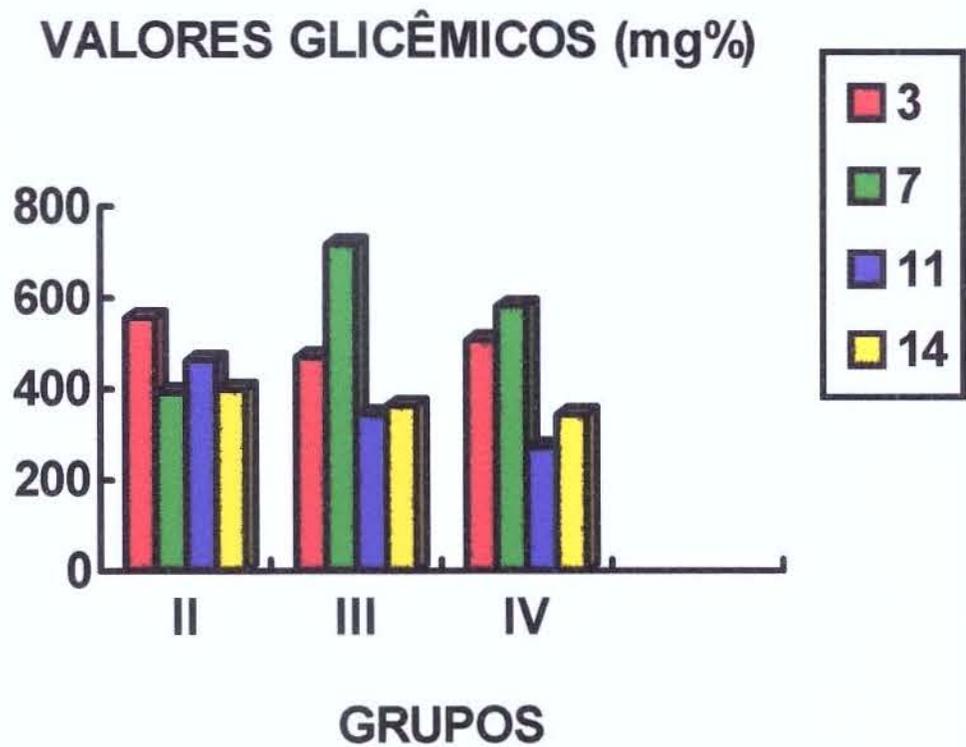


Gráfico 2 - Média dos valores glicêmicos dos animais dos grupos II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

Tabela 2 - Análise de variância da média dos valores glicêmicos

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F.	PROB.>F
DIAS	3	423209.19	141069.73	9.86	0.00011
GRUPO	2	49098.61	24549.31	1.71	0.18880
DIA*GRU	6	347433.50	57905.58	4.05	0.00261
RESÍDUO	48	686418.75	14300.40		
TOTAL	59	1506160.06			

significante ao nível de 5%

Média geral = 442.72

Coefficiente de variação = 27.011%

O teste de TUKEY para a glicemia ao nível de significância de 5% forneceu uma diferença mínima significativa (d.m.s.) igual 91.55. Com base nesse valor pode-se afirmar que os animais do grupo III apresentaram um nível de glicemia significativamente maior que os grupos II e IV no período de 7 dias, enquanto os do grupo IV apresentaram valores glicêmicos significativamente menores que o grupo II no período de 11 dias.

5.3.- Análise histométricas

5.3.1.- Fibroblastos

Pode-se observar no quadro 3 e gráfico 3 os valores médios do número de fibroblastos/500hits, dos animais dos grupos I(controle - normoprotéico), II(diabético - normoprotéico), III(diabético - hipoprotéico), IV(diabético -

hiperprotéico) sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão, seguidos da sua respectiva análise de variância na tabela 3.

Quadro 3 - Valores médios do nº de fibroblastos/500hits, dos animais do grupo I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos dias	I	II	III	IV
3	45.2 a	37.8 a	26.0 b	46.0 a
7	75.6 a	56.2 b	40.2 c	61.4 b
11	96.2 a	71.4 b	56.2 c	89.8 a
14	54.0 c	81.4 a	68.0 b	78.4 a

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

NÚMERO DE FIBROBLASTOS/ 500hits

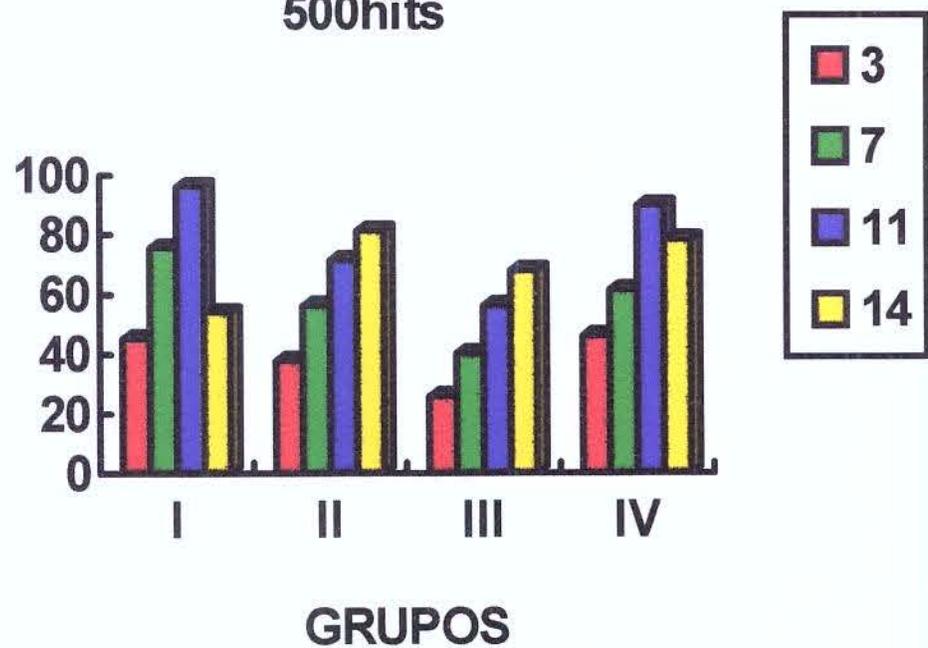


Gráfico 3- Valores médios do nº de fibroblastos / 500hits dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

Tabela 3 - Análise de variância da média dos valores do n° de fibroblastos/500hits

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F.	PROB.>F
DIAS	3	18737.90	6245.97	235.25	0.00001
GRUPO	3	5388.30	1796.10	67.65	0.00001
DIA*GRU	9	6328.40	703.15	26.48	0.00001
RESÍDUO	64	1699.20	26.55		
TOTAL	79	32153.80			

significante ao nível de 5%

Média geral = 60.95

Coefficiente de variação = 8.454%

Pelos resultados obtidos pode-se observar que o grupo III apresentou uma redução significativa (5%) do número de fibroblastos em relação aos outros grupos. Os animais dos grupos II e IV apresentaram valores significativamente menores que os controles (grupo I) aos 7 dias e significativamente maiores aos 14 dias, além disso, os animais do grupo II apresentaram uma significativa redução de fibroblastos em relação aos grupos I e IV aos 11 dias (Quadro 14, 15, 16, 17 no apêndice)

5.3.2.- Vasos sanguíneos

Pode-se observar no quadro 4 e gráfico 4 os valores médios do número de vasos sanguíneos/500hits dos animais dos grupos I(controle - normoprotéico), II(diabético - normoprotéico), III(diabético - hipoprotéico), IV(diabético - hiperprotéico) sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão, seguidos da sua respectiva análise de variância expressos na tabela 4.

Quadro 4 - Valores médios do nº de vasos sanguíneos/500hits, dos animais do grupo I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos dias	I	II	III	IV
3	8.0 a	6.8 b	3.2 c	7.8 ab
7	11.2 a	9.2 b	8.4 c	10.6 ab
11	16.4 a	13.4 b	11.4 c	15.2 ab
14	23.8 a	19.4 b	15.4 c	20.2 ab

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS / 500hits

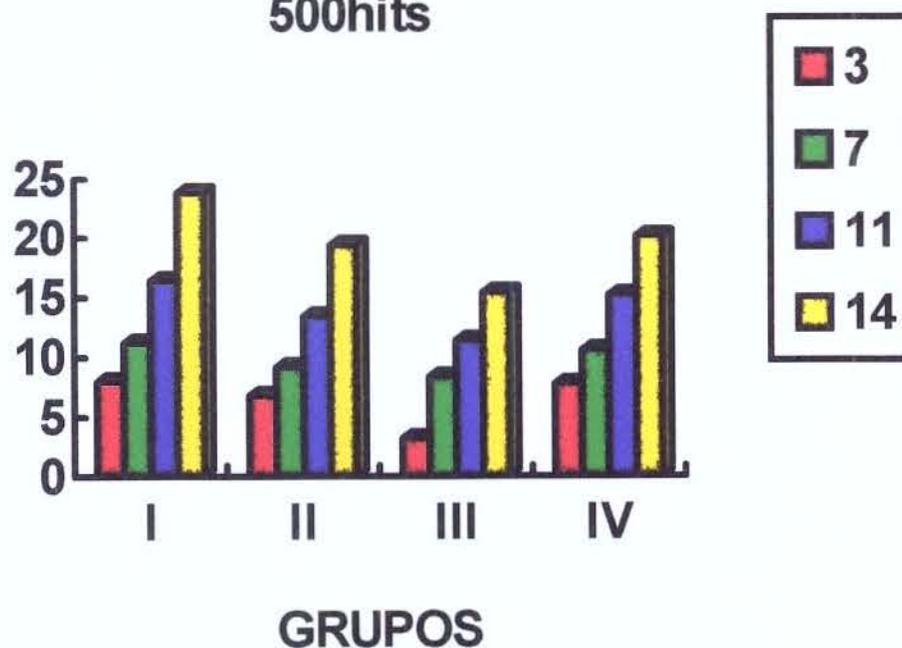


Gráfico 4 - Valores médios do nº de vasos sanguíneos/500hits dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

Tabela 4 - Análise de variância da média do n° de vasos sanguíneos/500hits.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F.	PROB.>F
DIAS	3	1946.14	648.71	131.72	0.00001
GRUPO	3	293.84	97.94	19.89	0.00001
DIA*GRU	9	46.81	5.20	1.06	0.40718
RESÍDUO	64	315.20	4.92		
TOTAL	79	2601.99			

não significante ao nível de 5%

Média geral = 12.51

Coefficiente de variação = 17.736%

Pela observação da análise dos valores médios de vasos sanguíneos /500hits, pode-se concluir que em todos os períodos analisados o grupo III apresentou uma redução significativa ao nível de 5%, do número de vasos sanguíneos em relação aos grupos I, II e IV, e os animais do grupo II em relação aos controles (grupo I). Entretanto os grupos I e IV não apresentaram valores significativamente diferentes entre si (Quadro 18, 19, 20, 21 do apêndice).

5.3.3.- Fibras colágenas.

Pelos dados observados no quadro 5 e gráfico 5, pode-se observar os valores médios do n° de fibras colágenas/500hits dos animais dos grupos I (controle - normoprotéico), II (diabético - normoprotéico), III (diabético - hipoprotéico) e IV (diabético - hiperprotéico) sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão, seguidos de sua respectiva análise de variância na tabela 5.

Quadro 5 - Valores médios do nº de fibras colágenas/500hits dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos dias	I	II	III	IV
3	150 a	123 a	108 b	135.2 a
7	152 a	142 a	121 b	146.0 a
11	207 a	192 a	172 b	193.2 a
14	236 a	239 a	205 b	246.0 a

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

NÚMERO DE FIBRAS COLÁGENAS/ 500hits

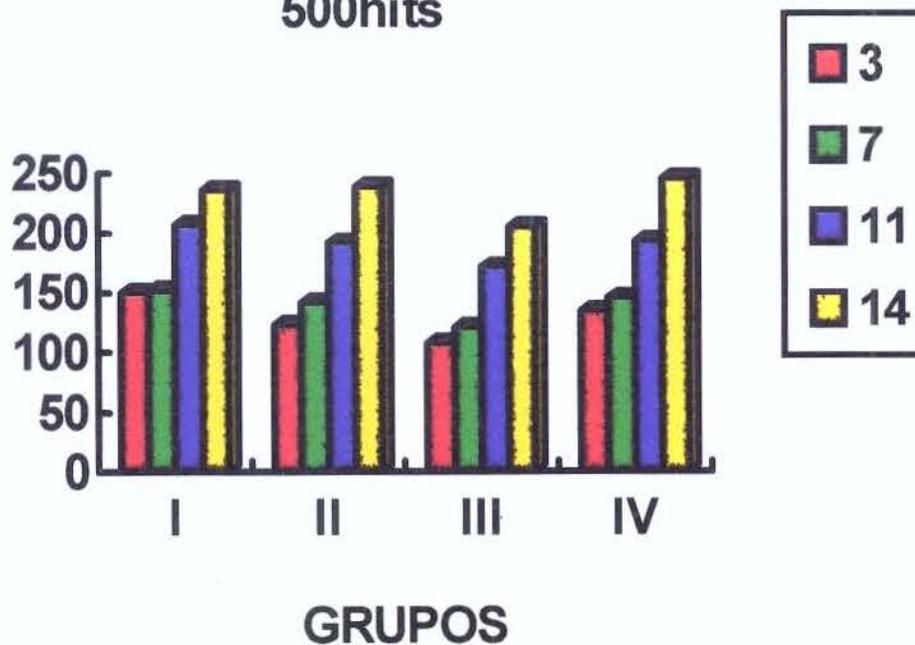


Gráfico 5 - Valores médios do nº de fibras colágenas/500hits, dos animais dos grupos I, II, III e IV sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

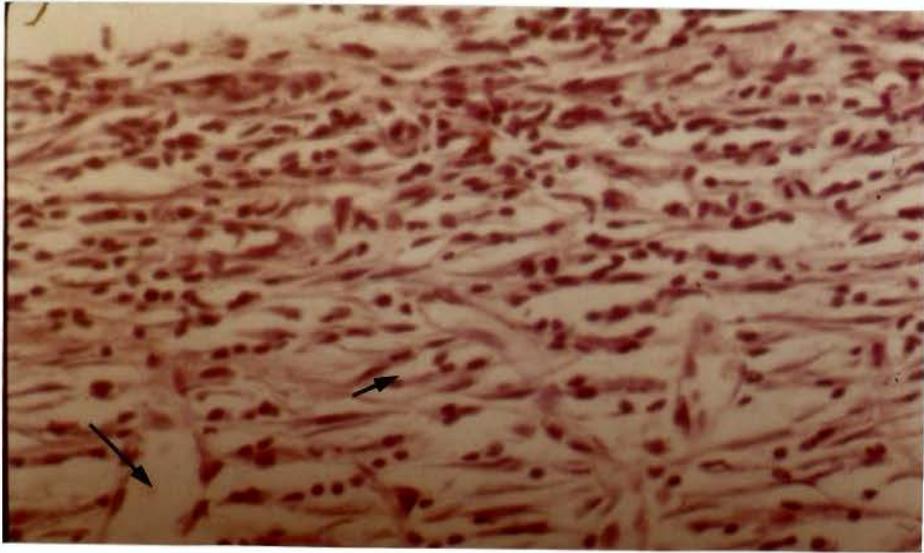


Figura 3 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo I aos 14 dias).
Observam-se fibroblastos (seta pequena) e vasos neoformados
(seta grande).
Coloração - HE Aumento - 256x

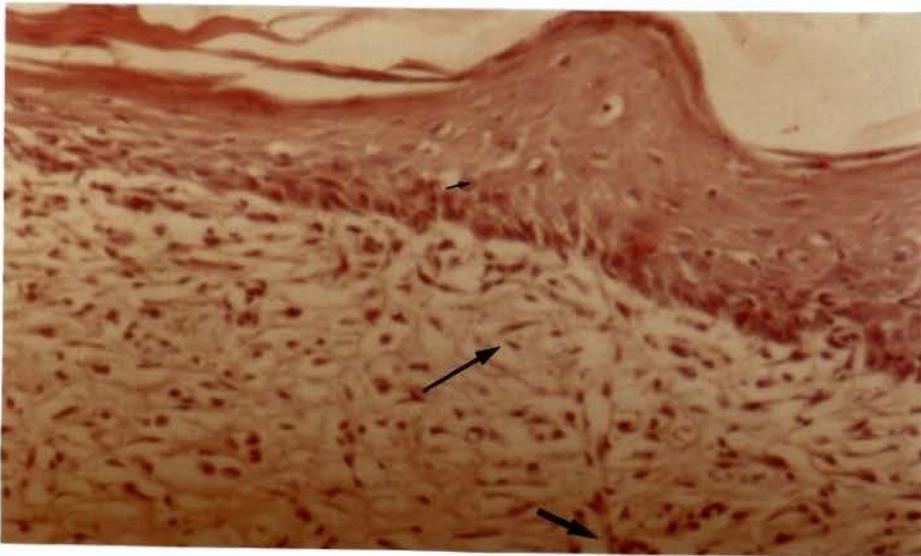


Figura 4 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo II aos 11 dias).
Observam-se epitélio desorganizado (seta pequena), vasos
neoformados (seta média) e fibras colágenas (seta grande).
Coloração - HE Aumento - 204,8x

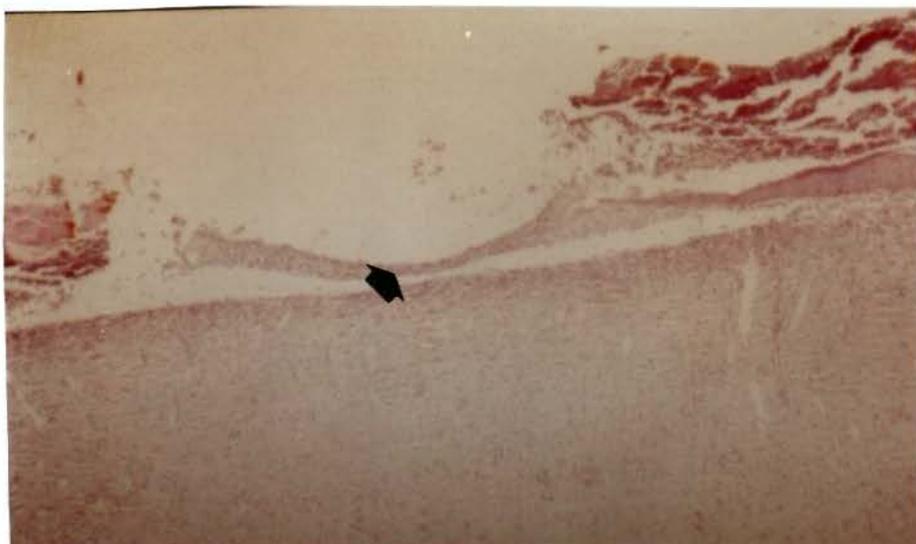


Figura 6 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo III).

Observa-se o centro da ferida completamente descoberto (seta).

Coloração - HE

Aumento - 256x

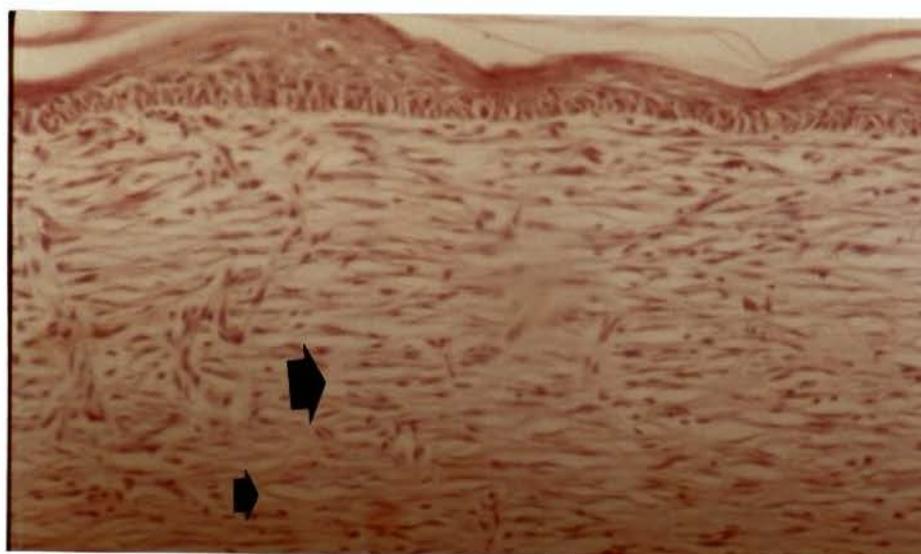


Figura 7 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo III).

Observam-se fibras colágenas paralelas ao eixo superficial, vasos sanguíneos (seta média) e fibroblastos (seta grande).

Coloração - HE

Aumento - 256x

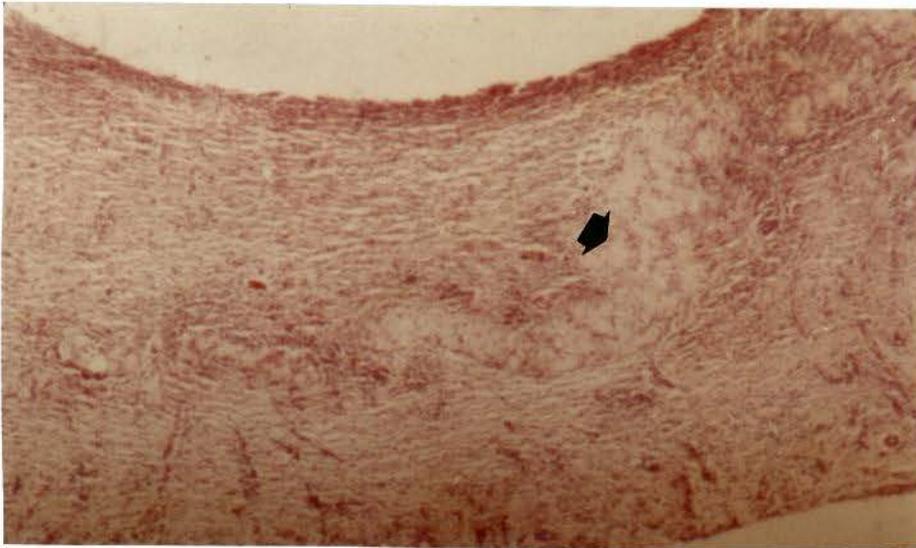


Figura 8 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo III).

Observa-se a matriz extracelular na forma de substância fundamental amorfa (seta).

Coloração - HE

Aumento - 256x

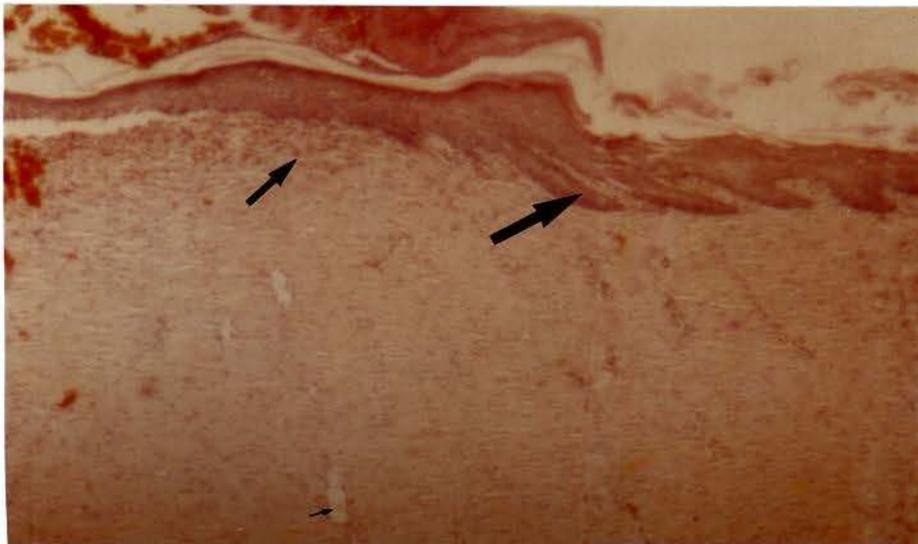


Figura 9 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo IV aos 11 dias).

Observa-se na região incisional uma crosta formada por polimorfonucleares (seta média), vasos sanguíneos (seta pequena) e cristas (seta grande).

Coloração - HE

Aumento - 256x

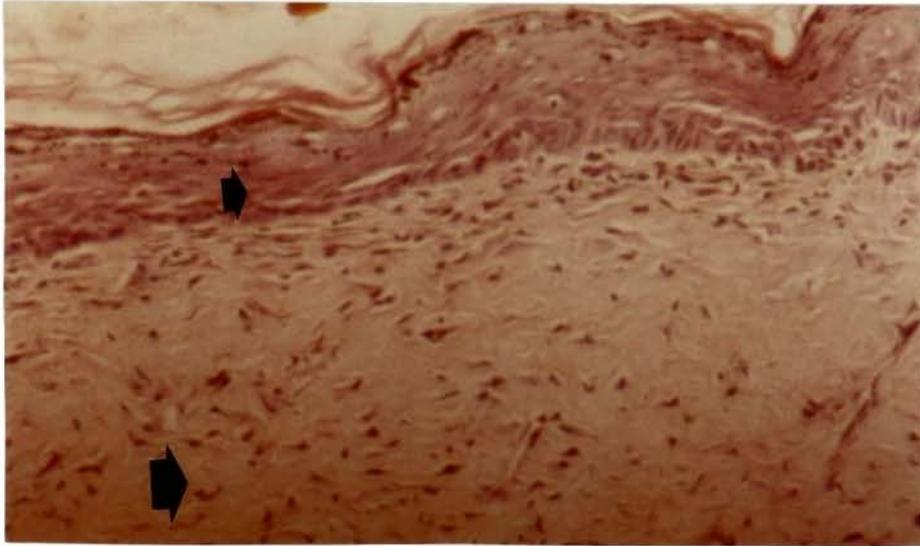


Figura 10 - Fotomicrografia da pele de rato (grupo IV aos 14 dias).

Observa-se epitélio de revestimento normal (seta pequena) e derme com fibras colágenas e conteúdo celular normal (seta grande).

Coloração - HE

Aumento - 160x

6.- DISCUSSÃO

A análise do crescimento mostrou que os animais do grupo III(diabético - hipoprotéico) apresentaram uma redução significativa do ganho de peso em relação aos outros grupos estudados (Gráfico 1).

A dieta é um importante fator na manifestação e no controle do diabetes. O teor protéico da dieta afeta a utilização de proteína e de energia tanto em animais diabéticos como nos normais. Entretanto, mesmo não se levando em consideração a composição da dieta, ratos diabéticos apresentaram maior ingestão protéico-calórica por unidade metabólica em relação ao peso corporal, que os animais controles (SIREK et al 1979).

Alguns autores têm relacionado a redução do ganho de peso de animais diabéticos com o nível protéico da dieta (BIRKBECK 1972 & SALMON 1975).

PHILIPS & ORAWSKI (1977) demonstraram que a atividade da somatomedina determinada pela incorporação de sulfato de condroitina foi significativamente diminuída em pacientes diabéticos e em ratos diabéticos, induzidos pela aloxana e pelo STZ.

O nível de somatomedina plasmática é dependente do hormônio de crescimento, entretanto tem sido reportado que o estado nutricional é um fator preponderante no controle da somatomedina (TAKANO et al 1978).

TAKANO et al (1980) determinaram o nível de somatomedina A, por radioimunoensaio em ratos tratados com STZ e observaram uma redução de peso corpóreo e do nível sérico de somatomedina A, que eram parcialmente restaurados pelo tratamento com insulina. Todavia, os ratos tratados com STZ sem insulina apresentaram uma diminuição progressiva dos níveis de somatomedina A e do peso corporal. Eles repetiram o mesmo experimento com ratos submetidos à depleção protéica e observaram que nestes, a redução do nível de somatomedina A era maior e não era restaurado pela administração de insulina, concluindo que além da insulina, o estado nutricional também interferiu de forma significativa na síntese de somatomedina A.

Entretanto, em relação aos animais diabéticos do grupo II, submetidos à dieta normoprotéica, embora tenham apresentado menor ganho de peso em relação aos controles, esta diferença somente foi significativa ao nível de 5%, no período de 14 dias. Além disso, comparando-se o ganho de peso entre os animais diabéticos dos grupos II e IV, pode-se observar que o aumento da ingestão protéica também induziu um aumento de ganho de peso somente no período de 14 dias.

Portanto, pode-se considerar pelos resultados obtidos neste trabalho que o aumento da ingestão protéica não interferiu de forma tão significativa quanto a restrição protéica no crescimento dos animais diabéticos.

A subnutrição protéica provocou alterações no metabolismo de carboidratos no homem e em animais experimentais. Investigações clínicas têm demonstrado intolerância à glicose e diminuição da liberação de insulina em crianças submetidas à deficiência protéico-calórica (BECKER et al 1972).

SIEGEL et al (1980) observaram que animais diabéticos induzidos por STZ, quando submetidos à dieta hiperprotéica com baixo nível de carboidratos, apresentaram redução do nível glicêmico e da glicosúria, levando a uma melhora do estado diabético induzido, como também das complicações secundárias.

BHUTANI et al (1985) verificaram que ratos submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram um nível de insulina pancreática significativamente maior, um aumento da glicemia e uma redução da insulina circulante. Essas observações indicam que a quantidade de proteína da dieta afetou a liberação de insulina. Esses mesmos autores demonstraram que esses animais apresentaram um significativo aumento de AMPc pancreático, sendo que este poderia inibir o efeito de glicose em estimular a liberação de insulina, reduzindo desta forma a insulina pancreática.

Segundo EIZIRIK et al (1986), o uso da dieta hiperprotéica pode melhorar o estado diabético de ratos previamente tratados com STZ, apresentando redução da hiperglicemia e glicosúria e aumento da insulina plasmática, sugerindo um efeito benéfico da dieta hiperprotéica no desenvolvimento do diabetes experimental em ratos.

SCHWARTING et al (1988) através de análises morfométricas observaram que a diminuição de células β pancreáticas em animais diabéticos induzidos pelo STZ é parcialmente prevenida pela dieta hiperprotéica, sugerindo que esta poderia iniciar o processo de reparação, resultando num aumento significativo do volume e densidade de células β dentro das ilhotas e neoformação de pequenas ilhotas. Esses achados morfológicos ocorrem paralelamente à melhora dos parâmetros metabólicos; os níveis de glicose urinário e sanguíneo são diminuídos e o ganho de peso e o conteúdo de insulina pancreática são maiores que os apresentados pelos animais diabéticos submetidos à dieta normoprotéica.

Entretanto, os valores glicêmicos apresentados pelos animais diabéticos dos grupos II, III e IV não foram de modo geral significativamente diferentes entre si, apesar dos animais diabéticos submetidos à dieta hipoprotéica terem apresentado um aumento significativo da glicemia no período de 7 dias e os animais do grupo IV, submetidos à dieta hiperprotéica, uma redução do nível glicêmico aos 11 dias. Desta forma, pode-se considerar que o teor de proteína da dieta não apresentou grande influência sobre a glicemia dos animais diabéticos induzidos pela aloxana.

Para indução do diabetes nos grupos II e IV foi utilizada a dose de 150mg/kg de aloxana. No entanto, os animais do grupo III submetidos à dieta hipoprotéica, apresentaram maior susceptibilidade à ação diabetogênica da droga, sendo necessária uma redução desta dosagem para 130mg/kg, uma vez que o índice de mortalidade era de 100% quando administrada na dosagem de 150mg/kg.

Vários autores também demonstraram que o teor protéico da dieta interfere na indução do diabetes experimental, alterando a susceptibilidade das células β aos agentes diabetogênicos, sendo que a deficiência protéica pode potencializar a predisposição ao diabetes (MILNER et al, 1971; BECKER, 1971 e WEINKOVE et al, 1977) e que animais submetidos à dieta hiperprotéica apresentam uma menor susceptibilidade à ação diabetogênica da aloxana e do STZ (SIEGEL et al, 1980; SCHMIDT, 1980; GOOD et al, 1984 e EIZIRIK & MIGLIORINI, 1985).

Esses estudos sugeriram que a deficiência protéica possui um significativo efeito betacitotóxico, levando a uma progressiva deterioração da função de células β de modo similar a outras alterações relacionadas ao aspecto nutricional, como nos indivíduos obesos que, após uma fase de hiperinsulinemia, passam a apresentar o diabetes.

Portanto, a subnutrição pode ser considerada um fator de risco, como a obesidade, na predisposição ao diabetes melito. Índices epidemiológicos confirmam essas observações, indicando que a deficiência protéica é um dos principais fatores que predispõe a população subnutrida ao diabetes (RAO 1984).

Por outro lado, o diabetes experimental causa profundas alterações no organismo com respeito à formação do tecido de granulação, resultando numa deficiente cicatrização de ferimentos, que tem sido relacionada a fatores metabólicos, hormonais e nutricionais.

Anormalidades de metabolização apresentadas por animais diabéticos induzem modificações qualitativas e quantitativas na produção de colágeno. SPANHEIMER & PETERKOFISKY (1985) demonstraram que a produção de colágeno é marcadamente diminuída em ratos diabéticos e que, dependendo da severidade da doença, há um comprometimento do estado nutricional e a produção de colágeno diminui ainda mais nos ratos diabéticos que perdem peso, de forma que o diabetes pode ser associado com algum grau de subnutrição.

ANDREASSEN & OXLUND (1987) estudando a evolução do processo de reparo em ferimentos provocados na pele de ratos normais e diabéticos, demonstraram que a insulina é essencial para o desenvolvimento normal do processo de cicatrização nos animais diabéticos e observaram também que o tratamento com insulina não é suficiente para prevenir o efeito inibidor do diabetes na fase inicial do processo de reparação tecidual. Entretanto, do 10º ao 20º dia, os animais diabéticos tratados com insulina apresentam a mesma evolução do processo de cicatrização que os animais normais.

NAKAMOTO & QUINBY (1987) analisaram o efeito do teor protéico da dieta sobre o conteúdo de proteína e de hidroxiprolina na matriz óssea de ratos normais e diabéticos, verificando que o decréscimo percentual de colágeno (hidroxiprolina) entre os animais diabéticos e não diabéticos é menor nos ratos submetidos à dieta hiperprotéica, concluindo que o teor protéico da dieta tem um efeito benéfico na matriz óssea dos animais diabéticos.

Os autores KIMURA et al (1987) verificaram que camundongos diabéticos são mais resistentes à formação do granuloma, apresentando menor infiltração de células inflamatórias, menor proliferação de fibroblastos, redução da formação de fibras colágenas e de vasos sanguíneos e que estas alterações estão relacionadas principalmente à deficiência de insulina.

UMPIERREZ et al (1989), estudando a influência do estado nutricional nas complicações metabólicas do diabetes, demonstraram que animais diabéticos submetidos à restrição protéica alimentar apresentaram uma redução significativa na produção de colágeno.

O tempo durante o qual a síntese de colágeno se inicia e evolui tem sido considerado um aspecto de grande importância. As etapas iniciais do processo de síntese de colágeno ocorrem intracelularmente, mais especificamente nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso dos fibroblastos secretores. Em continuidade, o material produzido é então transferido para as vesículas do aparelho de Golgi ou diretamente para o espaço extracelular como moléculas de protocógeno, onde agregam-se pela polimerização que ocorre.

Assim, as moléculas de protocógeno extracelular vão se agregando, tanto lateral quanto longitudinalmente às células que lhe deram origem, formando fibrilas de colágeno, e estas, por sua vez, unem-se em fibras que podem ser visualizadas ao microscópio óptico.

Por outro lado, a substância fundamental formada principalmente por um mucopolissacarídeo ácido (glicosaminoglicano), o ácido hialurônico, é indispensável ao processo de agregação das fibrilas de colágeno, funcionando como substância cimentante, no sentido de formar fibras e feixes de fibras, levando à reparação tecidual.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se verificar que os animais diabéticos submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram um significativo retardo no processo de reparação tecidual, uma vez que o número de vasos, fibroblastos e fibras colágenas foi drasticamente reduzido em relação aos controles e aos grupos diabéticos (Quadro 3, 4 e 5)

Os animais diabéticos submetidos à dieta normoprotéica apresentaram redução significativa de vasos sanguíneos em relação ao grupo controle em todos os períodos analisados (Quadro 4), e redução de fibroblastos aos 7 e 11 dias. Porém, os animais diabéticos submetidos à dieta hiperprotéica não se mostraram diferentes em relação aos controles para a variável vasos sanguíneos e só apresentaram menor número de fibroblastos que estes no período de 7 dias.

Como pode-se observar no Gráfico 3, nos animais controles e diabéticos submetidos à dieta hiperprotéica, a proliferação de fibroblastos atingem um pico máximo no período de 11 dias, apresentando valores respectivamente de 92.2 e 89.8, os quais foram reduzidos para 54.0 e 78.4 respectivamente aos 14 dias. Entretanto nos animais diabéticos dos grupos II e III (dieta normoprotéica e hipoprotéica), o número máximo de fibroblastos foi observado no período de 14

dias, apresentando valores significativamente maiores que os controles. Este fato pode indicar um retardo no processo de maturação do tecido neoformado.

VIZIOLI (1973), estudando o processo de evolução do tecido de granulação em esponjas implantadas subcutaneamente em ratos, observou que a síntese de fibras colágenas no processo de reparação tecidual tem início ao redor do 4º dia pós-injúria e aumenta bastante durante a fase de proliferação dos fibroblastos que as produzem, atingindo um grau máximo de desenvolvimento ao redor de 14 dias e posteriormente decai progressivamente.

De acordo com BAZIN et al (1976) o conteúdo de proteoglicanas no tecido neoformado, encontra-se aumentado até o 15º dia após o início do processo de cicatrização e, posteriormente, a quantidade decresce, uma vez que estas vão se ligando a fibras agregando os feixes de colágeno e, conseqüentemente contribuindo, entre outros fatores, para a maturação final do tecido.

GOTTRUP & ANDREASSEN (1981) têm demonstrado que a deposição de colágeno em ferimentos de indivíduos diabéticos é diminuída principalmente durante as fases iniciais do processo de reparo.

ARRUDA VEIGA et al (1992), através de leituras histofotométricas determinaram que a síntese de proteoglicanas em tecido de granulação aumentou gradativamente atingindo a fase mais ativa aos 10 dias após o início do processo, reduzindo-se posteriormente. Observaram também que a deficiência protéica alimentar causa 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 proteoglicanas.

Os resultados das análises histológicas deste trabalho, demonstraram claramente que os animais do grupo III(diabético - hipoprotéico) apresentaram um nítido retardo no processo de cicatrização, caracterizado por uma reepitelização incompleta aos 14 dias, presença de células vacuolizadas, fibroblastos com núcleo grande e cromatina frouxa.

Os animais diabéticos submetidos à dieta normoprotéica, também apresentaram um processo de reparo mais lento, caracterizado pela presença de um epitélio ainda desorganizado aos 11 dias, discreta hemorragia e um grande infiltrado linfocitário.

No entanto, os animais diabéticos do grupo IV (dieta hiperprotéica),apresentaram uma evolução do processo de cicatrização comparável aos animais controles, principalmente aos 14 dias onde podemos observar no tecido neoformado um epitélio de revestimento normal e na derme as orientações das fibras colágenas e o conteúdo celular com aspectos de normalidade.

Em relação à análise histométrica, pode-se observar que os animais do grupo II (diabéticos - normoprotéica) embora tenham apresentado uma redução de fibras colágenas aos 3, 7 e 11 dias em relação aos controles, esta não foi significativa à nível de 5%, como também não diferiram dos animais diabéticos

submetidos à dieta hiperprotéica. De forma que a indução do diabetes experimental não alterou o nº de fibras colágenas nos tecidos neoformados provenientes dos animais dos grupos II e III. Entretanto, a deficiência protéica alimentar, provocou uma redução significativa de fibras colágenas em todos os períodos analisados.

Desta forma, os animais do grupo II (diabético - normoprotéico) que apresentaram uma redução de fibroblastos aos 7 e 11 dias e uma fase mais prolongada de proliferação destes, não mostraram redução significativa de fibras colágenas, o que pode indicar que o diabetes experimental não reduziu quantitativamente a produção de colágeno.

Este fato pode ser comprovado com a hipótese de que as complicações metabólicas decorrentes do diabetes causem principalmente alterações qualitativas e não quantitativas do colágeno.

Essas alterações qualitativas na síntese de colágeno englobam: produção de moléculas anormais de protocógeno, alterações de peso molecular, de solubilidade e de estabilidade, interações covalentes anormais e glicosilação extracelular (TENNI, 1980; CHANG, 1980; SCHNIDER & KOHN, 1981; BERNSTEIN, 1987 e HENNESSEY, 1990).

Por outro lado, ficou evidente pelos resultados obtidos neste trabalho que a restrição protéica compromete drasticamente o processo de cicatrização de animais diabéticos, sendo este fato de grande importância clínica, uma vez que a prescrição de dietas hipoprotéicas tem sido indicada para pacientes com insuficiência renal.

com a finalidade de retardar o desenvolvimento da glomeruloesclerose e reduzir a TFG e o FSR (BRENNER 1985, SUNG FUNG 1985 e WARREN 1987).

Segundo DODDS et al (1990) nem todos os pacientes submetidos à restrição protéico alimentar apresentam resultados satisfatórios e a redução da TFG nem sempre ocorre com esse tipo de dieta. Além disso, a subnutrição protéica é benéfica somente no início da IR e não previne mas apenas retarda a progressão desta patologia.

Portanto é questionável a utilização deste procedimento, uma vez que a restrição protéica por longo período pode comprometer ainda mais as alterações metabólicas apresentados por pacientes diabéticos.

7.- CONCLUSÕES

A análise e discussão dos resultados obtidos, no estudo para verificar a influência do teor protéico da dieta na gênese do tecido de reparo de animais diabéticos, subsidiam as seguintes conclusões:

- 1- A restrição protéica induziu um significativo retardo no processo de reparação tecidual dos animais diabéticos, reduzindo o número de fibroblastos, de fibras colágenas e de vasos sanguíneos, sendo que histologicamente ocorreu uma reepitelização incompleta aos 14 dias, presença de células vacuolizadas, fibroblastos com núcleo grande e cromatina frouxa.
- 2- Os animais diabéticos submetidos à dieta normoprotéica apresentaram tecido de cicatrização aos 3, 7, 11 e 14 dias com menor número de vasos sanguíneos que os controles e redução de fibroblastos aos 7 e 11 dias. Do ponto de vista histológico, apresentaram um epitélio ainda desorganizado aos 11 dias e um grande infiltrado linfocitário.
- 3- Os tecidos de cicatrização obtidos dos animais diabéticos submetidos à dieta hiperprotéica apresentaram-se semelhantes aos controles, exceto pela redução de fibroblastos aos 7 dias, mostrando uma evolução do processo de cicatrização com aspectos de normalidade.

4- O diabetes experimental não induziu alterações do número de fibras colágenas nos tecidos neoformados, provenientes dos animais submetidos às dietas normoprotéica e hiperprotéica.

8.- RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a influência do teor protéico da dieta na gênese do tecido de reparo em animais diabéticos.

Foram selecionados 80 ratos da linhagem wistar, com 30 dias de idade, pesando em média 110g, distribuídos em 4 grupos de 20 animais cada e subdivididos em grupo I (controle - normoprotéico), II (diabético - normoprotéico), III (diabético - hipoprotéico) e IV (diabético - hiperprotéico).

Os animais foram mantidos com suas respectivas dietas até completarem 60 dias, após os quais, foi realizada a indução do diabetes que constituiu na administração de uma dose única de aloxana [Alloxan (5,6 - Dioxyuracil) Monohydrate], na concentração de 130mg/kg para os animais do grupo III e 150mg/kg para os animais dos grupos II e IV em um volume nunca superior a 0,5ml.

Após a comprovação do diabetes pela glicosúria, os animais foram submetidos a incisão lateral da pele de 1,0 x 1,5 cm com profundidade suficiente para expor o tecido muscular e sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após, sendo que os tecidos de cicatrização foram divulsionados, retirados e fixados em formol a 10% e submetidos a técnica histológica de rotina, para realização da análise histológica e histométrica. A histometria foi realizada em microscópio óptico

dotado de uma ocular integradora Zeiss Kpl - W 10x/25hits, contando-se fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos em 500 hits. Os animais do grupo I foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Os resultados mostraram que os animais do grupo III(diabético - hipoprotéico) apresentaram um retardo na evolução do processo de cicatrização, caracterizado pela diminuição do nº de fibroblastos, de vasos sanguíneos e de fibras colágenas e uma reepitelização incompleta aos 14 dias.

Os animais dos grupos II(diabético - normoprotéico) apresentaram o tecido de cicatrização aos 3, 7, 11 e 14 dias um menor número de vasos sanguíneos em relação ao controle e redução do número de fibroblastos aos 7 e 11 dias. Na análise histológica observou-se um epitélio desorganizado aos 11 dias.

Os animais do grupo IV(diabético - hiperprotéico) apresentou uma similaridade frente à reparação tecidual em relação ao grupo controle, não mostrando diferenças para a variável do número de vasos sanguíneos e menor número de fibroblastos somente aos 7 dias

Os resultados sugerem, a princípio, que a deficiência protéica compromete ainda mais o processo de cicatrização em animais diabéticos.

9.- SUMMARY

This work was performed with the purpose of verifying the influence of the proteic content of the diet in genesis of the healing tissue in diabetics animals.

80 rats of the Wistar lineage, of 30 days old, weighing on the average 110g were selected and distributed in 4 groups of 20 animals each and subdivided in group I(control - normoproteic), II(diabetic - normoproteic), III(diabetic - hipoproteic) e IV(diabetic - hiperproteic).

The animals were kept with its respective diets until they had completed 60 days, after wich, the diabetes has been induced using 130mg/kg of alloxan in single dose for the animals of group III and 150mg/kg for the animals of groups II and IV in a volume never superior than 0,5ml.

After the diabetes corroboration by glycosuria, the animals were submitted to lateral skin incision (1,0 x 1,5cm) with enough depth to expose the muscular tissue and sacrificed on the 3rd, 7th, 11th e 14th days, seeing that the cicatrization tissues were separeted, taken back and fixed in 10% formic aldehyde and submitted to the histologic technique of rotine, for the performance of the histologic and histometric analysis. The histometry was processed in optical microscope equipped with an integrator ocular Zeiss Kpl-W 10x/25hits, and the number of the fibroblasts,

collagen fibers and blood vessels were accounted in 500 hits. The animals of group I were submitted to the same procedures.

The results indicated that the animals of group III(diabetic - hipoproteic) presented a delay in evolution of the healing process, characterized by the reduction of the number of fibroblasts, blood vessels and collagens fibers and incomplete reepitheliation in 14 days. The animals of group II(diabetic - normoproteic) presented the healing tissue on the 3rd, 7th, 11th e 14th days of less number of blood vessels in relation of the fibroblasts on the 7th and 11th days. Histologic analysis where it was observed a desorganization of the epithelium on the 11th day. The animals of group IV(diabetic - hiperproteic) presented a similarity with regard to the healing tissue in relation to the control group not showing differences of the variable blood vessel and less number of fibroblasts only in the period of 7 days.

At first, the results suggest that the proteic deficiency endangers even more the healing process in diabetics animals.

10.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, J. et al. Effects of protein and lysine deficient diets on puberty and beginning of gestation in rats. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.32, p.1425-1433, 1985.
2. ANASUYA, A., NARASINGA, B.S. Relationship between body collagen and urinary hydroxyproline excretion in young rats fed on a low-protein or low-calorie diet. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v.24, p.97, 1970.
3. ANDREASSEN, T.T., OXLUND, H. The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biomechanical properties of rat skin incisional wounds. *Acta chir. scand.*, Stockholm, v.153, p.405-409, 1987.
4. ARRUDA VEIGA, M. C. F. et al. Influência do teor protéico da dieta sobre a gênese do tecido de reparo em ratos. *Arquivo lat.-am. Nutr.*, Caracas, v.42, n.4, p.414-419, 1992.
5. ARRUDA VEIGA, M.C.F. et al. Effects of "Parotin" four fractions on the oxygen consumption by epididymal fat of normal and diabetic rats. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.32, n.3, p.589-601, Aug. 1989.

6. BAZIN, S. et al. Collagen in granulation tissues. *Archs. Ophthalmol.*, v.35, p.115-126, 1976.
7. BECKER, D.J. et al. Insulin secretion in protein calorie malnutrition. 1. Quantitative abnormalities and response to treatment. *Diabetes*, New York, v.20, p.542, 1971.
8. _____. et al. Patterns of insulin response to glucose in protein-calorie malnutrition. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, v.25, p.499-505, 1972.
9. BEHERA, H.N., PATNAIK, B.K. Recovery from alloxan diabetes as revealed by collagen characteristics of bone, skin and tendon of swiss mice. *Gerontology*, Basel, v.27, p.32-36, 1981.
10. BERGER, S., VONGARAYA, N. Insulin response to ingested protein in diabetes. *Diabetes*, New York, v.15, p.303, 1966.
11. BERNSTEIN, R.E. Nonenzymatically glycosylated proteins. *Adv. clin. Chem.*, New York, v.26, p.1-78, 1987.
12. BERTONE, A.L. et al. Effect of wound location and the use of topical collagen gel on exuberant granulation tissue formation and wound healing in the horse and pony. *Am. J. vet. Res.*, Chicago, v.46, p.1438-1444, 1985.

13. BHUTANI, V. et al. Effect of inadequate dietary proteins on pancreatic insulin and cAMP levels in rats. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.32, p.1413-1420, 1985.
14. BIRKBECK, J.A. Growth in juvenile diabetes mellitus. *Diabetologia*, New York, v.8, p.221, 1972.
15. BOWERSOX, J.C. In vivo collagen metabolism in spontaneously diabetic (db/db) mice. *Expl Molec. Path.*, San Diego, v.45, p.221-226, 1986.
16. BRENNER, B.M. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.249, p.324-337, 1985.
17. CHANG, C. et al. Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes. Reversal by β aminopropionitrile and D-penicillamine. *Diabetes*, New York, v.29, p.778-781, Oct. 1980.
18. CHRISTIANSEN, J.S. On the pathogenesis of the increased glomerular filtration rate in short-term insulin dependent diabetes. *Dan. med. Bull.*, Copenhagen, v.31, p.349-361, 1984.
19. COHEN, M.P. et al. Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, New York, v.95, p.765-769, 1980.

20. COZZOLINO, S.M.F. et al. Estudo nutricional de misturas de arroz e feijão utilizados regionalmente. *Ciê. Cult.*, São Paulo, v.26, n.7, p.484, jul. 1974.
21. DAY, J.F. et al. Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo. *J. biol. Chem.*, Baltimore, v.254, p.9394-9400, 1979.
22. DODDS, R.A. et al. Low protein diet and conservation of renal function in diabetic nephropathy. *Diabete metab.*, Paris, v.16, p.464-469, 1990.
23. EIZIRIK, D.L. et al. Effects of a high protein diet on the evolution of diabetes in streptozotocin-induced and spontaneously diabetic "BB" wistar rats. *Acta diabet. lat.*, Milano, v.23, p.107, 1986.
24. _____, MIGLIONI, R.H. Protection against streptozotocin diabetes by high protein diets: effect of vegetable protein source (soya). *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.32, p.41, 1985.
25. ELLIOTT, R.B., MARTIN, J.M. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia*, New York, v.26, p.297, 1984.
26. ERIKSSON, U.J. Congenital malformations in offspring of diabetic rats. *Teratology*, New York, v.37, p.365-374, 1988.

27. ESTRICH, M.D. et al. Effects of co-ingestion of fat and protein upon carbohydrate-induced hyperglycemia. *Diabetes*, New York, v.16, n.4, p.232-237, 1967.
28. FRANK, Q.N. et al. Effects of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes care*, New York, v.7, n.5, p.465-470, Sept-Oct. 1984.
29. FRIEND, P.S. et al. Dietary restrictions early and late: Effects on the nephropathy of NZBB x NZW mouse. *Lab. Invest.*, Baltimore, v.38, p.629-632, 1978.
30. GIAVINI, E. et al. Diet composition modifies embryotoxic effects induced by experimental diabetes in rats. *Biologia Neonat.*, Basel, v.59, p.278-286, 1991.
31. GOLUB, L.M., GARANT, R.R., RAMAMURTHY, N.S. Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan-diabetic rat. *J. Periodont. Res.*, Copenhagen, v.12, p.402-418, 1977.
32. GOOD, R.A. et al. *Nutrition and immunity in present Knowledge in nutrition*. Washington, The Nutrition Foundation, 1984: p. 693.

33. GOTTRUP, F. & ANDREASSEN, T. T. Healing of incisinal wounds in stomach and duodenum: influence of experimental diabetes. *J. surg. Res., San Diego*, v.31, p.61-68, 1981.
34. GRODSKY, G.M. *J. clin. Invest., New York*, v.51, p.2047, 1972. Apud YOUNOSZAI, R., DIXIT, P.K. Decreased insulin secretion by isolated pancreatic islets from rats fed 4% protein diet. *Proc. Soc. exp. Biol. Med., Baltimore*, v.164, p.317-321, 1980.
35. HEARD, C.R.C. Effects of severe protein-calorie deficiency on the endocrine control of carbohydrate metabolism. *Diabetes, New York*, v.15, p.78, 1966.
36. _____, STEWART, R.J.C. Protein-calorie deficiency and disorders of the endocrine glands. *Hormones, Behav., San Diego*, v.2, p.40-64, 1971.
37. _____, TURNER, M.R. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. *Diabetes, New York*, v.16, p.96-107, 1967.
38. _____, C.R.C. et al. Biochemical characteristics of diferent forms of protein - energy malnutrition: an exzpermental model using yooung rats. *Br. J. Nutr., Cambridge*, v.37, p.1-21, 1977.

39. HENNESSEY, P.J. Growth factors and diabetic wound healing: EGF and insulin. *Curr. Surg., Philadelphia*, v.41, p.285-286, 1989.
40. _____, P.J., BLACK, C.T., ANDRASSY, R.J. Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats. *J. Pediat. Surg., Duluth*, v.25, n.1, p 75-78, Jan. 1990a.
41. _____. et al. EGF increases short-term type I collagen accumulation during wound healing in diabetic rats. *J. Pediat. Surg., Duluth*, v.25, n.1, p.893-897, Aug. 1990b.
42. HENNING, A. Kirtzche betrachtung zur volumen-und obertalchemessung in der mikroskopie. *Zeiss Werkz., Oberkochen*, v.16, p.78-86, 1958.
43. HOSTETTER, T.H. et al. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes. *Kidney Int., New York*, v.19, p.410-415, 1981.
44. KAPLAN, R. et al. Gingival collagen metabolism in human diabetics. *J. Den. Res., Washington*, v.61, p.275, 1982.
45. KARAM, J. H. Obesity and diabetes in humans. In: BRODOFF, B.N., BLEICHER, S.J., ed. *Diabetes mellitus and obesity*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1982. p. 294-300.

46. KATSUMI, I., MASAHARU, O., YOAHLATI, N. Effects of dietary level of protein on the maintenance. Energy requirement and net energetic efficiency for growth of post - weaning rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.32, p.513-525, 1986.
47. KAUFMAN, T. et al. Drug-loaded synthetic dressings: Effect on contraction, epithelialization, and collagen synthesis of deep second-degree experimental burns. *Ann. Plast. Surg.*, Boston, v.14, p.420-427, 1985.
48. KIMURA, M., AMEMIYA, K. SUZUKI, J. Insulin-induced granuloma tissue formation and angiogenesis in alloxan-treated diabetic mice. *Endocr. Jap.*, Tokyo, v.34, n.1, p.55-63, 1987.
49. KOHN, R.R. *Principles of mammalian aging*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1978. p.1-240.
50. _____, HAMLIN, C.R. Genetic effects on aging of collagen, with special reference to diabetes mellitus. In: BERGSMAN, D., HARRISON, D. *Genetic effects on aging*. New York: Alan R. Liss, 1978. p.387-401.
51. LEHRER, G. et al. The effect of diabetes in germ-free rats on gingival collagenolytic activity: preliminary observations. *J. dent. Res.*, Washington, v.60, p.135, 1981.

52. LIEN, Y.H. et al. Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent cross-linking by glucose. *Science, Washington*, v.225, p.1489-1491, 1984.
53. LUNN, P.G. et al. Progressive changes in serum cortisol, insulin and growth hormone concentration and their relationship to the distorted amino acid pattern during the development of Kwashiorkor. *Br. J. Nutr., Cambridge*, v.29, p.399-422, 1973.
54. MENUTTI, M.T. Teratology and genetic counseling in the diabetic pregnancy. *Clin. Obstet. Gynec., Philadelphia*, v.28, p.486-495, 1985.
55. MILLER, E.J., RHODES, R.K. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Meth. Enzym., New York*, v.82, p.33-64, 1982.
56. MILLS, J.L. Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratology, New York*, v.25, p.385-395, 1982.
57. MILNER, R.D.G. Insulin secretion in human protein-calorie deficiency. *Proc. Nutr. Soc., Cambridge*, v.31, n. 2, p.219, 1972.
58. _____. Metabolic and hormonal responses to glucose and glucagon in patients with infantile malnutrition. *Pediat. Res., Baltimore*, v.5, p.33-39, 1971a.

59. MILNER, R.D.G. Metabolic and hormonal responses to oral amino acids in infantile malnutrition. *Arch Dis. Childh.*, London, v. 46, p.301-305, 1971b.
60. MUNRO, W.N., CRIM, M.C. The proteins and acids. In: Goodhart, R.S., Shils, M.E., eds. *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea and Febiger, v. IV, p.51-112, 1980.
61. NAKAMOTO, T., QUINBY, G.E. Effects of maternal dietary protein on the mandibular growth of fetuses from diabetic dams. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.*, Westbury, v.56, n.2, May 1987.
62. NAKHOODA, A.F. et al. The spontaneously diabetic rat (the "BB" rat). Studies prior to and during development of the overt syndrome. *Diabetologia*, New York, v.14, p.199, 1978.
63. NWANKWO, M.U., SCHUIT, K.E., GLEW, R.H. Effects of maternal protein deprivation on the nutritional status and neurophil function of suckling neonatal rats. *J. Infect. Dis.*, v.151, p.23-32, 1985.
64. PHILIPS, L.S., ORAWSKI, A.T. Nutrition and somatomedin III, diabetic control, somatomedin, and growth in rats. *Diabetes*, New York, v.26, p.864, 1977.

65. PHILIPS, L.S., UNTERMAN, T.G. Somatomedin activity in disorders of nutrition and metabolism. *J. clin. Endocr. metab.*, v.13, p.145-189, 1984.
66. PIMSTONE, B.L. Endocrine function in protein-calorie malnutrition. *Clin. Endocr.*, Oxford, v.5, p.79-95, 1976.
67. PINTO, J.R. et al. Effect of low protein diet on the renal response to meat ingestion in diabetic nephropathy. *European J. clin. Invest.*, Oxford, v.21, p.175-183, 1991.
68. RAMAMURTHY, N.S., GOLUB, L.M. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. *J. Periodont. Res.*, Copenhagen, v.18, p.23-30, 1983.
69. RAO, K.J., RAGHURAMULU, N. Insulin secretion in Kwashiorkor. *J. clin. Endocr. metab.*, v.35, p.65-66, 1972.
70. RAO, M.D. The role of undernutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes care.*, New York, v.7, n.6, p.595-601, Nov - Dec. 1984.
71. SALMON, W.D. Interaction of somatomedin and peptide inhibitor in serum of hypophysectomized and starved, pituitary-intact rats. *Adv. metab. Dis.*, New York, v.8, p.183, 1975.

72. SCANES, C.G., GRIMINGER, P., BUONOMO, F.C. Effects of dietary protein restriction on circulating. Concentrations of growth hormone in growing domestic fowl (*Gallus domestics*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.168, p.334-337, 1981.
73. SCHMIDT, F. H. et al. Metabolic and hormonal investigations in long term streptozotocin diabetic rats on different dietary regimens. *Diabetologia*, New York, v.18, p.161, 1980.
74. SCHNIDER, S.L., KOHN, R.R. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and noneenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J. clin. Invest.*, Oxford, v.67, p.1630-1635, Jun. 1981.
75. SCHWARTING, H. et al. Morphometric analysis of the endocrine pancreas in streptozotocin- diabetic rats kept on different dietary regimens. *Res. exp. Med.*, New York, v.188, p.79-86, 1988.
76. SCOTT, F.W. et al. Diet can prevent diabetes in the BB rat. *Diabetes*, New York, v.34, p.1059-1062, Oct. 1985.
77. SEINO, Y. et al. Beneficial effects of high protein diet in treatment of mild diabetes. *Hum. Nutr. appl. Nutr.*, London, v.37a, p.226, 1983.

78. SELLERS, A., MURPHY, G. Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.*, New York, v.9, p.151-189, 1981.
79. SEYFFERT, W., BARKER, B., MADISON, L. The in vivo effects of changes in plasma free fatty acids on hepatic glucose output and peripheral glucose utilization. *Diabetes*, New York, v.15, p.515, 1966.
80. SHARMA, C. et al. Glycoprotein biosynthesis during inflammation in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Inflammation*. New York, v.9, n.3, 1985.
81. SIEGEL, E.G. et al. Beneficial effects of low carbohydrate high protein diets in long term diabetic rats. *Metabolism*, Orlando, v.29, n.5, p.421, May, 1980.
82. SIREK, A. et al. Effect of diabetes and dietary tryptophan on food selection and plasma ratio of tryptophan to neutral aminoacids in the self-selecting rat. *Pediat. Adoles. Endocr.*, v.7, p.369-375, 1979.
83. SPANHEINER, R. G., PETERKOFISKY, B. A specific decrease in collagen synthesis in acutely fasted vitamin C supplemented guinea pigs. *J. Biol. Chem.*, v.62, p.260-295, 1985.

84. SUNG-FENG, W., HUANG, T.P., MOORTHY, A.V. Effects of low-protein diet on experimental diabetic nephropathy in the rat. *J. Lab. clin. Med.*, Saint Louis, v.106, p.589-597, Nov. 1985.
85. TAKANO, K. et al. Effect of growth hormone and nutrition on the level of somatomedin A in rat. *Acta Endocrin.*, Copenhagen v.87, p.485, 1978.
88. TAKANO, K. et al. Effect of insulin and nutrition on serum levels of somatomedin A in the rat. *Endocrinology*, Baltimore, v.107, n.5, p.1614-1619, 1980.
89. TENNI, R. et al. Cultured fibroblasts of juvenile onset diabetics have excessively soluble pericellular collagen. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, New York, v.92, p.1071-1075, 1980.
90. UITTO, J. et al. Glycosylation of human glomerular basement membrane collagen (GBMC): increased nonenzymatic glucosylation in diabetes. *Fedin Proc.*, Bethesda, v.39, p.1792, 1980.
91. UMPIERREZ, G.E. et al. Nutritional and hormonal regulation of articular collagen production in diabetic animals. *Diabetes*, New York, v.38, p.758-763, 1989.

92. VASANTHA, M.B. Biochemical changes in skin in experimental protein and calorie deficiency. *Am. J. clin. Nutr.*, New York, v.23, n.1, p.99-104, Jan. 1970.
93. VILJANTO, J. et al. Fibronectin in early phases of wound healing in children. *Acta chir. scand.*, Stockholm, v.147, p.7-13, 1981.
94. VIZIOLI, M. R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. *Acta Anat.*, Basel, v.85, p.368-377, 1973.
95. WARREN, L.K. et al. Effect on renal function of change from high to moderate protein intake in type I diabetic patients. *Diabetes*, New York, v.36, p.73-78, Jan. 1987.
96. WEINKOVE, C., WEINKOVE, E.A., PIMSTONE, B.L. Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. *Clin. Sci. molec. Med.*, Oxford, v.50, p.153-163, 1976.
97. _____ et al. *Archs. Path. Lab. Med.*, Chicago, v.101, p.703, 1977.
98. _____ et al. Pancreatic islets of malnourished rats. *Archs. Path. Lab. Med.*, Chicago, v.101, p.266-269, 1974.

APÊNDICE

Tabela 6 - Valores médios do peso inicial (PI) e peso final (PF), em gramas, dos animais dos grupos I, II, III e IV, sacrificados aos 3, 7, 11 e 14 dias após a incisão.

grupos ratos	I		II		III		IV	
	PI	PF	PI	PF	PI	PF	PI	PF
3	95.04	195.58	97.02	166.64	97.08	104.34	95.26	173.84
7	96.2	195.58	101.6	180.4	111.5	131.9	114.5	231.7
11	112.8	247.08	109.2	209.6	98.42	112.94	93.1	180.8
14	108.5	255.02	98.7	164.9	102.5	112.2	103.4	211.2

Quadro 6 - Teste de Tukey para médias de grupo dentro de dia 3 do fator dia para os valores de ganho de peso.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	100.54	a	A
2	2	grupo II	5	69.62	a	A
3	3	grupo III	5	7.26	b	B
4	4	grupo IV	5	78.58	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 7 - Teste de Tukey para médias de grupo dentro de dia 7 do fator dia para valores de ganho de peso.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	99.38	a	A
2	2	grupo II	5	78.80	a	A
3	3	grupo III	5	20.36	b	B
4	4	grupo IV	5	65.20	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 8 - Teste de Tukey para médias de grupo dentro de dia 11 do fator dia para valores de ganho de peso.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	134.28	a	A
2	2	grupo II	5	100.40	ab	AB
3	3	grupo III	5	14.52	c	C
4	4	grupo IV	5	87.68	b	B

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 9 - Teste de Tukey para médias de grupo dentro de dia 14 do fator dia para valores de ganho de peso.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	146.52	a	A
2	2	grupo II	5	66.20	c	B
3	3	grupo III	5	9.68	d	C
4	4	grupo IV	5	107.76	b	AB

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 10 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 3 do fator dia para valores glicêmicos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo II	5	554.50	a	A
2	2	grupo III	5	468.00	a	A
3	3	grupo IV	5	494.74	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 11 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 7 do fator dia para valores glicêmicos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo II	5	390.46	b	B
2	2	grupo III	5	717.10	a	A
3	3	grupo IV	5	528.24	b	AB

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 12 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 11 do fator dia para valores glicêmicos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo II	5	462.22	a	A
2	2	grupo III	5	342.70	ab	A
3	3	grupo IV	5	270.06	b	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 13 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 14 do fator dia para valores glicêmicos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo II	5	398.08	a	A
2	2	grupo III	5	362.82	a	A
3	3	grupo IV	5	323.60	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 14 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 3 do fator dia para n° de fibroblastos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	45.20	a	A
2	2	grupo II	5	37.80	a	A
3	3	grupo III	5	26.00	b	B
4	4	grupo IV	5	40.20	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 15 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 7 do fator dia para n° de fibroblastos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	75.60	a	A
2	2	grupo II	5	56.20	b	B
3	3	grupo III	5	40.20	c	C
4	4	grupo IV	5	61.40	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 16 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 11 do fator dia para n° de fibroblastos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	96.20	a	A
2	2	grupo II	5	69.00	b	B
3	3	grupo III	5	55.80	c	C
4	4	grupo IV	5	89.80	a	A

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 17 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 14 do fator dia para n° de fibroblastos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	54.00	c	C
2	2	grupo II	5	81.40	a	A
3	3	grupo III	5	68.00	b	B
4	4	grupo IV	5	78.40	a	AB

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 18 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 3 do fator dia para n° de fibras colágenas.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	150	a	A
2	2	grupo II	5	123	a	A
3	3	grupo III	5	108	a	A
4	4	grupo IV	5	205	b	B

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 19 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 7 do fator dia para n° de fibras colágenas.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	152	a	A
2	2	grupo II	5	142	a	A
3	3	grupo III	5	121	a	A
4	4	grupo IV	5	146	b	B

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 20 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 11 do fator dia para n° de fibras colágenas.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	207	a	A
2	2	grupo II	5	192	a	A
3	3	grupo III	5	172	a	A
4	4	grupo IV	5	193.2	b	B

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 21 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 14 do fator dia para n° de fibras colágenas.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	236	a	A
2	2	grupo II	5	239	a	A
3	3	grupo III	5	205	a	A
4	4	grupo IV	5	246	b	B

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 22 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 3 do fator dia para n° de vasos sanguíneos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	8	a	A
2	2	grupo II	5	6.8	ab	AB
3	3	grupo III	5	3.2	b	B
4	4	grupo IV	5	7.8	c	C

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 23 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 7 do fator dia para n° de vasos sanguíneos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	11.2	a	A
2	2	grupo II	5	9.2	ab	AB
3	3	grupo III	5	8.4	b	B
4	4	grupo IV	5	10.6	c	C

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 24 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 11 do fator dia para n° de vasos sanguíneos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	16.4	a	A
2	2	grupo II	5	13.4	ab	AB
3	3	grupo III	5	11.4	b	B
4	4	grupo IV	5	15.2	c	C

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância

Quadro 25 - Teste de Tukey para médias de grupo de dia 14 do fator dia para n° de vasos sanguíneos.

num. ordem	num. trat.	nome	num. repet	médias	5%	1%
1	1	grupo I	5	23.8	a	A
2	2	grupo II	5	19.4	ab	AB
3	3	grupo III	5	15.4	b	B
4	4	grupo IV	5	20.2	c	C

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância