

Influência do componente protéico na consolidação de fraturas: trabalho experimental em ratos.

Influence of the protein component upon fracture healing: an experimental study in rats

ROBERTO GUARNIERO¹, MARCELO YUJI CINAGAVA², PAULO JOSÉ DE SANTANA³, MARCO ANTONIO BATISTA³, LUIZ ANTÔNIO ALCÂNTARA DE OLIVEIRA³, CONSUELO JUNQUEIRA RODRIGUES⁴, FERNANDO TAKAO CINAGAVA⁵

RESUMO

Os autores estudaram a influência da nutrição protéica na consolidação de fraturas em 40 ratos Lewis divididos em 4 grupos de 10. Durante 6 semanas os grupos 1, 2 e 3 receberam respectivamente dietas com 0, 19% e 36% de proteínas. O grupo 4 recebeu dieta sem proteínas durante as 2 primeiras semanas e com 36% de proteínas nas 4 semanas seguintes. Foram realizadas fraturas nas tíbias esquerdas ao final de 2 semanas e após 4 semanas das fraturas os animais foram sacrificados para estudo dos calos ósseos. Para a avaliação dos resultados foram utilizadas medidas clínicas, bioquímicas, radiográficas, densitométricas, e histomorfométricas. Concluiu-se que a dieta hiperprotéica alterou a consolidação óssea produzindo um calo maior e mais resistente, mas não alterou a qualidade em concentração de cálcio e em porcentagem a quantidade de tecido ósseo.

Descritores: Ratos; Desnutrição Proteica; Proteínas na dieta/metabolismo; Proteínas na dieta/Uso terapêutico; Consolidação da fratura; Calo ósseo/Metabolismo

INTRODUÇÃO

A consolidação óssea consiste de uma série complexa de eventos celulares que demanda alta taxa de síntese protéica. Vários estudos ressaltam a importância do estado nutricional eutrófico e da dieta com níveis adequados de proteínas para a prevenção e também para a consolidação de fraturas.

Todavia, existem poucos relatos na literatura quanto ao uso de dietas hiperprotéicas e seus efeitos na consolidação óssea.

Este trabalho tem como objetivo verificar se a alimentação com alta concentração de proteínas contribui para o processo de consolidação comparando os resultados com dietas aprotéica e normoprotéica sob as mesmas condições experimentais.

SUMMARY

The authors investigated the influence of a protein diet on fracture healing in 40 Lewis rats divided into four groups of ten. During 6 weeks, Groups 1, 2 and 3 were fed diets containing, respectively, 0, 19% and 36% protein. Group 4 was fed a proteinless diet during the first two weeks and a 36%-protein diet during the next 4 weeks. At two weeks, fractures were performed in the left tibias; all animals were killed 4 weeks later so that the bone calluses could be investigated. Clinical, biochemical, radiographic, densitometry and histomorphometry measurements were performed to evaluate the findings. The conclusion was that the hyperprotein diet altered bone healing by producing a larger, more resistant callus, although it did not change quality as regards calcium levels and the percentage amount of bone tissue.

Key words: Rats; Protein malnutrition; Protein in diet/Metabolism; Protein in diet/Therapeutical use; Fracture healing; Bone callus/metabolism

INTRODUCTION

Bone healing consists of a complex series of cell events demanding a high protein synthesis rate. Several studies emphasize the importance of the eutrophic nutritional status and of a diet with appropriate protein levels to prevent and heal fractures.

However, few reports are found in literature as regards the use of hyperprotein diets and their effects upon bone healing.

The objective of this study is to verify whether a high-protein diet will contribute to the healing process by comparing the results with proteinless and normoprotein diets under the same experimental conditions.

Trabalho realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Londrina (FMUEL)

- 1 - Professor associado da FMUSP
- 2 - Mestre pela FMUSP
- 3 - Médico assistente da FMUEL
- 4 - Professora associada da FMUSP
- 5 - Residente da FMUEL

Endereço para correspondência: R. João Ramalho, 105, ap24, Vila Quirino de Lima. São Bernardo do Campo - SP - CEP 09715-360

Trabalho recebido em 09/04/2003. Aprovado em 20/07/2003

Work performed at the Institute of Orthopedics and Traumatology, Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (FMUSP), SP, Brazil, and Faculty of Medicine, State University of Londrina (FMUEL), PR, Brazil

- 1 - Associate Professor, FMUSP
- 2 - Master's degree from FMUSP
- 3 - Assistant Doctor, FMUEL
- 4 - Associate Professor, FMUSP
- 5 - Resident, FMUEL

Address: R. João Ramalho, 105, ap 24, Vila Quirino de Lima. São Bernardo do Campo, SP 09715-360 - Brazil

MATERIAL E MÉTODO

Para este estudo foram seguidos todos os conceitos e padrões estabelecidos de ética e moral em respeito aos animais de experimentação⁽³⁾. Foram utilizados quarenta ratos Lewis (*norvegicus, albinus, rodentia, mammalia*) do sexo masculino, adultos e hígidos divididos em quatro grupos de dez durante seis semanas de experimento. O grupo 1 recebeu dieta aprotéica⁽⁹⁾, o grupo 2 recebeu dieta normal de laboratório com 19% de proteínas *Nuvilab*[®]CRU (*Nuvital Nutrientes*), o grupo 3 recebeu dieta hiperprotéica com 36% de proteínas *Maxi Junior*[®] (*Royal Canin*) e o grupo 4 recebeu dieta aprotéica por duas semanas e dieta hiperprotéica nas quatro últimas semanas. Em todos os grupos foram oferecidos alimento e água à vontade. A constituição protéica de cada dieta está relatada na Tabela 1.

Com duas semanas de experimento foram produzidas fraturas no terço médio das patas traseiras esquerdas de forma manual, semelhantes quanto ao traço e sem exposição ao meio externo, por um único pesquisador, sob anestesia intraperitoneal de solução composta por cetamina na dose de 40mg/kg e de xilazina, na dose de 5mg/kg⁽¹¹⁾. Não foi utilizado nenhum tipo de imobilização. Ao final de seis semanas todos os animais foram sacrificados com dose letal de 200mg/Kg de pentobarbital sódico⁽⁶⁾.

As seguintes variáveis foram avaliadas ao início, com duas semanas e com seis semanas de experimento: evolução ponderal com balança eletrônica *Helmac HM 5000*[®], dosagem sérica das proteínas totais pelo método do biureto, dosagem sérica da albumina pelo método do verde de bromo-cresol e dosagem sérica de osteocalcina pelo processo de radioimunoensaio com o *Kit Elsa-osteo* da marca *Cis Bio International*.

Ao final do experimento o calo ósseo foi avaliado pelos métodos descritos a seguir. Avaliação clínica conforme uma escala de zero a dois⁽⁸⁾; foi atribuído grau zero à fratura consolidada, sem mobilidade ao teste manual, grau dois quando ocorreu mobilidade franca e grau um ao padrão intermediário de movimentação. Avaliação do calo ósseo pela área radiográfica, com

Nutrientes	Diets		
	Aprotéica	Normal	Hiperprotéica
Proteína bruta	0g	190g	360g
Arginina	-	8,5g	14,5g
Lisina	-	10g	12,5g
Metionina	-	4,1g	4,1g
Triptofano	-	2,3g	2,4g
Treonina	-	4,9g	8,1g

Tabela 1: Componentes protéicos das diferentes dietas
Table 1: Protein component of different diets

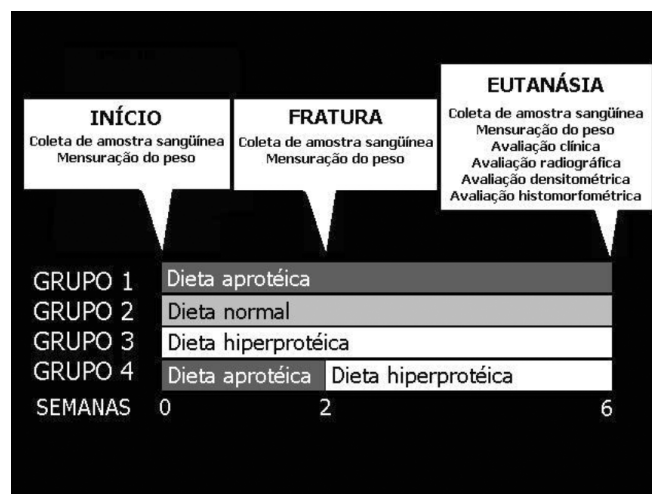


Figura 1: Delineamento experimental
Figure 1: Experimental outline

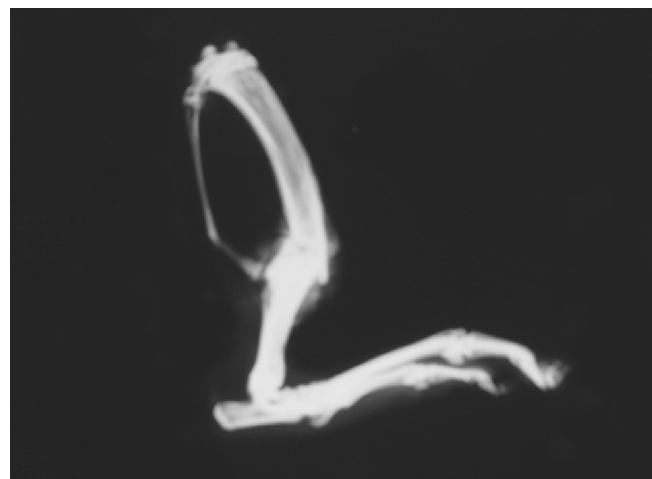


Figura 2: Radiografia – Exemplo do grupo 2.
Figure 2: Radiograph – Example from Group 2

Cis Bio International.

By the end of the trial, the bone callus was assessed by the methods described below. A clinical evaluation was performed using a 0 – 2 scale⁽⁸⁾; where a score of zero corresponded to a healed fracture with no mobility to manual testing; 2 corresponds to obvious mobility, and 1 to the intermediate pattern of movement. The bone callus was assessed by its radiographic area, with images in the profile position obtained with a GCE/Siemens planimograph at 30mA, 25kV and 0.5 s exposure (Figure 2); the planimetric value was determined by calculating the area (in mm²)

MATERIAL AND METHOD

In this study, all established ethical and moral concepts and standards regarding experimental animals were observed⁽³⁾. A total of forty healthy adult male Lewis rats (*Norvegicus albinus, Rodentia, Mammalia*) divided into four groups of ten were studied during a six-week trial. Group 1 was fed a proteinless diet⁽⁹⁾; Group 2 was fed a normal laboratory 19%-protein diet *Nuvilab*[®]CRU (*Nuvital Nutrientes*); Group 3 was fed a 36%-hyperprotein diet *Maxi Junior*[®] (*Royal Canin*) and Group 4 was fed a proteinless diet for two weeks and a hyperprotein diet for the last four weeks. Food and water were available to all groups at all times. Table 1 shows the protein composition of each diet.

At Week 2 of the trial, fractures were manually produced in the medium third of the left hind legs; the traces of all fractures were similar, with no exposure to the outer environment; all fractures were performed the same investigator, under intraperitoneal anesthesia using a solution of 40 mg/kg ketamine and 5 mg/kg xylazine⁽¹¹⁾. No immobilization of any kind was employed. After six weeks all animals were killed using a lethal dose of 200 mg/kg sodium pentobarbital⁽⁶⁾.

The following variables were assessed at the beginning and on Week 2 and Week 6 of the trial: weighted evolution, using a *Helmac HM 5000*[®] electronic balance; total serum protein evaluation by the biuret reaction; serum albumin evaluation using *Brom Cresol Green* indicator; and serum osteocalcin evaluation by radioimmunoassay, using an *Elsa-Osteo Kit*/

imagens na posição de perfil com mamógrafo GCE/Siemens, com técnica de 30mA, 25kV e 0,5s de exposição (Figura 2), nas quais a medida planimétrica foi determinada através de cálculo da área vista nos raios-x em mm² através de digitalização da imagem através de captura por scanner sob foco de luz. Avaliação densitométrica na qual foi determinada a medida da densidade mineral óssea dos calos ósseos em densitômetro Lunar DPX-A com software para pequenos animais (Figura 3). Avaliação histomorfométrica pela diferenciação dos tecidos ósseo, fibroso e cartilágneo do calo ósseo em sistema analisador de imagem Kontron Eletronic 300 em lâminas coradas pelo método de triclouro de Masson (Figura 4). Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância e teste T de Student com nível de significância de 0,05. O delineamento experimental está resumido na Figura 1.

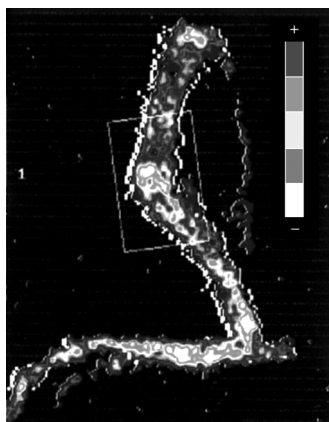


Figura 3: Densitometria óssea – densidade óssea em ordem crescente a partir do branco. Exemplo do grupo 4.

Figure 3: Bone densitometry – bone densitometry in ascending order from blank. Example from Group 4

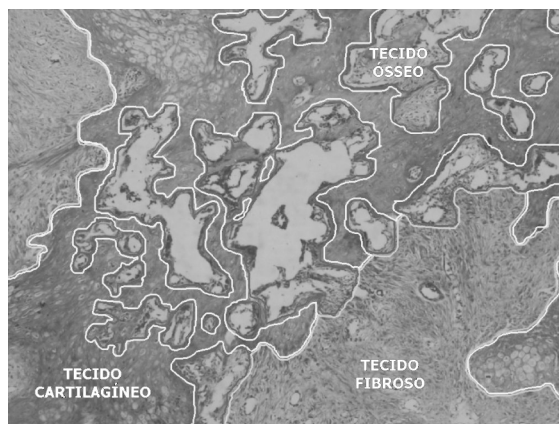


Figura 4: Histomorfometria – diferenciação do calo ósseo por tipo de tecido. Exemplo do grupo 3.

Figure 4: Histomorphometry – bone callus differentiation by tissue type. Example from Group 3

	PESO g			PROTEÍNAS mg/dl			ALBUMINA mg/dl			OSTEOCALCINA mg/dl		
	0s	2s	6s	0s	2s	6s	0s	2s	6s	0s	2s	6s
Grupo 1	419	368*	249*	6,71	6,33	5,46*	1,36	1,29	1,16*	12,5	13,6	16,8
Grupo 2	418	377*	400*	6,72	6,67	7,02*	1,40	1,46	1,49	11,7	11,9	25,5*
Grupo 3	417	372*	447*	6,45	7,01*	7,49*	1,38	1,37	1,52*	12,3	12,7	30,6*
Grupo 4	410	375*	435*	6,62	6,52	6,92*	1,36	1,31	1,52*	13,0	13,5	26,9*

Tabela 2: Média dos resultados obtidos nos diferentes grupos com relação ao peso, proteínas, albumina e osteocalcina

Table 2: Average values of results obtained in different groups as regards weight, proteins, albumin and osteocalcin

	TESTE MANUAL Heard			PLANIMETRIA mm2	DENSITOMETRIA g/cm2	HISTOMORFOMETRIA %		
	0	1	2			osso	cartilagem	fibrose
Grupo 1	0	9	1	12,5	0,21	41,33	29,90	28,77
Grupo 2	6	4	0	13,95	0,22	44,92	25,51	29,57
Grupo 3	9	1	0	16,46*	0,22	47,60	26,98	25,42
Grupo 4	10	0	0	13,66	0,22	48,80	36,99	14,21

Tabela 3: Média dos resultados obtidos nos diferentes grupos com relação ao teste manual, planimetria, densitometria e histomorfometria.

Table 3: Average values of results obtained in different groups as regards manual testing, planimetry, densitometry and histomorphometry

RESULTADOS

Os resultados estão descritos na Tabela 2 e na Tabela 3 de acordo com a sua média e os dados estatisticamente significantes estão acompanhados com asterisco.

DISCUSSÃO

Levamos em conta a necessidade de obtermos fraturas as mais semelhantes possíveis, para que ao realizar o estudo experimental elas sejam passíveis de comparação⁽⁷⁾, deste modo todas as fraturas foram realizadas por único pesquisador.

Aceitamos que a não imobilização das fraturas experimentais nas tíbias dos ratos não interfere na obtenção da consolidação, como já foi verificado por outros autores⁽¹⁾. Não utilizamos a fixação metálica para permitir uma melhor visualização do desenvolvimento natural do calo ósseo sem preocupações com as alterações oriundas da presença do material de síntese^(2,7).

Com relação aos resultados, ao final do estudo verificamos uma diminuição acentuada do peso com a dieta aprotéica e um aumento do peso com a dieta

seen in the X-rays and obtained by scanning the images under a light focus. A Lunar DPX-A densitometer with software for small animals was used to measure the bone mineral density of bone calluses (Figure 3). A histomorphometric evaluation was performed that differentiated bone, fibrous and cartilaginous tissue from the bone callus using a Kontron Eletronic 300 image analyzer system and the Masson trichrome staining method (Figure 4). Statistical tests consisted of a variance analysis and Student's t-test with a 0.05 significance level. Figure 1 is an outline of the trial.

RESULTS

Tables 2 and 3 present the average values of the results; statistically significant data are indicated by an asterisk.

DISCUSSION

Given the need to obtain fractures as similar as possible so that they may be compared during the trial⁽⁷⁾, all fractures were performed by one investigator only.

We agreed that the lack of immobilization of experimental fractures in the rats' tibias does not influence the healing, as already noticed by other authors⁽¹⁾. We did not use metal fixators to allow a better view of the natural development of the bone callus without worrying about changes caused by the presence of the synthesis material^(2,7).

By the end of the study we noticed a marked decrease in the weights of the rats fed a proteinless diet, and a weight increase in those that had been fed the normal diet until baseline. However, similarly to Groups 3 and 4 that were fed a hyperprotein diet, a significant increase in the body mass was found well above the baseline weight. These findings were compatible with the purpose of the trial and showed that the effect expected from the hyperprotein diet when rats were fed a more nutritious feeding really existed.

normal até os níveis iniciais. Porém foi com a dieta hiperprotéica que constatamos nos grupos 3 e 4 um aumento significativo de massa corporal bem acima do peso inicial. Estes achados são compatíveis com o propósito do experimento e mostram que há o efeito esperado da dieta hiperprotéica com melhor nutrição dos ratos.

Em adição, verificamos que houve uma queda nos níveis de proteínas totais e albumina na dieta aprotéica e um ganho nas dietas hiperprotéicas, mesmo no grupo inicialmente desnutrido. Estes dados fornecem evidências que a maior porcentagem de proteínas oferecida na alimentação melhorou o estado de nutrição dos ratos.

Para a avaliação do metabolismo ósseo mensuramos a osteocalcina, um marcador de formação óssea específico⁽⁴⁾. Observamos que ao final das seis semanas de experimento houve um aumento significativo dos níveis séricos de osteocalcina para os grupos com dieta protéica e hiperprotéica, correspondendo ao maior metabolismo ósseo encontrado nestes grupos. Com relação ao grupo aprotéico não se obteve alteração significativa.

Na análise clínica verificamos que os alimentados com dieta hiperprotéica, grupos 3 e 4, não apresentaram mobilidade no foco de fratura (grau 0) em nove e dez casos respectivamente. Nas amostras dos grupos com dieta normal do grupo 2 obtivemos consolidação franca em seis casos e no grupo 1 de dieta aprotéica não houve consolidação firme, sendo que ocorreu um caso de não consolidação (grau 2) e nove casos de consolidação intermediária. Deste modo, a dieta mais rica em proteínas provocou maior número de tíbias totalmente consolidadas.

Foi nítida na avaliação radiográfica, a diferença entre os resultados médios do calo ósseo, que se apresentaram com uma maior área nas amostras dos grupos dieta hiperprotéica, com diferença significativa quando comparada às amostras dos grupos dieta normal. Isto sugere que há um ganho na quantidade de calo ósseo com a maior oferta nutricional. Nos grupos 1, 2 e 4 não houve diferença significativa com relação à medida planimétrica quando comparados com o grupo de dieta normal.

Os resultados confirmam que há benefício na consolidação das fraturas experimentais com a dieta hiperprotéica se levarmos em conta a avaliação manual das fraturas e a quantidade de calo ósseo formado, isto é, mensurações quantitativas. Ao analisamos qualitativamente os calos ósseos na densitometria não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este achado sugere que a maior resistência óssea observada nos animais se tornou possível mais pela maior quantidade das estruturas orgânicas e não pelo aumento da concentração de minerais. Estes dados também foram comprovados pela avaliação histomorfométrica do calo ósseo com quantidades semelhantes nos quatro grupos em porcentagem de fibrose, cartilagem e osso.

Estamos convencidos que para a fase de formação cartilaginosa do calo ósseo na consolidação endocondral faz-se necessário uma maior quantidade de proteínas para a melhor resposta possível. Deste modo uma dieta rica em proteínas nas primeiras fases da consolidação das fraturas tem efeito benéfico. Supomos por analogia que para a última fase da consolidação óssea uma maior quantidade de cálcio e vitamina D resultaria numa melhor ossificação do calo cartilaginosa e abrimos este campo para a pesquisa.

In addition, we found a decrease in total protein and albumin levels with the proteinless diet and a gain with hyperprotein diets, even in the group that presented malnutrition at baseline. These data provide evidence that the higher percentage of protein given in the diet improved the rats' nutritional condition.

In order to evaluate the bone metabolism, we measured osteocalcin, a specific marker of bone formation⁽⁴⁾. At Week 6 of the study we could observe a significant increase in the serum osteocalcin levels in the groups receiving normoprotein and hyperprotein diets, corresponding to the highest bone metabolism found in these groups. The proteinless group showed no significant changes.

The clinical analysis showed that rats subjected to the hyperprotein diet (Groups 3 and 4) did not present mobility at the fracture focus (score of zero) in nine and ten cases, respectively. In samples taken from groups on the normal diet (Group 2), bone healing was evident in six cases, while in Group 1 (on a proteinless diet) no firm healing occurred, and in one case the bone did not heal at all (score of 2); nine cases of intermediate bone healing were found. Therefore, the diet with the highest protein contents caused a larger number of totally healed tibias.

The radiographic evaluation clearly showed the difference between the average results of bone calluses, with a larger area in the samples drawn from the groups on hyperprotein diet and a significant difference as compared with samples drawn from the groups on the normoprotein diet. This suggests that a gain exists in the amount of bone calluses with a higher nutritional offer. Groups 1, 2 and 4 showed no significant differences in the planimetric measurement as compared to the group on the normoprotein diet.

Our results confirm that the healing of experimental fractures benefits from a hyperprotein diet, if we take into account that the assessment of the fractures was performed manually, and that the amount of bone calluses formed was quantitatively measured. A qualitative densitometry analysis of the bone calluses showed no statistically significant differences among groups. This finding suggests that the higher bone strength observed in the animals was made possible due to the larger amount of organic structures, rather than the increase in mineral concentration. These data were also confirmed by histomorphometry assessment of the bone calluses with similar amounts in the four groups, as percentages of fibrosis, cartilages and bone.

We are convinced that, for the phase of cartilaginous formation of the bone callus in endochondral healing, a larger amount of protein is required in order to obtain the best possible response. In this way, a protein-rich diet has a beneficial effect during the first phases of fracture healing. Similarly, we suppose that during the last phase of bone healing a higher amount of calcium and vitamin D would result in better ossification of the cartilaginous callus, and wish to suggest that this field be investigated.

However, we emphasize that a hyperprotein diet should not be administered for long time periods, since proteins in excessive amounts can lead to an increased calcium excretion and, in some cases, even to renal failure, which might cause a higher incidence of fractures in individuals usually on hyperprotein diets^(5,10).

Since in this study we observed that a hyperprotein diet helps heal bone fractures in rats, we suggest that human clinical studi-

Porém, ressaltamos que a dieta hiperprotéica não deve ser administrada por longo período de tempo porque uma quantidade excessiva de proteínas pode levar à excreção aumentada de cálcio e em alguns casos até à insuficiência renal. Isto pode acarretar em uma maior incidência de fraturas nos indivíduos que tomam como hábito uma dieta hiperprotéica^(6,10).

Observamos neste trabalho que uma dieta hiperprotéica auxilia a consolidação óssea em ratos e sugerimos estudos clínicos em humanos para a utilização da dieta hiperprotéica na prática diária do ortopedista.

CONCLUSÃO

A dieta hiperprotéica favorece a consolidação de fraturas experimentais em ratos pela melhora da quantidade orgânica do calo ósseo.

es should be performed, so that a hyperprotein diet may be used in the daily practice of orthopedists.

CONCLUSION

A hyperprotein diet favors induced fracture healing in rats by improving the organic amount of bone calluses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andreev O, Larson SE. Effects of parathyroidectomy and vitamin D on fracture healing. *Acta Orthop Scand* 54:805-09,1983.
2. Camargo Junior JN. Estudo experimental comparativo da morfologia e da dinâmica da população celular no calo de reparação de fraturas de ossos longos tratados com e sem osteosíntese intramedular [Tese Doutorado]. São Paulo (SP): Fac. Med. Univ. São Paulo, 1972.
3. Close B, Banister K. Recommendation for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab Anim*. 30:293-316,1996.
4. Delmas PD. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. *Bone*. 13:17-21,1992.
5. Feskanich D, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA. Protein consumption and bone fractures in women. *Am J Epidemiol*. 143:472-9,1996.
6. Goss-Sampson MA, Kriss A. Effects of pentobarbital and ketamine-xylazine anaesthesia on somatosensory, brainstem auditory and peripheral sensory-motor responses in rat. *Laboratory Animals*. 25:360-6,1991.
7. Guarniero R. Estudo da consolidação de fraturas na desnutrição protéica: trabalho experimental em ratos [Tese Doutorado]. São Paulo (SP): Fac. Med. Univ. São Paulo, 1987.
8. Heard CW, Griffith RB, Dudrick SJ. The positive impact of nutritional support on fracture healing. In: Abstracts VI Aspen Congress, San Francisco, Califórnia, 1982a.
9. Modolin MLA, Bevilacqua, RG, Margarido NF, Lima-Gonçalves E. Cicatrização das feridas abertas na desnutrição com hipoproteinemia. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 37:275-78,1982.
10. Nordin BE, Need AG, Steurer T, Morris HA, Chatterton BE, Horowitz M. Nutrition, osteoporosis, and aging. *Ann N Y Acad Sci*. 854:336-51,1998.
11. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on core and surface body temperature regulation in adult male rats. *Laboratory Animal Science*.37:743,1987.