CRISTINA DE SOUSA BOLINA

**Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de
resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar
subnutridos**

São Paulo
2014

CRISTINA DE SOUSA BOLINA

Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3072
FMVZ

Bolina, Cristina de Sousa

Efeitos da recuperação protética pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos / Cristina de Sousa Bolina. -- 2014.
113 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Subnutrição. 2. Renutrição. 3. Resveratrol. 4. Cartilagem articular. 5. Microscopia eletrônica.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos: análise morfoquantitativa e expressão do IGF-I e IGF-IR", protocolado sob o nº 2844/2012, utilizando 54 (cinquenta e quatro) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Effects of protein recuperation postnatal supplementation with resveratrol in the articular cartilage of knee joint of Wistar rats undernourished: morfoquantitativa analysis an expression of IGF-I and IGF-IR", protocol number 2844/2012, utilizing 54 (fifty four) rats, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOLINA, Cristina de Sousa

Título: Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Eu pedi Força...e Deus me deu Dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi Sabedoria...e Deus me deu Problemas para resolver.
Eu pedi Prosperidade...e Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar.
Eu pedi Coragem... e Deus me deu Perigo para superar.
Eu pedi Amor... e Deus me deu pessoas com Problemas para ajudar.
Eu pedi Favores... e Deus me deu Oportunidades.
Eu não recebi nada do que pedi... Mas eu recebi tudo de que precisava

Autor desconhecido.

Dedicatória

Aos meus pais, Paulina José Domingues de Sousa Bolina e Euclides José Bolina, pelo amor, carinho, preocupação e apoio, proporcionado durante a minha vida e no decorrer deste percurso. Amo vocês.

E a Sílvia de Campos Boldrini (*In memoriam*), que me acolheu tão gentilmente e iniciou este percurso. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de agradecer aos meus pais, *Euclides José Bolina e Paulina J. D. de Sousa Bolina*, por todos os momentos de alegrias compartilhadas. Por essa linda família, que me proporcionam tanto carinho e amor. Vocês são o suporte da minha vida e o motivo para continuar lutando.

As minhas irmãs *Regina e Daniela* e aos meus sobrinhos *Yasmim, Giovanna, Tayná e Samuel*, fonte de inspiração e apoio, nos momentos tristes e felizes. O meu sincero agradecimento.

Ao meu amado *Adriano Polican Ciena*, por todo o carinho, amizade, dedicação e companheirismo; pelas conversas e paciência nos momentos difíceis. Você me auxiliou a conquistar tantas vitórias e realizar os meus sonhos, que espero poder continuar a compartilhar com você. Saiba que lhe admiro muito.

Aos meus cunhados, *Rogério Galvão e Paulo Henrique Matos*, pela amizade e incentivo.

Ao *Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti*, pelos ensinamentos de anatomia, pela compreensão e auxílio durante esse período.

AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, pela oportunidade de desenvolvimento científico.

À Professora Doutora *Maria Angélica Miglino* e ao *Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo*.

Aos amigos *Sebastião Boleta, Sônia Regina Yokomizo, Kelly Patrícia e Marta Maria Righetti* pelo auxílio com as técnicas laboratoriais, mas principalmente e o mais importante, pela amizade e os momentos felizes realizadas nesse período. Muito obrigada.

A *Liliana Ribeiro*, pela amizade, preocupação, confiança, incentivo e força. Por todos os “socorros” atendidos pessoal e profissional.

A *Rosana Duarte Prisco*, por todos os ensinamentos e horários de estatística, pela conversa agradável e pelas risadas proporcionadas.

À *Malu Motta*, obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos companheiros do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e a Cirurgia - LAFACC, VQM. *Thelma Parada, Eduardo Beber, Flávio Tampelini, Josemberg Baptista, Bruna Cecília Caixeta, Aline Gonçalves, Aline Marosti, Diana Alves, Lucilene Ferreira, Ricardo Bandeira, Thiago Habacuque, Marcelo Cavalli, Karina Marques, Valquíria Mariotti, Liliana Ribeiro, Any Kelly Lima, Catarina Tivane, Joice Bertaglia, Jodonai Barbosa, Ricardo Eustáquio, Eduardo Beber, Lídia Rocha, Lígia Mendonça, Josy Cal, Ivone Benigno e ao Marcos Vinícius da Silva (agregado)*.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, *Fábio França e Renivaldo de Souza*.

À *todos os amigos e colegas de pós-graduação* que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese. Muito obrigada.

RESUMO

BOLINA, C. S. Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos. [Effects of postnatal protein recovery with resveratrol supplementation the articular cartilage of the knee joint of rats undernourished]. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O resveratrol (RES), um composto natural, é encontrado em diversas plantas, mas pode ser observado em altas concentrações na uva e nos vinhos tintos, apresentando propriedades antioxidantes e condroprotetoras capazes de proteger a cartilagem articular, no entanto, os efeitos do resveratrol frente à subnutrição ainda são desconhecidos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação com resveratrol sobre o tecido cartilágneo do joelho de ratos submetidos a uma subnutrição protéica. Para tanto, foram formados 6 grupos experimentais de animais subnutridos e nutridos nos períodos pré e pós-natal com 21 e 60 dias de vida (Grupos S21 e N21; e S60 e N60, respectivamente). Dois grupos de 60 dias, um submetido à recuperação protéica e outro suplementado com resveratrol (ambos a partir do 22º dia) formaram, respectivamente os grupos RN60 e RES60. Após o desmame, foram mensurados os parâmetros metabólicos de ingestão hídrica e alimentar, bem como os de excreção de fezes e urina. As amostras da articulação do joelho foram processadas com técnicas rotineiras de histologia e submetidas a colorações que permitam evidenciar os componentes cartilágneo e de colágeno. Os aspectos tridimensionais e ultraestruturais da cartilagem articular também foram analisados. Para as avaliações relativas aos dados metabólicos foi utilizada a Análise de Variância - ANOVA com dois fatores (idade e dieta) e quando necessário aplicou-se pós-teste de *Bonferroni*. Para as demais variáveis empregou-se a Análise de Variância - ANOVA com dois fatores (idade e dieta) e a Análise de Variância – ANOVA com um fator e, quando necessário, aplicaram-se comparações múltiplas pelo método de *Tukey*. Os nossos resultados mostram que a subnutrição é capaz de modificar as propriedades biomecânicas das cartilagens articulares do fêmur e da tíbia, causando atraso no seu desenvolvimento. Quanto às dietas aqui empregadas, mostram que a renutrição protéica melhora os efeitos da subnutrição sobre a cartilagem articular, mas não recupera em comparação ao grupo controle, enquanto que, a renutrição suplementada com resveratrol, reestabelece os parâmetros analisados. Conclui-se que o

resveratrol auxiliou na recuperação dos efeitos deletérios da subnutrição, melhorando os aspectos metabólicos, estruturais e ultraestruturais da cartilagem articular do fêmur e da tíbia em fases precoces do desenvolvimento.

Palavras-chave: Subnutrição. Renutrição. Resveratrol. Cartilagem articular. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

BOLINA, C. S. Effects of postnatal protein recovery with resveratrol supplementation the articular cartilage of the knee joint of rats undernourished. [Efeitos da recuperação protéica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos]. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Resveratrol (RES), a naturally occurring compound is found in several plants, but can be observed at high concentrations in grapes and red wines having antioxidant and chondroprotective properties and able to protect the articular cartilage, however, the effects of resveratrol front malnutrition are still unknown. Thus, this study aimed to evaluate the effects of supplementation with resveratrol on the cartilage tissue of the knee of rats submitted to protein malnutrition. Thus, we formed six experimental groups of malnourished and nourished animals pre- and postnatal 21 and 60 days (Groups S21 and N21, and N60 and S60, respectively). Two groups of 60 days, one submitted to protein recovery and other supplemented with resveratrol (both from the 22nd day) formed respectively the RN60 and RES60 groups. After weaning, metabolic parameters of water and food intake and the excretion of faeces and urine were measured. The knee joint specimens were processed for routine histology staining techniques and submitted to which emphasize the collagen and cartilage components. Three-dimensional and ultrastructural aspects of articular cartilage were also analyzed. For assessments of the metabolic data was used analysis of variance - ANOVA with two factors (age and diet) and when necessary applied Bonferroni post-test. For the other variables we used analysis of variance - ANOVA with two factors (age and diet) and analysis of variance - ANOVA with one factor and, when necessary, we applied multiple comparisons by the Tukey method. Our results show that malnutrition is able to modify the biomechanical properties of articular cartilage of the femur and tibia, causing delays in their development. The diets used here, show that the protein renutrition improves the effects of malnutrition on the articular cartilage, but does not recover as compared to the control group, while renutrition supplemented with resveratrol, restores the parameters analyzed. We conclude that resveratrol helped him overcome the deleterious effects of malnutrition, improving metabolic, structural and ultrastructural aspects of the articular cartilage of the femur and tibia in the early stages of development.

Keywords: Malnutrition. Renutrition. Resveratrol. Articular cartilage. Electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da fome.....	26
Figura 2 - Tipos de subnutrição.....	27
Figura 3 – Demonstração das estruturas da cartilagem articular.....	31
Figura 4 - Composição das rações.....	41
Figura 5 - Obtenção dos grupos experimentais.....	42
Figura 6 - Gaiolas Metabólicas.....	43
Figura 7 - Monitoramento dos animais nas gaiolas metabólicas.....	44
Figura 8 - Fotografia demonstrando o <i>software</i> para a mensuração da espessura.....	50
Figura 9 - Fotografia utilizando-se o sistema teste para a determinação do número de condrócitos/área.....	51
Figura 10 - Fotografia sistema teste para a densidade de volume dos condrócitos e da MEC.....	52
Figura 11 - Fotografia utilizando-se o sistema teste e o <i>software</i> para a mensuração da área dos condrócitos.....	53
Figura 12 - <i>Software</i> utilizado para a mensuração da área da matriz MEC.....	53
Figura 13 - Comprimento dos animais dos grupos experimentais.....	58
Figura 14 - Representação gráfica da massa corporal (g).....	59
Figura 15 - Representação gráfica da ingestão alimentar (g) e excreção de fezes (g).....	60
Figura 16 - Representação gráfica da ingestão hídrica (ml) e excreção de urina (ml).....	61
Figura 17 - Representação gráfica da razão Ingestão Alimentar/Massa Corporal (g) e Ingestão Hídrica/Massa Corporal (ml/g).....	62
Figura 18 - Representação gráfica da razão Excreção de Fezes/Ingestão Alimentar (g) e excreção de Urina/Ingestão Hídrica (ml).....	64
Figura 19 - Aspecto geral da cartilagem articular do fêmur e da tíbia.....	66

Figura 20 - Aspecto dos condrócitos na cartilagem articular do fêmur e da tíbia.....	67
Figura 21- Avaliação da matriz extracelular da cartilagem articular do fêmur e da tíbia.	69
Figura 22 - Avaliação do colágeno da cartilagem articular do fêmur e da tíbia.....	71
Figura 23 - Espessura da cartilagem articular do fêmur e da tíbia.....	73
Figura 24 - Aspectos ultraestruturais da cartilagem articular.....	75
Figura 25 - Representação gráfica da espessura das cartilagens (μm).....	77
Figura 26 - Representação gráfica da área da MEC das cartilagens (μm^2).....	78
Figura 27 - Representação gráfica da área dos condrócitos das cartilagens (μm^2).....	79
Figura 28 - Representação gráfica do Vv matriz e Vv condrócitos das cartilagens (%)...	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Média ($\pm$ DP) das massas corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	59
Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) da ingestão alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	60
Tabela 3 – Média ($\pm$ DP) da excreção de fezes (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	60
Tabela 4 – Média ($\pm$ DP) da ingestão hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	61
Tabela 5 – Média ($\pm$ DP) da excreção de urina (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	61
Tabela 6 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão Alimentar/Massa Corporal (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	62
Tabela 7 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão Hídrica/Massa Corporal (ml/g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	62
Tabela 8 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de Fezes/Ingestão Alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final* $p<0,05$	63
Tabela 9 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de Urina/Ingestão Hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final * $p<0,05$	63
Tabela 10 – Média ($\pm$ DP) da área das cartilagens dos grupos experimentais (mm ²).....	76
Tabela 11 – Média ($\pm$ DP) do número de condrócitos/área das cartilagens do fêmur e da tíbia (mm ²)	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
c	Camada calcificada
°C	Celsius
c/a	Condrócitos por área
DP	Desvio padrão
g	Gramas
HE	Hematoxilina – eosina
Inter	Intermediária
m	Camada média
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ml	Mililitros
N	Nutrido
N21	Grupo nutrido com 21 dias
N60	Grupo nutrido com 60 dias
p	Camada profunda
RES60	Grupo resveratrol com 60 dias
RN60	Grupo renutrido com 60 dias
s	Camada superficial
S	Subnutrido
S21	Grupo subnutrido com 21 dias
S60	Grupo subnutrido com 60 dias
Vv	Densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	SUBNUTRIÇÃO: CONCEITOS.....	24
2.1.1	Subnutrição: aspectos gerais.....	25
2.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO E DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	29
2.3	O RESVERATROL: CONCEITOS E REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS	31
3	JUSTIFICATIVA.....	34
4	OBJETIVOS.....	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1	ACASALAMENTO E GESTAÇÃO.....	39
5.2	OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
5.2.1	Formação dos grupos de 21 dias (N21 e S21).....	40
5.2.2	Formação dos grupos de 60 dias (N60, S60, RN60 e RES60).....	41
5.3	ANÁLISES METABÓLICAS.....	43
5.4	OBTENÇÃO DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO	45
5.5	AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	45
5.5.1	Evidenciação do aspecto geral da articulação do joelho.....	46
5.5.2	Evidenciação dos aspectos gerais do tecido cartilágneo através do método de Hematoxilina-Eosina (HE).....	46
5.5.3	Evidenciação da matriz extracelular (MEC) através do método de Safranina-O.....	47

5.5.4	Evidenciação e tipificação das fibras colágenas através do método de Picrosirius.....	47
5.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	47
5.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	48
5.8	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA.....	49
5.8.1	Área da cartilagem.....	50
5.8.2	Espessura da cartilagem articular	50
5.8.3	Número de condrócitos por área (c/a).....	51
5.8.4	Densidade de volume dos condrócitos e da matriz (V_v).....	51
5.8.5	Área dos condrócitos.....	52
5.8.6	Área da matriz extracelular.....	53
5.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	ASPECTOS FÍSICOS E METABÓLICOS.....	56
6.2	ASPECTOS QUANTITATIVOS METABÓLICOS	59
6.2.1	Massa corporal.....	59
6.2.2	Ingestão alimentar e Excreção de fezes.....	60
6.2.3	Ingestão hídrica e excreção de urina.....	61
6.2.4	Ingestão alimentar/Massa corporal e Ingestão hídrica/Massa corporal.....	62
6.2.5	Fezes / Ingestão alimentar e Urina / Ingestão hídrica.....	63
6.3	ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS.....	64
6.3.1	Aspecto geral da cartilagem articular.....	64
6.3.2	Matriz extracelular (MEC).....	68
6.3.3	Avaliação do colágeno.....	70
6.3.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	72
6.3.5	Microscopia eletrônica de transmissão.....	74

6.4	ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUANTITATIVOS.....	76
6.4.1	Área da cartilagem articular.....	76
6.4.2	Espessura da cartilagem articular.....	77
6.4.3	Área da matriz extracelular (MEC).....	77
6.4.4	Área dos condrócitos.....	78
6.4.5	Número de Condrócitos/Área.....	79
6.4.6	Densidade de condrócitos e de MEC (Vv).....	80
7	DISCUSSÃO.....	82
7.1	CONSIDERAÇÕES MACROSCÓPICAS E METABÓLICAS.....	83
7.2	ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA.....	87
8	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXOS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A subnutrição, caracterizada por ser uma síndrome complexa, é conhecida como um problema de saúde mundial. Suas causas podem estar relacionadas com a fome, com uma dieta inadequada ou com a fome oculta também conhecida como ingestão deficiente de micronutrientes, muitas vezes, associada com a obesidade (FAO, 2014).

Muito embora tenha havido uma redução no número de pessoas que sofrem com a fome desde 1992, estima-se que pelo menos dois mil milhões de pessoas apresentam alguma forma de subnutrição (FAO, 2014). O Brasil pertence ao grupo de 42 países do mundo que respondem por 90% das mortes decorrentes de algum tipo de subnutrição, dessa forma, é uma das síndromes que mais causa mortalidade em humanos (AMARAL et al., 2005; COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008).

Aproximadamente 43% das crianças em países em desenvolvimento sofrerá subnutrição em algum momento da vida. Estima-se que, mais de um terço das crianças menores que 5 anos de idade sofrem de subnutrição grave ou moderada (FAO, 2006). Assim, a subnutrição é uma das doenças que mais leva crianças a óbito abaixo dos 5 anos de idade (SAWAYA, 2006). Particularmente, acredita-se que as crianças são mais vulneráveis às deficiências nutricionais, muitas vezes causando alterações irreparáveis (MONTE, 2000). Dessa forma, a subnutrição, determinada pela privação proteica promove alterações em diversos tecidos e está relacionada com o baixo peso corporal, atraso no crescimento e no desenvolvimento cognitivo, vulnerabilidade a doenças infecciosas e crônicas como *diabetes mellitus*, síndrome metabólica na vida adulta, hipertensão e doenças cardiovasculares (BARKER et al., 1993; BATISTA-FILHO, RISSIN, 2003).

Durante a fase de intensa proliferação celular, os tecidos encontram-se sensíveis a injúrias decorrentes de fatores extrínsecos. Dentre esses fatores, dependendo do momento, da duração e da intensidade em que ocorra a subnutrição, pode causar efeitos nocivos, principalmente em tecidos que estejam em fase de desenvolvimento acelerado (MORGANE et al., 2002). A cartilagem articular, um tecido especializado que forma e sustenta as superfícies articulares, apresenta propriedades físicas que atuam na regulação do desenvolvimento, manutenção e reparo, através da interação entre os componentes da matriz e os condrócitos (HUBER, et al., 2000; HARDINGHAM et al., 2002) que podem ser alterados em decorrência da subnutrição (BOLDRINI, 2003; CAVALLI, 2011).

Portanto, tem sido descrito que a preservação dos componentes da cartilagem articular pode ser realizada através do resveratrol, um composto encontrado em uvas e em vinhos tintos que apresentam efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e condroprotetores (ELMALI, 2007).

Na presente pesquisa, considerou-se que sua importância está relacionado com os efeitos da restrição protéica sobre a cartilagem articular do fêmur e da tíbia de ratos adultos, e de uma possível recuperação através da suplementação com resveratrol, visando a melhora dos parâmetros metabólicos, estruturais e ultraestruturais.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo dedica-se à descrição da literatura, a partir de um levantamento bibliográfico detalhado, sobre os assuntos envolvidos no presente estudo e está subdividida em tópicos como se segue:

2.1 SUBNUTRIÇÃO: CONCEITOS

A nutrição é o processo biológico mediante o qual, os organismos assimilam os alimentos e os líquidos necessários para assegurar o crescimento, a maturação e a duplicação celular; e está associada a uma dieta adequada e equilibrada (ALVES; DÂMASO; PAI, 2008; WHO, 2012).

Na literatura, a palavra desnutrição está associada a diversos significados, e termos como subnutrição e má nutrição (utilizados como sinônimos). Segundo Chandra (1992), a subnutrição apresenta, simultaneamente, diversas deficiências, caracterizando uma síndrome complexa. Para Morgane et al. (2002), a subnutrição está associada a uma deficiência energética, e a má nutrição está relacionado com o baixo ou elevado consumo de um ou mais nutrientes.

Segundo Monteiro (2003), a desnutrição decorre de um aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes e do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos. A FAO (2006) define desnutrição como ingestão insuficiente de alimentos, durante um período prolongado, da inadequada absorção e das deficiências calórica, protéica ou calórico-protéica. Por sua vez, a subnutrição é definida como quantidade de nutrientes insuficiente na alimentação, relativamente à quantidade mínima exigida, para manter constante o peso corporal. Para Martins et al. (2011), a desnutrição é definida como nutrição inadequada, ou seja, quantidade insuficiente de alimentos com teor energético, bem como, o inadequado consumo de alimentos de boa qualidade.

A *World Food Programme* (2013), definiu a subnutrição como um estado em que os indivíduos não conseguem manter as capacidades naturais do corpo, cuja ingestão de alimentos não é suficiente para atender as necessidades mínimas fisiológicas. O termo pode

estar relacionado com a deficiência de vitaminas, minerais e proteínas, causando problemas como, baixo peso, nanismo ou até mesmo, obesidade.

Desta forma, com base nos conceitos acima, o termo subnutrição será aqui utilizado para definir uma deficiência protéica.

2.1.1 Subnutrição: aspectos gerais

A subnutrição é conhecida como um problema de saúde mundial e atinge populações de vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Sua origem encontra-se na pobreza, caracterizada por diversos fatores, está comumente relacionada com o baixo nível socioeconômico e cultural, como também, com outros fatores relacionados à produção, industrialização, distribuição e o custo dos alimentos, o que explica a morbidade e mortalidade nos primeiros anos de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; VALADARES, 2006; BLACK et al., 2008).

Em 1995 até o ano de 2009, o número de pessoas subnutridas aumentou, e os valores eram inaceitavelmente altos. Em 2010, houve um declínio mundial da subnutrição, devido, ao crescimento econômico e à queda nos preços internacionais dos alimentos (FAO, 2012). Em 2013, 165 milhões de crianças com menos de 5 anos apresentaram-se subnutridas em todo o mundo, levando ao óbito mais de 300 crianças por hora e impedindo o desenvolvimento de 170 milhões em todo o mundo (ONU, 2013). No Brasil, onde a população total representa 196,7 milhões de pessoas, 13,0 milhões dessas apresentam algum tipo de subnutrição, prevalência de 7% (FAO, 2012). Os índices em 2011 eram apenas de 5 a 9%, valor considerado muito baixo (WFP, 2011), em 2012, este índice passou para 5 a 14%, moderadamente baixa (WFP, 2012) e em 2014, este índice reduziu para menor que 5% (WFP, 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Mapa da Fome

Fonte: (WFP, 2012; WFP, 2014)

Legenda: Observar os índices de subnutrição no Brasil.

Independente de sua forma, a subnutrição está associada à morte de 2,2 milhões de crianças menores de 5 anos no mundo (BLACK et al., 2008). Entre as diversas formas de subnutrição existem duas síndromes principais denominadas *Marasmus* e *Kwashiorkor* e se manifestam de formas distintas (WHO, 2012). O *Marasmus* é considerado como uma deficiência calórica e protéica (SCRIMSHAW; VITERI, 2010). Sua etiologia é decorrente da

inadequada ingestão energética e de uma condição crônica de desperdício de energia. Além disto, apresentam episódios de diarreia e dislipidemias, no entanto, seus mecanismos permanecem desconhecidos (ECE et al., 2007). Os sinais de marasmo são bastante evidentes como magreza excessiva, perda de massa muscular, sinais de envelhecimento facial, pele frouxa, peso muito baixo, retardo no crescimento. Podem apresentar temperatura corpórea mais baixa (hipotermia) e hiperatividade (MONTE, 2000).

O *Kwashiorkor* é um tipo de subnutrição oriundo da deficiência severa de proteína relativa às calorias. Ocorre por meio de dietas restritivas maternas e, normalmente, pela substituição do primeiro filho pelo segundo durante o aleitamento materno, tempo considerado insuficiente para a nutrição (TIERNEY; SAGE; SHWAYDER, 2010). Os principais sinais clínicos, além da presença de edema, localizado em todo o corpo, mas principalmente nas pernas, são: diarreia, esteatose hepática, ascite, retardo no crescimento, alterações mentais e de humor, lesões na pele (despigmentação, dermatose, descamação), alterações no cabelo (textura, cor, queda), perda de gordura subcutânea e muscular (MONTE, 2000; AHMED; RAHMAN; CRAVIOTO, 2009).

Uma proporção das crianças subnutridas podem apresentar uma forma de desnutrição mista, o *Kwashiorkor* - marasmático, com características mistas em relação às duas outras formas clínicas. Geralmente, quando desaparece o edema com o tratamento, pode-se ver que elas são portadoras de marasmo (MONTE, 2000) (Figura 2).

Figura 2 – Tipos de subnutrição

Fonte: (WFP, 2012)

Legenda: *Marasmus* e *Kwashiorkor*

Além destas formas de subnutrição, considera-se a existência de mais três, classificadas de acordo com medidas antropométricas, que são baixa estatura ou nanismo nutricional, emagrecimento e baixo peso (MONTE, 2000).

A subnutrição pode ter início em diversos períodos como, precocemente na vida intrauterina (baixo peso ao nascer) e, frequentemente, cedo na infância. Além disto, pode estar associada à ocorrência de doenças infecciosas (diarreias e respiratórias), gerando a subnutrição primária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Suas causas incluem o aporte inadequado de alimentos necessários para o desenvolvimento e o ótimo funcionamento do organismo (VALADARES, 2006).

Na fase adulta, a subnutrição pode aumentar o risco de desenvolver doenças como diabetes, hipertensão, e obesidade (CLEMENTE et al., 2011). Além disto, em crianças e adolescentes com sobrepeso ou baixa estatura, a pressão arterial pode-se apresentar alterada, concomitante com os níveis de glicose e de insulina (SANTOS et al., 2010).

Durante o período materno, a subnutrição pode gerar complicações na gravidez, causando alterações no metabolismo materno e redução da massa placentária e fetal (CLEMENTE et al., 2012). Essa redução placentária deve-se a redução da ingestão de proteínas e do conteúdo lipídico da glândula mamária, bem como, das alterações hormonais, como a prolactina, a leptina, o glucagon e a insulina (BALLEN et al., 2009). Essa restrição da dieta altera o conteúdo lipídico, que por sua vez, sinaliza ao hipotálamo e aumenta a quantidade de leptina, consequentemente há um aumento da prolactina, contribuindo para manter o consumo alimentar elevado e estimular o crescimento fetal (SMITH; WADDEL, 2003).

No período gestacional ocorre intensa proliferação celular e, dependendo do momento, da duração e da intensidade em que ocorra a subnutrição, esta pode gerar efeitos nocivos, algumas vezes, irreversíveis (BOLDRINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2010). Diversos sistemas corporais, como o esquelético e o articular, sofrem alterações devido aos efeitos da subnutrição, reduzindo o crescimento tibial e femoral em 8,7% (REGA; COSTA-NEVES, 2010). Os efeitos também podem ser observados em proles subnutridas desde o desmame, causando redução do peso corporal, promovendo prejuízos à estrutura óssea (MONTEIRO et al., 2010) e interferindo no crescimento ósseo (YANAGUIZAWA et al., 2008).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO E DA CARTILAGEM ARTICULAR

O osso é um tecido mineralizado e sua formação envolve uma atividade de remodelação e de reparação óssea (AMADEI et al., 2006). Esta atividade é realizada por dois tipos de células: os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas), fornecendo um reservatório de minerais (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003) e remodelando o tecido ósseo; e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção de tecido ósseo, o que lhes confere diversas funções, tanto mecânicas quanto metabólicas (SODEK; MCKEE, 2000).

A matriz óssea é responsável pela viscoelasticidade e força tensil do osso, além disto, é composta por 90% de colágeno tipo I (CROCI et al., 2003). Acredita-se que os osteócitos, situados em cavidades ou lacunas no interior da matriz, sejam responsáveis pelo remodelamento ósseo e pela transmissão de estímulos aos osteoblastos e osteoclastos (GUSMÃO; BELANGERO, 2009). O processo de reparação óssea, também é controlado por uma cascata de eventos regulada por vários hormônios, fatores de crescimento e citocinas (GINANI; BARBOSA, 2011).

Os processos de formação e reabsorção óssea são processos contínuos no organismo (CARDOSO et al., 2010) e, são afetados por fatores locais e externos (AMADEI et al., 2006). Estes processos são realizados através de métodos de diferenciação do mesênquima denominados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003). A ossificação endocondral, responsável pelo desenvolvimento e crescimento dos ossos longos, é caracterizada por um processo de formação óssea inicial (centro de ossificação), a partir de um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é substituído por tecido ósseo (OH et al., 2012).

O tecido ósseo apresenta-se de duas formas: compacto e esponjoso. Nas extremidades dos ossos longos localizam-se as epífises, formadas, em maior parte, por osso esponjoso e uma delgada camada superficial de osso compacto e, a diáfise (corpo do osso), quase totalmente compacta, exceto pela cavidade medular e, com pequena quantidade de osso esponjoso. Nas epífises encontram-se as superfícies e cartilagens articulares (ROSS; PAWLINA, 2008). Estas cartilagens são responsáveis pelo crescimento longitudinal e transversal da diáfise, como também, pela forma do osso. A linha epifisial é responsável pelo crescimento ósseo (YANAGUIZAWA et al., 2008).

As superfícies articulares são recobertas por cartilagem hialina, responsáveis pela redução da fricção e da carga mecânica das articulações sinoviais, bem como, facilita o deslizamento dos ossos nas articulações. Essa cartilagem é um tecido avascular, ausente de nervos e circulação linfática (GOBBI et al., 2010), o que limita a capacidade regenerativa, devido à incapacidade dos condrócitos de se diferenciar e se multiplicar (NETO et al., 2010).

Estas superfícies articulares são constituídas de células: os condrócitos, os condroblastos, como também, de matriz extracelular, de água e de macromoléculas (proteoglicanas e colágeno) (VELOSA et al., 2007) e, ainda, pelo osso subcondral (GOBBI, 2010). Os condrócitos, incorporados e encontrados em um fluido abundante, a matriz extracelular, são células secretoras de colágeno, principalmente tipo II, de proteoglicanas e glicoproteínas (GANNON; NAGEL; KELLY, 2012).

A cartilagem articular possui espessura variável e apresenta uma estrutura organizada em camadas, baseadas na orientação das fibras colágenas, nos diferentes tamanhos de células e na composição biomecânica da matriz extracelular (KOBINA et al., 2012). Desta forma, a cartilagem pode ser dividida em quatro camadas: superficial, média (transicional), profunda (radial) e calcificada (TEMENOFF; MIKOS, 2000; KRAUS et al., 2010).

A camada **superficial (s)** é a mais fina, formada por duas camadas distintas, sendo que uma é acelular, com predominância de fibras colágenas (lâminas “*splendens*”), abrangendo a articulação. A outra camada é constituída por condrócitos achatados, com eixos longos, paralelos à superfície articular, circundados por fibras de colágeno do tipo II (TEMENOFF; MIKOS, 2000). Esta camada tem por função resistir à compressão e à tração. Na camada **média (m)**, localizada abaixo da camada superficial, os condrócitos apresentam-se esféricos e distribuídos ao acaso dentro da matriz. As fibras colágenas são menos organizadas e estão dispostas em uma orientação oblíqua em relação à superfície. A camada **profunda (p)**, geralmente maior, caracteriza-se por pequenos condrócitos arredondados, dispostos em fileiras, perpendiculares à superfície da articulação e, por fibras colágenas, com maior diâmetro, posicionadas entre as colunas paralelas ao eixo longitudinal do osso. Por fim, uma camada **calcificada (c)**, caracterizada por uma matriz calcificada com a presença de poucos condrócitos indicando menor atividade metabólica, encontra-se situada acima ao osso subcondral e está separada da camada profunda por uma linha lisa e intensamente calcificada, chamada de “*tidemark ou linha d’água*” (KRAUS et al., 2010; WANG et al., 2011; DESROCHERS; AMREIN; MATYAS, 2012) (Figura 3).

Figura 3 – Demonstração das estruturas da cartilagem articular

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: As figuras ilustram os componentes celulares e colágenos da cartilagem articular, organizados nas camadas superficial (s), média (m), profunda (p) e calcificada (c). Coloração: HE; Objetiva: 40X. Coloração: Picrosirius; Objetiva: 16X

O osso subcondral, por sua vez, está associado diretamente com a cartilagem articular, influenciando no efeito mecânico. Tal alteração pode afetar a integridade estrutural e funcional da cartilagem (XIE et al., 2012). Além disto, anormalidades no osso subcondral, tais como na densidade mineral óssea e na cartilagem não calcificada, pode comprometer a remodelação da camada calcificada (VALVERDE-FRANCO et al., 2012).

No entanto, têm sido relatado que o desenvolvimento saudável da cartilagem pode ser estar associado a compostos polifenólicos, que inibem os radicais livres, através de vias pró-inflamatórias, impedindo a destruição e a perda de proteoglicanas (ELMALI, 2007).

2.3 O RESVERATROL: CONCEITOS E REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS

O resveratrol (RES) (3,5,4'-triidroxiestilbeno) é uma fitoalexina polifenólica, pertencente à família dos estilbenos (PANDEY; RIZVI, 2010). Os compostos fenólicos são substâncias responsáveis por conceder propriedades sensoriais às plantas. Estes, por sua vez, têm a qualidade de fitoalexina, que são sintetizadas por plantas sob condições de estresse ambiental (SANTOS; VEIGA; RIBEIRO, 2011), através de infecções fúngicas ou exposição à radiação ultravioleta (BERTAGNOLLI et al., 2007). Os efeitos do resveratrol estão atribuídos às fortes propriedades antioxidantes deste composto (PANDEY; RIZVI, 2010), bloqueando os radicais livres em diversos tecidos (ELMALI, 2007).

O resveratrol é uma substância orgânica encontrada em várias partes da videira, em algumas espécies de plantas (BERTAGNOLLI et al., 2007), bem como, em vários produtos alimentares, dentre eles o amendoim, a amora (DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2007), a uva, assim como, no vinho tinto. Nestes dois últimos, principalmente na uva, o resveratrol encontra-se em níveis mais elevados na casca (50 – 100µg/g), e nos vinhos, em uma concentração de 1,5 – 2mg/L (ELMALI, 2007). Pode ser encontrado sob duas isoformas: o trans-resveratrol (t-RSV) e o cis-resveratrol (c-RSV). O isômero trans é a forma mais estável quando protegida da luz e pode ser convertido em cis-resveratrol quando exposto a radiação ultravioleta e pH elevado, sendo facilmente oxidável (SAUTTER et al., 2005).

O interesse por este composto é crescente na última década (SANTOS; VEIGA; RIBEIRO, 2011), sugerindo que possa desempenhar um papel importante na prevenção de várias doenças (PANDEY; RIZVI, 2010). Este interesse está associado às fortes atividades terapêuticas do resveratrol (SANTOS; VEIGA; RIBEIRO, 2011), devido principalmente, às suas propriedades antioxidante, anti-agregação plaquetária, cardioprotetora (MATOS et al., 2011), neuroprotetora, anticarcinogênica, anti-envelhecimento (PANDEY; RIZVI, 2010), antidiabética (JENSEN et al., 2010), antiinflamatória (SANTOS; VEIGA; RIBEIRO, 2011) e condroprotetora (IM et al., 2012).

Este composto é absorvido pelo intestino delgado e sua metabolização é feita por enzimas hepáticas, sendo que sua capacidade máxima antioxidante é alcançada entre 1 a 4 horas após a sua ingestão (LEKAKIS et al., 2005). Após sua absorção, podem ser observados efeitos deste em diversos órgãos como no fígado, nos rins, nos pulmões, no baço, no encéfalo, no coração, nos testículos, entre outros (SANTOS; VEIGA; RIBEIRO, 2011).

O RES atua, principalmente, no controle do metabolismo, aumentando a densidade mitocondrial e o estado de defesa antioxidante (ZHENG et al., 2011). Em pacientes subnutridos, há alterações metabólicas da glicose e da insulina, bem como, uma diminuição na oxidação de gorduras e aumento da pressão sanguínea, ocasionando doenças na fase adulta (SAWAYA, 2006). Evidências sugerem que os efeitos protetores deste componente podem diminuir o estresse oxidativo, bem como, o risco de doenças (BAUR; SINCLAIR, 2006), através de vias que inibem o fator NF- κ B, responsável por sinalizar a inflamação do tecido, inibindo a atividade ciclo-oxigenase 2, que atua nos adipócitos (ELMALI et al., 2007; WANG et al. 2012), dessa forma protegendo contra o desenvolvimento da obesidade e prevenindo contra o diabetes tipo 2 (FRÖJDÖ et al., 2008), típico de pessoas subnutridas (SAWAYA, 2006).

Os efeitos deste antioxidante também podem proteger contra a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), captando os radicais livres, evitando a progressão da oxidação e auxiliando contra o desenvolvimento de aterosclerose (ZOU et al., 2000). Além disto, o estresse oxidativo, resultado da produção de radicais livres em excesso, é diminuído, melhorando a sensibilidade á insulina (BRASNYÓ et al., 2011).

Estudos mostraram que as propriedades do RES, em animais que receberam uma dieta hipercalórica, apresentaram vida útil mais longa, incluindo, sensibilidade á insulina, que reduz os níveis de IGF-I, e aumenta o nível da proteína quinase, a qual consequentemente eleva o número e função mitocondrial (BAUR et al., 2006).

Nos condrócitos de pacientes com osteoartrite, os efeitos antioxidantes do RES promoveram elevação da síntese de proteoglicanas, bem como, induziu os efeitos catabólicos, prevenindo a apoptose dos condrócitos, através da inibição da despolarização da membrana mitocondrial e da COX-2 (inflamação) (atividade ciclo-oxigenase 2) (DAVE et al., 2008).

Desta forma, a suplementação de RES pode reduzir os radicais livres, gerados pelo estresse oxidativo, diminuir a perda de proteoglicanas, estimular a proliferação e a diferenciação osteoblástica e, ainda, aumentar a resistência óssea (MIZUTANI et al., 1998; ELMALI et al., 2005).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Dentre os fatores extrínsecos ao organismo capazes de desencadear morbidades, cujas sequelas podem se tornar irreversíveis, destacam-se os diferentes estados de subnutrição. Aproximadamente 43% das crianças, em países em desenvolvimento, apresentarão um quadro de subnutrição em algum momento da vida. Estima-se, nesses países, que mais de um terço das crianças menores que 5 anos de idade sofrem de subnutrição grave ou moderada, desencadeando doenças crônicas durante a fase adulta. Particularmente, o Brasil pertence ao grupo dos 42 países do mundo que respondem por 90% das mortes decorrentes de algum tipo de subnutrição. Assim, a subnutrição é uma das doenças que mais causa mortalidade em crianças abaixo dos 5 anos de idade. Considerando-se que muitos dos estudos sobre subnutrição têm se desenvolvido com o intuito de entender seus efeitos no desenvolvimento dos diversos órgãos, poucos são aqueles que avaliam sua repercussão sobre a ótica da reabilitação e ou da suplementação, onde efeitos morfológicos importantes têm sido descritos.

Numa tentativa de se evitar a morbidade e mortalidade mundiais decorrentes da subnutrição, novas abordagens sobre a recuperação nutricional e tratamentos de distúrbios associados, têm sido empregadas, nem sempre capazes de reverter quadros considerados mais severos. Desta forma, tem sido descrito que muitas substâncias utilizadas como suplementação poderiam auxiliar nessa recuperação, como é o caso específico do resveratrol, um componente encontrado em abundância na natureza e em diversos produtos alimentícios que, é administrado e absorvido com facilidade em humanos, que pode atuar no controle do metabolismo e auxiliar na proteção contra doenças. Além disso, o resveratrol exibe funções complementares como as antioxidantes, as antiinflamatórias e as condroprotetoras, capazes de evitar a perda de proteoglicanas e estimular a proliferação e a diferenciação celular

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Ao se observar o panorama resultante dos efeitos da subnutrição sobre os diferentes órgãos e tecidos, pretende-se na presente pesquisa avaliar na cartilagem articular do joelho, os aspectos estruturais decorrentes da subnutrição pré e pós-natal e se há a possibilidade de recuperação com um restabelecimento protéico da dieta, e/ou suplementada com resveratrol.

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar no tecido cartilagíneo da articulação do joelho de ratos Wistar, os efeitos da subnutrição e renutrição protéica ou com resveratrol (RES).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos animais submetidos às diferentes rações normoprotéica, hipoprotéica e suplementada com resveratrol:

1. As características físicas e metabólicas;
2. A massa corporal em diferentes períodos de vida;
3. Os padrões metabólicos de ingestão (alimentar e hídrica) e de excreção (fezes e urina);
4. Os componentes estruturais celular, cartilagíneo e de colágeno, qualitativamente;
5. Quantitativamente, o número de condrócitos, a densidade de volume e a área dessas células nas camadas da cartilagem articular;
6. Os aspectos tridimensionais da cartilagem articular;
7. A ultraestrutura dos condrócitos e da matriz cartilagínea, constituintes da cartilagem articular.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este tópico compreende a descrição detalhada, em ordem cronológica, da metodologia utilizada. A presente pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III - Universidade de São Paulo (ICB III - USP).

5.1 ACASALAMENTO E GESTAÇÃO

Para a formação dos grupos experimentais, foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, não consanguíneos, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do mesmo instituto. Os animais utilizados neste experimento foram mantidos de acordo com os princípios da Comissão de ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – protocolo nº 2844/2012.

Os animais foram alojados em gaiolas plásticas de polipropileno, medidas 41x34x16cm, com cama de maravalha autoclavada e dispostas em estante vertical. Esses foram acondicionados em salas climatizadas, com a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), e fotoperíodo (ciclo claro/escuro – 12 horas cada). A água e a ração padrão do biotério (NUVILAB) foram oferecidas sem restrições.

Para o acasalamento foram utilizados animais com idades entre 60 e 90 dias, e peso entre 280 e 320 gramas, durante um período de 10 dias. A partir do primeiro dia de acasalamento, os animais que antes recebiam a dieta padrão do biotério (pelets), passaram então, a receber sem restrições (“*ad libitum*”) a dieta AIN-93G em pó, específica para crescimento de roedores, de acordo com os grupos experimentais, estabelecida em conformidade com o protocolo preconizado pelo “*American Institute of Nutrition*” (REEVES; NIELSEN; FAHEY-JÚNIOR, 1993). No acasalamento, foi utilizado o sistema poligâmico, ou seja, 1 macho para 2 fêmeas, sendo que estas foram induzidas ao ciclo estral (com duração de 4 a 5 dias) através do contato com a urina do macho, ativando o ciclo ovariano. Para isto, as gaiolas das fêmeas foram colocadas em proximidade ao do macho, no período de 2 dias, para adaptação. Posteriormente, as fêmeas foram alocadas na gaiola em que se encontrava o macho

e vice-versa, durante 2 dias. Após este período, o macho foi introduzido na gaiola que se apropriavam as fêmeas. Findo os 10 dias, as fêmeas foram separadas, em gaiolas individuais, do macho e entre si, durante toda a gestação e a lactação.

Após o nascimento, foram realizadas a sexagem (através da distância anogenital) e a padronização do número de filhotes por matriz, priorizando-se a permanência de 6 filhotes, preferencialmente machos, sendo os animais excedentes destinados a outros estudos desenvolvidos em nosso laboratório (LAFACC/ICB/USP). Estes machos (filhotes da mesma ninhada) foram selecionados através de comparações entre os tamanhos, como também, da quantidade de leite no estômago, caracterizado por uma mancha branca no abdome. O desenvolvimento físico das ninhadas foi analisado através do número de filhotes, pesos corporais, bem como, o descolamento das orelhas, o aparecimento de pêlos e a abertura dos olhos.

5.2 OBTENÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste item foram descritos os critérios para a formação dos grupos experimentais N21, S21, N60, S60, RN60 e RES60, utilizando-se 9 animais/grupo.

5.2.1 Formação dos grupos de 21 dias (N21 e S21)

Esses grupos foram formados desde o acasalamento, onde os animais receberam uma ração específica e foram mantidos com a mesma até que os filhotes atingissem 21 dias (eutanásia). Desta forma, consideraram-se como pertencentes ao grupo **N21** (normal ou nutrido), os animais submetidos à dieta protéica ou normoprotéica (20% de caseína); e aqueles submetidos à dieta hipoprotéica (5% de caseína), formaram o grupo **S21** (subnutrido).

5.2.2 Formação dos grupos de 60 dias (N60, S60, RN60 e RES60)

Para a formação desses grupos, os animais receberam uma ração específica até os 21 dias (desmame), a partir dessa data, foram mantidos com suas respectivas rações até que atingissem 60 dias (eutanásia). Desta forma, consideraram-se como pertencentes ao grupo **N60**, os animais submetidos à dieta protéica ou normoprotéica (20% de caseína); e aqueles submetidos à dieta hipoprotéica (5% de caseína), formaram o grupo **S60**. Os grupos recuperados foram constituídos pelos animais do grupo S, que aos 22 dias passaram a receber a dieta específica. Desta forma, consideraram-se pertencentes ao grupo **RN60**, os animais submetidos à dieta protéica ou normoprotéica (20% de caseína); aqueles submetidos à dieta protéica e suplementada com resveratrol (20% de caseína + $22,4 \pm 0,4 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (BAUR et al., 2006), constituíram o grupo **RES60**.

Os dados referentes às rações (Rhoster Indústria e Comércio Ltda) utilizadas e a formação de todos os grupos experimentais (N21, S21, N60, S60, RN60 e RES60) estão representados na figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 – Composição das rações (%)

Ração AIN-93G	Ração Normoprotéica	Ração Hipoprotéica	Ração Resveratrol
Umidade	8,4	7,8	8,4
Proteína bruta	20	5,2	20
Extrato etéreo	7,2	7,0	7,2
Matéria fibrosa	4,1	5,0	4,1
Matéria mineral	2,8	2,8	2,8
Cálcio	0,56	0,5	0,56
Fósforo	0,26	0,3	0,26
Carboidrato	58,95	72,2	57,28
Kcal/g Dieta	3,8	3,73	3,75

Fonte: (Rhoster indústria e comércio LTDA, Araçoiaba da Serra, SP., Brasil, 2012.)

Legenda: Demonstrativo da composição das rações normoprotéica (padrão), hipoprotéica e resveratrol.

Figura 5 - Obtenção dos grupos experimentais

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Fluxograma correlacionando os eventos realizados para a formação dos grupos experimentais nos diferentes períodos.

5.3 ANÁLISES METABÓLICAS

Os animais dos grupos N60, S60, RN60 e RES60 mantidos em gaiolas plásticas até completarem 21 dias de idade (desmame), foram alocados em gaiolas metabólicas (TECNIPLAST®, modelo 3701M081) localizadas em sala restrita no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) (Figura 6).

Figura 6 - Gaiolas Metabólicas

Fonte: (LUIZ, 2012)

Legenda: Monitoramento dos animais. (A) Gaiola metabólica. Bebedouro (Seta azul), Gavetas de alimentação (Seta verde), Tubo coletor para desperdício de água (Seta roxo), Tubo coletor de urina (Seta rosa), Tubo coletor de fezes (Seta branca). (B) Estante vertical com 12 gaiolas metabólicas. (C) Caixas de polipropileno.

As gaiolas comportam uma câmara de alimentação bi-partida, localizada fora da gaiola, objetivando captar os restos de alimentos, impedindo a contaminação com as fezes, como também, o desperdício de ração. Além disto, possuem recipiente para líquidos, tubos de coleta de urina e de fezes, tubos de coleta de desperdício de ração e de água, bem como, dreno (funil de coleta com cone separado) para o desperdício de líquidos e sólidos (Figura 7).

Figura 7 - Monitoramento dos animais nas gaiolas metabólicas

Fonte: (INSTRULAB, 2014)

Legenda: Representação ilustrativa do manejo dos animais nas gaiolas metabólicas.

Durante o período das análises metabólicas, foi realizado monitoramento em três períodos, contados a partir do desmame, durante 6 dias por período, sendo que o primeiro (Inicial) compreendido entre 21° ao 26° dia, o segundo (Inter) entre o 37° ao 42° dia e o terceiro (Final) entre o 55° ao 60° dia. Em cada período, diariamente, entre 10:00 e 12:00 horas os animais eram visitados para mensuração de dados como massa corporal, ingestão de ração e água, excreção de fezes e urina, como também, o desperdício, tanto de ração quanto de água; reposição de ração e água e higienização das gaiolas metabólicas. Todos os parâmetros foram obtidos por meio de balança de precisão (MARTE, modelo AS1000C) e registrados em ficha específica individual.

Após as avaliações macroscópicas, os animais de todos os grupos experimentais (N21, S21, N60, S60, RN60 e RES60) foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIII/USP).

5.4 OBTENÇÃO DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO

Após incisão sagital da pele na região do joelho, que foi completamente retirada a fim de se expor a musculatura adjacente, procedeu-se á dissecação da região, com o intuito de observar os ossos fêmur e tíbia, bilateralmente. Em seguida, foi realizada uma incisão transversal, tomando-se como referência a diáfise dos ossos, desprezando-se as epífises proximal, do fêmur, e distal, da tíbia.

5.5 AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS

As articulações do fêmur e da tíbia de cada animal foram dissecadas e imersas em solução fixadora de formalina 10%, por 5 dias. Findo esse período, as amostras foram descalcificadas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), a 7%. O teste de descalcificação (solução na qual o espécime estava imerso e solução de oxalato de amônio, a 5%, na proporção de 5:1) foi realizado para avaliação do conteúdo mineral. Após a

descalcificação, os espécimes foram imersos em solução de sulfato de sódio (5%), por 24 horas, posteriormente desidratados em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto), diafanizados em xilol, incluídos rotineiramente em parafina histológica e submetidos a secções sagitais, 5 µm de espessura, em micrótomo (Leica SM 200R). As secções foram acomodadas em lâminas histológicas e mantidas em estufa a 57°C, para desparafinização. As secções assim obtidas foram utilizadas para as diferentes técnicas histológicas.

Todos os preparados histológicos foram observados em microscópio (Carl Zeiss, modelo Axioscope 40). As alterações foram documentadas através do sistema de análise de imagem (Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioscope 40 e câmera Axiocam ligados ao software Axiovision). E quando necessário, foram fotografadas em lupa estereoscópica (Carl Zeiss Microimaging, Modelo Stemi®, SV6) com câmera digital acoplada (Power Shot A640, Canon, China.).

5.5.1 Evidenciação do aspecto geral da articulação do joelho

Para a avaliação qualitativa do aspecto geral da articulação do joelho, as secções sagitais foram coradas pelo método histológico de Azul de toluidina a 1% (aproximadamente 1 minuto), lavadas em água corrente, para retirar o excesso.

5.5.2 Evidenciação dos aspectos gerais do tecido cartilágneo através do método de Hematoxilina-Eosina (HE)

As características da cartilagem articular foram analisadas através da coloração dos cortes pela técnica de Hematoxilina-eosina (HE) (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976), possibilitando evidenciar o aspecto geral da cartilagem articular do fêmur e da tíbia. Para esta técnica as lâminas foram submersas na solução de hematoxilina por 3 minutos. Findo o período, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 5 minutos, e submersas na solução de eosina, por 1:15 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas para tirar o excesso de corante, desidratadas em série crescente de álcoois (2 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 minutos cada) e montadas entre lâmina e lamínula com meio apropriado.

5.5.3 Evidenciação da matriz extracelular (MEC) através do método de Safranina-O

A técnica de coloração Safranina-O (LUNA, 1968) confere à matriz da cartilagem articular diferentes tonalidades de vermelho, indicando quantidades de proteoglicanas constituintes da MEC. Para esta técnica, as secções permaneceram durante 3 minutos na solução de Safranina-O, posteriormente, lavadas em água corrente (2 minutos), desidratadas em álcoois 95% I e II (passagem rápida), álcoois absoluto I e II (2 minutos cada) e diafanizadas em xilol (2 minutos cada). Após esse processo, foram montadas entre lâmina e lamínula.

5.5.4 Evidenciação e tipificação das fibras colágenas através do método de Picrosirius

A avaliação qualitativa das fibras colágenas foi realizada em 25 cortes/grupo, corados pelo método histológico de Picrosirius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979) e avaliadas sob luz polarizada. Para esta técnica, as secções foram imersas durante 50 minutos na solução, posteriormente, lavadas em água corrente, para tirar o excesso, desidratadas em álcoois (2 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 minutos cada) e montadas entre lâmina e lamínula.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura foram utilizados 12 animais (n=2 por grupo), estes foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, perfundidos com a solução de *Karnovsky* modificada contendo glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (2%), em solução de cacodilato de sódio (0,1M), pH 7,4, durante 24 horas, à temperatura de 4° C (CIENA et al. 2012). As articulações do joelho foram dissecadas e as amostras da cartilagem articular foram fixadas na mesma solução durante 3 horas, à

temperatura de 4° C. As amostras foram submetidas às secções sagitais, em seguida, lavadas em solução tampão fosfato de sódio de (12 a 24 horas) e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio (1%). Posteriormente, desidratadas em série crescente de álcool (60% ao absoluto), seguida de imersão em solução de acetato de isoamila, durante 3 horas, à 4° C, e secas em aparelho ponto-crítico Balzers CPD-30, utilizando CO₂ líquido, de acordo com a técnica descrita por Bolina et al. (2013). As amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas, cobertas com íons de ouro (aparelho Balzers SCD-040), e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados 12 animais (n=2 por grupo), anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, estes foram submetidos a toracotomia adjacente ao gradil costal, com elevação do mesmo, seguida de perfusão transcardíaca com a solução fixadora de *Karnovsky* modificada (glutaraldeído à 2,5% e paraformaldeído 2%), em solução tampão fosfato de sódio, à 0,1M e pH= 7,4, injetando-se aproximadamente 80 ml da solução pelo ventrículo esquerdo do coração (CIENA et al., 2010).

As articulações do joelho foram dissecadas e imersas em solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Findo este período, as amostras foram descalcificadas em solução de EDTA a 7%, por 6 meses. Após o processo de descalcificação, as amostras foram imersas em solução aquosa de sulfato de sódio (5%) para inibir o efeito do EDTA.

Posteriormente, as amostras foram, por 3 vezes, lavadas com a solução de tampão fosfato de sódio e, pós-fixadas com a solução de tetróxido de ósmio (1%), durante 2 horas, à 4° C. Novamente, as amostras foram lavadas em solução de tampão fosfato de sódio e contrastadas com a solução aquosa de acetato de uranila (0,5%), durante 12 horas, à temperatura ambiente e na ausência de luminosidade. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e 95%), álcool etílico absoluto (4x - 15 minutos em cada) e óxido de propileno (2x - por 15 minutos).

Após a desidratação, as amostras permaneceram por 4 horas em uma mistura de resina (Low Viscosity Embedding Média Spurr's Kit, Electron Microscopy Sciences, USA) e óxido de propileno (proporção de 1:1), sob agitação, em temperatura ambiente, para gradativa infiltração de resina no material. Em seguida, a mistura foi trocada por resina pura (12 a 18 horas), sob agitação, em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada por resina pura, juntamente com as amostras, e aquecidas por 1 hora, em estufa à 37° C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos do material.

Para o procedimento de inclusão das amostras os moldes retangulares de silicone foram preenchidos por resina pura e, mantidos por 5 dias, em estufa à 60° C, a fim de concretizar-se a polimerização do bloco.

Obtidos os blocos de resina, estes foram trimados para a realização de cortes semifinos (300 micrômetros) em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany) e corados pelo método de azul de toluidina (1%), para verificação da área em microscópio de luz. Posteriormente, selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos (60 nanômetros) em ultramicrotomo, coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uranila (4%), por 3 minutos, lavados em água destilada, e, novamente contrastados com a solução aquosa de citrato de chumbo (0,4%), por 3 minutos e lavados com água destilada (WATANABE; YAMADA, 1983). As telas foram examinadas aos microscópios eletrônicos de transmissão FEI - Morgagni 268D, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.

5.8 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

As mensurações foram realizadas nos cortes corados pelas técnicas: H.E (25 cortes/grupo, sendo avaliados em cada corte 3 campos (Região: Anterior, Média e Posterior) = 75 campos/grupo selecionados aleatoriamente através da tabela randômica - Anexo A) e Safranina-O (25 cortes/grupo). Foram utilizadas entre 100 e 200 medições por animal, considerando-se os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al., 1999), a fim se determinar os valores para cada parâmetro analisado.

5.8.1 Área da cartilagem

Para mensuração da área da cartilagem foram utilizados 25 cortes/grupo, fotografados em lupa estereoscópica (Carl Zeiss Microimaging, Modelo Stemi®, SV6) com câmera digital acoplada (Power Shot A640, Canon, China.).

5.8.2 Espessura da cartilagem articular

Para a realização da espessura da cartilagem articular foram utilizados 75 cortes/grupo. Destes foram selecionadas três regiões (anterior, média, posterior) equidistantes, nas quais foram mensuradas cinco medidas (μm), utilizando um sistema de imagem computadorizada (Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioscope 40 e câmera ligada ao software Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha).

Conforme ilustra a figura 8, as medidas foram realizadas desde a região mais superficial da camada articular até a camada calcificada.

Figura 8 - Fotografia demonstrando o *software* para a mensuração da espessura

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Representação da mensuração para espessura da cartilagem articular tibial. Coloração: HE; Objetiva: 10X.

5.8.3 Número de condrócitos por área (c/a)

Para a determinação do **c/a** foi utilizado o mesmo sistema de imagem computadorizada descrito no item 4.10.2, com o auxílio de um sistema teste (47,16 cm de altura e 62,88 cm de largura = $2.965,42 \mu\text{m}^2$ ou $0,002965 \text{ mm}^2$) (Anexo B), alocado sobre a imagem na tela do computador. Todos os condrócitos dentro do sistema foram contados, incluindo os que tocam a linha de inclusão (verde - pontilhada); os que estão na linha de exclusão (vermelha) não foram contados (Figura 9).

Figura 9 - Fotografia utilizando-se o sistema teste para a determinação do número de condrócitos/área

Fonte: (BOLINA, 2014)

Legenda: Sistema teste com linhas de inclusão e exclusão limitando a área de contagem de condrócitos.
Aumento: 100X. Técnica histológica: HE.

5.8.4 Densidade de volume dos condrócitos e da matriz (V_v)

Esse parâmetro (V_v), expressa a fração do volume ocupado pela estrutura de interesse, em relação ao volume total (volume referência) e foi determinado utilizando-se um sistema teste composto por 130 pontos equidistantes ($5,24 \mu\text{m}$) entre si (Anexo C).

Desta forma, como se verifica na figura 10, foram contados os pontos contidos no espaço referência (pontos pretos) e aqueles que tocaram os condrócitos (pontos amarelos). Posteriormente, dividiu-se o número de pontos amarelos pelo número de pontos pretos,

utilizando-se de acordo com Delesse (1847), Rosiwal (1898) e Thompson (1930), a seguinte equação:

$$V_v = \sum p_{\text{(estrutura de interesse)}} / \sum P_{\text{(espaço referência)}}$$

p = número total de pontos que tocam a estrutura de interesse;

P = número total de pontos no espaço referência.

Esta estimativa, que varia de 0 a 1, será transformada em porcentagem, multiplicando-se o resultado por 100 (HOWARD; REED, 2005).

Figura 10 - Fotografia sistema teste para a densidade de volume dos condrócitos e da MEC

Fonte: (BOLINA, 2014)

Legenda: Procedimento de quantificação dos pontos. Pontos que tocam os condrócitos (amarelos) e pontos do espaço referência (pontos pretos). Aumento: 100X. Técnica histológica: HE.

5.8.5 Área dos condrócitos

Para a quantificação da área, delimitada pelo sistema teste (Anexo B), os condrócitos, foram circundados utilizando-se o software de quantificação, obtendo-se medidas em μm^2 (Figura 11).

Figura 11 - Fotografia utilizando-se o sistema teste e o *software* para a mensuração da área dos condrócitos

Fonte: (BOLINA, 2014)

Legenda: Mensuração da área dos condrócitos. Aumento: 100X. Técnica histológica: HE.

5.8.6 Área da matriz extracelular

Para a quantificação foram utilizados 25 cortes/grupo. A região média de cada corte foi fotografada utilizando um sistema de imagem descrito no item 5.10.2. Após obtenção das imagens, a quantificação da área da matriz foi realizada no programa Image Pró Plus, selecionando-se a cor mais clara da imagem. Portanto, quanto mais alto o valor da área, menor a quantidade de matriz extracelular (Figura 12).

Figura 12 - *Software* utilizado para a mensuração da área da matriz MEC

Fonte: (BOLINA, 2014)

Legenda: Procedimento de quantificação da área da matriz extracelular. Aumento: 40X. Técnica histológica: Safranina-O.

5.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para as avaliações relativas aos dados metabólicos foi utilizada a Análise de Variância - ANOVA com dois fatores: Dieta (S60, N60, RES60 e RN60) e Período (I, II e III), considerando-se o Período como fator de medida repetida. Sempre que necessário aplicou-se pós-teste de *Bonferroni*.

Para as demais variáveis de interesse neste estudo, empregou-se a análise de variância - ANOVA com dois fatores: Dieta (N e S) e Idade (21 e 60 dias); e Análise de Variância – ANOVA com um fator Grupo (N60, S60, RES60 e RN60). Quando necessário aplicou-se comparações múltiplas pelo método de *Tukey*.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das análises qualitativas e quantitativas foram ordenados da seguinte maneira:

6.1 ASPECTOS FÍSICOS E METABÓLICOS

Neste item serão apresentados, para todos os grupos experimentais, os resultados referentes às características corporais gerais.

Através do protocolo utilizado para o monitoramento dos grupos experimentais acondicionados, no primeiro momento, em caixas e posteriormente nas gaiolas metabólicas, foram observadas diferenças físicas e comportamentais.

Desde o período de acasalamento, quando macho e fêmeas começaram a receber as rações específicas, normoprotéica e hipoprotéica, observou-se que o grupo nutrido acasalou-se mais facilmente comparado ao subnutrido, uma vez que esse último se estressava mais rapidamente, e, em alguns momentos impossibilitava o acasalamento. Após a prenhez, foi possível observar que as fêmeas subnutridas apresentaram um forte comportamento maternal, muitas vezes, carregando intensamente os filhotes de um lado para outro; além disso, o ganho de massa corporal foi menor nessas comparadas as fêmeas nutridas.

Após o nascimento dos filhotes, foi observado que os animais nutridos obtiveram menos filhotes (5 a 11) que os animais subnutridos (9 a 14). É importante ressaltar que apesar dos animais subnutridos apresentarem ninhadas maiores, a taxa de natimortos e de morte pós-natal foi mais elevada neste grupo. Normalmente as ninhadas eram reduzidas devido ao ato de canibalismo existente no grupo subnutrido, fenômeno que ocorria tanto entre mãe e filhote, como entre os próprios filhotes.

Durante o desenvolvimento físico das ninhadas do grupo N, observou-se que o processo de descolamento das orelhas ocorreu entre o 2º ao 3º dia; o aparecimento da lanugem entre o 5º ao 8º dia, e a abertura dos olhos entre o 12º ao 15º dia. A locomoção e a alimentação (ração) foram observadas a partir do 15º dia. Nos animais do grupo S estes processos se apresentaram, em média, com um dia de atraso, sendo que em relação à locomoção e à alimentação, os mesmos se tornaram independentes próximo ou no 21º dia.

Desde o nascimento, os pêlos dos animais dos grupos S (21 e 60) eram curtos e menos vistosos e de distribuição escassa, observando-se algumas vezes, pequenas áreas com alopecia. Quando do término dos diferentes tipos de tratamento (RN60 e RES60), a pelagem foi completamente recuperada. Todavia, logo após o início da recuperação no 22º dia, e por um período de aproximadamente uma semana, os animais do grupo RES60 exibiram áreas extensas de alopecia.

No período de monitoramento dos animais, foi possível observar que as fezes consistentes e de coloração variando do marrom escuro ao preto, características dos grupos N21 e N60, contrastaram com as fezes de aspecto pastoso e de coloração marrom claro dos grupos S21 e S60. Quanto ao grupo RN60 as fezes assemelhavam-se ora com aquelas do grupo N60, ora com as do grupo S60; entretanto, os animais do grupo RES60 exibiram características típicas daquelas verificada para o grupo N60. Quanto ao aspecto da urina, deve-se destacar que somente nos grupos S21 e S60 a mesma exibiu coloração escura, às vezes, com traços de sangue.

Os animais subnutridos (S21, S60) exibiram um comportamento hiperativo e de fuga quando da tentativa de manipulação, diferente do comportamento dócil e constante dos animais dos grupos nutrido (N21, N60) e recuperado (RN60, RES60).

Fisicamente, é importante ressaltar que os animais S21 e S60 apresentaram um tamanho corporal muito inferior comparativamente aos respectivos controles (N21 e N60). Tanto os animais dos grupos RN60 e RES60 assemelharam-se aos do grupo N60 relativamente a esse parâmetro (Figura 13).

A pele relativamente delgada, facilitando a exposição do fêmur e da tíbia, e ossos mais frágeis verificados quando da retirada da articulação do joelho foi uma característica somente dos animais subnutridos, tanto com 21 dias, como com 60 dias.

Figura 13 - Comprimento dos animais dos grupos experimentais

Fonte: (BOLINA, 2014)

Legenda: Observar, de cima para baixo, o comprimento dos animais de todos os grupos experimentais (N60, RES60, RN60, N21, S60 e S21).

6.2 ASPECTOS QUANTITATIVOS METABÓLICOS

Os resultados das avaliações metabólicas permitiram estabelecer as relações entre os processos nutricionais e as comparações funcionais descritas a seguir.

6.2.1 Massa corporal

Relativamente ao grupo N60, o grupo S60 apresentou 81,5% menor massa corporal. Enquanto que, os grupos recuperados, RN60 e RES60, apresentaram 39% e 28% de massa corporal menor, respectivamente. O grupo RES60 obteve 16% a mais de massa corporal que o grupo RN60 (Tabela 1; Figura 14).

Tabela 1 – Média ($\pm$ DP) das massas corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Massa Corporal (g)	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	68,61 $\pm$ 4,42	25,43 $\pm$ 2,04	35,66 $\pm$ 7,06	49,08 $\pm$ 2,71
Inter	214,90 $\pm$ 13,0	37,27 $\pm$ 6,09	97,19 $\pm$ 19,74	134,03 $\pm$ 5,26
Final	274,16 $\pm$ 15,57	50,50 $\pm$ 9,50	168,15 $\pm$ 22,53	196,37 $\pm$ 6,21
N60 $\neq$ S60, RN60 e RES60*				
S60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*				
REN60 $\neq$ RES60 (Inter e Final)*				
Inicial $\neq$ Inter $\neq$ Final (S60, N60, RN60, RES60)*				

Figura 14 - Representação gráfica da massa corporal (g)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da massa corporal (g) obtida nos períodos Inicial, Inter e Final de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias. ANOVA * $p < 0,05$

6.2.2 Ingestão alimentar e Excreção de fezes

Em referência aos animais do grupo N60, o grupo S60 apresentou redução de 74% de ingestão alimentar e 71% de excreção de fezes. Enquanto que, os grupos recuperados, RN60 e RES60, apresentaram 31% e 33% de ingestão e 20% e 37% de fezes, respectivamente (Tabelas 2 e 3; Figura 15).

Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) da ingestão alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Ingestão Alimentar (g)	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	10,09 $\pm$ 0,78	4,10 $\pm$ 1,15	4,82 $\pm$ 1,33	7,95 $\pm$ 0,39
Inter	20,92 $\pm$ 1,58	5,65 $\pm$ 1,07	12,33 $\pm$ 2,17	14,34 $\pm$ 0,29
Final	22,37 $\pm$ 0,69	5,78 $\pm$ 1,22	15,51 $\pm$ 1,99	15,01 $\pm$ 2,25
N60 $\neq$ S60 e RN60; N60 $\neq$ RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (N60, RES60)*		
S60 $\neq$ RN60 (Inter e Final); S60 $\neq$ RES60*		Inicial $\neq$ Inter $\neq$ Final (RN60)*		
REN60 $\neq$ RES60 (Inicial)*				

Tabela 3 – Média ($\pm$ DP) da excreção de fezes (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Fezes (g)	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	1,00 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,21	0,49 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,12
Inter	2,54 $\pm$ 0,46	0,80 $\pm$ 0,22	1,72 $\pm$ 0,33	1,87 $\pm$ 0,22
Final	2,77 $\pm$ 0,57	0,81 $\pm$ 0,28	2,22 $\pm$ 0,59	1,75 $\pm$ 0,21
N60 $\neq$ S60; N60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter, Inicial $\neq$ Final (N60, RN60, RES60)*		
S60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*				

Figura 15 - Representação gráfica da ingestão alimentar (g) e excreção de fezes (g)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) da ingestão alimentar (g) e excreção de fezes, obtidas nos períodos Inicial, Inter e Final de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias. ANOVA * $p < 0,05$

6.2.3 Ingestão hídrica e excreção de urina

O grupo S60, em relação ao N60 apresentou redução de 84% de ingestão hídrica e 93% de excreção de urina. Enquanto que, os grupos RN60 e RES60, apresentaram 47,5% e 41% de ingestão e 62% e 53% de fezes, respectivamente (Tabelas 4 e 5; Figura 16).

Tabela 4 – Média ($\pm$ DP) da ingestão hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Ingestão hídrica (ml)	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	13,97 $\pm$ 1,23	5,61 $\pm$ 1,07	10,30 $\pm$ 2,25	14,94 $\pm$ 1,66
Inter	51,60 $\pm$ 5,75	6,71 $\pm$ 1,57	22,52 $\pm$ 3,48	23,50 $\pm$ 3,33
Final	55,57 $\pm$ 8,03	9,07 $\pm$ 3,52	29,15 $\pm$ 4,74	32,77 $\pm$ 4,47
N60 $\neq$ S60; N60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (N60, RN60)*		
S60 $\neq$ RN60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter $\neq$ Final (RES60)*		
S60 $\neq$ RES60*				

Tabela 5 – Média ($\pm$ DP) da excreção de urina (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Urina (ml)	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	8,09 $\pm$ 1,45	1,10 $\pm$ 0,37	2,84 $\pm$ 1,36	6,27 $\pm$ 1,80
Inter	40,44 $\pm$ 6,24	1,40 $\pm$ 0,48	11,34 $\pm$ 2,86	13,52 $\pm$ 1,88
Final	43,21 $\pm$ 8,10	3,09 $\pm$ 1,55	16,35 $\pm$ 4,46	20,32 $\pm$ 4,57
N60 $\neq$ S60, N60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (N60, RN60)*		
S60 $\neq$ RN60 e RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Inter $\neq$ Final (RES60)*		

Figura 16 - Representação gráfica da ingestão hídrica (ml) e excreção de urina (ml)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) da ingestão hídrica (ml) e excreção de urina (ml), obtidas nos períodos Inicial, Intermediário e Final de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias. ANOVA * $p < 0,05$

6.2.4 Ingestão alimentar/Massa corporal e Ingestão hídrica/Massa corporal

O grupo S60 apresentou aumento de 38% da razão ingestão alimentar/massa corporal e redução de 11% da razão ingestão hídrica/massa corporal, com base no N60. Com relação ao S60, o RES60 apresentou aumento de 46% e 8% dessas razões (Tabelas 6 e 7; Figura 17).

Tabela 6 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/Massa corporal (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Ingestão Alimentar / Massa Corporal	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	0,057 $\pm$ 0,002	0,064 $\pm$ 0,018	0,053 $\pm$ 0,007	0,063 $\pm$ 0,002
Inter	0,040 $\pm$ 0,002	0,060 $\pm$ 0,006	0,051 $\pm$ 0,003	0,043 $\pm$ 0,002
Final	0,034 $\pm$ 0,001	0,047 $\pm$ 0,006	0,038 $\pm$ 0,005	0,032 $\pm$ 0,004
N60 $\neq$ S60 (Inter)*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (N60, RES60)*		
S60 $\neq$ RES60 (Inter e Final)*		Inicial $\neq$ Final (S60)*		

Tabela 7 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão hídrica/Massa corporal (ml/g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Ingestão Hídrica / Massa Corporal	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	0,196 $\pm$ 0,014	0,219 $\pm$ 0,044	0,279 $\pm$ 0,022	0,292 $\pm$ 0,037
Inter	0,237 $\pm$ 0,035	0,177 $\pm$ 0,027	0,233 $\pm$ 0,057	0,172 $\pm$ 0,021
Final	0,202 $\pm$ 0,035	0,179 $\pm$ 0,063	0,173 $\pm$ 0,032	0,165 $\pm$ 0,022
N60 $\neq$ RN60 (Inicial), N60 $\neq$ RES60 (Inicial)*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (RES60)*		
S60 $\neq$ RES60 (Inicial)*		Inicial $\neq$ Final (RN60)*		

Figura 17 - Representação gráfica das razões Ingestão alimentar/Massa corporal (g) e da Ingestão hídrica/Massa corporal (ml/g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) razões Ingestão alimentar/Massa corporal (g) e Ingestão hídrica/Massa corporal (ml/g).

6.2.5 Fezes / Ingestão alimentar e Urina / Ingestão hídrica

Relativamente á razão fezes/ingestão alimentar, não houve diferença significativa entre os grupos, apenas entre os períodos em decorrer da idade. Com relação á urina/ingestão hídrica em comparação ao N60 o grupo S60 apresentou redução de 58% e os RN60 e RES60 redução de 28% e 21%, respectivamente (Tabelas 8 e 9; Figura 18).

Tabela 8 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de fezes/Ingestão alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final. ANOVA * $p < 0,05$

Excreção de Fezes / Ingestão Alimentar	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	0,098 $\pm$ 0,008	0,115 $\pm$ 0,034	0,109 $\pm$ 0,008	0,089 $\pm$ 0,015
Inter	0,121 $\pm$ 0,014	0,146 $\pm$ 0,021	0,142 $\pm$ 0,013	0,132 $\pm$ 0,015
Final	0,124 $\pm$ 0,022	0,147 $\pm$ 0,034	0,142 $\pm$ 0,030	0,128 $\pm$ 0,030
Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (N60, S60, RN60, RES60)*				

Tabela 9 – Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de urina/Ingestão hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos Inicial, Intermediário e Final. ANOVA * $p < 0,05$

Excreção de Urina / Ingestão Hídrica	N60	S60	RN60	RES60
Inicial	0,583 $\pm$ 0,062	0,213 $\pm$ 0,057	0,260 $\pm$ 0,090	0,423 $\pm$ 0,087
Inter	0,782 $\pm$ 0,041	0,199 $\pm$ 0,058	0,498 $\pm$ 0,057	0,575 $\pm$ 0,025
Final	0,772 $\pm$ 0,037	0,323 $\pm$ 0,098	0,559 $\pm$ 0,062	0,613 $\pm$ 0,057
N60 $\neq$ S60, RN60, RES60*		Inicial $\neq$ Inter e Inicial $\neq$ Final (RES60)*		
S60 $\neq$ RES60, S60 $\neq$ RN60 (Inter, Final)*		Inicial $\neq$ Final (RN60)*		
RES60 $\neq$ RN60 (Inicial)*				

Figura 18 - Representação gráfica da razão Excreção de fezes/Ingestão alimentar (g) e Excreção de urina/Ingestão hídrica (ml)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) das razões Excreção de fezes/Ingestão alimentar (g) e razão Excreção de urina/Ingestão hídrica (ml), obtidas de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias.

6.3 ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS

Neste item serão apresentados, para todos os grupos experimentais, os resultados qualitativos referentes às características da cartilagem articular do fêmur e da tíbia.

6.3.1 Aspecto geral da cartilagem articular

As características estruturais da **cartilagem articular** do fêmur e da tíbia são evidenciadas na figura 19 e 20.

No grupo N21 (Figura 19 N21) tanto no fêmur como na tíbia as camadas constituintes da cartilagem articular superficial (**s**), média (**m**), profunda (**p**) e calcificada (**c**) estavam bem definidas. Comparativamente, a densidade de condrócitos no fêmur, foi menor do que a verificada na tíbia. No entanto, a densidade de MEC no fêmur foi maior nas camadas **s**, **m** e **p** (Figura 20 N21). No grupo S21 (Figuras 19 e 20 S21), a espessura da cartilagem articular tanto do fêmur como da tíbia aumentou; porém quando comparada com o grupo N21 a camada **s** do fêmur exibiu menor espessura e maior densidade de condrócitos. Ao contrário,

na tíbia predominou a densidade de matriz. Nesse grupo, não foi possível delimitar com precisão as camadas **m** e **p**.

Nos animais do grupo N60 (Figura 19 N60), todas as camadas (**s**, **m**, **p**, **c**) apresentaram-se delgadas. Na camada **s** do fêmur e na tíbia, observou-se homogeneidade na distribuição de condrócitos e matriz; nas camadas **m** e **p** os condrócitos estavam dispostos em grupo isógenos, com predomínio da densidade de MEC.; a camada **c** não se encontra em evidência (Figura 20 N60). Na cartilagem articular do fêmur dos animais do grupo S60 (Figuras 19 e 20 S60), a camada **m** revelou aspecto delgado, com predomínio de MEC; na tíbia, as camadas **s**, **m** e **p**, com quantidade de condrócitos relativamente maior, não estavam bem delimitadas.

O grupo RN60 (Figuras 19 e 20 RN60), não foi possível estabelecer nos dois ossos, os limites precisos entre as camadas **s**, **m**, **p** e **c**. Na tíbia, os condrócitos exibiram uma forte organização em fileira. No grupo RES60 (Figura 19 e 20 RES60) o aspecto da cartilagem articular foi semelhante no fêmur e na tíbia, com densidade maior de MEC, onde se destacaram agrupamentos de condrócitos (*clusters*), não observado nos demais grupos. Também foi nesse grupo que a camada **c** foi bem evidenciada.

Figura 19 - Aspecto geral da cartilagem articular do fêmur e da tíbia

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: A – Aspecto mesoscópico da articulação do joelho; Coloração: Azul de toluidina; Objetiva: 0,8X; N21 a RES60 - A área demarcada indica os cortes dos grupos, mostrando as camadas da cartilagem articular: (s) superficial, (m) média, (p) profunda e (c) calcificada; notar as diferenças nas distribuições das camadas; no RES60 observar os grupos isógenos, quadrado, em destaque; Coloração: HE; Objetiva: 20X.

Figura 20 - Aspecto dos condrócitos na cartilagem articular do fêmur e da tíbia

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: **A** – Aspecto mesoscópico da articulação do joelho; Coloração: Azul de toluidina; Objetiva: 0,8X; **N21 a RES60** - A área demarcada indica os cortes dos grupos N e S (21 e 60), RN e RES mostrando a densidade de condrócitos e matriz extracelular; maior densidade observada em 21 dias, diminuindo com a idade. No grupo RES60 observar os grupos isógenos, asterisco, em destaque; Coloração: HE; Objetiva: 100X.

6.3.2 Matriz extracelular (MEC)

As características da **MEC** da cartilagem articular do fêmur e da tíbia evidenciadas pela Safranina-O e estão expressas na figura 21.

Ao se comparar o fêmur e a tíbia dos grupos N21 e S21 (Figuras 21 N21, S21), não foram notadas diferenças quanto à intensidade de coloração. Já entre os grupos de 60 dias (N60 e S60) foi nítida a diferença entre eles nos dois ossos, com a cartilagem articular dos ossos dos animais subnutridos exibindo fraca intensidade de coloração (Figuras 21 N60, S60). Tomando-se o grupo N60 como referência, pode-se afirmar que a intensidade de coloração da MEC dos ossos do grupo RES60 foi a que mais se assemelhou com o padrão controle (Figura 21 RES60). No grupo RN60 notou-se um padrão de intensidade intermediário entre os grupos N60 e S60 (Figura 21 RN60).

Figura 21 - Avaliação da matriz extracelular da cartilagem articular do fêmur e da tíbia

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: **A** – Aspecto mesoscópico da articulação do joelho; Coloração: Azul de toluidina; Objetiva: 0,8X; A área demarcada indica os cortes dos grupos **N21 a RES60** -, mostrando as camadas das cartilagens articular: (**s**) superficial, (**m**) média, (**p**) profunda e (**c**) calcificada; – observar as diferenças da matriz extracelular, menos corada no grupo S60; Coloração: Safranina-O; Objetiva: 40X

6.3.3 Avaliação do colágeno

As características do **colágeno** da cartilagem articular do fêmur e da tíbia são evidenciadas na figura 22.

Avaliando-se em conjunto no fêmur e na tíbia, a distribuição das fibras colágenas dos tipos I (vermelho, laranja, amarelo), II (esverdeada ou azulada) e III (verde), muito embora tenham sido detectadas fibras do tipo II em pouca quantidade, verificou-se o predomínio do colágeno tipo I, principalmente na camada s, no grupo N21 e do tipo III no grupo S21 (Figuras 22 N21 e S21).

Entre os grupos N60 e S60 (Figuras 22 N60 e S60), a principal diferença relacionou-se às fibras colágenas do tipo II, ou seja, as mesmas predominaram nos animais nutridos. Não foram detectadas diferenças aparentes entre os grupos recuperados, onde foi nítido o predomínio das fibras colágenas do tipo II (Figuras 22 RN60 e RES60).

Figura 22 - Avaliação do colágeno da cartilagem articular do fêmur e da tíbia

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: **A** - Aspecto mesoscópico da articulação do joelho. Coloração: Azul de toluidina; Aumento: 0,8X. A área demarcada indica os grupos de **N21 a RES60**, mostrando os tipos de colágeno; predomínio de colágeno tipo II no grupo N60 comparado aos subnutridos (S21 e S60); **RN60 e RES60** – não apresentam diferenças aparente quanto ao colágeno. Coloração: Picrosirius; Objetiva: 16X e 40X.

6.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Através da análise tridimensional, confirmaram-se os dados qualitativos referentes à microscopia de luz (HE), particularmente sobre a espessura da cartilagem articular. Desta forma, o grupo N21 (Figura 23 N21) apresentou a cartilagem menos espessa no fêmur e na tíbia, quando comparado ao grupo S21 (Figura 23 S21).

Tanto no fêmur como na tíbia, manteve-se essa diferença entre os animais N60 e S60, com destaque para a camada **c** que, nos animais subnutridos ocupou uma grande parte da cartilagem articular (Figuras 23 N60 e S60).

Nos grupos recuperados (RN60 e RES60) (Figuras 23 RN60 e RES60) pode-se afirmar que a espessura da cartilagem articular exibiu padrão intermediário aos grupos nutrido e subnutrido dessa faixa etária, com o fêmur do grupo R60 exibindo a menor espessura de todos os grupos estudados.

Figura 23 - Espessuras das cartilagens articulares do fêmur e da tíbia

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: **A** – Eletromicrografia da articulação do joelho (a área demarcada indica os cortes de N21 a RES60); Aumento: 82X; **N21** e **21** – menor espessura das camadas da cartilagem articular: (**s**) superficial, (**m**) média, (**p**) profunda e (**c**) calcificada, evidenciada no grupo N21; **N60** e **S60** – observar a camada **c** presente no grupo subnutrido; **RN60** e **RES60** – apresentaram tamanho intermediário da espessura da cartilagem. Aumento: 586X.

6.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Por essa metodologia, foram avaliados, comparativamente entre os grupos, o retículo endoplasmático rugoso (RER), o nucléolo e a matriz extracelular, todas elas estruturas dependentes de conteúdo protéico.

Ao se analisar o RER, verificou-se nos animais N21 as cisternas com aspecto normal, e relativa quantidade de ribossomos em suas paredes, diferentemente do grupo S21, com cisternas irregulares e pobres em ribossomos; nos animais correspondentes de 60 dias (N60 e S60), foram mantidas as mesmas características (Figura 24 A-D-G-J). Entre os grupos de animais tratados, pode-se admitir que o grupo RN60 encontra-se como intermediário entre os grupos N60 e S60, ou seja, embora as cisternas se apresentem paralelas entre si e bem organizadas como nos animais nutridos, aparentemente a densidade de ribossomos encontra-se diminuída, assemelhando-se ao verificado nos animais subnutridos (Figura 24 M). Quanto às características do RER, o grupo tratado com resveratrol (RES60) foi aquele que mais se assemelhou aos animais nutridos (N60) (Figura 24 P).

O nucléolo dos animais do grupo N60 caracterizou-se pelo seu maior tamanho e consequente aumento de centros fibrilares e da região fibrilar. Os componentes da região granular exibiram eletrondensidade intensa. Nos grupos S60 e RN60 o nucléolo e seus componentes foram alterados, ao observar diminuição da região granular e fibrilar comparados ao grupo controle N60. Quanto aos animais RES60, o tamanho e os centros fibrilares apresentaram característica similar ao grupo N60 e às regiões fibrilar e granular foram parcialmente aumentadas (Figura 24 B-E-H-K-N-Q).

Relativamente às fibrilas colágenas da matriz extracelular verificou-se, quanto à espessura, uma grande densidade de fibras espessas nos grupos N21, N60 e RES60. Todavia, as estrias transversais características de fibras colágenas maduras, presentes nos grupos N60 e RES 60, não foram bem evidenciadas nos animais do grupo N21. Nos demais grupos (S21, S60 e R60) foi nítido o predomínio de fibrilas colágenas delgadas, e a baixa densidade das mesmas (Figura 24 C-F-I-L-O-R).

Figura 24 – Aspectos ultraestruturais da cartilagem articular

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Aspectos ultraestruturais dos grupos experimentais **N21** (A-B-C), **S21** (D-E-F), **N60** (G-H-I), **S60** (J-K-L), **RN60** (M-N-O) e **RES60** (P-Q-R). Observou-se diferenças no retículo endoplasmático rugoso, diminuição das cisternas e quantidade de ribossomos nos grupos S21, S60 (D-J) e semelhanças entre RES60 e N60 (G-P). No nucléolo do grupo N60 (H) foi evidente os componentes granular, eletrondenso, (seta) e fibrilar (*); entre os grupos tratados, observou-se essas mesmas características no grupo RES60 (Q). AS fibrilas colágenas apresentaram-se reduzidas nos grupos S21, S60 e RN60 (F-L-O), e maior densidade e diâmetro foram observados nos grupos N21, N60 e RES60 (C-I-R).

6.4 ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUANTITATIVOS

Neste item serão apresentados, para todos os grupos experimentais, os resultados quantitativos referentes à cartilagem articular do fêmur e da tíbia dos seguintes parâmetros: área da cartilagem, espessura da cartilagem, área da matriz extracelular (MEC), área dos condrócitos, número de condrócitos/área e densidade (Vv) condrócitos e matriz.

6.4.1 Área da cartilagem articular

Ao se analisar este parâmetro entre os grupos S21, S60, N21 e N60, na cartilagem do fêmur e da tíbia, os animais de 21 dias apresentaram maiores áreas comparados aos de 60 dias (40% menor no fêmur e 32% menor na tíbia), independentemente se N ou S (18% menor no fêmur e 33% menor na tíbia).

Quanto à análise da cartilagem do fêmur e da tíbia nos grupos N60, S60, RN60 e RES60, o grupo S60 mostrou menor área comparada aos demais (38% no fêmur e 41% na tíbia relativamente ao grupo N60); enquanto que, os grupos tratados não apresentaram diferença significativa ao grupo N60.

A tabela 10 ilustra os dados referentes à área da cartilagem.

Tabela 10 – Média ($\pm$ DP) da área das cartilagens dos grupos experimentais (mm²)

Área da cartilagem		Fêmur	Tíbia
N21		3,6 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,4
S21		3,4 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,2
N60		2,6 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4
S60		1,6 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,1
RES60		2,5 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,2
RN60		2,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,3
Fêmur	Fêmur	Tíbia	Tíbia
S21, S60, N21 e N60	S60, N60, RES e RN	S21, S60, N21 e N60	S60, N60, RES e RN
21d $\neq$ 60d p<0,001	S60 $\neq$ N60 p<0,05	21d $\neq$ 60d p<0,001	S60 $\neq$ N60 p<0,05
S $\neq$ N p=0,046	S60 $\neq$ RES p<0,05	S $\neq$ N p<0,001	S60 $\neq$ RES p<0,05
	S60 $\neq$ RN p<0,05		S60 $\neq$ RN p<0,05

6.4.2 Espessura da cartilagem articular

A análise entre os grupos S21, S60, N21 e N60 permitiu observar diferença significativa de 21 para 60 dias (67% menor no fêmur e 28% menor na tíbia) e entre S e N apenas no fêmur (24% maior); na tíbia, foi detectada diferença entre S21 e N21.

No entanto, na espessura dos grupos N60, S60, RN60 e RES60, em ambas as cartilagens, não foi possível detectar diferença significativa entre os grupos.

A figura 25 ilustra os dados referentes à espessura das cartilagens.

Figura 25 - Representação gráfica da espessura das cartilagens (μm)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) da espessura da cartilagem do fêmur e da tíbia dos grupos experimentais.

6.4.3 Área da matriz extracelular (MEC)

Os resultados da área da matriz foram realizados através da seleção de menor intensidade de coloração da cartilagem, como descrito no item 4.10.6, dessa forma, quanto maior os valores obtidos, menor a quantidade de matriz extracelular da cartilagem.

Relativamente à MEC, dos grupos S21, S60, N21 e N60, foi detectada no fêmur diferença entre os grupos N e S (123% maior) e entre 21 e 60 dias no grupo N (70% menor).

Na cartilagem da tíbia evidenciou diferença entre os grupos N e S (91% maior) e entre as idades 21 e 60 dias (49% menor).

Na cartilagem do fêmur e da tíbia, dos grupos S60, N60, RES60 e RN60 foi possível observar, em relação ao grupo N60, que o S60 apresentou 344% maior no fêmur e 259% maior na tíbia). Os grupos tratados (RES60 e RN60) apresentaram diferenças significantes entre si, mas, não foi evidenciada diferença entre N60 e RES60.

A figura 26 ilustra os dados referentes à área da matriz das cartilagens.

Figura 26 - Representação gráfica da área da MEC das cartilagens (μm^2)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) da área da MEC da cartilagem do fêmur e da tíbia dos grupos.

6.4.4 Área dos condrócitos

Ao se analisar este parâmetro entre os grupos S21, S60, N21 e N60, observou-se na cartilagem do fêmur que houve diferença significativa entre as idades de 21 para 60 dias (14% maior) e entre os grupos N e S (12% menor). Na cartilagem da tíbia, não houve diferença entre os grupos.

A análise da área entre os grupos N60, S60, RN e RES, mostrou diferença significativa apenas na cartilagem do fêmur entre S60 e RES.

A figura 27 ilustra os dados referentes à área dos condrócitos.

Figura 27 - Representação gráfica da área dos condrócitos das cartilagens (μm^2)

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias ($\pm$ DP) da área dos condrócitos da cartilagem do fêmur e da tíbia dos grupos experimentais.

6.4.5 Número de Condórcitos/Área

Relativamente aos grupos S21, S60, N21 e N60, o número de condrócitos por área apresentou diferença significativa na cartilagem do fêmur entre as idades de 21 e 60 dias (36% menor). Na cartilagem da tíbia, houve diferença entre os grupos N e S (28% maior) e entre as idades 21 e 60 dias (32% menor).

A análise entre os grupos N60, S60, RN60 e RES60, não mostrou diferença significativa na cartilagem do fêmur. Na cartilagem da tíbia, N60 apresentou diferença do S60 (22% maior).

A tabela 11 ilustra os dados referentes ao número de condrócitos/área das cartilagens.

Tabela 11 – Média ($\pm$ DP) do número de condrócitos/área das cartilagens do fêmur e da tíbia (mm^2)

Número de condrócitos/área		Fêmur	Tíbia
	N21	75,5 $\pm$ 5,0	84,5 $\pm$ 9,8
	S21	62,6 $\pm$ 5,3	71,9 $\pm$ 10,7
	N60	81,8 $\pm$ 8,9	88,7 $\pm$ 18,9
	S60	75,3 $\pm$ 4,4	82,9 $\pm$ 6,3
	RES60	86,7 $\pm$ 3,2	88,9 $\pm$ 6,0
	RN60	85,4 $\pm$ 5,3	102,9 $\pm$ 11,9
Fêmur	Fêmur	Tíbia	Tíbia
S21, S60, N21 e N60	S60, N60, RES e RN	S21, S60, N21 e N60	S60, N60, RES e RN
21d $\neq$ 60d p<0,001	Não detectado p=0,451	21d $\neq$ 60d p<0,001 S $\neq$ N p<0,001	S60 $\neq$ N60 p<0,001

6.4.6 Densidade de condrócitos e de MEC (Vv)

Relativamente á análise do Vv nos grupos S21, S60, N21 e N60, houve diferença significativa entre as idades (21 para 60 dias). Na cartilagem do fêmur o Vv de condrócitos foi 22% menor e de MEC 15% maior e, na tíbia, 16% menor condrócitos e 9% maior matriz.

Nos grupos S60, N60, RES60 e RN60, nas cartilagens do fêmur e da tíbia, não foram detectadas diferenças significantes entre eles.

A figura 28 ilustra os dados referentes ao Vv de condrócitos e MEC.

Figura 28 - Representação gráfica do Vv matriz e Vv condrócitos das cartilagens (%)

Fêmur
S21, S60, N21 e N60

21d ≠ 60d p<0,001

Fêmur
S60, N60, RES e RN
Não detectado p=0,888

Tíbia
S21, S60, N21 e N60
21d ≠ 60d p<0,001

Tíbia
S60, N60, RES e RN
Não detectado p=0,066

Fonte: (BOLINA, 2014).

Legenda: Médias (± DP) do Vv matriz e Vv condrócitos da cartilagem do fêmur e da tíbia.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos relacionados aos aspectos metabólicos, morfológicos macroscópicos e microscópicos.

7.1 CONSIDERAÇÕES MACROSCÓPICAS E METABÓLICAS

As médias dos parâmetros metabólicos analisados na presente pesquisa (massa corporal, ingestão alimentar e hídrica e excreção de fezes e urina) foram maiores no grupo N60, e menores no grupo S60; os grupos RN60 e RES60 exibiram resultados intermediários. Principalmente nos animais subnutridos, esses dados são relevantes, uma vez que estudos que avaliam a subnutrição desde a gestação e a lactação, que podem induzir graves alterações metabólicas (HOWIE; SLOBODA; VICKERS, 2012), além de causar efeitos nocivos, ou até mesmo, irreversíveis (OLIVEIRA et al., 2010).

Diante das alterações metabólicas, verificadas a partir do 21º dia até a fase adulta, foi possível evidenciar que a massa corporal no grupo N60 aumentou consideravelmente nos primeiros períodos analisados; no entanto, após o 42º dia, esse aumento foi gradativo e equilibrado. Além disso, o comprimento desses animais foi maior em relação aos outros grupos analisados. Já no grupo S60, além da evidente diminuição do comprimento, observou-se uma evolução precária da massa corporal durante todos os períodos analisados, reduzida drasticamente no final em 81,5% comparativamente ao controle. Esses dados assemelham-se aos animais do grupo N21, o que permite inferir que a subnutrição foi capaz de afetar o crescimento.

Esses resultados corroboram com as principais características observadas em humanos subnutridos, que são o baixo peso corporal e a redução do comprimento (SAWAYA, 2006). Dados similares foram encontrados em ratos por Abreu, Weckx e Hirata (2006) que relataram uma redução do peso corporal devido à subnutrição por 45 dias; Howie, Sloboda e Vickers (2012) ao observarem menor peso ao nascimento e do nascimento até o desmame (22º dia); Baptista et al. (2013) que detectaram diminuição do peso corporal em ratos subnutridos (5% de caseína) com 60 dias de idade; e Ayala-Moreno et al. (2013), que ao estudarem ratos

desnutridos durante a gestação e lactação, evidenciaram redução desses parâmetros nas proles desde o nascimento.

Segundo Ballen et al. (2009) esses eventos estão associados ao baixo teor de proteínas, o que pode causar modificação no metabolismo materno e na redução da massa placentária (CLEMENTE et al., 2012), bem como, possíveis alterações das glândulas mamárias (PINE; JESSOP; ALLAN, 1994; BALLEEN et al., 2009). Além disso, prejuízos no desenvolvimento geralmente associam-se a alterações da proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2010) que promovem prejuízos a estrutura óssea, e atuam em reposta a estímulos de crescimento (YANAGUIZAWA et al., 2008).

Os grupos tratados (RN60 e RES60) apresentaram aumento gradual da massa corporal desde os 21 até os 60 dias e retomada do comprimento, com o grupo RES60 exibindo maior ganho de massa corporal (16% a mais) comparado ao RN60, inferindo os efeitos benéficos do resveratrol em relação à esse parâmetro. Isto mostra que os tratamentos empregados por um período de 39 dias foram eficazes para esses parâmetros frente à subnutrição, porém, não suficientes para que fossem atingidos os resultados do grupo controle. Tais dados foram confirmados por Baptista et al. (2013) ao descreverem que a renutrição com 20% de caseína é eficiente para recuperar o peso corporal em animais subnutridos, mas não o suficiente para reestabelecer o padrão comparado ao grupo controle. Ainda, essas observações permitem concordar com Chen et al. (2012) que ao avaliarem a retomada do crescimento após restrição alimentar em ratos detectaram uma redução nos parâmetros ósseos e do peso corporal, e um aumento considerável da densidade mineral óssea após a realimentação com resveratrol, sem contudo atingirem os parâmetros descritos para o grupo controle.

Segundo Sawaya (2006), através da recuperação nutricional adequada pode haver recuperação do crescimento, o que evitaria na fase adulta o acúmulo de lipídios e, assim, diminuiria os riscos de doenças, como diabetes e cardiopatias. Tem sido relatado que o resveratrol seja capaz de diminuir a massa corporal, devido à redução dos lipídios (LAGOUGE et al., 2006). Tal afirmação é reforçada por Baile et al. (2011) e Dolinsky et al. (2011) que ao descreverem o tratamento com resveratrol em ratos alimentados com dietas hiper-lipídicas observaram efeitos sobre os adipócitos capazes de aumentar a lipólise e diminuir a lipogênese, com consequente diminuição do peso corporal. Para Baur et al. (2006) os efeitos do resveratrol ($22,4 \pm 0,4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) sobre ratos alimentados com uma dieta de alto teor calórico comprovou que o composto pode melhorar a sensibilidade à insulina e regular o teor de lipídios, prolongando a expectativa de vida, mesmo que o ganho de peso corporal nos ratos alimentados com resveratrol tenha sido menor do que o do grupo controle.

Os resultados aqui expostos permitem concordar em parte com esses autores uma vez que, embora tenha sido detectada uma diminuição de 28% na massa corporal dos animais do grupo RES60, a presente pesquisa carece de parâmetros morfométricos e fisiológicos do tecido adiposo desses animais.

Os valores para os parâmetros ingestão alimentar e hídrica, bem como de excreção de fezes e urina foram maiores no grupo N60, principalmente até os 42 dias com tendência logo após, à redução na ingesta de alimento e de água e eliminação de fezes e urina, como consequência da idade, ou seja, do 21º ao 60º dia. No grupo S60, esses parâmetros foram reduzidos consideravelmente, não apresentando diferenças significantes em nenhum dos períodos analisados, o que justifica a redução da massa corporal observada nesses animais. Os grupos tratados, (RN60 e RES60), apresentaram médias intermediárias, e recuperaram os parâmetros em relação ao grupo S60. No entanto, quanto à ingestão alimentar e hídrica do grupo RES60, no período entre 21 e 42 dias, não foram detectadas diferenças significantes em relação ao grupo N60, mostrando os benefícios do resveratrol frente à subnutrição, no início do tratamento.

Segundo Sawaya, (2003), em indivíduos subnutridos, como é o caso do grupo S60, a ingestão de alimentos é reduzida em decorrência da má absorção dos mesmos. Para Marques, Markus e Morris (2009) o aumento dos parâmetros da ingestão alimentar e hídrica, após a restrição protéica associado à suplementação com resveratrol, atuam aumentando o metabolismo celular, o que promove maior atividade mitocondrial com influência direta na capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos. Além disso, por ser absorvido rapidamente pelo intestino delgado (LEKAKIS et al., 2005) o resveratrol modula as vias intercelulares como a ativação do Sirt 1, uma proteína do grupo das sirtuínas, que atuam nas alterações metabólicas e aumentam a atividade oxidativa em diversos tecidos (FEIGE et al., 2008).

Em animais realimentados com 20% de caseína (RN60) e os subnutridos (S60) as fezes apresentaram-se pastosas, provavelmente devido à má adaptação da ração, fato destacado por Baptista et al. (2013) ao estudar o timo de ratos nutridos, subnutridos e recuperados proteicamente. No presente estudo, verificou-se que a consistência das fezes dos animais tratados com resveratrol (RES60) não diferiu daquela observada para o grupo controle (N60), o que permite supor que o resveratrol tenha contribuído para uma adaptação na absorção da ração com baixo teor de caseína empregada para os grupos S60 e RN60. Essa afirmativa é suportada pelas descrições de BAUR et al., 2006; LAGOUGE et al., 2006, que ao suplementarem a dieta de ratos com resveratrol, verificaram uma melhora na absorção intestinal desses animais.

Ao se avaliar a razão ingestão alimentar/massa corporal verificou-se que os grupos S60 e RN60 ingeriram mais quantidade de ração, proporcionalmente à massa corporal. Quanto às fezes/ingestão alimentar, apesar de não apresentar diferença entre os grupos, pode observar que houve tendência ao aumento das médias nos animais S60 e RN60. Esses dados indicam que os animais, subnutridos desde a gestação e lactação, demonstraram uma necessidade de se alimentar, com o intuito de suprir a carência protéica, devido à má adaptação e absorção do alimento pelo trato gastrointestinal. No entanto, dados inversos foram encontrados nos grupos N60 e RES60, que apresentaram médias inferiores. Além disso, o grupo RES60, demonstra um perfil muito semelhante ao grupo N60, podendo inferir que a suplementação com resveratrol tenha contribuído para suprir a carência protéica e auxiliado na adaptação e absorção da dieta imposta, recuperando os efeitos da subnutrição.

Os mecanismos do apetite são controlados por alterações de eixos hormonais que estão relacionados com o hipotálamo e a hipófise e, portanto, devem-se levar em consideração as ações da leptina e da grelina. A leptina, hormônio da saciedade, é secretada pelos adipócitos no organismo (quanto mais adipócitos, maior a quantidade de leptina) que sinalizam ao hipotálamo, e por sua vez envia sinais aos receptores de neurônios em resposta à restrição ou ingestão de alimentos (RIBEIRO et al., 2007; SAVINO et al., 2007). Dessa forma, a leptina auxilia na regulação da quantidade de energia armazenada e/ou da ingestão alimentar. Por outro lado, a grelina, ou hormônio da fome, atua estimulando o apetite (WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011; RIEDL et al., 2012; SHARMA et al., 2013). A perda da massa corporal, associada à subnutrição, aumenta os níveis de grelina, que por sua vez, aumenta a ingestão alimentar (RIEDL et al., 2012) e a atividade do Sirt 1, uma proteína da família das sirtuínas que modulam os processos metabólicos no hipotálamo (VELÁSQUEZ et al., 2011). O resveratrol aumenta o Sirt 1, que auxilia a coordenar mecanismos e respostas antioxidantes protetoras e regula a atividade da leptina (GRECO et al., 2011; TURAN; TUNCAY; VASSORT, 2012). A restrição protéica aqui empregada estimula os níveis séricos do hormônio de crescimento e resulta na diminuição da leptina (RIBEIRO et al., 2007) mantendo as atividades corporais através dos ácidos graxos (PIMSTONE et al., 1968). Com os dados obtidos na presente pesquisa, pode-se inferir que a secreção reduzida de leptina no tecido adiposo diminui o processo de retroalimentação da ingestão alimentar junto ao hipotálamo, fazendo o animal subnutrido ingerir alimento em excesso, sem contudo saciá-lo. No entanto, é possível supor que os benefícios antioxidantes do resveratrol, desde o período de adaptação da ração (entre o 21º ao 42º dia) até os 60 dias, tenham reestabelecido os mecanismos do apetite alterados pela subnutrição.

Ao avaliar as razões excreção de urina/ingestão hídrica e ingestão hídrica/massa corporal, observou-se que os grupos N60 e RES60 apresentaram médias maiores em relação aos grupos RN60 e S60. Este último exibiu uma acentuada redução urina/água, mostrando que os animais subnutridos retém água nos tecidos, provavelmente pelo baixo nível de proteínas. Esse fato pode ser comprovado com os efeitos oriundos de uma subnutrição severa (*Kwashiorkor*), onde um dos principais sinais clínicos é a presença de edema (AHMED; RAHMAN; CRAVIOTO, 2009; TIERNEY; SAGE; SHWAYDER, 2010).

O grupo N60 mostrou a pelagem mais densa e sedosa dos animais do grupo N60 e contrastou com a pelagem fina e escassa dos animais S60, que exibiram áreas com alopecia. Esses parâmetros foram restabelecidos nos grupos recuperados, com os animais RES60 exibindo densidade aparentemente maior de pelos, e também mais viçosos do que os animais do grupo RN60. Essas observações estão de acordo com os efeitos descritos em consequência da subnutrição, incluindo alteração na textura, cor, falta de brilho e, muitas vezes, queda dos pêlos (SAWAYA, 2003). Também permitem concordar com as afirmações de Batista et al. (2013) que verificara uma melhora parcial do pelo de ratos subnutridos e renutridos com proteína, e com Larrosa et al. (2010), que notaram um reestabelecimento da textura do pelo e/ou da alopecia em ratos após tratamento com resveratrol.

7.2 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA

A subnutrição demonstra efeitos em diversos períodos que podem ser evidenciados na vida uterina, na infância, e também na fase adulta. Suas causas estão relacionadas com a inadequada ingestão de alimentos, necessários para o desenvolvimento do organismo (VALADARES, 2006). Segundo Rega e Costa-Neves (2010) a subnutrição pode afetar diversos sistemas corporais, incluindo os componentes articulares.

A cartilagem articular ou cartilagem hialina do fêmur e da tíbia constitui-se de um tecido avascular, oriundo do desenvolvimento endocondral, que reveste as superfícies das epífises desses ossos nas articulações sinoviais. É formada principalmente pelos condrócitos, responsáveis pela secreção do colágeno e proteoglicanas, localizados na matriz extracelular, que contém ainda água e macromoléculas (GOBBI et al., 2010; GANNON; NAGEL; KELLY, 2012).

De uma maneira geral, sob o aspecto quantitativo, a subnutrição determinou na cartilagem articular do fêmur e da tíbia dos grupos subnutridos (S21 e S60) alterações na área sua total e na sua espessura, bem como na densidade e no número de condrócitos/área; além disso, essa condição alterou a estrutura da matriz extracelular, influenciado no tipo e na organização ultraestrutural das fibras colágenas. Muito embora não se tenha avaliado o comprimento total do fêmur e da tíbia desses animais, os dados sobre a área e a espessura da cartilagem articular permitem concordar com Rega e Costa-Neves (2010), que demonstraram que os fatores dieta e idade contribuem para alterar as dimensões desses ossos em ratos subnutridos.

As alterações aqui analisadas mostraram similaridades entre as cartilagens da tíbia e do fêmur, com exceção aos parâmetros relativos à área e intensidade de marcação da matriz extracelular, maior naquele osso. Segundo Thorp et al. (2006), provavelmente tal comportamento deva estar associado à distribuição e suporte da massa corporal nesse osso, levando assim a alterações na sua organização estrutural e funcional.

No fêmur e na tíbia dos animais dos grupos S21 e S60 a área total, a espessura da cartilagem e a área dos condrócitos apresentaram-se reduzidos, confirmados pela análise ao microscópio eletrônico de varredura ao serem avaliados os aspectos tridimensionais. Quanto à densidade de células e o número de condrócitos por área nesses animais, avaliados nas camadas **s**, **m** e **p**, com relação ao grupo nutrido (N), não foram detectadas alterações em função da subnutrição, mas apenas em relação à idade. Apesar de a cartilagem articular apresentar-se estruturalmente alterada nos animais subnutridos (S), notou-se que nas suas camadas onde há alta atividade celular e secreção de matriz extracelular, a densidade dos condrócitos não se alterou em relação ao controle (N21) claramente, como descrito por Oliveira et al. (2010) e Cavalli (2011), uma tentativa de manutenção da integridade do tecido cartilágneo. Segundo Monteiro et al. (2010) a carência protéica diminui a espessura da cartilagem articular em indivíduos subnutridos e conseqüentemente, determina um atraso no desenvolvimento, caracterizado pelo baixo peso e estatura no adulto. Dados similares e que corroboram com os resultados da presente pesquisa em animais subnutridos foram encontrados por Rega; Costa-Neves (2010) ao descreverem que a massa corporal e a estrutura óssea são prejudicadas devido à subnutrição, com conseqüente comprometimento do crescimento ósseo.

Com relação á matriz extracelular, os animais subnutridos (S21 e S60) apresentaram menor intensidade de coloração (evidenciada pela técnica histológica Safranina-O) em relação aos respectivos controles nutridos (N21 e N60); além disso, mostraram diminuição da área de

matriz sob influências da dieta e da idade. Portanto, a quantidade de área da matriz extracelular significativamente reduzida nos grupos subnutridos, associada a uma menor área dos condrócitos, foram efetivamente eventos decorrentes da carência protéica. Segundo Olstad et al. (2007) essas diferenças de intensidade de coloração histológica estão relacionadas com as alterações dos componentes da matriz extracelular (fibras colágenas, as glicoproteínas multiadeseivas, as glicaminoglicanas e as proteoglicanas), que podem ser modificados devido à ossificação endocondral, pela diminuição da área dos condrócitos e da espessura da cartilagem, que comprometem o crescimento ósseo evidenciado na fase adulta. Além disso, Hudelmaier et al. (2001), relataram que os condrócitos diminuem a sua atividade celular com o avançar da idade, e desse modo podem alterar os componentes da matriz extracelular, bem como a sua espessura.

A metodologia para a avaliação dos tipos de fibras colágenas permitiu evidenciar o predomínio de fibras do tipo I no grupo N21, e de fibras do tipo II no grupo N60. No entanto, nos grupos subnutridos (S21 e S60) predominaram as fibras do tipo III, com menor densidade das fibras do tipo II. Tais resultados foram confirmados com a avaliação ultraestrutural da matriz extracelular, onde a densidade de fibrilas colágenas apresentou-se muito diminuída nos animais subnutridos (S21 e S60), em comparação aos respectivos controles (N21 e N60) que, além da maior densidade, exibiram fibrilas nitidamente mais espessas. Segundo Teshima et al. (2004) e Oda et al. (2007) o colágeno, uma proteína extracelular com função estrutural, é continuamente remodelado durante a fase de crescimento e desenvolvimento, sendo que na cartilagem o colágeno do tipo I é substituído pelo colágeno tipo II, um colágeno mais maduro para esse tecido. Para Montes (1996), os tipos de fibras colágenas apresentam alterações específicas nos componentes da matriz extracelular, sendo que as do tipo III estão presentes no processo de desenvolvimento fetal, e mais tarde são substituídas por fibras do tipo I. Na cartilagem articular, há o predomínio das fibras do tipo II, que constitui cerca de 85% do conteúdo colágeno desse tecido (ATAYDE, 2011). Assim, considerando-se a cartilagem hialina como responsável por diminuir a carga mecânica e a consequente redução da fricção através de seus componentes celulares e colágenos (FUJIOKA, AOYAMA, TAKAKUWA, 2013) admite-se que, de acordo com Kraus et al. (2010) e Wang et al. (2011), as alterações de suas camadas e dos condrócitos podem prejudicar a sua função de resistir à compressão e à tração. Dessa forma, como são alteradas a organização e a espessura de suas camadas constituintes, bem como a disposição das fibras colágenas e os volumes de suas células, a função da cartilagem pode estar comprometida em indivíduos subnutridos (ATHANASIOU et al., 2000; GOBBI et al., 2010; KOBRINA et al., 2012; FUJIOKA, AOYAMA,

TAKAKUWA, 2013). De fato, através dos resultados aqui apresentados, a subnutrição é capaz de modificar as propriedades biomecânicas das cartilagens articulares do fêmur e da tíbia, uma vez que, através da modificação dos componentes estruturais e ultraestruturais da matriz extracelular, como diminuição de proteoglicanas e alteração dos tipos e arranjos de colágenos, ocorreu não uma degeneração do tecido, mas um atraso no seu desenvolvimento.

Em relação aos parâmetros quantitativos avaliados nos grupos de 60 dias, nutrido (N60), subnutrido (S60) e tratados durante um período de 39 dias (RN60 e RES60), não se verificou diferenças significativas relativas à espessura, densidade e número de condrócitos por área. Todavia, as áreas da cartilagem e da matriz extracelular foram menores no grupo S60, quando comparado aos grupos tratados (RN60 e RES60). Entre estes, detectou-se diferenças relativas à área da matriz que foi maior no primeiro grupo, porém não o suficiente para atingir os valores observados para o grupo N60. Todavia, pode-se afirmar que no grupo RES60 a estrutura da matriz foi restabelecida, uma vez que a análise ultraestrutural demonstrou semelhanças entre esses grupos na densidade e espessura das fibrilas colágenas.

Esses resultados são indicativos de que os efeitos do resveratrol preservaram os condrócitos e, dessa forma, mantiveram a quantidade de matriz extracelular. Reforçam essa teoria os resultados de Shen et al. (2012) ao demonstrarem que as alterações na cartilagem articular podem ser revertidas por compostos polifenólicos como o resveratrol. Dados similares foram descritos por Elmali et al. (2005), ao estudarem os efeitos da administração do resveratrol em coelhos com osteoartrite, e demonstraram que a perda de proteoglicanas e de alterações da cartilagem articular foram significativamente reduzidas, prevenindo contra a destruição do tecido cartilágneo. Além disso, acredita-se que o fator NF- κ B, responsável por sinalizar a inflamação do tecido, pode ser alterado pelos efeitos anti-inflamatórios do resveratrol (ELMALI et al., 2007), ao inibir a atividade ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e promover a elevação da síntese de proteoglicanas (DAVE et al., 2008). Segundo Wang et al. (2012), a apoptose dos condrócitos podem ser evitadas através do tratamento com resveratrol, ao diminuir o estresse oxidativo através do bloqueio de NF- κ B, e dessa forma, preservar a cartilagem articular, corroborando com os resultados aqui encontrados.

Através da microscopia eletrônica de transmissão, que possibilitou uma análise das organelas da cartilagem articular, verificou-se alterações determinadas pela subnutrição, uma vez que os animais do grupo S60 apresentaram condrócitos com aparente redução na densidade de ribossomos em seu retículo endoplasmático; alterações dos componentes do nucléolo e diminuição do diâmetro e da densidade de fibrilas colágenas, todos evidenciando carência protéica. Da mesma forma, o grupo RN60 mostrou o mesmo padrão observado para

o grupo S60, demonstrando que a recuperação após o 22º dia não foi capaz de restabelecer de forma efetiva a atividade celular. Já no grupo RES60, foi nítido o aumento da densidade de ribossomos e melhor organização das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, bem como dos componentes do nucléolo e das fibrilas de colágeno, estas, muito semelhantes ao verificado para o grupo N60. Todas essas observações encontram apoio nas descrições de diversos autores, em diferentes tecidos. Assim, ao analisarem as células da hipófise de ratos e macacos subnutridos, Herbert et al. (1993) e Cónsole et al. (2001) observaram o amplo comprometimento das organelas citoplasmáticas, destacando a extensa redução das cisternas que constituem o retículo endoplasmático rugoso, bem como do complexo de Golgi. Segundo Liberti et al. (2007) a privação protéica altera o aspecto dos componentes do nucléolo de neurônios mioentéricos, evidenciada pela menor densidade da região granular, sugerindo um atraso no desenvolvimento. Além disso, Berger, Machackova e Berger (2005) descreveram que após a restrição alimentar ocorre uma diminuição da região granular e do formato circular do nucléolo, comprometendo a síntese pré-ribossomal do RNA. Segundo Kodiha et al (2014) o resveratrol pode atuar estimulando o sensor de energia (5' AMP proteína quinase - AMPK) relacionado com diversos processos biológicos como o metabolismo de lipídios e homeostasia protéica, o que promove uma reorganização do nucléolo, essencial para a formação de novos ribossomos.

Segundo Csaki, Mobasher, Shakibaei, (2009) a apoptose dos condrócitos ocorre através de vias pró-inflamatórias, que estão relacionadas com a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Tew et al. (2007), enfatizam que este fator de transcrição ao causar apoptose dos condrócitos atuam em vias intracelulares que clivam as proteínas necessárias para o desenvolvimento embrionário, e alteram os componentes celulares e os elementos da matriz extracelular que constituem a cartilagem articular. Dessa forma, acredita-se que os efeitos condroprotetores do resveratrol, observados no grupo RES60, atuam ao inibir a via do NF- κ B, e consequente aumenta a síntese de colágeno do tipo II e de matriz extracelular.

Como evidenciado na presente pesquisa, apesar da dieta normoprotéica sinalizar para uma melhora no tecido cartilagíneo (RN60), a mesma não foi o suficiente para reestabelecer os componentes estruturais da cartilagem articular relativos aos parâmetros normais. No entanto, pode-se afirmar que os resultados do fornecimento da dieta normoprotéica suplementada com resveratrol (RES60), indicam a capacidade desse composto em auxiliar na recuperação dos efeitos deletérios da subnutrição, melhorando os aspectos metabólicos, estruturais e ultraestruturais da cartilagem articular do fêmur e da tíbia em fases precoces do desenvolvimento.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados acerca das alterações morfológicas determinadas pela subnutrição na cartilagem articular do fêmur e da tíbia, e possível recuperação do tecido através da renutrição protéica associada com resveratrol é lícito concluir-se que:

1. Os animais dos grupos subnutridos exibiram características físicas reduzidas e metabólicas alteradas, em relação aos seus respectivos controles nutridos (N21 e N60) e aos grupos tratados (RN60 e RES60);
2. A massa corporal foi reduzida com a subnutrição, mas foi reestabelecida com os tratamentos utilizados (protéica e suplementada com resveratrol), todavia, o grupo RES60 foi o que mais se assemelhou ao N60;
3. Os parâmetros metabólicos apresentaram menores médias no grupo subnutrido, intermediárias nos grupos tratados e maiores no grupo controle. O grupo RES60 apresentou melhora dos parâmetros, principalmente a ingestão e excreção, frente à subnutrição;
4. A cartilagem dos animais S60 e RN60 demonstraram menor intensidade de matriz extracelular e menor quantidade de colágeno tipo II, enquanto que, nos grupos N60 e RES60, houve predomínio de colágeno tipo II e maior matriz extracelular;
5. O número de condrócitos, a densidade de volume e a área dessas células nas camadas da cartilagem articular não apresentam diferenças significativas com relação à dieta, somente com a idade;
6. Quanto ao aspecto tridimensional, a espessura da cartilagem apresentou redução com a dieta (N e S) e a idade (21° ao 60° dia). Os grupos tratados (RN60 e RES60) não apresentaram diferenças do grupo controle (N60);

7. Os componentes celulares ultraestruturais da cartilagem articular alteraram em decorrência da idade (21 e 60 dias) e da dieta imposta (N e S); nos grupos tratados, o RN60 apresentou recuperação parcial, enquanto que, o RES60 reestabeleceu os parâmetros ultraestruturais observados no grupo controle (N60).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABREU, M. A. M. M.; WECKX, L. L. M.; HIRATA, C. H. W. Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 4, p. 523-527, 2006.

AHMED, T.; RAHMAN, S.; CRAVIOTO, A. Oedematous malnutrition. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 5, p. 651-654, 2009.

ALVES, A. P.; DÂMASO, A.; PAI, V. D. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, 2008.

AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. Á. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 05-12, 2006.

AMARAL, J.; LEITE, A. J. M.; CUNHA, A. J. L. A.; VICTORA, C. G. Impact of IMCI health worker training on routinely collected child health indicators in Northeast Brazil. **Health Policy and Planning**, v. 20, p. 42-48, 2005.

ATAYDE, S. A. **Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes mellitus**. 2011. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; WANG, S.; AGRAWAL, C. M. Effects of aging and dietary restriction on the structural integrity of rat articular cartilage. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 28, p. 143-149, 2000.

AYALA-MORENO, R.; RACOTTA, R.; ANGUIANO, B.; ACEVES, C.; QUEVEDO, L. Perinatal undernutrition programmes thyroid function in the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 12, p. 2207-2215, 2013.

BAILE, C. A.; YANG, J. Y.; RAYALAM, S.; HARTZELL, D. L.; LAI, C. Y.; ANDERSEN, C.; DELLA-FERA, M. A. Effect of resveratrol on fat mobilization. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 40-47, 2011.

BALLEN, M. L. O.; MORETTO, V. L.; SANTOS, M. P.; GONÇALVES, T. S. S.; KAWASHITA, N.H.; STOPPIGLIA, L.F.; MARTINS, M.S.F.; GOMES-DA-SILVA,

M.H.G. Protein restriction in pregnancy: effects related to dam metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 87-94, 2009.

BAPTISTA, J. S.; MAYER, W. P.; FONTES, R.; SEYFERT, C. E.; BOLDRINI, S. C.; LIBERTI, E.A. Morphological characteristics of the rat thymus during perinatal protein deprivation and early refeeding: a qualitative and quantitative study. **Journal of Morphology Science**, v. 30, n. 1, p. 33-42, 2013.

BARKER, D. J.; HALES, C. N.; FALL, C. H.; OSMOND, C.; PHIPPS, K.; CLARK, P. M. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n.1, p. 62-67, 1993.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S181-S191, 2003.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A.; LERIN, C. L.; PRABHU, V. V.; ALLARD, J. S.; LOPES-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P. J.; POOSALA, S.; BECHER, K. G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K. W.; SPENCER, R. G.; LAKATTA, E. G.; COUTEUR, S. L.; SHAW, R. J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D. K.; CABO, R.; SINCLAIN, D. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-342, 2006.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart-Edusp, 1976. p. 225.

BERGER, J.; MACHACKOVA, M.; BERGER, Z. Effects of feed restriction on the nucleolar structure and function in lymphocytes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, n. 4, p. 236-237, 2005.

BERTAGNOLLI, S. M. M.; ROSSATO, S. B.; SILVA, V. L.; CERVO, T.; SAUTTER, C. K.; HECKTHEUER, L. H.; PENNA, N. G. Influência da maceração carbônica e da irradiação ultravioleta nos níveis de *trans*-resveratrol em vinhos de uva cabernet sauvignon. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 71-77, 2007.

BLACK, R. T.; ALLEN, L. Y.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; ONIS, M.; EZZATI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243-260, 2008.

BOLDRINI, S. C. **Efeitos da desnutrição pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos Wistar: análise craniométrica morfoquantitativa e ultra-estrutural.** 2003. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BOLINA, C. S.; BOLINA-MATOS, R. S.; ALVES, P. H. M.; CURY, D. P.; CIENA, A. P.; WATANABE, II-SEI. Three-dimensional aspects of the structural characteristics and kidney angioarchitecture of adult and aged wistar rats: a scanning electron microscopy study. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, p. 538–544, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASNYÓ, P.; MOLNÁR, G. A.; MOHÁS, M.; MARKÓ, L.; LACZY, B.; CSEH, J.; MIKOLÁS, E.; SZIJÁRTÓ, I. A.; MÉREI, Á.; HALMAI, R.; MÉSZÁROS, L. G.; SÜMEGI, B.; WITTMANN, I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 383–389, 2011.

CARDOSO, M. J. L.; COSTA, F. S.; MUNIZ, L. M. R.; MELUSS, M.; VALÉRIO, M. A. Marcadores do metabolismo ósseo em gatos. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1765-1769, 2010.

CAVALLI, M. A. **Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição protéica no processo condilar da mandíbulas de ratos Wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina.** 2011.109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **The Journal of Nutrition**. v. 122, n. 3, p. 597-600, 1992.

CHEN, L. L.; WANG, S. X.; DAI, Y.; BUCKOREELALL, P.; ZHANG, P.; ZHANG, H. H.; KONG, W. Effect of catch-up growth by various dietary patterns and resveratrol intervention on bone status. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 297– 304, 2012.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; DIAS, F. J.; BOLINA, C. S.; ISSA, J. P. M.; IYOMASA, M. M.; OGAWA, K.; WATANABE, I. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastrics muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 258-262, 2012.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, IS. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.

CLEMENTE, A. P. G.; SANTOS, C. D. L.; SILVA, A. A. B.; SAWAYA, A. L. Body mass index of adolescents: comparison among different references. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, p. 171-177, 2011.

CLEMENTE, A. P. G.; SANTOS, C. D.; SILVA, A. A. B.; MARTINS, V. J.; MARCHESANO, A. C.; FERNANDES, M. B.; ALBUQUERQUE, M. P.; SAWAYA, A. L. Mild stunting is associated with higher blood pressure in overweight adolescents. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, p. 6-12, 2012.

CÓNSOLE, G. M.; JURADO, S. B.; OYHENART, E. FERRESE, C.; PUCCIARELLI, H.; DUMM, C. L. A. G. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 65-74, 2001.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, NATACHA. Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, 2008.

CROCI, A. T.; CAMARGO, O. P.; BITAR, G.; PEREIRA, S. L. B.; MOREIRA, M.; FREITAS JR., S. Effect of plasma concentrate on bone defects induced in mice femurs via stimulation of bone formation: an experimental study. **ACTA Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, 2003.

CSAKI, C.; MOBASHERI, A.; SHAKIBAEI, M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 6, p. 1-17, 2009.

DAVE, M.; ATTUR, M.; PALMER, G.; AL-MUSSAWIR, H. E.; KENNISH, L.; PATEL, J.; ABRAMSON, S. B. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 9, p. 2786-2797, 2008.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1156-1160, 2007.

DESROCHERS, J.; AMREIN, M. W.; MATYAS, J. R. Viscoelasticity of the articular cartilage surface in early osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 413-421, 2012.

DOLINSKY, V. W.; RUEDA-CLAUSEN, C. F.; MORTON, J. S.; DAVIDGE, S. T.; DYCK, J. R. B. Continued postnatal administration of resveratrol prevents diet-induced metabolic syndrome in rat offspring born growth restricted. **Diabetes**, v. 60, p. 2274-2284, 2011.

ECE, A.; GÜRKAN, F.; CELİK, F.; BOŞNAK, M.; YEL, S.; BALIK, H.; EREL, O. Paraonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 634-639, 2007.

ELMALI, N.; BAYSAL, O.; ESENKAYA, I.; MIZRAK, B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. **Inflammation Research**, v. 30, n. 1-2, p. 1-6, 2007.

ELMALI, N.; ESENKAYA, I.; HARMA, A.; ERTEM, K.; TURKOZ, Y.; MIZRAK, B. Effects of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. **Inflammation Research** v. 54, p. 158-162, 2005.

ELMALI, N.; ESENKAYA, I.; KARADAĞ, N.; TAŞ, F.; ELMALI, N. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. **Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi-Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v. 13, n. 4, p. 274-80, 2007.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **BRICS countries share strategies against malnutrition ahead of ICN2**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The spectrum of malnutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsummit/english/fsheets/malnutrition.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Undernourishment around the world**, 2006. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0750e/a0750e02.pdf>>. Acesso em 09/07/2012

FEIGE, J. N.; LAGOUGE, M.; CANTO, C.; STREHLE, A.; HOUTEN, S.M.; MILNE, J. C.; LAMBERT, P. D.; MATAKI, C.; ELLIOTT, P. J.; AUWERX, J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 347-358, 2008.

FRÖJDÖ, S.; DURAND, C.; PIROLA, L. Metabolic effects of resveratrol in mammals - a link between improved insulin action and aging. **Current Aging Science**, v. 1, n. 3, p. 145-151, 2008.

FUJIOKA, R.; AOYAMA, T.; TAKAKUWA, T. The layered structure of the articular surface. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, p. 1092-1098, 2013.

GANNON, A. R.; NAGEL, T.; KELLY, D. J. The role of the superficial region in determining the dynamic properties of articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 1417-1425, 2012.

GINANI, F.; BARBOZA, C. A. G. Influence of vitamin D on osteoclastic activity in a bone organ culture model. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 619-623, 2011.

GOBBI, R. G.; DEMANGE, M. K.; BARRETO, R. B.; PÉCOR, J. R.; REZENDE, M. U.; FILHO, T. E. P.; LOMBELLO, C. B. Autologous chondrocyte implantation – series of 3 cases. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 4, n. 45, p. 449-56, 2010.

GRECO, S. J.; HAMZELOU, A.; JOHNSTON J. M.; SMITH M. A.; ASHFORD, J. W.; TEZAPSIDIS, N. Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and b-amyloid in neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, p. 170-174, 2011.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 3, n. 193, p.199-211, 1999.

GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. How do bone cells sense mechanical loading? **Revista Brasileira de Ortopedia**, n. 44, v. 4, p. 299-305, 2009.

HARDINGHAM, T.; TEW, S.; MURDOCH, A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. **Arthritis Research**, v. 4, n. 3, p. 63-68, 2002.

HERBERT, D. C.; YASHIRO, T.; MURAKI, T.; OKANO, T.; HATTORI, A.;SUZUKI, T. Quantitative morphological analysis of the pituitary gland in protein-calorie malnourished rats. **Anatomical Record**, v. 235, p. 121-125, 1993.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Three-dimensional measurement in microscopy. In: _____ **Unbiased Stereology**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005. 246 p.

HOWIE, G. J.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 298-307, 2012.

HUBER, M.; TRATTNIG, S.; LINTNER, F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. **Investigative Radiology**, v. 35, n. 10, p. 573-580, 2000.

HUDELMAIER, M.; GLASER, C.; ENGLMEIER, R. H.; RESER, M.; PUTZ, R.; ECKSTEIN, F. Age-related changes in the morphology on deformational behavior of knee joint cartilage. **Arthritis Rheumatology**, v. 44, n. 11, p. 2556-2561, 2011.

IM, H. J.; LI, X.; CHEN, D.; YAN, D.; KIM, J.; ELLMAN, M. B.; STEIN, G. S.; COLE, B.; KC, R.; CS-SZABO, G.; WIJNEN, A. J. Biological effects of the plant-derived polyphenol resveratrol in human articular cartilage and chondrosarcoma cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n.10, p. 3488-3497, 2012.

JENSEN, J. S.; WERTZ, C. F.; O'NEILL, V. A. Preformulation stability of trans-resveratrol and trans-resveratrol glucoside (piceid). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1685-1690, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KOBRINA, Y.; RIEPPO, L.; SAARAKKALA, S.; JURVELIN, J. S.; ISAKSSON, H. Clustering of infrared spectra reveals histological zones in intact articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 460-468, 2012.

KRAUS, V. B.; HUEBNER, J. L.; DEGROOT, J.; BENDELE, A. The oarsi histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 3, p. 35-52, 2010.

LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; MEZIANE, H.; LERIN, C.; DAUSSIN, F.; MESSADEQ, N.; MILNE, J.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, P.; GENY, B.; LAAKSO, M.; PUIGSERVER, P.; AUWERX, J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006.

LARROSA, M.; TOMÉ-CARNEIRO, J.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; ALCÁNTARA, D.; SELMA, M. V.; BELTRÁN, D.; GARCÍA-CONESA, M. T.; URBÁN, C.; LUCAS, R.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; MORALES, J. C.; ESPÍN, J. C. Preventive oral treatment with resveratrol pro-prodrugs drastically reduce colon inflammation in rodents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7365-7376, 2010.

LEKAKIS, J.; RALLIDIS, L. S.; ANDREADOU, I.; VAMVAKOU, G.; KAZANTZOGLOU, G.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, A.; KREMASTINOS, D. T. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, n. 12, p. 596–600, 2005.

LIBERTI, E. A.; FONTES, R. B. V.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: A histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.

LUNA, L. G. **Histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Will, 1968. 62 p.

MARQUES, F. Z.; MARKUS, M. A.; MORRIS, B. J. Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 11, p. 2125-2128, 2009.

MARTINS, V. J. B.; FLORÊNCIO, T. M. M. T.; GRILLO, L. P.; FRANCO, M. C. P.; MARTINS, P. A.; CLEMENTE, A. P. G.; SANTOS, C. D. L.; VIEIRA, M. F. A.; SAWAYA, A. L. Long-lasting effects of undernutrition. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 6, p. 1817-46, . 2011.

MATOS, R. S.; BARONCINI, L. A. V.; PRÉCOMA, L. B.; WINTER, G.; LAMBACH, P. H.; CARON, E. Y.; KAIBER, F.; PRÉCOMA, D. B. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 2, 2011.

MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y.; YAMORI, Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 3, n. 30, p. 859-863, 1998.

MONTE, C. M. G. Undernourishment: a century old challenge to infant nutrition. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, A. C. T.; PAES, S. T.; SANTOS, J. A.; LIRA, K. D. S.; MORAES, S. R. A. Effects of physical exercise during pregnancy and protein malnutrition during pregnancy and lactation on the development and growth of the offspring's femur. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 3, p. 233-238, 2010.

MONTEIRO, C. A. Hunger, Malnutrition and Poverty: beyond the Semantics. **Saúde e Sociedade**, v. 12, n. 1, p. 7-11, 2003.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, p. 15-27, 1996.

MORGAGNE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 471-483, 2002.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **Trends in Genetics-Cell**, v. 19, n. 8, p. 458-466, 2003.

NETO, O. A. L.; FRANCIOZI, C. E. S.; JÚNIOR, G. S. M. G.; QUEIROZ, A. A. B.; FILHO, M. C.; NAVARRO, R. D. Surgical treatment of osteochondral lesions of the knee with mosaicplasty. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 2, p. 166-73, 2010.

ODA, J. Y.; LIBERTI E. A.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Variation in articular cartilage in rats between 3 and 32 months old. A histomorphometric and scanning electron microscopy study. **Biogerontology**, v. 8, p. 835-352, 2007.

OH, J. H.; PARK, S. Y.; CROMBRUGGHE, B.; KIM, J. E. Chondrocyte-specific ablation of osterix leads to impaired endochondral ossification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, p. 634-640, 2012.

OLIVEIRA, B. C. C.; OLIVEIRA, F.; MARTINI, D. T.; PRISCO, C. R. D.; RIGUETTI, M. M. S.; LIBERTI, E. A.; BOLDRINI, S. C. The relative effects of severe burn injury and pre- and post-natal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 45-54, 2010.

OLSTAD, K.; YTREHUS, B.; EKMAN, S.; CARLSON, C. S.; DOLVIK, N. I. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. **Journal of Orthopaedic**, v. 25, n. 8, 2007.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. **Phytotherapy Research**, v. 24, 2010.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 909-913, 2010.

PIMSTONE, B. L.; BARBEZAT, G.; HANSEN, J. D.; MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 482-487, 1968.

PINE, A. P.; JESSOP, N. S.; ALLAN, G. F. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats 4. Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein. **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 831-844, 1994.

REEVES P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR. G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1931-1939, 1993.

REGA, R. M. S.; COSTA-NEVES, M. Influência da restrição protéica precoce no crescimento de ossos longos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Episteme – Revista Científica da Faculdade Católica Salesiana do Espírito do Santo**, v. 1, p. 76-79, 2010.

RIBEIRO, S. M. L.; SANTOS, Z. A.; SILVA, R. J.; LOUZADA, E.; DONATO JR, J. D.; TIRAPEGUI, J. Leptina: Aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 1, p. 11-24, 2007.

RIEDL, S.; KLUGE, M.; SCHWEITZER, K.; WALDHO, T.; FRISCH, H. Adaptation of ghrelin and the GH/IGF axis to high altitude. **European Journal of Endocrinology**, v. 166, p. 969–976, 2012.

ROMEIS, B. **Mikroskopische technnik**. Aufl. München: Oldenbourg, 1968, p. 368-389.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia – texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 183-227.

SANTOS, A. C.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. J. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 8, p. 973-990, 2011.

SANTOS, C. D.; CLEMENTE, A. P. G.; MARTINS, V. J.; ALBUQUERQUE, M. P.; SAWAYA, A. L. Adolescents with mild stunting show alterations in glucose and insulin metabolism. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 94, p. 1-6, 2010.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 5, p. 437-442, 2005.

SAVINO, W.; DARDENE, M.; VELLOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 11-16, 2007.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 147-158, 2006.

SAWAYA, A. L.; SOLYMOS, G. M. B.; FLORÊNCIO, T. M. M. T.; MARTINS, P. A. Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. **Estudos Avançados**, v. 17, n. 48, p. 21-44, 2003.

SCRIMSHAW, N. S.; VITERI, F. E. INCAP studies of *kwashiorkor* and marasmus. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 34-41, 2010.

SHARMA, R.; AGRAWAL, S.; SAXENA, A.; PANDEY, M.; SHARMA, R. K. Association of genetic variants of ghrelin, leptin and UCP2 with malnutrition inflammation syndrome and survival in end-stage renal disease patients. **Genes Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 611-621, 2013.

SHEN, C. L.; SMITH, B. J.; LO, D. F.; CHYU, M. C.; DUNN, D. M.; CHEN, C.; KWUN, I. S. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1541-1548, 2012.

SMITH, T. J.; WADDEL, J. B. Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. **Endocrinology**, v. 144, p. 3024-3330, 2003.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol**, v. 24, p. 99-126, 2000.

TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 21, p. 431-440, 2000.

TESHIMA, R.; ONO, M.; YAMASHITA, Y.; HIRAKAWA, H.; NAWATA, K.; MORIO, Y. Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage. **Journal Orthopaedic Science**, v. 9, n. 3, p. 270-273, 2004.

TEW, S. R.; CLEGG, P. D.; BREW, C. J.; REDMOND, C. M.; HARDINGHAM, T. E. SOX9 transduction of a human chondrocytic cell line identifies novel genes regulated in primary human chondrocytes and in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 5, 2007.

THORP, L. E.; WIMMER, M. A.; BLOCK, J. A.; MOISIO, K. C.; SHOTT, S.; GOKER, B.; SUMNER, D. R. Bone mineral density in the proximal tibia varies as a function of static alignment and knee adduction angular momentum in individuals with medial knee osteoarthritis. **Bone**, v. 39, n. 5, p. 1116-1122, 2006.

TIERNEY, E. P.; SAGE, R. J.; SHWAYDER, T. *Kwashiorkor* from a severe dietary restriction in an 8-month infant in suburban Detroit, Michigan: case report and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 5, p. 500-506, 2010.

TURAN, B.; TUNCAY, E.; VASSORT, G. Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 44, p. 281-296, 2012.

VALADARES, V. T. **Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória**. 2006. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, 2006.

VALVERDE-FRANCO, G.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H.; HUM, D.; MATSUO, K.; LUSSIER, B.; KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J. O. In vivo bone-specific ephb4 overexpression in mice protects both subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, p. 3614-3625, 2012.

VELÁSQUEZ, D. A.; MARTÍNEZ, G.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, M. J.; BOIT, K. D.; DOPESO-REYES, I. G.; LÓPEZ, M.; VIDAL, A.; NOGUEIRAS, R.; DIÉGUEZ, C. The Central Sirtuin 1/p53 Pathway Is Essential for the Orexigenic Action of Ghrelin. **Diabetes**, v. 60, p. 1177 – 1184, 2011.

VELOSA, A. P. P.; OLIVEIRA, A. M.; CARRASCO, S.; CAPELOZZI, V. L.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Meniscectomy as an experimental model of osteoarthritis in rabbits and protector effect of chloroquine diphosphate. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 6, p. 401-410, 2007.

WANG, L. H.; FU, Y.; SHI, Y. X.; WANG, W.G. T-2 Toxin induces degenerative articular changes in rodents: link to kaschin-beck disease. **Toxicologic Pathology**, v. 39, p. 502-507, 2011.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

WERNETTE, C. M.; WHITE, B. D.; ZIZZA, C. A. Signaling proteins that influence energy intake may affect unintentional weight loss in elderly persons. **Journal of American Diet Association**, v. 111, p. 864-873, 2011.

WFP. WORLD FOOD PROGRAMME. **Hunger map**, 2011. Disponível em: <<http://www.wfp.org/hunger/glossary>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

WFP. WORLD FOOD PROGRAMME. **Hunger map**, 2012. Disponível em: <<http://www.wfp.org/students-and-teachers/teachers/blog/new-teaching-tool-hunger-map-2011>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

WFP. WORLD FOOD PROGRAMME. **Hunger map**, 2014. Disponível em: <<http://www.wfp.org/hunger/map>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Nutrition**. Disponível em: <<http://www.who.int/nutrition/en/>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hunger**. Disponível em: <<http://www.fao.org/hunger/en/>>. Acesso em: 5 jan.2013.

ONU – Organização das Nações Unidas. **Desnutrição**. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

XIE, L.; LIN, A. S. P.; KUNDU, K.; LEVENSTON, M. E.; MURTHY, N.; GULDBERG, R. E. Quantitative imaging of cartilage and bone morphology, reactive oxygen species, and vascularization in a rodent model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1899–1908, 2012.

YANAGUIZAWA, M.; TABERNER, G. S.; AIHARA, A. Y.; YAMAGUCHI, C. D. K.; GUIMARÃES, M. C.; ROSENFELD, A.; FERNANDES, J. L.; FERNANDES, A. R. C. Imaging of growth plate injuries. **Radiologia Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 199-204, 2008.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984.

ZHENG, J.; CHEN, L. L.; ZHANG, H. H.; HU, X.; KONG, W.; HU, D. Resveratrol improves insulin resistance of catch-up growth by increasing mitochondrial complexes and antioxidant function in skeletal muscle. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 61, n.7, p. 954-965, 2012.

ZOU, J.; HUANG, Y.; CHEN, Q.; WEI, E.; CAO, K.; WU, J. M. Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein. **Chinese Medical Journal**, n. 113, v. 2, p. 99-102, 2000.

ANEXO A - Tabela de número randômicos

ISS STEREOLOGY COURSE

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

- 1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out!
 - 2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion. (= 26)
- Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is ≥ 100 you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

7137	7139	7141	7143	7145	7147	7149	7151	7153	7155	7157	7159	7161	7163	7165	7167	7169	7171	7173	7175	7177	7179	7181	7183	7185	7187	7189	7191	7193	7195	7197	7199	7201	7203	7205	7207	7209	7211	7213	7215	7217	7219	7221	7223	7225	7227	7229	7231	7233	7235	7237	7239	7241	7243	7245	7247	7249	7251	7253	7255	7257	7259	7261	7263	7265	7267	7269	7271	7273	7275	7277	7279	7281	7283	7285	7287	7289	7291	7293	7295	7297	7299	7301	7303	7305	7307	7309	7311	7313	7315	7317	7319	7321	7323	7325	7327	7329	7331	7333	7335	7337	7339	7341	7343	7345	7347	7349	7351	7353	7355	7357	7359	7361	7363	7365	7367	7369	7371	7373	7375	7377	7379	7381	7383	7385	7387	7389	7391	7393	7395	7397	7399	7401	7403	7405	7407	7409	7411	7413	7415	7417	7419	7421	7423	7425	7427	7429	7431	7433	7435	7437	7439	7441	7443	7445	7447	7449	7451	7453	7455	7457	7459	7461	7463	7465	7467	7469	7471	7473	7475	7477	7479	7481	7483	7485	7487	7489	7491	7493	7495	7497	7499	7501	7503	7505	7507	7509	7511	7513	7515	7517	7519	7521	7523	7525	7527	7529	7531	7533	7535	7537	7539	7541	7543	7545	7547	7549	7551	7553	7555	7557	7559	7561	7563	7565	7567	7569	7571	7573	7575	7577	7579	7581	7583	7585	7587	7589	7591	7593	7595	7597	7599	7601	7603	7605	7607	7609	7611	7613	7615	7617	7619	7621	7623	7625	7627	7629	7631	7633	7635	7637	7639	7641	7643	7645	7647	7649	7651	7653	7655	7657	7659	7661	7663	7665	7667	7669	7671	7673	7675	7677	7679	7681	7683	7685	7687	7689	7691	7693	7695	7697	7699	7701	7703	7705	7707	7709	7711	7713	7715	7717	7719	7721	7723	7725	7727	7729	7731	7733	7735	7737	7739	7741	7743	7745	7747	7749	7751	7753	7755	7757	7759	7761	7763	7765	7767	7769	7771	7773	7775	7777	7779	7781	7783	7785	7787	7789	7791	7793	7795	7797	7799	7801	7803	7805	7807	7809	7811	7813	7815	7817	7819	7821	7823	7825	7827	7829	7831	7833	7835	7837	7839	7841	7843	7845	7847	7849	7851	7853	7855	7857	7859	7861	7863	7865	7867	7869	7871	7873	7875	7877	7879	7881	7883	7885	7887	7889	7891	7893	7895	7897	7899	7901	7903	7905	7907	7909	7911	7913	7915	7917	7919	7921	7923	7925	7927	7929	7931	7933	7935	7937	7939	7941	7943	7945	7947	7949	7951	7953	7955	7957	7959	7961	7963	7965	7967	7969	7971	7973	7975	7977	7979	7981	7983	7985	7987	7989	7991	7993	7995	7997	7999	8001	8003	8005	8007	8009	8011	8013	8015	8017	8019	8021	8023	8025	8027	8029	8031	8033	8035	8037	8039	8041	8043	8045	8047	8049	8051	8053	8055	8057	8059	8061	8063	8065	8067	8069	8071	8073	8075	8077	8079	8081	8083	8085	8087	8089	8091	8093	8095	8097	8099	8101	8103	8105	8107	8109	8111	8113	8115	8117	8119	8121	8123	8125	8127	8129	8131	8133	8135	8137	8139	8141	8143	8145	8147	8149	8151	8153	8155	8157	8159	8161	8163	8165	8167	8169	8171	8173	8175	8177	8179	8181	8183	8185	8187	8189	8191	8193	8195	8197	8199	8201	8203	8205	8207	8209	8211	8213	8215	8217	8219	8221	8223	8225	8227	8229	8231	8233	8235	8237	8239	8241	8243	8245	8247	8249	8251	8253	8255	8257	8259	8261	8263	8265	8267	8269	8271	8273	8275	8277	8279	8281	8283	8285	8287	8289	8291	8293	8295	8297	8299	8301	8303	8305	8307	8309	8311	8313	8315	8317	8319	8321	8323	8325	8327	8329	8331	8333	8335	8337	8339	8341	8343	8345	8347	8349	8351	8353	8355	8357	8359	8361	8363	8365	8367	8369	8371	8373	8375	8377	8379	8381	8383	8385	8387	8389	8391	8393	8395	8397	8399	8401	8403	8405	8407	8409	8411	8413	8415	8417	8419	8421	8423	8425	8427	8429	8431	8433	8435	8437	8439	8441	8443	8445	8447	8449	8451	8453	8455	8457	8459	8461	8463	8465	8467	8469	8471	8473	8475	8477	8479	8481	8483	8485	8487	8489	8491	8493	8495	8497	8499	8501	8503	8505	8507	8509	8511	8513	8515	8517	8519	8521	8523	8525	8527	8529	8531	8533	8535	8537	8539	8541	8543	8545	8547	8549	8551	8553	8555	8557	8559	8561	8563	8565	8567	8569	8571	8573	8575	8577	8579	8581	8583	8585	8587	8589	8591	8593	8595	8597	8599	8601	8603	8605	8607	8609	8611	8613	8615	8617	8619	8621	8623	8625	8627	8629	8631	8633	8635	8637	8639	8641	8643	8645	8647	8649	8651	8653	8655	8657	8659	8661	8663	8665	8667	8669	8671	8673	8675	8677	8679	8681	8683	8685	8687	8689	8691	8693	8695	8697	8699	8701	8703	8705	8707	8709	8711	8713	8715	8717	8719	8721	8723	8725	8727	8729	8731	8733	8735	8737	8739	8741	8743	8745	8747	8749	8751	8753	8755	8757	8759	8761	8763	8765	8767	8769	8771	8773	8775	8777	8779	8781	8783	8785	8787	8789	8791	8793	8795	8797	8799	8801	8803	8805	8807	8809	8811	8813	8815	8817	8819	8821	8823	8825	8827	8829	8831	8833	8835	8837	8839	8841	8843	8845	8847	8849	8851	8853	8855	8857	8859	8861	8863	8865	8867	8869	8871	8873	8875	8877	8879	8881	8883	8885	8887	8889	8891	8893	8895	8897	8899	8901	8903	8905	8907	8909	8911	8913	8915	8917	8919	8921	8923	8925	8927	8929	8931	8933	8935	8937	8939	8941	8943	8945	8947	8949	8951	8953	8955	8957	8959	8961	8963	8965	8967	8969	8971	8973	8975	8977	8979	8981	8983	8985	8987	8989	8991	8993	8995	8997	8999	9001	9003	9005	9007	9009	9011	9013	9015	9017	9019	9021	9023	9025	9027	9029	9031	9033	9035	9037	9039	9041	9043	9045	9047	9049	9051	9053	9055	9057	9059	9061	9063	9065	9067	9069	9071	9073	9075	9077	9079	9081	9083	9085	9087	9089	9091	9093	9095	9097	9099	9101	9103	9105	9107	9109	9111	9113	9115	9117	9119	9121	9123	9125	9127	9129	9131	9133	9135	9137	9139	9141	9143	9145	9147	9149	9151	9153	9155	9157	9159	9161	9163	9165	9167	9169	9171	9173	9175	9177	9179	9181	9183	9185	9187	9189	9191	9193	9195	9197	9199	9201	9203	9205	9207	9209	9211	9213	9215	9217	9219	9221	9223	9225	9227	9229	9231	9233	9235	9237	9239	9241	9243	9245	9247	9249	9251	9253	9255	9257	9259	9261	9263	9265	9267	9269	9271	9273	9275	9277	9279	9281	9283	9285	9287	9289	9291	9293	9295	9297	9299	9301	9303	9305	9307	9309	9311	9313	9315	9317	9319	9321	9323	9325	9327	9329	9331	9333	9335	9337	9339	9341	9343	9345	9347	9349	9351	9353	9355	9357	9359	9361	9363	9365	9367	9369	9371	9373	9375	9377	9379	9381	9383	9385	9387	9389	9391	9393	9395	9397	9399	9401	9403	9405	9407	9409	9411	9413	9415	9417	9419	9421	9423	9425	9427	9429	9431	9433	9435	9437	9439	9441	9443	9445	9447	9449	9451	9453	9455	9457	9459	9461	9463	9465	9467	9469	9471	9473	9475	9477	9479	9481	9483	9485	9487	9489	9491	9493	9495	9497	9499	9501	9503	9505	9507	9509	9511	9513	9515	9517	9519	9521	9523	9525	9527	9529	9531	9533	9535	9537	9539	9541	9543	9545	9547	9549	9551	9553	9555	9557	9559	9561	9563	9565	9567	9569	9571	9573	9575	9577	9579	9581	9583	9585	9587	9589	9591	9593	9595	9597	9599	9601	9603	9605	9607	9609	9611	9613	9615	9617	9619	9621	9623	9625	9627	9629	9631	9633	9635	9637	9639	9641	9643	9645	9647	9649	9651	9653	9655	9657	9659	9661	9663	9665	9667	9669	9671	9673	9675	9677	9679	9681	9683	9685	9687	9689	9691	9693	9695	9697	9699	9701	9703	9705	9707	9709	9711	9713	9715	9717	9719	9721	9723	9725	9727	9729	9731	9733	9735</
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------

ANEXO B - Sistema teste, contendo linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (linhas cheias), utilizado para as quantificações

Fonte: Laboratório de Anatomia funcional aplicado à clínica e à cirurgia - LAFACC (ICB/USP).

ANEXO C - Sistema teste utilizado paras as quantificações

25 x 19 =
475

Fonte: Laboratório de Anatomia funcional aplicado à clínica e à cirurgia - LAFACC (ICB/USP).