LÍDIA DOS SANTOS ROCHA CRUZ

**Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as
estruturas cartilagíneas de ossos longos de ratos Wistar nas fases
pré e pós-natal**

São Paulo
2015

LÍDIA DOS SANTOS ROCHA CRUZ

**Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as estruturas
cartilagíneas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal**

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2015

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.3186
FMVZ

Rocha Cruz, Lídia dos Santos

Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as estruturas cartilagueas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal / Lídia dos Santos Rocha Cruz. -- 2015. 92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento 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. Dieta de Moçambique. 2. Subnutrição. 3. Renutrição. 4. Cartilagem articular. 5. Lâmina epifisial. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que a aluna Lidia dos Santos Rocha Cruz entregou, nesta data, o projeto de pesquisa intitulado: "Repercussões morfológicas da dieta de Moçambique sobre as estruturas cartilagueas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal", sob responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, o qual foi protocolado sob o nº 2898/2013.

São Paulo, 29 de janeiro de 2013.

Roseli da Costa Gomes

Chefe do Serviço de Apoio Acadêmico
e secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lúcio Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.013/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 020/12/CEUA, aprovado em 26.03.12, e por solicitação do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de *Lígia Pelosi Mendonça, Lídia dos Santos Rocha Cruz e Liliana Ribeiro* ao Projeto de Pesquisa "*Análise morfoquantitativa e ultraestrutural dos componentes do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos submetidos à dieta padrão de moçambique nos períodos pré e pós-natal*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de março de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCHA CRUZ, Lídia dos Santos

Título: Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as estruturas cartilagíneas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Dedicatória

Dedico essa dissertação ao meu esposo Carlos e filho Felipe, meu alicerce, pela compreensão, carinho e apoio em todas as minhas decisões.

Agradecimentos

Agradeço especialmente a Deus, por direcionar meu caminho, e colocar pessoas de valores inexoráveis ao meu lado, por me fazer forte e persistente quando necessitei, em fim por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais (Neuza e José), meus maiores exemplos, pelo dom da vida, por me educarem com amor, e pelas orações dedicada a mim.

Ao estimado Prof. Dr. Edson Liberti, que tanto respeito e prezo, pelo seu legado que vai além de um exemplo de profissional apaixonado pela anatomia, mas principalmente o de ser humano, íntegro, amigo e família. Que Deus esteja sempre presente em sua vida.

Agradeço aos meus irmãos (Odair, Elisangela e Elaine) sobrinhos (Junior, Leonardo, David, Iasmim), afilhados (Bianca, Beatriz, Marcos, Ricardo, Michele, Gabriele) e cunhados (Alessandro, Shirley e Sandra) pelas doces lembranças e por todas aquelas que certamente virão, sou feliz por compartilhar minha vida com vocês.

À Aline Marosti, a quem tenho carinho enorme, se mostrou uma amiga verdadeira, sempre presente, companheira de biotério, de abraços e conversas naqueles momentos difíceis ou aquelas regadas por grandes risadas.

Aos demais amigos do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à clínica e a cirurgia – LAFACC, VQM, Aline Gonçalves, Anny Kelly, Catarina Tivane, Cristina Bolina, Flávio Tampeline, Josy Cal, Joice Bertaglia, Jodonai Barbosa, Liliana Ribeiro, Ligia Mendonça, Marcelo Cavalli, Maria Brito, Paulo Henrique Matos, Regina Bolina. Que me acolheram com prontidão e compartilharam técnicas, experiências e alguns momentos de descontração.

Aos queridos Ricardo Bandeira, Marcos Vinícius, Ana Regina Alves, e Jhonatan Pinheiro pelo companheirismo e amizade.

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

À Professora Doutora Maria Angélica Miglino pela oportunidade única, de participar do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo.

Aos mestres Silvia Lacchini e César Natal, pelo incentivo minha participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE.

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

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Anatomia, Sebastião Boleta, Sônia Regina Yokomizo e Marta Maria Righetti pela paciência, dedicação e auxílio com as técnicas laboratoriais, sempre com grande disponibilidade.

Aos funcionários do ICB-USP e da FMVZ-USP, especialmente Maycon Barbosa, Jaqueline Martins, as bibliotecárias Elza e Neusa pela atenção, e respeito em todos os momentos que foram solicitados.

Ao Professor Francisco Crisostomo, pelo auxílio e desempenho estatístico, úteis para validação desse estudo.

Agradeço aos componentes da banca de defesa desta dissertação pela disponibilidade em contribuir para aperfeiçoamento deste estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, tão importante para minha vida profissional, Muito Obrigada.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

ROCHA CRUZ, L. S. **Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as estruturas cartilagíneas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal.** [Morphological effects of diet pattern of Mozambique in the structures cartilage the bones long of rats during periods pre and pos-natal]. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A subnutrição tem sido ao longo dos anos um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, que acomete principalmente crianças de países em desenvolvimento. Estima-se que em Moçambique na África Oriental, cerca de 40% das crianças são acometidas pela desnutrição crônica que resulta dentre outras afecções em baixa estatura e diminuição da capacidade física. Este estudo visa avaliar a estrutura óssea de ratos wistar submetidos à dieta básica da população de Moçambique (DM) reproduzida em laboratório. Para isso a DM foi oferecida aos animais em fase pré e pós-natal durante 42 dias. Para alguns desses animais foi fornecida a DM acrescida de 20% de caseína (DMC) subsequentemente os grupos subnutrido de Moçambique (SM) e nutrido de Moçambique (NM). Foi formado também um grupo denominado renutrido (RM) composto por animais que receberão a DMC a partir do 22º dia e até completarem 42 dias de vida. Após o desmame foram mensurados os parâmetros metabólicos da ingestão alimentar e hídrica, excreção de urina e fezes. A tíbia e o úmero do lado direito foram macerados quimicamente a fim de verificar as medidas ósseas. Esses ossos do lado esquerdo foram processados com técnicas rotineiras histológicas e corados de forma a evidenciar as estruturas cartilagineas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância paramétrica seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$. Os resultados apontam que a Subnutrição é capaz de modificar a espessura da CA e da LE e os componentes de sua MEC. Embora a inserção de caseína na dieta dos animais SM, tenha reestabelecido parâmetros da osteometria, na LE e na CA a melhora apresentada, não foi o suficiente para atingir seus parâmetros normais apresentados no grupo NM.

Palavras-chave: Dieta de Moçambique. Subnutrição. Renutrição. Cartilagem articular. Lâmina epifisial.

ABSTRACT

ROCHA CRUZ, L. S. Morphological effects of diet pattern of Mozambique in the structures cartilage the bones long of rats during periods pre and pos-natal. [Repercussões morfológicas da dieta padrão de Moçambique sobre as estruturas cartilagíneas de ossos longos de ratos Wistar nas fases pré e pós-natal]. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Undernutrition has been over the years one of the major public health problems worldwide, which affects mainly children in developing countries. It is estimated that in Mozambique in East Africa, about 40% of children are affected by chronic undernutrition resulting from other conditions in stature and diminished physical capacity. This study aims to evaluate the bone structure of Wistar rats submitted to the staple diet of the population of Mozambique (DM) reproduced in the laboratory. To this DM was given to the animals in pre and postnatal 42 days. For some of these animals was provided to DM plus 20% casein (DMC) subsequently the undernourished groups of Mozambique (SM) and nursed Mozambique (NM). Also it has formed a group called renutrido (RM) consists of animals that receive the DMC from the 22nd day until completing 42 days of life. After weaning metabolic parameters were measured food and water intake, urine output and feces. The tibia and the humerus on the right side were chemically macerated in order to verify the bone measurements. These bones on the left side were processed with routine histological techniques, and stained to show the form cartilage structures. The data were subjected to parametric analysis of variance followed by multiple comparisons by the Tukey method, with significance level of $p < 0.05$. The results show that the Malnutrition is able to modify the thickness of the CA and LE and the components of its MEC. Although the inclusion of casein in the diet of animals SM, has reestablished osteometria parameters in LE and CA improvement presented, was not enough to achieve their normal parameters presented in NM group.

Keywords: Mozambique diet. Undernutrition. Renutrition. Articular cartilage. Growth plate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de fome.....	26
Figura 2 -	Representação gráfica do suprimento energético derivada de cereais, raízes e tubérculos (1990-1992 e 2007-2009)	27
Figura 3 -	Obtenção dos grupos experimentais.....	37
Figura 4 -	Instruções para manipulação da gaiola metabólica	38
Figura 5 -	Comparações das médias ósseas da tíbia e do úmero dos grupos experimentais	40
Figura 6 -	Demonstração da espessura da LE e da CA.....	41
Figura 7 -	Representação gráfica da massa corporal (g).....	45
Figura 8 -	Representação gráfica da ingestão alimentar (g) e da excreção de fezes (g)	46
Figura 9 -	Representação gráfica da Ingestão hídrica (ml) e excreção de urina (ml)	48
Figura 10 -	Representação gráfica da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/massa corporal (%) e da Ingestão hídrica/massa corporal (%)	49
Figura 11 -	Representação gráfica da razão dos parâmetros Excreção de fezes/Ingestão alimentar (%) e Excreção de Urina/Ingestão hídrica (%).....	51
Figura 12 -	Representação gráfica do comprimento total(cm) do úmero e da tíbia.....	52
Figura 13 -	Representação gráfica da largura proximal e distal (cm) do úmero e da tíbia.....	53
Figura 14 -	Representação gráfica da razão da largura proximal/em relação a largura distal(%) do úmero e da tíbia	53
Figura 15 -	Características gerais da LE do úmero e da tíbia	55
Figura 16 -	Aspecto dos condrócitos da LE do úmero e da tíbia	56
Figura 17 -	MEC da LE do úmero e da tíbia.....	57
Figura 18 -	Características gerais da CA do úmero e da tíbia.....	59
Figura 19 -	Aspecto dos condrócitos da CA do úmero e da tíbia	60
Figura 20 -	MEC da CA úmero e da tíbia	61
Figura 21 -	Fibras colágenas presentes na CA e na LE do úmero e da tíbia.....	62

Figura 22 - Representação gráfica das espessuras das camadas da LE (μm) do úmero ..	64
Figura 23 - Representação gráfica das espessuras das camadas da LE (μm) da tíbia	65
Figura 24 - Representação gráfica das espessuras das camadas da CA (μm) do úmero ..	66
Figura 25 - Representação gráfica das espessuras das camadas da CA (μm) tíbia.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das Rações utilizadas na presente pesquisa.....	36
Tabela 2 - Parâmetros gerais: comprimento dos ratos (cm) dos diferentes grupos experimentais	44
Tabela 3 - Média ($\pm$ DP) das massas corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período.....	45
Tabela 4 - Média ($\pm$ DP) de ingestão alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas na primeiro e segundo período	46
Tabela 5 - Média ($\pm$ DP) da excreção de fezes (g) de acordo com as avaliações metabólicas na primeiro e segundo período	46
Tabela 6 - Média ($\pm$ DP) da ingestão hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas na primeiro e segundo período	47
Tabela 7 - Média ($\pm$ DP) da excreção de urina (ml) de acordo com as avaliações metabólicas na primeiro e segundo período	47
Tabela 8 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/ massa corporal de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período	49
Tabela 9 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros ingestão hídrica/ massa corporal de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período	49
Tabela 10 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de fezes/ Ingestão alimentar de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período	50
Tabela 11 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de urina/ Ingestão hídrica de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período.....	50
Tabela 12 - Média ($\pm$ DP) do comprimento e largura (cm) do úmero e da tíbia dos animais dos grupos experimentais.....	51
Tabela 13 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da LE (μ m) do úmero e de suas camadas nos grupos experimentais	63
Tabela 14 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da LE (μ m) da tíbia e de suas camadas nos grupos experimentais	64
Tabela 15 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da CA (μ m) do úmero e de suas camadas nos grupos experimentais	65

Tabela 16 - Média e ($\pm$ DP) referentes as espessuras da CA (μm) da tíbia e de suas camadas nos grupos experimentais	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPU	Alimentos Terapêuticos Prontos para Uso
c	Camada calcificada da cartilagem articular
CO ₂	Gás Carbônico
CTT	Comprimento Total da Tíbia
CTU	Comprimento Total do úmero
DA	Desnutrição Aguda
DC	Desnutrição Crônica
DM	Dieta padrão de Moçambique
DMC	Dieta de Moçambique acrescida com 20% de caseína
DP	Desvio Padrão
h	Camada hipertrófica da lâmina epifisial
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Kg	Kilograma
LDT	Largura distal da tíbia
LDU	Largura distal do úmero
lp	Camada proliferativa da lâmina epifisial
LPT	Largura proximal da tíbia
LPU	Largura proximal do úmero
m	Camada superficial da cartilagem articular
mμ	Micrometro
MEC	Matriz Extracelular
ml	Mililitro
NM	Grupo de Nutrido de Moçambique
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Camada profunda da cartilagem articular

r	Camada de repouso da lâmina epifisial
RM	Grupo de Renutrido de Moçambique
S1	Primeira semana de avaliação metabólica
S2	Segunda semana de avaliação metabólica
SM	Grupo de Subnutrido de Moçambique
Tc	Camada calcificada da cartilagem articular da tíbia
TCat	Cartilagem articular total da tíbia
Th	Camada hipertrófica da lâmina epifisial da tíbia
Tlet	Lâmina epifisial total da tíbia
Tm	Camada média da cartilagem articular da tíbia
Tp	Camada profunda da cartilagem articular da tíbia
Tp	Camada proliferativa da lâmina epifisial da tíbia
Tr	Camada de repouso da lâmina epifisial da tíbia
Ts	Camada superficial da cartilagem articular da tíbia
Uc	Camada calcificada da cartilagem articular do úmero
UCat	Cartilagem articular total do Úmero
Uh	Camada hipertrófica da lâmina epifisial do úmero
Ulet	Lâmina epifisial total do úmero
Ulp	Camada proliferativa da lâmina epifisial do úmero
Um	Camada média da cartilagem articular do úmero
Up	Camada profunda da cartilagem articular do úmero
Ur	Camada de repouso da lâmina epifisial do úmero
Us	Camada superficial da cartilagem articular do úmero

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	TERMINOLOGIA.....	24
2.2	SUBNUTRIÇÃO E A DIETA PADRÃO DE MOÇAMBIQUE	25
2.3	SUBNUTRIÇÃO E O TECIDO CARTILAGINOSO DE OSSOS LONGOS	28
2.4	CARACTERISTICAS GERAIS DA LE E DA CA	29
2.4.1	Lâmina epifisial	29
2.4.2	Cartilagem articular	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.2	OBTENÇÃO DAS ESPECIMES	39
4.3	OSTEOMETRIA	39
4.4	HISTOLOGIA	40
4.4.1	Evidenciação e morfologia da LE e da CA	41
4.4.2	MEC e componente colágeno da LE e da CA	42
4.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	42
5	RESULTADOS	44
5.1	ASPECTOS FÍSICOS	44
5.2	ASPECTOS QUANTITATIVOS METABÓLICOS	44
5.2.1	Massa corporal	44
5.2.2	Ingestão alimentar e excreção de fezes	45
5.2.3	Ingestão hídrica e excreção de urina	47

5.2.4	Razão Ingestão alimentar/Massa corporal e Ingestão hídrica/Massa corporal.....	48
5.2.5	Razão Excreção d fezes/Ingestão alimentar e Excreção de urina/Ingestão Hídrica	50
5.3	OSTEOMETRIA	51
5.3.1	Comprimento total do úmero e da tíbia	52
5.3.2	Largura proximal e distal da do úmero e da tíbia	52
5.4	ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS.....	54
5.4.1	Características gerais e MEC da LE.....	54
5.4.2	Características gerais e MEC da CA	58
5.5	ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUANTITATIVOS.....	63
5.5.1	Espessura da LE e de suas camadas no úmero	63
5.5.2	Espessura da LE e de suas camadas na tíbia.....	64
5.5.3	Espessura da CA e de suas camadas no úmero.....	65
5.5.4	Espessura da CA e de suas camadas na tíbia	66
6	DISCUSSÃO	68
6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL E EXPERIMENTAL	69
6.2	CONSIDERAÇÕES FÍSICAS E METABOLICAS	71
6.3	OSTEOMETRIA	73
6.4	CONSIDERAÇÕES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DA LE	75
6.5	CONSIDERAÇÕES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DA CA	76
7	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICES	88

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A subnutrição pode ser definida como um estado de deficiência, excesso ou desequilíbrio de nutrientes, resultante de ingestão inadequada e da má absorção ou utilização dos nutrientes ingeridos, que pode ocasionar efeitos adversos ao organismo com consequências clínicas e funcionais (KONDRUP et al., 2002; STRATTON et al., 2004; STRATTON, 2005). Sendo a dieta hipoproteica e hipocalórica uma das causas mais frequentes de subnutrição (GILLESPIE et al., 1996).

Apesar da redução da prevalência de indivíduos subnutridos nos últimos anos, a subnutrição ainda constitui um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, e está envolvida em mais de 50 % das causas de morte de crianças menores de 5 anos em países subdesenvolvidos (FAO, 2012). Estima-se que em Moçambique na África Oriental, cerca de 40% das crianças são acometidas pela desnutrição crônica (DC), uma forma grave de subnutrição (ROSE; TSCHIRLEY, 2003; BLACK et al., 2008), que segundo publicação oficial local¹, representa uma das principais causas de morte em crianças menores de 5 anos.

A DC pode ser causada pela subnutrição da mãe ainda antes da gravidez, durante período de gestação e lactação. Ela é expressa pela baixa estatura para idade e resulta da Desnutrição Aguda (DA) que consiste no baixo peso para a altura, esta última diferente da DC, pode ser reversível até os primeiros dois anos de vida (LI et al., 2003).

No período de gestação há intensa proliferação celular para formação e desenvolvimento dos órgãos, cujos tecidos encontram-se sensíveis a injúrias decorrentes de fatores extrínsecos. Dentre esses fatores está a subnutrição, cuja gravidade correlaciona-se com o momento em que ocorre, duração e intensidade (MORGANE et al., 2002).

As consequências da subnutrição para o organismo são variadas, porém, desde as formas leves às mais severas, é constante o comprometimento do desenvolvimento de crianças, sobretudo em países subdesenvolvidos (WHO, 2010).

---

¹ República de Moçambique. 2010. Plano de ação multisetorial para a redução da desnutrição crônica em Moçambique 2011-2014 (2020).

Na estrutura óssea, os efeitos da subnutrição se propagam desde a fase intra-uterina através da redução do tamanho e atraso do aparecimento de centro de ossificações em relação à idade gestacional (ADAMS, 1971), bem como na vida extra-uterina a partir da redução no índice de crescimento e desenvolvimento ósseo pós-nascimento (SHRADER; ZEMAN, 1973; BOLDRINI, 2003), na redução das dimensões ósseas e alteração da cartilagem articular (CA) e da lâmina epifisial (LE), na diminuição na quantidade de células na medula óssea (MIRANDA, 2006) e no atraso do fechamento da LE de ratos jovens, e na diminuição das dimensões ósseas em animais adultos (REICHLING; GERMAN, 2000).

Estudos verificaram que a renutrição não foi capaz de corrigir atraso do desenvolvimento ósseo (SHRADER; ZEMAN, 1973) e recuperar dimensões ósseas, porém reconstituiu satisfatoriamente os componentes estruturais do tecido cartilaginoso (BOLDRINI, 2003; MIRANDA, 2006).

Ao considerar os efeitos deletérios da subnutrição em Moçambique e que o processo do crescimento ósseo pode ser influenciado por fatores nutricionais, a presente pesquisa visa melhor compreender as suas repercussões na estrutura óssea através da reprodução em laboratório da dieta básica consumida pela população de Moçambique bem como possível recuperação com a suplementação proteica.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo destina-se a descrição da literatura pertinente aos assuntos envolvidos na presente pesquisa e está subdividida em tópicos.

2.1 TERMINOLOGIA

Na literatura não há um consenso sobre a nomenclatura utilizado para alterações nutricionais. Relativamente pode-se encontrar o uso de termos como desnutrição, subnutrição, má nutrição e inadequação alimentar, como sinônimos. De acordo com o dicionário Aurélio escrito por ferreira (2010) a desnutrição é definida como nutrição ineficiente ou nula. Não obstante o termo subnutrição é dado ao estado de insuficiência nutricional, que pode comprometer a saúde quando prolongado. Da mesma forma Chandra (1992) descreve a subnutrição como uma síndrome complexa, onde diversas deficiências ocorrem simultaneamente. Para Morgane et al. (2012), a subnutrição está relacionada a deficiência energética, enquanto a má nutrição associa-se com consumo inadequado de um ou mais nutrientes, que além da escassez pode indicar um excesso.

Entretanto recentemente o *World Food Programme* (2013), definiu a subnutrição como ingestão alimentar insuficiente para atender as necessidades mínimas fisiológicas do indivíduo. Dessa forma esse termo abrange a carência de qualquer nutriente passível de diversas repercussões no organismo.

Sendo assim o termo subnutrição será empregado neste estudo, para definir uma deficiência proteica.

2.2 SUBNUTRIÇÃO E A DIETA PADRÃO DE MOÇAMBIQUE

A subnutrição é considerada um problema de saúde pública no mundo e acomete principalmente países em desenvolvimento. Sua incidência é o melhor indicador da qualidade do capital humano de um país (UNCF, 2015).

Dados do Instituto Nacional de Estatística (2015) mostra que entre os anos de 2011 e 2015, há uma prevalência de subnutrição aproximadamente 35% da população geral de países do continente africano, que incluem: Angola, Etiópia, Moçambique, República Democrática do Congo, República Centro-Africana, Chad, Zâmbia (Figura 1).

No ano 2010, na República de Moçambique a subnutrição crônica foi responsável por um terço das mortes de crianças com idade inferior a cinco anos, e quando não chegam ao óbito, deixa consequências irreversíveis como a baixa estatura, a menor capacidade física produtiva, redução da função cognitiva que leva a um menor rendimento escolar, e riscos elevados de acometimento por doenças como a diabetes e a obesidade (BLACK et al., 2008).

Entre 2005 e 2011, um a cada quatro países africanos relataram uma taxa de subnutrição de pelo menos 40%, o que é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma prevalência muito alta (FAO, 2012).

O mapa de fome apresentado pelo *World Food Programme* (2015) aponta uma redução da porcentagem de subnutrição em Moçambique nos últimos anos, porém constitui ainda índices preocupação em relação ao estado nutricional de seus habitantes, com uma média de 25-34,9% da população (Figura 3).

Esses dados correlacionam-se com a pobreza absoluta deste País (AZZARRI, 2010) e com a qualidade precária da dieta fornecida a esses indivíduos que apesar de suprir suas necessidades energéticas, possui graves déficits de proteína, gordura e ferro em sua composição (ROSE; TSCHIRLEY, 2003).

Embora as tendências na produção alimentar mundial sejam perceptivelmente crescente, esse panorama não se aplica a África, uma vez que sua produção agrícola aumenta pouco menos de 1% ao ano, em comparação a outros países em desenvolvimento que apresentam um aumento de cerca de 2%. Além disso, enquanto outras regiões tendem substituir a oferta energética basicamente vegetal, a África parece manter esse padrão alimentar (FAO, 2012).

Figura 1- Mapa de fome

Fonte: (WFP, 2011; WFP, 2015)

Legenda: Observar os índices de subnutrição em Moçambique.

Em Moçambique, o amendoim compõe a principal fonte de proteína da dieta, além de outros componentes como farinha de milho, couve liofilizada. O amendoim pode variar seu proteico de 21,0 a 36,4% (WOODROOF, 1983).

De acordo com a FAO (2012) a participação dos produtos pecuários no fornecimento de proteína vem crescendo a nível global, com os países em desenvolvimento fazendo grandes progressos (Figura 2). Na maioria dos países e regiões, a alta disponibilidade de alimentos está associada a taxas relativamente baixas de subnutrição.

Somando-se a isso conforme descrito por Hiane et al. (2006), a digestibilidade determina qualidade proteica da dieta. E grande parte das proteínas de origem animal proporciona uma boa absorção de aminoácidos pelo organismo (PIRES et al., 2006). Por outro lado, as proteínas de origem vegetal, são mais resistentes à ação das enzimas digestivas (MAGA et al., 1973; CARIAS et al., 1995).

Figura 2 – Representação gráfica do suprimento energético derivada de cereais, raízes e tubérculos (1990-1992 e 2007-2009)

Fonte: (FAO, 2012).

Legenda: Observar maior índice no continente Africano entre os anos de 2007-2009. *LAC: América Latina e Caribe.

Relativamente a subnutrição branda oriunda de uma dieta inadequada, o uso de Alimento Terapêutico Pronto para Uso (ATPU), ou de uma dieta terapêutica adequada com alimentos locais ricos em nutrientes e suplementada com micronutrientes, pode ser capaz de reestabelecer o estado nutricional adequando (WHO et al., 2007).

2.3 SUBNUTRIÇÃO E O TECIDO CARTILAGINOSO DE OSSOS LONGOS

Shrader e Zeman (1973) Ao promover subnutrição no período pré-natal em alguns filhotes e pós-nascimento em outros, comprovaram que a subnutrição materna possui maior influencia sobre o centro de ossificação da tíbia que aquela promovida no período pós-natal e ambos resultaram em redução do crescimento ósseo. Além disso, os autores relatam que a suplementação alimentar durante o período de amamentação não foi suficiente para corrigir esses efeitos.

Hayha e Millward (1994) submeteram ratos a dietas com diferentes proporções de teor proteico, a partir do desmame por até 10 dias e mostraram que quanto maior a restrição proteica, mais rápidas são as alterações no comprimento da tíbia e especialmente na espessura da Lâmina Epifisial (LE). Houve também uma proporção semelhante na velocidade de reestabelecimento dessas estruturas frente à realimentação, porém mesmo com adição de proteína os parâmetros não foram totalmente revertidos em nenhum dos grupos.

Rechling e German (2000) também verificaram os efeitos da subnutrição no crescimento ósseo a partir do desmame até a fase adulta. Os autores descreveram que os ossos longos foram afetados pela subnutrição e comprimento da tíbia foi significativamente menor que a largura.

Miranda (2006) em estudo com ratos mostrou que uma subnutrição iniciada na fase intrauterina e prolongada até 42 dias de vida, ocasionou redução do crescimento ósseo e alterações morfológicas da LE e da camada superficial (S) da CA. Relatou ainda diferentemente dos estudos anteriores, que a suplementação proteica, foi suficiente para reestabelecer as características desses tecidos.

Bolina (2015) avaliou os efeitos da suplementação alimentar com resveratrol sobre o tecido cartilagineo da articulação do joelho em ratos submetidos a dieta hipoproteica, e constatou que a subnutrição pode modificar propriedades mecânicas da cartilagem articular do fêmur e da tíbia através de modificações dos componentes estruturais e ultraestruturais da MEC com degeneração e atraso no desenvolvimento do tecido. Entretanto quando realizou o tratamento com a dieta normoproteica complementada com resveratrol, atingiu uma melhora significativa em relação a reintrodução somente da proteína, porém não houve reestabelecimento completo das características teciduais.

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA LE E DA CA

As cartilagens encontradas nos ossos longos são formadas a partir da diferenciação das células mesenquimais, em condrócitos, envoltos por uma Matriz Extracelular (MEC), imprescindíveis ao crescimento ósseo longitudinal através da LE (VAN DER EERDEN et al., 2003) e integridade da superfície articular por meio da CA (VELOSA et al., 2007).

2.4.1 Lâmina epifisial

A LE é composta por um tecido cartilaginoso altamente organizado, localizada entre a epífise e metáfise nas extremidades de ossos longos, que confere ao osso o crescimento longitudinal, através de um processo denominado ossificação endocondral caracterizado pela formação de um centro de ossificação, com proliferação e diferenciação de condrócitos a partir de um molde de cartilagem hialina que é substituído gradativamente por tecido ósseo (OH et al., 2012).

Os condrócitos ficam dispostos na LE em camadas horizontais de acordo com seus diversos estágios de diferenciação.

Na porção proximal da LE, encontra-se a camada da cartilagem de repouso (r) ou de células germinativas que são cruciais para a orientação das colunas subjascentes de condrócitos e, por conseguinte, o crescimento do osso, unidirecional (ABAH et al., 2002; VAN DER EERDEN et al., 2003). Em seguida encontra-se a camada de cartilagem proliferativa (pl), nessa camada os condrócitos são achatados e sofrem divisão celular, na direção longitudinal com organização típica coluna a coluna. Essas células sintetizam quantidades substanciais de proteínas da MEC essenciais para a estrutura da LE (GAFNI et al., 2001; MININA et al., 2002; VAN DER EERDEN et al., 2003). Quando os condrócitos perdem a capacidade de se dividir e adquirem maior volume celular constituem uma zona de transição onde inicia a camada hipertrófica (h), composta por células arredondadas que secretam grandes quantidades de proteínas da MEC. Esta fase se caracteriza por um aumento de cálcio intracelular que inclui uma zona de cartilagem calcificada considerada área de junção metafisial (WANG; KIRSCH 2002; VAN DER EERDEN et al., 2003).

A camada h possui células osteogênicas que se diferenciam e depositam tecidos osteóides na superfície da metáfise, posteriormente esses tecidos são invadidos por vasos sanguíneos, osteoclastos e macrófagos mononucleares responsáveis pela reabsorção óssea e osteoblastos formando o tecido esponjoso (HOWELL; DEAN, 1992). O novo tecido ósseo é progressivamente formado na região inferior da LE, que resulta em alongamento do osso (NILSSON et al., 2005).

No interstício dos condrócitos existe a MEC, um meio aquoso composto de moléculas que contribuem para a manutenção da LE. As fibras colágenas são expressas predominantemente na MEC nas camadas pl e h, desempenham um papel essencial no sequestro de vários fatores de crescimento envolvidos na regulação da diferenciação e proliferação de condrócitos junto às proteoglicanas que também realizam *crosslinking* auxiliando na estrutura da MEC (VAN DER EERDEN et al., 2003).

A capacidade de proliferação dos condrócitos na LE é limitada, sua redução ocorre gradativamente até a maturação sexual, entretanto existem diversos fatores genéticos, hormonais, ambientais e nutricionais que contribuem para estabelecer o desenvolvimento e crescimento ósseo (NILSSON et al., 2005).

Dessa forma a LE está em processo contínuo de maturação e mineralização da MEC, até que haja uma mudança de direção da proliferação que implica no estreitamento da área de proliferação de condrócitos e consequentemente na fusão total da metáfise e epífise eliminando a LE (GERTNER, 1999).

2.4.2 Cartilagem articular

A superfície articular é recoberta por uma cartilagem hialina, a CA que é composta por condrócitos dispostos paralelamente entre si e perpendicularmente ao osso, seu interstício é preenchido por uma densa MEC cujas propriedades formam o esqueleto estrutural do tecido (fibras de colágeno) e confere maleabilidade frente a pressões, permitindo que o tecido volte ao seu estado de origem pós carga (proteoglicanas) (HUGHES et al., 2005).

A CA possui um papel importante na redução da fricção e da carga mecânica, absorve impacto e facilita o deslizamento dos ossos nas articulações (ALFORD; COLE, 2005). Entretanto a ausência de nervos e circulação sanguínea e linfática (GOBBI et al., 2010) limita

sua regeneração, pois resulta na incapacidade de diferenciação e multiplicação dos condrócitos (NETO et al., 2010).

A CA é constituída por três camadas que possuem diferentes espessuras, composição da MEC e morfologia e organização dos condrócitos (GANNON; NAGEL; KELLY, 2012)

A camada superficial (s) é a mais fina das camadas possui a finalidade de proteger as camadas mais profundas de tensões e lesões. Superficialmente é constituída por uma camada acelular constituída por fibras colágenas denominadas película brilhante (lâmina splendens) (BALANS; DENLINGER, 1989), logo abaixo é composta por um número relativamente elevado de condrócitos achatados (TEMENOFF; MIKOS, 2000). Esta camada está em contacto com o líquido sinovial e é responsável pela a maior parte das propriedades da cartilagem, que lhe permite resistir a tensão, tração, e forças de compressão impostas pela articulação (FOX; BEDI; RODEO, 2009). Logo a baixo encontra-se a camada média (M) que funciona como uma zona de transição interligando a camada superficial à camada profunda, possui baixa densidade de seus condrócitos esféricos (FOX; BEDI; RODEO, 2009), organizadas aleatoriamente com fibras de colágeno dispostas de forma oblíqua (GANNON; NAGEL; KELLY, 2012).

. Funcionalmente, essa camada é a primeira linha de resistência às forças de compressão. A camada profunda (p) é responsável por fornecer o maior resistência a forças de compressão, uma vez que as fibrilas de colágeno estão dispostas perpendicularmente à superfície articular. Além disso, possui maior quantidade de proteoglicanas, e menor concentração de água. Os condrócitos são tipicamente dispostos em colunas, paralelas às fibras de colágeno e perpendicular à linha da articulação (FOX; BEDI; RODEO, 2009). A camada calcificada (c) está localizada acima do osso subcondral, contem poucos condrócitos e uma matriz extracelular calcificada, que indica menor atividade metabólica (WANG et al., 2011).

A CA e o osso subcondral estão intimamente relacionados, de tal forma que uma alteração na estrutura de um é capaz de afetar a integridade funcional do outro, portanto mudanças na densidade mineral do osso subcondral pode comprometer o remodelamento ósseo (XIE et al., 2012).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Considerando os efeitos deletérios da subnutrição em Moçambique e que o processo do crescimento ósseo pode ser influenciado por fatores nutricionais, pretende-se na presente pesquisa avaliar as suas repercussões na estrutura óssea.

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar na cartilagem articular e lâmina epifisial de ossos longos de ratos wistar, as possíveis repercussões morfológicas da subnutrição proteica, através da comparação de animais submetidos à dieta padrão de Moçambique (hipoproteica) com animais que receberam esta mesma ração suplementada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos animais submetidos a rações baseadas na dieta padrão de Moçambique e com suplementação proteica:

- 1) As características físicas
- 2) A massa corporal
- 3) Padrões metabólicos de ingestão (alimentar e hídrica) e de excreção (fezes e urina);
- 4) As variações ósseas dimensionais;
- 5) Os aspectos qualitativos dos componentes estruturais da cartilagem articular e da lâmina epifisial;
- 6) Os aspectos qualitativos dos componentes estruturais da cartilagem articular e da lâmina epifisial.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a formação dos grupos experimentais foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com peso entre 280 e 320 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais, mantidos no biotério do Departamento de Anatomia de acordo com os princípios das Comissões de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP) e do ICB/USP, foram acondicionados em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada, dispostas em estante vertical, sob temperatura controlada entre 23 e 25°C, e ciclo de claro-escuro de 12 horas. A água e a ração padrão do biotério (NUVILAB) foram oferecidas sem restrições.

Depois de ambientados no biotério, por dois dias as gaiolas das fêmeas foram pareadas às dos machos. Em seguida, os animais foram acasalados, onde permaneceram 2 fêmeas para cada macho em uma mesma gaiola, por um período de 10 dias (sistema poligâmico). Nesse período, o ciclo estral das fêmeas foi induzido através do contato com a urina do macho. Durante o acasalamento, os animais foram separados em dois grupos, a fim de receber as respectivas rações para o experimento. Desta forma, para o primeiro grupo foi oferecida uma dieta que simula aquela predominante na população de Moçambique (dieta de Moçambique - DM), composta pelos seguintes elementos: farinha de milho, farinha de amendoim torrado, couve liofilizada, mix mineral AIN-93G, mix vitamínico AIN-93. O segundo grupo de animais foi submetido à DM acrescida de 20% de caseína (DMC). Ambas as dietas foram

preparadas por um laboratório bioquímico especializado¹, cuja composição encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 – Composição das Rações utilizadas na presente pesquisa*

Composição Nutricional	Ração de Moçambique	
	Padrão (%)	Suplementada (%)
Umidade	4,7	5,6
Proteína Bruta	16,2**	24,2
Estrato Etéreo	24,1	20,7
Fibra Bruta	0,9	1,3
Matéria Mineral	3,3	3,3
Carboidrato	50,5	44,9
Kcalg	4,8	4,6

* Quantidade presente por kg de ração

** Proteína vegetal

Após o período de acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com a respectiva dieta, mantida durante o período de gestação e de amamentação juntamente com os filhotes, até completarem 21 dias de vida extra-uterina, época determinada para o desmame. Para evitar possíveis diferenças no número de filhotes por ninhada, foi preconizado um número mínimo de 4 e número máximo de 8 animais por ninhada, desprezando-se aquelas com menos de 4 filhotes, ninhadas cujas mães alimentaram-se dos filhotes, excedente de ninhadas com 8 filhotes e os filhotes do sexo feminino. A partir do 22º dia de vida, os filhotes que receberam a DM e a DMC foram separados e mantidos com as respectivas dietas até o 42º dia de vida, constituindo-se assim, respectivamente os grupos Subnutrido de Moçambique (SM) e Nutridos de Moçambique (NM).

Para a formação de um terceiro grupo foram utilizados alguns animais do grupo SM que, a partir do 22º dia, receberam a DMC até completarem 42 dias de vida, constituindo-se assim, o grupo Renutrido de Moçambique (RM).

O fluxograma da figura 3 ilustra os procedimentos para a obtenção dos animais de todos os grupos experimentais (NM, SM e RM).

Figura 3 – Obtenção dos grupos experimentais

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Fluxograma dos eventos realizados para a formação dos grupos experimentais

Dieta de Moçambique (DM), Dieta de Moçambique suplementada com caseína (DMC), grupo nutrido de Moçambique (NM), subnutrido de Moçambique (SM) e renutrido de Moçambique (RM).

Todos os grupos foram constituídos por 5 animais, que foram colocados em gaiolas metabólicas durante 5 dias após o desmame (primeiro período – S1), e 5 dias antes da eutanásia (segundo período – S2) para controle diário do peso, ingestão de ração e água, e excreção de fezes e de urina. Os valores foram obtidos com o uso de uma balança de precisão (MARTE, modelo AS1000C), e registrados em fichas específicas.

As gaiolas metabólicas são constituídas por uma câmara de alimentação bi-partilhada, que capta os restos dos alimentos fora da gaiola a fim de evitar desperdício da ração e contaminação com as fezes. Além disso, possuem recipientes para ingestão hídrica, bem como tubos distintos para coleta de urina e fezes, como ilustra a figura 4.

Figura 4 - Instruções para manipulação da gaiola metabólica

Fonte: (INSTRULAB, 2015)

Legenda: Ilustração da manipulação de animais na gaiola metabólica

Findo o período de 42 dias, os animais dos grupos SM, NM e RM foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂), e submetidos às diversas técnicas.

4.2 OBTENÇÃO DAS ESPECIMENS

Após o sacrifício, os animais de todos os grupos (NM, SM, RM) tiveram retirados, bilateralmente, os membros anteriores e posteriores, a fim de se dissecar os úmeros e as tíbias. A tíbia e o úmero do lado esquerdo foram submetidos às técnicas rotineiras de histologia; a osteometria foi realizada nos ossos do lado direito, macerados quimicamente.

4.3 OSTEOMETRIA

Durante um período de 48 horas, a tíbia e o úmero de cada animal de todos os grupos permaneceram imersos em uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 40 vol) a 10%. Após lavados em água corrente por 10 minutos, e remoção dos remanescentes das partes moles sob lupa estereoscópica (Stemi Dv4 Karl Zeiss) os mesmos foram secos em estufa a 37°C (Figura 5), quando tiveram as medidas descritas a seguir, determinadas com auxílio de um paquímetro (DIGIMESS CAP 0-150/0,05).

- **Comprimento total do úmero (CTU):** Do ponto mais alto da cabeça do úmero até a tróclea;
- **Comprimento total da tíbia (CTT):** Do tubérculo intercondilar até a extremidade do maléolo medial;
- **Largura da epífise proximal do úmero (LPU):** A maior circunferência da cabeça do úmero;
- **Largura da epífise proximal da tíbia (LPT):** A maior distância entre os côndilos;
- **Largura distal do úmero (LDU):** Entre os epicôndilos;
- **Largura distal da tíbia (LDT):** A maior distância na altura da maior profundidade da fossa articular.

Figura 5 - Comparação das medidas ósseas da tíbia e do úmero nos grupos experimentais

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: ilustração das medidas ósseas tíbia e do úmero no grupo Nutrido de Moçambique(NM), Subnutrido de Moçambique (SM) e Renutrido de Moçambique (RM)

4.4 HISTOLOGIA

Após imersos em solução fixadora de formol durante 48 horas, a tíbia e o úmero de cada animal de todos os grupos (NM, SM e RM) foram descalcificados em solução de Morse (Ácido Fórmico / Citrato de Sódio), trocada a cada 48 horas, durante 12 meses. Em seguida à descalcificação (testada através da imersão do osso em solução de oxilato de amônio a 5% na proporção de 5:1 para avaliação do conteúdo mineral), os ossos foram lavados em água corrente por 48 horas e tiveram removidos o terço proximal contendo a epífise, a cartilagem epifisial, a metáfise e a parte proximal da diáfise.

Os espécimes foram desidratados em série crescente de alcoóis (70% ao absoluto), diafanizados em xilol, incluídos em parafina, e submetidos a cortes seriados de 5µm realizados no plano frontal em micrótomo (Leica SM 200R). Após acomodados em lâminas histológicas e mantidos em estufa de 57°C para a desparafinização, os cortes foram corados de acordo com a determinação dos parâmetros a seguir, e montados com Entellan (MERCK), entre lâmina e lamínula.

4.4.1 Evidenciação e morfometria da LE e da CA

Para as avaliações qualitativa e quantitativa (morfometria) dessas estruturas, os cortes histológicos foram submetidos à técnica de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (BEHMER, TOLOSA, FREITAS-NETO, 1976).

A morfometria (espessuras da CA e da LE) foi realizada em cinco cortes de cada animal de todos os grupos (NM, SM, RM) com o uso de um microscópio (Carl Zeiss, modelo Axioscope 40) acoplado a um sistema computadorizado de imagens (Axionvision Rel. 4,6, Gottingen, Alemanha). De cada corte, foram obtidos três campos equidistantes (lateral, intermédio e medial) onde, em cada um deles, foram realizadas três medidas lineares da espessura total (μm) da CA (desde a superfície da camada articular até o final da camada hipertrófica), e da LE (desde o início da camada de repouso até o final na camada hipertrófica). Desta forma, obteve-se a **espessura total**, tanto da cartilagem articular do úmero (Ucat) e da tíbia (Tcat); como da lâmina epifisial total do úmero (Ulet) e da tíbia (Tlet).

Da mesma forma foram, ainda, determinadas em três medidas lineares, a **espessura de cada camada** dessas estruturas. Para CA: camada superficial do úmero (Us) e da tíbia (Ts); camada média do úmero (Um) e da tíbia (Tm); camada profunda do úmero (Up) e da tíbia (Tp) e camada calcificada do úmero (Uc) e da tíbia (Tc). Na LE: a camada de repouso do úmero (Ur) e da tíbia (Tr); camada proliferativa do úmero (Ulp) e da tíbia (Tlp) e camada hipertrófica do úmero (Uh) e da tíbia (Th), como ilustra a Figura 6.

Figura 6- Demonstração da espessura da LE e da CA

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: exemplificação da metodologia utilizada para obtenção das medidas da espessura total da cartilagem articular do úmero (Ucat) e suas camadas superficial (s), média (m), profunda (p) e calcificada (c) (A). Espessura total da LE da tíbia (Tlet) e das camadas de repouso (r), proliferativa (pl) e hipertrófica (h) (B)

4.4.2 MEC e componente colágeno da LE e da CA

A evidenciação da MEC foi realizada através da técnica de coloração Safranina-O (LUNA, 1968), o que permite avaliar, proporcionalmente à intensidade da cor a quantidade de proteoglicanas presentes na cartilagem.

A tipificação das fibras colágenas foi determinada com o método do Picrosirius (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979) avaliado sob luz polarizada, que permite distinguir as fibras colágenas dos tipos I (vermelho, laranja, amarelo); II (azul esverdeado); e III(verde).

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados dos grupos (NM, SM e RM) referentes ao comprimento e largura do úmero e da tíbia, assim como os valores referentes à espessura da CA, da LE e de suas camadas constituintes foram submetidos à análise de variância paramétrica seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. Para todas as avaliações o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os resultados relativos à espessura da LE e CA da tíbia e do úmero também foram submetidos ao Teste de hipótese de dupla comparação com nível de significância de 95% para $Z < -1,95$ ou $> 1,95$ (Apêndices A, B, C, D).

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS FÍSICOS

Quanto ao comportamento, observou-se de forma acentuada no grupo SM canibalismo de mãe para filho, natimortos, e morte de filhotes pós-nascimento. Além disso, os animais desse grupo caracterizaram-se por exibir pelagem escassa e curta, diferentemente dos demais grupos, com animais com pelos de aspecto viçoso.

Comparativamente aos grupos NM e RM, o comprimento dos animais do grupo SM foi estatisticamente inferior, atingindo uma diferença de 16,6% e 12,6%, respectivamente, enquanto que nos animais renutridos (RM) essa diferença foi reduzida para 4,6% em relação aos NM (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros gerais: comprimento dos ratos (cm) dos diferentes grupos experimentais

Medidas	NM42	SM42	RM42
Comprimento (cm)	17,5 ± 0,5a	14,6 ± 0,4c	16,7 ± 0,5b

Dados expressos em Média ± desvio padrão (DP) a $p < 0,05$ grupo NM comparado aos grupos SM e RM; b $p < 0,05$ grupo RM comparado aos Grupos SM e NM; c $p < 0,05$ grupo SM comparado aos grupos NM e RM.

5.2 ASPECTOS QUANTITATIVOS METABÓLICOS

Nos períodos S1 e S2 foram avaliados diariamente dados relativos à **massa corporal**, **ingestão alimentar e hídrica**, e **excreção de fezes e de urina**.

5.2.1 Massa corporal

Os dados relativos à massa corporal indicaram efeitos de interação entre grupos e semanas, com aumento estatisticamente significativo ($p < 0,5$) entre S1 e S2 para todos os

grupos (NM, SM, RM), e entre os grupos (Tabela 3, Figura 7). Durante S1 verificou-se uma diferença 22,5% maior nos animais do grupo NM em relação àqueles do grupo SM; entre os grupos SM e RM, os resultados foram estatisticamente semelhantes. Em S2, a diferença entre os grupos SM e NM aumentou para 29%; entretanto, os valores apresentados para o grupo RM nesse período, indicou um aumento da massa corporal que atingiu 86,4% dos valores do grupo NM. Relativamente ao grupo SM, o grupo RM apresentou valores 17,7% maiores.

Tabela 3 - Média ($\pm$ DP) das massas corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Massa corporal(g)	NM42	SM42	RM42
S1	61,5 $\pm$ 4,0	36,9 $\pm$ 2,0	35,5 $\pm$ 0,7
S2	122,8 $\pm$ 7,1	62,0 $\pm$ 7,20	91,5 $\pm$ 3,3
NM $\neq$ SM e RM (S1)*			S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*
NM $\neq$ SM $\neq$ RM (S2)*			

Figura 7 – Representação gráfica da massa corporal (g)

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da massa corporal (g) obtidas no primeiro (S1) e no segundo período(S2) de avaliação metabólica dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

5.2.2 Ingestão alimentar e excreção de fezes

Em todos os grupos (NM, SM, RM) houve um aumento estatisticamente significativo do consumo de ração entre S1 e S2, porém, sem diferenças estatísticas entre si (Tabela 4 e Figura 8-A).

A quantidade de fezes eliminadas aumentou significativamente em todos os grupos, de S1 para S2. Quando analisada a excreção de fezes por grupo, comparando-se com o grupo NM, os animais dos grupos RM e SM eliminaram, respectivamente, cerca de 70% e 73,9% do que foi excretado pelos animais nutridos (Tabela 5 e Figura 8-B).

Tabela 4 - Média ($\pm$ DP) de ingestão alimentar (g) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Ingestão Alimentar(g)	NM42	SM42	RM42
S1	6,9 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 1,2	5,8 $\pm$ 1,4
S2	12,3 $\pm$ 1,3	9,5 $\pm$ 1,6	10,7 $\pm$ 1,0
S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*			

Tabela 5 - Média ($\pm$ DP) da excreção de fezes (g) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Excreção de fezes(g)	NM42	SM42	RM42
S1	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
S2	1,5 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
NM $\neq$ SM $\neq$ RM (S2)*			
S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*			

Figura 8 – Representação gráfica da ingestão alimentar (g) e da excreção de fezes (g)

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da ingestão alimentar (g) e da excreção de fezes (g) obtidas no primeiro(S1) e período(S2) de avaliação metabólica dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* **p<0,05**

5.2.3 Ingestão hídrica e excreção de urina

De S1 para S2 o consumo de água aumentou significativamente para todos os grupos. Durante S1, o grupo NM consumiu cerca de 12 ml de água, quantidade superior àquela consumida pelos grupos SM e RM. No segundo período (S2), não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 6 e Figura 9A).

Quando comparado o volume de excreção de urina entre S1 e S2, todos os grupos exibiram diferença estatisticamente significativa. Desta forma, os animais do grupo SM eliminaram em S2 68% de urina a mais do que em S1; nos grupos NM e RM, essa diferença foi de 65% (Tabela 7 e Figura 9B).

Tabela 6 - Média ($\pm$ DP) da ingestão hídrica (ml) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Ingestão hídrica (ml)	NM42	SM42	RM42
S1	12,50 $\pm$ 2,40	8,62 $\pm$ 1,79	9,05 $\pm$ 1,78
S2	31,20 $\pm$ 7,10	21,55 $\pm$ 9,20	26,26 $\pm$ 7,80
NM $\neq$ SM e RM (S1)*		S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*	

Tabela 7 - Média ($\pm$ DP) da excreção de urina (ml) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Excreção de urina (ml)	NM42	SM42	RM42
S1	5,9 $\pm$ 1,80	2,80 $\pm$ 0,80	2,79 $\pm$ 0,78
S2	17,9 $\pm$ 6,00	8,81 $\pm$ 4,78	13,77 $\pm$ 6,35
S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*			

Figura 9 – Representação gráfica da Ingestão hídrica (ml) e excreção de urina (ml)

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da Ingestão hídrica (ml) (A) e excreção de urina (ml) (B) obtidas no primeiro (S1) e segundo período (S2) de avaliação metabólica dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

5.2.4 Razão Ingestão alimentar/massa corporal e Ingestão Hídrica/Massa corporal

Os dados relacionados à razão ingestão alimentar/massa corporal, mostram que houve uma necessidade de maior consumo de ração para obtenção da massa corporal nos ratos que receberam a dieta de Moçambique (SM) em relação aos demais grupos. No primeiro período foi observada uma razão nos grupos SM e RM equivalente a 16% enquanto os animais NM ingeriram cerca de 11% da sua massa corporal. No segundo período, foi observada uma redução significativa dos valores no grupo RM para aproximadamente 11% porém foram mantidos os valores da razão de ingestão por massa corporal para os grupos SM e NM (Tabela 8 e Figura 10A).

Quando avaliada a razão da ingestão hídrica/massa corporal, não houve diferença estatística de S1 para S2, e nem entre os grupos, porém os animais SM representaram uma tendência a maiores valores em S2, com cerca de 34% (Tabela 9 e Figura 10-B).

Tabela 8 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/ massa corporal (%) de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Ingestão Alimentar/ Massa Corporal(%)	NM	SM	RM
S1	11,38 $\pm$ 2,57	16,11 $\pm$ 2,86	16,35 $\pm$ 3,81
S2	10,07 $\pm$ 0,75	15,20 $\pm$ 1,38	11,67 $\pm$ 0,71
NM $\neq$ SM (S1)* SM $\neq$ RM e NM (S2)*			S1 $\neq$ S2 (RM)*

Tabela 9 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão hídrica/massa corporal de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Ingestão Hídrica/ Massa Corporal (%)	NM	SM	RM
S1	20,44 $\pm$ 4,43	23,48 $\pm$ 4,98	25,49 $\pm$ 3,00
S2	25,37 $\pm$ 5,73	34,85 $\pm$ 14,55	28,74 $\pm$ 8,60
NM $\neq$ SM e RM (S1)*			

Figura 10 – Representação gráfica da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/ massa corporal (%) e da Ingestão hídrica/massa corporal (%)

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Ingestão alimentar/Massa corporal (A) e do Ingestão hídrica/Massa(B) corporal(%) obtidas no primeiro(S1) e segundo periodo(S2) de avaliação metabólica dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$.

5.2.5 Razão Excreção de fezes/Ingestão alimentar e Excreção de urina/Ingestão hídrica

Ao analisar a proporção de excreção de fezes por ingestão alimentar, não verificou-se alteração de S1 para S2, nem diferença significativa entre os grupos (Tabela 10 e Figura 11A).

Já quando avaliada a razão entre a excreção de urina e o consumo de água, durante S1 o grupo NM apresentou resultados maiores cerca de 46% em relação aos grupos SM e RM. Porém no S2 o grupo RM obteve um aumento de aproximadamente 20% em relação a S1 atingindo uma razão de 50%. Os menores valores foram observados no grupo SM com uma proporção de 36% da razão (Tabela 11 e Figura 11-B).

Tabela 10 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de fezes/Ingestão alimentar de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Excreção de fezes/ Ingestão alimentar (%)	NM	SM	RM
S1	8,17 $\pm$ 3,53	12,52 $\pm$ 4,76	10,88 $\pm$ 4,93
S2	11,86 $\pm$ 2,46	13,54 $\pm$ 2,87	9,92 $\pm$ 1,43
S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*			

Tabela 11 - Média ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros Excreção de urina/ Ingestão hídrica de acordo com as avaliações metabólicas no primeiro e segundo período

Excreção de urina /ingestão hídrica (%)	NM	SM	RM
S1	3,83 $\pm$ 0,16	3,45 $\pm$ 0,13	3,40 $\pm$ 0,12
S2	4,02 $\pm$ 0,11	3,52 $\pm$ 0,41	3,92 $\pm$ 0,12
NM $\neq$ SM e RM (S1)* SM $\neq$ RM e NM (S2)*		S1 $\neq$ S2 (NM, SM e RM)*	

Figura 11 – Representação gráfica da razão dos parâmetros Excreção de fezes /Ingestão alimentar (%) e Excreção de Urina/ Ingestão hídrica(%)

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da razão dos parâmetros excreção de fezes ingestão alimentar (g) (A) e Excreção de Urina Ingestão hídrica (ml) (B) obtidas no primeiro período (S1) e no segundo período (S2) de avaliação metabólica dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

5.3 OSTEOMETRIA

As médias ($\pm$ desvio padrão) relativas às medidas ósseas para os grupos NM, SM e RM estão expressas na tabela 12 e figuras 12 a 14.

Tabela 12 - Média ($\pm$ DP) do comprimento e largura (cm) do úmero e da tíbia dos animais dos grupos experimentais.

Medidas	NM42	SM42	RM42
CTU	2,05 $\pm$ 0,03	1,76 $\pm$ 0,02	2,04 $\pm$ 0,03
CTT	3,01 $\pm$ 0,04	2,53 $\pm$ 0,02	2,99 $\pm$ 0,03
LPU	0,37 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01
LPT	0,60 $\pm$ 0,00	0,49 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01
LDU	0,57 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,01
LDT	0,59 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01
LPU/ LDU	0,20 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01
LPT/ LDT	0,16 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,03

Os dados relacionados a todas as medidas ósseas mostram valores menores do grupo SM em relação aos grupos NM e RM, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

5.3.1 Comprimento total do úmero e da tíbia

Os animais do grupo SM apresentaram 85,9% do comprimento total do úmero dos animais do grupo NM, que não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo RM. Em proporções similares o comprimento total da tíbia foi menor no grupo SM equivalente a 15,5% e 15,4% em relação aos grupos NM e RM respectivamente (Figura 12 e Tabela12).

Figura12 - Representação gráfica do comprimento total (cm) do úmero e da tíbia.

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da do comprimento total do úmero (CTU) e da tíbia (CTT) (cm) dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

5.3.2 Largura proximal e distal da do úmero e da tíbia

Os resultados da largura proximal e distal do úmero e da tíbia indicam menor proporção nos ratos do grupo SM em relação ao grupo NM com aproximadamente 19% e 18% das medidas para úmero e tíbia respectivamente, e manteve uma diferença semelhante a essa quando comparado ao grupo RM (Figura 13 e Tabela12).

Figura13 - Representação gráfica da largura proximal e distal (cm) do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) da Largura proximal (A) e distal (B) do úmero e da tíbia (cm) dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

Já as medidas relacionadas às razões LPU/LDU e LPT/LDT, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Figura 14 e Tabela12).

Figura14 - Representação gráfica da razão largura proximal/ largura distal (%) do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) dos parâmetros referentes a razão Largura proximal/ Largura distal (Razão LP/LD) do úmero e da tíbia (cm) dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$

5.4 ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS

Neste item serão apresentados para todos os grupos experimentais, os resultados qualitativos referentes à LE e CA do úmero e da tíbia.

5.4.1 Características gerais e MEC da *LE*

Ao se avaliar as características morfológicas da LE do úmero e da tíbia, verificou-se nos grupos NM e RM as camadas r, p e h preservadas, e lacunas de MEC organizadas no sentido longitudinal. Entretanto, no grupo SM, a maioria dos espécimes caracterizou-se pela ausência das camadas r e p, e poucas lacunas orientadas diagonalmente. Naqueles cujas camadas foram detectadas, as lacunas eram mais amplas, bem como apresentavam uma densidade celular aparentemente bem menor do que a observada nos animais do grupo NM. Ainda, aparentemente, a espessura da LE tanto do úmero como da tíbia dos grupos NM e RM foi o dobro daquela do grupo SM (Figuras 15, 16).

Os aspectos morfológicos da LE do úmero e da tíbia estão evidenciados nas figuras 15 a 16.

Figura15 - Características gerais da LE do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Lâmina epifisial (LE) do úmero (A,B,C,D) e da tíbia (E,F, G, H), dos grupos NM (A,E) SM (B,C,F,G) e RM (D, H), e as camadas de repouso (r), proliferativa (p) e hipertrófica (h). Notar as diferenças da espessura da LE entre os grupos, principalmente o grupo SM, onde evidencia-se a menor espessura e organização diversa de suas camadas. (HE. Barra de calibração: 20 μ m).

Figura16 - Aspecto dos condrócitos da LE do úmero e da tibia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Em maior aumento, observa-se as camadas da LEL do úmero (A,B,C) e da tibia (D,E,F), dos grupos NM (A, D), SM (B, E) e RM (C e F). Notar organização das lacunas de MEC, bem como a densidade celular aparente, menor no grupo SM. (HE. Barra de calibração: 20 µm).

Quanto à MEC da tibia e do úmero evidenciada pelo método da Safranina-O observaram-se nas lacunas da camada **p**, diferenças entre os grupos. Tomando-se como

padrão a intensidade detectada nos animais do grupo NM, pode-se admitir que a intensidade no grupo SM foi fraca, enquanto que o grupo RM, exibiu intensidade intermediária (Figura 17).

Figura 17 - MEC da LE do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: LE do Úmero (A,B,C) e da Tíbia (D,E,F) , dos grupos NM (A, D), SM (B, E) e RM (C e F), onde observa-se as diferenças de intensidade de marcação da MEC, particularmente na camada **p** *. (Safranina-O. Barra de calibração: 20 μ m).

5.4.2 Características gerais e MEC da CA

Para todos os grupos (NM, SM, RM), as camadas **s** (com a película brilhante), **m** e **p**, bem como a camada **c** da CA do úmero e da tíbia estavam bem definidas; porém, com espessura menor nos animais do grupo SM, em relação aos grupos NM (Figura 18).

Aparentemente, no grupo NM, a densidade dos condrócitos da camada **p** na tíbia foi maior que no úmero; nos grupos SM e RM não se observou diferenças entre os dois ossos quanto a esse parâmetro. Da mesma forma, a densidade celular foi maior nos grupos NM e RM, e menor no grupo SM, tanto no úmero quanto na tíbia (Figura 19).

Figura18 - Características gerais da CA do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Camadas superficial (s), média (m), profunda (p) e calcificada (c) da CA do úmero (A,B,C) e da tíbia (D,E,F) , dos grupos NM (A, D), SM (B, E) e RM (C e F). Notar a presença da película brilhante (seta), e as diferentes espessuras entre os grupos. (HE. Barra de calibração: 20 μ m).

Figura19 - Aspecto dos condrócitos da CA do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Aspecto, em maior aumento, da camadas da CA do úmero (A,B,C) e da tíbia (D,E,F) , nos grupos NM (A, D), SM (B, E) e RM (C e F) onde se evidencia, na camada p, uma densidade celular nos grupos NM e RM. (HE. Barra de calibração: 20 μ m).

Com relação à intensidade de coloração da MEC evidenciada pelo método da Safranina-O, a mesma gradação verificada para a LE pode ser aqui admitida para a camada **m**,

ou seja, a maior intensidade foi verificada no grupo NM, e a menor no grupo SM; o grupo RM exibiu intensidade intermediária (Figura 20).

Figura 20 - MEC da CA do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015).

Legenda: Camadas s, média (m), profunda (p) e calcificada (c) da cartilagem articular do úmero (A,B,C) e da tíbia (D,E,F), dos grupos NM (A, D), SM (B, E) e RM (C e F). Notar as diferenças de coloração da MEC na camada **m** (*), mais intensa no grupo NM, menos no grupo SM, e intermediária no grupo RM (Safranina-O. Barra de calibração: 20 μ m).

A análise das lâminas coradas pelo método do picro-sírius sob luz polarizada permitiu verificar, tanto na CA como na LE da tíbia e do úmero, a presença de fibras colágenas do tipo II, características de cartilagem hialina. Nessas regiões dos dois ossos, verificou-se uma grande densidade dessas fibras nos animais do grupo NM, contrastando com a sua escassez verificada nos animais do grupo SM. Aparentemente, a densidade de fibras do tipo II estava elevada nos animais RM, assemelhando-se àquela observada no grupo controle (NM) (Figura 21).

Figura 21 - Fibras colágenas presentes na CA e na LE do úmero e da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Aspectos da CA e da LE relativos às fibras colágenas observadas sob luz polarizada nos animais dos grupos NM (A, B), SM (C, D), e RM (E, F). Notar a densidade elevada de fibras do tipo II (esverdeadas) nos animais nutridos, diminuída nos animais subnutridos (C, D), e semelhante ao grupo controle nos animais renutridos (E, F) (T- Tíbia; U- Úmero. Picro-sírius. Barra de calibração: 20 μ m).

5.5 ASPECTOS MICROSCÓPICOS QUANTITATIVOS

Neste item serão apresentados os resultados quantitativos relativos às diferentes **espessuras** da **CA** e da **LE** do úmero e na tíbia dos animais dos grupos NM, SM e RM.

5.5.1 Espessuras da LE e de suas camadas no úmero

A **Ulet** em animais NM foi maior, 68,94% e 36,62%, do que a observada nos animais SM e RM, respectivamente. Comparando-se com o grupo RM, o grupo SM atingiu apenas 31,06% de sua espessura.

As diferenças estatísticas entre NM e SM prevaleceram em todas as demais variáveis da LE do úmero (ou seja, as espessuras das camadas r, lp e h), com as medidas dos animais nutridos atingindo valores superiores aos dos animais subnutridos. Desta forma, a Ur (51,5%), a Ulp (56,0%) e a Uh (53,7%) do grupo SM foi praticamente a metade das espessuras do grupo NM.

Os dados do grupo RM, em comparação com o grupo NM, foram inferiores para a Ur (33,3%) e para a Ulp (58,5%); o valor da Uh não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Quando se comparou com o grupo SM, a Ur, a Ulp e a Uh foram, respectivamente, 27,2%, 11,5% e 51,8% menores (Tabela 13, Figura 22).

Tabela 13 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da LE (μm) do úmero e de suas camadas nos grupos experimentais

Medidas	NM	SM	RM
Ulet	275,84 $\pm$ 13,34	85,68 $\pm$ 40	233,92 $\pm$ 6,93
Ur	44,79 $\pm$ 1,50	21,73 $\pm$ 2,17	32,59 $\pm$ 2,10
Ulp	123,11 $\pm$ 5,29	45,20 $\pm$ 4,54	108,96 $\pm$ 3,25
Uh	102,76 $\pm$ 4,11	47,54 $\pm$ 3,09	96,68 $\pm$ 4,68

SM $\neq$ NM $\neq$ RM (Ulet, Ur, Ulp)*

SM $\neq$ NM e RM (Uh)*

Figura22 - Representação gráfica das espessuras das camadas da LE (μm) do úmero

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) referentes às espessuras das camadas de repouso (Ur), proliferativa (Ulp) e hipertrófica (Uh) da lâmina epifisial (μm) do úmero dos animais dos grupos NM, SM e RM dos. ANOVA* $p < 0,05$. TESTE DE HIPÓTESE DE DUPLA COMPARAÇÃO* $Z < -1,95$ ou $> 1,95$

5.5.2 Espessuras da LE e de suas camadas na tíbia

Quando comparados os grupos entre si, observou-se que o grupo SM apresentou valores menores que os grupos NM e RM em todas as variáveis.

Assim, na Tlet, essa diferença chegou a 56% em relação ao grupo RM e 51,3% quando comparada ao grupo NM. A Tr, Tlp e Th desses animais foram, respectivamente 39,8%, 47% e 36,05% do verificado para os animais nutridos. A Th do grupo SM apresentou 55% do valor total do grupo RM, enquanto que a Tr e a Tlp não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Já a Th e a Tlet o grupo RM comparadas com o grupo NM apresentaram uma espessura 9,7% e 14,1% maior (Tabela 14, Figura 23).

Tabela 14 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da LE (μm) da tíbia e de suas camadas nos grupos experimentais

Medidas	NM	SM	RM
Tlet	275,57 $\pm$ 10,66	134,42 $\pm$ 8,70	305,21 $\pm$ 6,26
Tr	42,82 $\pm$ 6,12	25,77 $\pm$ 3,82	35,81 $\pm$ 2,22
Tlp	132,78 $\pm$ 5,10	70,39 $\pm$ 3,48	138,65 $\pm$ 4,60
Th	115,07 $\pm$ 3,69	73,57 $\pm$ 10,29	134,05 $\pm$ 4,69

SM $\neq$ NM $\neq$ RM (Tlet, Tr, Tlp, Th)*

Figura23 - Representação gráfica das espessuras das camadas da LE (μm) da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) referentes as espessuras das camadas de repouso (Tr), proliferativa (Tp) e hipertrófica (Th) da lâmina epifisial (μm) da tíbia dos animais dos grupos NM, SM e RM dos. ANOVA* $p < 0,05$. TESTE DE HIPÓTESE DE DUPLA COMPARAÇÃO* $Z < -1,95$ ou $> 1,95$

5.5.3 Espessuras da CA e de suas camadas no úmero

Todas as variáveis estudadas (Ucat, Us, Um, Up e Uc) apresentaram valores menores nos animais pertencentes ao grupo SM em relação ao grupo NM. Os animais renutridos (grupo RM) exibiram valores estatisticamente semelhantes aos animais nutridos (grupo NM) para as variáveis Ucat, Us, Up e Uc; já a variável Um foi menor (21,3%), dado semelhante ao observado para os animais subnutridos (grupo SM). Para as variáveis Us, Up e Uc, o grupo SM apresentou valores com proporções de 27%, 25,8% e 24,7% respectivamente menores que as exibidas pelo grupo NM (Tabela 15 e Figura 24).

Tabela 15- Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da CA (μm) do úmero e de suas camadas nos grupos experimentais

Medidas	NM	SM	RM
Ucat	391,80 $\pm$ 19,32	313,58 $\pm$ 14,4	367,76 $\pm$ 12,10
Us	31,80 $\pm$ 1,62	23,14 $\pm$ 1,50	29,02 $\pm$ 2,40
Um	57,30 $\pm$ 6,57	43,36 $\pm$ 2,50	45,11 $\pm$ 6,50
Up	85,50 $\pm$ 6,06	63,43 $\pm$ 4,20	87,00 $\pm$ 3,30
Uh	179,96 $\pm$ 5,89	136,65 $\pm$ 4,80	178,02 $\pm$ 6,93

SM $\neq$ NM e RM (Ucat, Us, Up e Uc)*

SM $\neq$ NM (Um)*

Figura24 - Representação gráfica das espessuras das camadas da CA (μm) do úmero

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) referentes as espessuras das camadas superficial (Us), média (Um), profunda (Up) e calcificada (Uc) da cartilagem articular (μm) do úmero dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$. TESTE DE HIPÓTESE DE DUPLA COMPARAÇÃO* $Z < -1,95$ ou $> 1,95$

5.5.4 Espessuras da CA e de suas camadas na tíbia

Os resultados relativos à CA da tíbia estão expressos na tabela 16 e figura 25. A análise dos dados revela valores distintos, estatisticamente significativos para todas as avaliações em todos os grupos estudados (NM, SM e RM), exceto para a espessura da camada média. Assim, verificou-se que os valores da Tcat para os grupos NM e RM foram cerca de 57,9% e 54%, maiores em relação ao grupo SM. Em comparação ao grupo RM, o grupo NM prevaleceu com uma espessura 14,4% maior.

Diferente dos resultados obtidos no úmero, a camada média da tíbia apresentou espessura semelhante entre NM e RM; entretanto, a espessura no grupo NM foi 32,2% maior que aquela do grupo SM.

Relativamente ao grupo controle (NM), a espessura da camada superficial da tíbia do grupo SM foi 28,4% menor; já em relação ao grupo RM, essa diferença foi de 12,6%. Quando comparados os grupos NM e SM, os animais renutridos exibiram uma espessura 18,6% maior.

A espessura da camada profunda da tíbia do grupo SM correspondeu, aproximadamente, à metade dos valores dos grupos NM (57%) e RM (46,7%).

A espessura da camada calcificada dos animais RM alcançou 87,7% da espessura obtidas no grupo NM. Entretanto, nos animais do grupo SM essa espessura foi equivalente a 51,53% daquela dos animais NM, e 58,7% quando confrontados com os animais RM.

Tabela 16 - Média ($\pm$ DP) referentes as espessuras da CA (μm) da tíbia e de suas camadas nos grupos experimentais

Medidas	NM	SM	RM
Tcat	351,48 $\pm$ 14,67	190,58 $\pm$ 38,05	300,9 $\pm$ 33,30
Ts	33,19 $\pm$ 2,93	23,62 $\pm$ 1,90	29,00 $\pm$ 02,45
Tm	54,12 $\pm$ 5,00	36,72 $\pm$ 3,35	52,82 $\pm$ 03,4
Tp	112,50 $\pm$ 5,67	48,41 $\pm$ 5,30	87,49 $\pm$ 09,30
Th	165,80 $\pm$ 11,10	85,45 $\pm$ 9,75	145,40 $\pm$ 10,40

SM $\neq$ NM $\neq$ RM (Tcat, Ts, Tp e Tc)*

SM $\neq$ NM (Tm)*

Figura25 - Representação gráfica das espessuras das camadas da CA (μm) da tíbia

Fonte: (ROCHA-CRUZ, 2015)

Legenda: Média e ($\pm$ DP) referentes as espessuras das camadas superficial (Ts), média (Tm), profunda (Tp) e calcificada (Tc) da cartilagem articular (μm) da tíbia dos animais dos grupos experimentais. ANOVA* $p < 0,05$. TESTE DE HIPOTESE DE DUPLA COMPARAÇÃO* $Z < -1,95$ ou $> 1,95$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este capítulo destina-se a discutir os resultados relevantes obtidos nesse estudo relacionados aos aspectos metabólicos, morfológicos macroscópicos e microscópicos.

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL E EXPERIMENTAL

Existe uma diversidade de modelos animais utilizados para pesquisas, cuja maior proporção é realizada em ratos (MONTEIRO et al., 2009). De acordo com Aksoy (2002) os estudiosos optam por animais de pequeno porte devido à facilidade na obtenção e manipulação experimental, na observação da patogenia e de aspectos clínicos. Entretanto Nóbrega (1986) ressalta que a interpretação dos resultados em condições como a subnutrição é mais intensa em animais experimentais quando comparados aos seres humanos.

Dessa forma, como modelo experimental do presente estudo foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem wistar não consangüíneos que, segundo Braga (2010) apresentam cerca de 90% de heterozigose, que possibilita a manutenção de grande diversidade genética (vários alelos), numa mesma colônia. Como resultado ocorre uma reprodução fiel de populações naturais, com grande similaridade das características humanas. Além disso, esses animais possuem uma alta taxa reprodutiva, baixo índice de mortalidade e um ciclo vital curto, o que permite o estudo de todas as fases da vida em uma grande população com menor custo.

Esses ratos entram na puberdade já a partir dos 30 dias de vida, e a maturidade sexual acontece entre os 50 e 60 dias, (VIAL et al., 2005). De acordo com essas informações foi determinada a idade para o acasalamento entre 60 e 90 dias de vida, com a finalidade de proporcionar uma maior taxa de sobrevivência, tendo em vista os animais subnutridos, que apresentam maior instabilidade no momento do acasalamento e menor número de filhotes nascidos vivos e sobreviventes.

Ao se considerar o sexo do animal, optou-se por utilizar amostras somente do sexo masculino, minimizando a influencia dos hormônios sexuais femininos, pois de acordo com Smith et al. (1994) durante a puberdade, o pico de crescimento é provavelmente influenciado por níveis baixos de estrogênio em combinação com a secreção aumentada do hormônio do

crescimento(GH). Por outro lado, a fusão da LE é mediada pela ação exclusiva de níveis elevados de estrogênio, demonstrando assim que esse hormônio acima de uma certa concentração, pode inibir o crescimento longitudinal.

Os modelos experimentais de subnutrição e recuperação nutricional utilizam diferentes protocolos em relação à quantidade e qualidade de proteína na dieta, e período de oferta (ADAMS, 1971; SHRADER; ZEMAN, 1973; LUKE, 1979; YAMANO et al., 1980; METHA et al., 2002; BOLDRINI, 2003; REICHLING; GERMAN, 2003; MORAES, 2006; MIRANDA, 2006; BOLINA-MATOS, 2015).

Na presente pesquisa optou-se por adotar um modelo relacionado à alta prevalência de subnutrição em Moçambique, cuja endemecidade acomete principalmente a população infantil (BLACK et al., 2008).

Em 2010, a manifestação da subnutrição crônica na República de Moçambique foi responsável por um terço das mortes de crianças com idade inferior a cinco anos. Quando não chegam ao óbito, elas exibem consequências irreversíveis como a baixa estatura, a menor capacidade física produtiva, redução da função cognitiva que leva a um menor rendimento escolar, e riscos elevados de acometimento por doenças como a diabetes e a obesidade (BLACK et al., 2008).

Este alto índice de subnutrição pode estar relacionado com a qualidade da dieta básica oferecida à população de Moçambique, cuja composição tem no amendoim sua principal fonte de proteína com cerca de 21,0 a 36,4% de teor proteico. Isso por que, segundo Carias et al. (1995), as proteínas de origem vegetal são mais resistentes à ação de enzimas digestivas, o que resulta em pouca digestibilidade.

Já a caseína, uma fosfoproteína estrutural também utilizada na presente pesquisa, exibe um teor proteico de 81,57%, proporciona boa absorção de aminoácidos (PIRES et al., 2006) e tem digestibilidade de cerca de 96% (SGARBIERI, 1987).

De acordo com estudo de Sanz-Sampelayo, Fenolla e Extremera (1991) uma dieta composta com cerca de 18% de caseína é suficiente para a obtenção do crescimento ideal dos animais experimentais.

Todos os fatos acima citados corroboram com os resultados aqui obtidos, já que os animais considerados subnutridos (SM) receberam uma ração baseada na dieta básica de Moçambique, e os do grupo controle (NM), que receberam essa dieta suplementada com aproximadamente 20% de caseína, no geral apresentaram características de animais nutridos.

De acordo com Ahmad e Rahman (1975) a relação entre a disponibilidade de leite para a prole e o número de animais por ninhada pode influenciar no estado de nutrição do filhote.

Com isso, foi padronizado uma quantidade entre 4 e 8 filhotes para a matriz, a fim de minimizar vieses nos grupos ao evitar discrepâncias quanto a oferta alimentar nas ninhadas. Além disso, procurou-se reduzir o canibalismo, que foi observado apenas da mãe para o filhote, principalmente no grupo SM, e em menor proporção nos demais grupos.

Segundo Braga (2010) o rato é um animal muito sensível às alterações de odor, textura e aparências dos alimentos, sendo necessário considerar-se que na fase inicial de acasalamento, as fêmeas passam de uma alimentação balanceada para uma dieta hipoproteica, o que de certa forma contribuiu para um estresse cumulativo que levou ao canibalismo.

Além da perda de amostras por canibalismo, também foi observado no grupo SM casos de aborto e natimortos, assim como descrito no trabalho de Diaz del Castillo (1975) em estudo com gestantes submetidas a dietas hipoproteicas.

Para Andrade, Pinto e Oliveira (2002), diversas situações como alimentação, mudança de trocador, manejo, isolamento, métodos experimentais e barulho excessivo contribuem com o estresse do animal, e consequentemente a respostas fisiológicas. Essa situação foi confirmada durante o período de obtenção dos grupos aqui utilizados, uma vez que as reformas no biotério onde os animais foram alojados efetivamente influenciaram contribuíram para o estresse dos animais, resultando em canibalismo até nos animais dos grupos NM e RM.

Em relação ao período de eutanásia, foi preconizado para o presente estudo um período de 45 dias de vida. De acordo com o estudo de Bolina (2015) esse período comporta o maior índice metabólico dos ratos, que tende a diminuir gradativamente até os 60 dias.

6.2 CONSIDERAÇÕES FÍSICAS E METABOLICAS

No grupo SM notou-se alterações no aspecto do pêlo, menor em tamanho e densidade quando comparado aos demais grupos. Essas observações encontram apoio nas descrições de Shrader e Zeman (1969) que, através de análise histológica, verificaram uma redução considerável na atividade enzimática nas camadas da epiderme, nas células epiteliais dos brotos rudimentares do pêlo, nos componentes do tecido conjuntivo e nas papilas em formação de animais subnutridos.

Para o grupo NM, os parâmetros metabólicos avaliados nesta pesquisa (massa corporal, ingestão alimentar e hídrica, excreção de fezes e urina) apresentaram resultados que,

quando não foram significativamente maiores, foram sugestivos de um aumento em relação aos demais grupos, o que está de acordo com estudos experimentais de subnutrição na fase intra e extrauterina (HOWIE; SLOBODA; VICKERS, 2012; BOLINA, 2015) onde foram detectadas alterações metabólicas graves.

Em diversos estudos, a redução da massa corporal e do comprimento naso-anal foram destacados como características apresentadas em animais subnutridos (ADAMS, 1971; SHRADER; ZEMAN, 1973; LUKE, 1979; MIRANDA, 2006; BOLINA-MATOS, 2012; BOLINA, 2015). Nos animais que receberam a dieta de Moçambique (SM) desde a fase intrauterina, esses parâmetros não foram diferentes, uma vez que esses animais apresentaram menos que a metade da massa corporal e do comprimento naso-anal dos animais nutridos (NM).

Quando a dieta de animais SM foi suplementada com caseína (RM) por um período de 21 dias iniciado logo após o desmame, observou-se ganho de massa corporal e aumento do comprimento naso-anal; porém, não o suficiente para reestabelecer os parâmetros do grupo controle (NM), assim como descrito em estudos com ossos (MIRANDA, 2006; BOLINA, 2015), encéfalo (BOLINA-MATOS, 2012) e timo (BAPTISTA et al., 2013).

No grupo RM, o período inicial quando se ofertou somente a dieta de Moçambique, pode ter influenciado nos resultados obtidos, especificamente por se tratar da fase intrauterina e de lactação, que conforme Borsatto (1999) consiste em uma fase crítica para o desenvolvimento corporal, quando ocorre intensa atividade celular em resposta a estímulos de crescimento. De acordo com Ancona Lopes (1973) a intensidade e a permanência da subnutrição estão relacionadas proporcionalmente ao período de sua instalação, e inversamente ao início da reposição nutricional, o que é corroborado com os dados da presente pesquisa, referentes aos animais renutridos. Reforçam essa teoria os estudos que evidenciaram que a subnutrição materna influencia na redução da massa placentária (CLEMENTE et al., 2012) e nas características das glândulas mamárias (PLATTE; STEWART, 1968), e que resultaram em alterações na oferta e na qualidade da alimentação da prole (PINE; JESSOP, 2004).

Na avaliação metabólica, verificou-se em todos os grupos que a ingestão alimentar e hídrica aumentou consideravelmente do S1 para o S2, porém sem apresentarem diferenças estatísticas significativas entre si. Esses dados diferem de outros modelos experimentais de subnutrição, quando se verificou que os animais nutridos ingeriram maior quantidade de alimento e água, em relação aos subnutridos e renutridos (BOLINA-MATOS, 2012;

BOLINA, 2015). Tais resultados contraditórios permitem inferir que a digestibilidade da dieta padrão de Moçambique é inferior àquela suplementada.

Quando avaliada a razão ingestão alimentar e hídrica/massa corporal, foram apresentados resultados semelhantes ao da literatura (BOLINA, 2015; BOLINA-MATOS, 2012) onde foi observado que os animais SM necessitavam de uma maior quantidade tanto de ração quanto de água para atingir seu peso corporal em relação aos animais NM desde o primeiro período de avaliação (S1). Os animais RM obtiveram uma razão semelhante ao grupo NM, demonstrando uma redução na necessidade de ingestão alimentar e hídrica após suplementação da dieta, especialmente no último período de avaliação. Para Bolina (2015) os animais que são submetidos à subnutrição desde a gestação e lactação, possuem necessidade maior de se alimentar para suprir a carência proteica devido à má absorção de alimentos pelo trato gastrointestinal.

O mecanismo do apetite está relacionado com a ação da leptina e da grelina, hormônios da saciedade e da fome. A leptina é sintetizada pelo tecido adiposo e atua na regulação da ingestão alimentar, sinalizando ao hipotálamo a quantidade de energia armazenada no organismo. Por outro lado a grelina é um hormônio que atua no trato gastrointestinal a secreção de enzimas digestivas e do hormônio do crescimento, além de sinalizar ao hipotálamo a necessidade de aquisição de energia, e assim estimular a fome (WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011).

De todos os grupos experimentais, aqueles que receberam a dieta padrão de Moçambique (SM) apresentaram uma redução acentuada da excreção de urina em relação à ingestão de água, comprovando uma retenção hídrica nesses animais. De acordo com Ahmed, Rahman e Cravioto (2009) esta é uma característica de subnutrição severa cuja presença de edema está entre as principais manifestações clínicas.

6.3 OSTEOMETRIA

A FAO (2012) aponta altas taxas de baixa estatura e peso no Continente Africano. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) entre os anos de 2005 e 2011, cerca de 40% da população de um a cada quatro países africanos apresenta subnutrição.

A antropometria faz parte de um conjunto de indicadores de segurança alimentar. Elas passam informações sobre as consequências mais dramáticas e de longa duração de subnutrição. Essas medidas em crianças menores de cinco anos de idade podem estimar o estado nutricional de uma população (FAO, 2012).

Estudos experimentais apontam a subnutrição como determinante para o atraso no crescimento ósseo de animais submetidos a uma dieta hipoproteica nas fases pré-natal e de lactação, através da redução no crescimento longitudinal e no tamanho das epífises ósseas (LUKE et al., 1979; REICHLING; GERMAN, 2000; MORAES; MIRANDA, 2006). As medidas no comprimento do úmero e da tíbia, realizadas na presente pesquisa indicam que os animais que receberam a DM apresentam um crescimento ósseo menor que daqueles cuja dieta foi suplementada (DMC), assumindo dessa forma característica de animais subnutridos. Entretanto, após a recuperação nutricional, os animais do grupo RM reestabeleceram as medidas ósseas semelhantes às apresentadas no grupo controle (NM).

O estudo realizado por Shrader e Zeman (1973) utilizou além do comprimento, a largura das extremidades do fêmur, tíbia e úmero como parâmetro de crescimento e desenvolvimento ósseo e comprovaram que os animais subnutridos apresentavam valores reduzidos também para essas medidas. Ainda Yayha e Millward (2000) descreveram que a largura dos ossos foram mais sensíveis à privação de proteína que o comprimento. Da mesma forma, no presente estudo, os resultados da largura proximal e distal do úmero e da tíbia também indicam menor proporção nos ratos do grupo SM em relação aos demais grupos que não apresentaram diferença estatística.

A ossificação endocondral é caracterizada pela de formação de um centro de ossificação a partir de um molde de cartilagem hialina, que é gradualmente substituída por tecido ósseo, processo este responsável pelo desenvolvimento e crescimento de ossos longos no período fetal e durante toda a vida (OH et al., 2012). O processo de ossificação sofre influência de diversos fatores intrínsecos como a genética, presença de cálcio, proteínas específicas, hormônios e diferenciação celular (KRONENBERG, 2003), além de fatores extrínsecos como os ambientais e nutricionais (SHAPIRO; PIMSTONE, 1977; GETNER, 1999).

De acordo com Adams (1971) a subnutrição pode levar a um atraso no aparecimento do centro de ossificação ainda na fase intrauterina. Para Shrader e Zeman (1973) a subnutrição materna durante o período pré-natal exerce maior influencia sobre a formação do centro de ossificação endocondral que a subnutrição promovida na fase de lactação. Nos trabalhos de Boldrini (2003) e Miranda (2006), em relação à renutrição, cuja dieta

hipoproteica foi oferecida à mãe desde a fase gestacional e mantida durante a lactação, o processo de recuperação protéica não foi suficiente para reestabelecer as dimensões ósseas. Diferentemente, os dados obtidos no presente estudo apontam que a renutrição (grupo RM) foi capaz de corrigir as diferenças detectadas na osteometria do úmero e da tíbia, em relação aos ratos nutridos (grupo NM). Essa divergência de resultados pode ser relacionada às diferenças nos protocolos experimentais pois, como já comentado, no presente estudo foi ofertada uma dieta cuja composição protéica, embora com teor proteico maior que dos trabalhos citados (5% de caseína) possui menor digestibilidade. Conforme relatado por Mendonça (2015) em parâmetros relacionados a peso, comprimento e estrutura do sistema nervoso periférico, animais submetidos à dieta de Moçambique são acometidos numa proporção menor que aqueles cuja a oferta de proteína foi restrita a 5% de caseína

6.4 CONSIDERAÇÕES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DA LE

Estudos em animais subnutridos têm demonstrado redução na espessura da LE bem como uma irregularidade no arranjo dos condrócitos (SHRADER; ZEMAN, 1973; MIRANDA, 2006; MORAES, 2006). Resultados semelhantes foram aqui obtidos, uma vez que os animais do grupo SM apresentaram uma espessura total da LE equivalente à metade daquela obtida nos animais NM. Em muitos dos animais subnutridos não foi possível identificar as camadas de r e lp, devido ao aumento do tamanho dos condrócitos que estavam orientados diagonalmente. Em outros, cujas camadas estavam todas preservadas, havia um aumento de lacunas, e com isso menor densidade celular aparente.

A divergência na organização dos condrócitos da LE em um mesmo grupo pode estar relacionada com a influencia hormonal que infere diretamente na ossificação endocondral, já que se trata de uma mesma prole, condições ambientais e nutricionais (KRONENBERG, 2003). De acordo com Gertner (1999) a mudança de direção da proliferação celular implica no estreitamento da área de proliferação de condrócitos, e conseqüentemente na fusão total da metáfise e epífise eliminando a LE.

A renutrição não foi suficiente para reestabelecer os parâmetros da LE; entretanto, verificou-se nesse grupo medidas intermediárias de sua espessura total e de suas camadas no úmero. Na tíbia não foram identificadas diferenças entre as camadas da LE em relação aos

animais do grupo SM, exceto na camada h, onde foi apresentada uma maior espessura em relação ao grupo nutrido.

De acordo com Howell e Dean (1992) a camada h constitui a cartilagem calcificada, local em que as células osteogênicas se diferenciam e depositam tecido osteóide após sofrer remodelação intensa. Nas lacunas dos condrócitos da LE principalmente na camada lp, é encontrada a MEC que fornece a eles suporte, regulação da diferenciação e proliferação celular além de promover o sequestro de fator de crescimento (VAN DER EERDEN et al., 2003) cuja redução pode comprometer o crescimento ósseo (OLSTAD et al., 2007).

Utilizando o método da Safranina-O, Miranda (2006) observou que a subnutrição pode afetar os componentes presentes na MEC da LE no úmero e na tíbia. Da mesma forma, no presente estudo, a coloração da MEC também foi mais intensa no grupo NM, especialmente na camada lp, e no grupo SM foi detectada uma intensidade menor da coloração; O grupo RM alcançou uma coloração intermediária da MEC. Sendo assim, a subnutrição pode comprometer a estrutura da MEC e consequentemente o arranjo dos condrócitos que influencia na manutenção da LE e portanto, no crescimento do osso.

6.5 CONSIDERAÇÕES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DA CA

Estudos mostram que a subnutrição afeta a espessura da CA, bem como a morfologia e a densidade dos condrócitos (MONTEIRO et al., 2010; BOLINA, 2015).

Ao analisar a CA do úmero e da tíbia de animais do grupo SM foi verificada uma espessura reduzida de suas camadas constituintes, bem como a densidade aparente de condrócitos em comparação ao grupo nutrido (NM). O grupo renutrido RM) restabeleceu a espessura da CA e de suas camadas no úmero, e apresentou resultados intermediários na tíbia. Porém, quando avaliada qualitativamente a densidade dos condrócitos, verificou-se que a mesma apresentou-se de forma intermediária entre os grupos NM e SM tanto para o úmero quanto para a tíbia, o que pode contribuir para o estabelecimento de lesões da CA em animais subnutridos, já que os condrócitos e a MEC conferem as propriedades resistivas na superfície da articulação sinovial (GANNON; NAGEL; KELLY, 2012). De acordo com Monteiro et al. (2010) a redução da espessura da CA está associada, dentre outros fatores, à carência proteica

e conseqüentemente determina um atraso no desenvolvimento ósseo de indivíduos subnutridos.

Com relação à MEC, nos animais subnutridos (SM), pode-se conferir uma fraca coloração pelo método Safranina-O em relação aos renutridos (RM), e principalmente ao grupo nutrido (NM). Essas diferenças na intensidade da coloração estão associadas a alterações na quantidade das proteínas da MEC, que podem ocorrer devido à redução da espessura da cartilagem, da densidade dos condrócitos e da ossificação endocondral, e podem comprometer as funções da CA (OLSTAD et al., 2010).

Tanto na CA quanto na LE do úmero e da tíbia, a coloração com picro sirius sob luz polarizada permitiu evidenciar o predomínio de fibras do tipo II nos grupos NM e RM, e menor densidade dessas fibras no grupo SM.

As fibras colágenas contidas na MEC propiciam a organização estrutural dos condrócitos na CA e na LE (KOBURINA et al., 2012); Elas são continuamente remodeladas durante a fase de desenvolvimento, quando as fibras do tipo I são substituídas por fibras do tipo II, um colágeno mais maduro (TESHIMA et al., 2004) que são predominantes na cartilagem hialina (MONTES, 1996). A CA está constituída por cerca de 85% de fibras colágenas; dessa forma, com a redução da quantidade dessas fibras verificada no grupo SM, admite-se que ocorra uma alteração na estrutura da CA com prejuízo de suas funções. Essa afirmativa pode ser embasada no trabalho de Fujioka, Aoyama e Takakuwa (2013) que descreveram os componentes colágenos e celulares da CA como responsáveis por diminuir a carga mecânica e conseqüente a fricção sobre a CA. Já na LE, como as fibras colágenas do tipo II estão relacionadas com o sequestro de fatores de crescimento envolvidos na regulação da diferenciação e proliferação dos condrócitos a fim de manter a integridade da LE (VAN DER EERDEN et al., 2003), os dados para o grupo SM demonstram que essa estrutura encontra-se visivelmente alterada pelo processo de subnutrição.

Finalizando, conforme evidenciado na presente pesquisa, animais submetidos à alimentação padrão de Moçambique apresentam efeitos deletérios de subnutrição na LE e CA do úmero e da tíbia. Embora com a suplementação com caseína após a lactação esses efeitos tenham sido minimizados, a recuperação protéica não foi suficiente para restabelecer todos os componentes estruturais relativos aos parâmetros considerados normais obtidos para o grupo NM.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos no presente estudo acerca das repercussões morfológicas causadas pela subnutrição proteica na CA e LE do úmero e da tíbia, e possível recuperação do tecido através da renutrição proteica pode-se concluir que:

1. Os animais do grupo que recebeu somente a dieta padrão de Moçambique (SM) apresentaram alterações físicas como comprimento naso-anal reduzido, e aspecto dos pêlos, em relação aos grupos nutrido (NM) e tratado (RM);
2. A massa corporal foi reduzida frente à subnutrição, uma vez que foi menor nos animais SM. A renutrição nos períodos empregados, não foi suficiente para que o peso corporal atingisse os valores dos animais nutridos;
3. Os parâmetros metabólicos de ingestão alimentar e hídrica e excreção de fezes e de urina ao final da avaliação foram semelhantes entre os grupos estudados; Porém os animais subnutridos (SM) necessitavam de maior quantidade de alimento para manterem a massa corporal e excretavam menos urina em relação ao consumo de água, quando comparados aos demais grupos;
4. As medidas ósseas do úmero e da tíbia foram menores no grupo subnutrido (SM) e reestabelecidas no grupo renutrido (RM), em relação ao grupo controle (NM);
5. No grupo subnutrido (SM) espessura da CA apresentou-se mais delgada, com uma marcação das proteoglicanas da MEC menos intensa e quantidade de fibras colágenas tipo II menor que no grupo nutrido (NM). O grupo renutrido apresentou características intermediárias;
6. Com a subnutrição a espessura da LE, o arranjo dos condrócitos foram comprometidos, bem como a intensidade de marcação das proteoglicanas da MEC e a presença de fibras colágenas tipo II. Com a renutrição houve um aumento desses parâmetros, porém não suficiente para restabelecer os valores considerados normais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABAD, V.; MEYERS, J. L.; WEISE, M.; GAFNI, R. I.; BARNES, K. M.; NILSSON, O.; BACHER, J. D.; BARON, J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, v. 143, p. 1851–1857, 2002.
- ADAMS, P. H. Intra-uterine growth retardation in the pig. II. Development of the skeleton. **Biology of the Neonate**, v.19, p.341-353, 1971.
- AHMAD, G.; RAHMAN, A. Effects of undernutrition and protein malnutrition o brain chemistry of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 105, n9, p. 1090-1103, 1975.
- AHMED, T.; RAHMAN, S.; S.; CRAVIOTO, A. Pedematous malnutrition. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 651-654, 2009.
- AKSOY, M. H.; VARGEL, I.; CANTER, I. H.; ERK, Y.; SARGON, M.; PINAR, A.; GÜLER TEZEL, G. A new experimental hypertrophic scar model in guinea pigs. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 26, p. 388-396, 2002.
- ALFORD, J. W.; COLE, B. J. Cartilage restoration, Part 1: Basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, p. 1-12, 2005.
- ANCONA LOPES, F. **Comportamento do magnésio plasmático e tecidual na má nutrição proteica; estudo experimental no rato**. 1973. 110 f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Faculdade de Ciencias Médicas e Biológicas em Botucatu, Botucatu, 1073.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: ED. Fiocruz, 2002, 388 p.
- AZZARRI, C. Child undernutrition in Mozambique. In: SEMINAR UNICEF, MAPULO MINISTRY OF REALTH, 2010, Mozambique.
- BALANS, E. A.; DENLINGER, J. L. Clinical uses of hyaluronan. **Ciba foundation Symposium**, v. 143, p. 265-75, 1989.
- BAPTISTA, J. S.; MAYER, W. P.; FONTES, R.; SEYFERT, C. E.; BOLDRINI, S. C.; LIBERT, 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, p. 33-42, 2013.
- BHEMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart-Edusp, 1976. p. 225.
- BLACK, R. E., L. H. ALLEN, Z. A. BHUTTA, L. E. CAULFIELD, M. DE ONIS, M. EZZATI, 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 pósnatal sobre o crescimento craniofacial de ratos Wistar: análise craniométrica morfoquantitativa e ultra-**

estrutural. 2003. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BOLINA, C. S. **Efeitos da recuperação proteica 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.

BOLINA-MATOS, R. S. **Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar.** 2012. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BORSATTO, E. M. **Desnutrição proteica:** avaliação in vitro da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monócitos da medula óssea de camundongos. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BRAGA, L. M. G. M. O animal como um modelo experimental: noções básicas de genética, sanidade, alojamento e manutenção de animais de laboratório. In: FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. (Org.). **Animais na pesquisa e no ensino:** aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: Edipucrs, 2010. 171 - 186 p.

CARIAS, D.; CIOCCIA, A. M.; HEVIA, P. Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico. **Archivos. Latinoamericanos de Nutrición**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 1995.

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

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

DIAZ DEL CASTILLO, E. Consideraciones sobre desnutrición materna y desnutrición in útero. **Ginecologia e Obstetricia de México**, v. 37, p. 103-118, 1975.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Undernourishment around the world.** 2012. Disponível em: Acesso em: 05 Fev. 2015.

FERREIRA, A. B. H. **Mini-aurélio:** o dicionário da língua portuguesa. 8. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 960 p.

FOX, A. J. S.; BEDI, A.; RODEO, C. A. The Basic Science of articular cartilage: Structure, composition, and function, **Sports Health**, v. 1 p. 461-468, 2009.

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

GAFNI, R. I.; WEISE, M.; ROBRECHT, D. T.; MEYERS, J. L.; BARNES, K. M.; DE DEVI, S.; BARON, J. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. **Pediatric Research** v. 50, p.618–623, 2001.

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.

GERTNER, J. M. Normal and abnormal skeletal growth. In: SEIBEL M. J.; ROBINS S. P.; BILEZIKIAN J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego, CA: Academic Press; 1999, p. 247-260.

GILLESPIE, S. R.; MASON, J. B. e MARTORELL, R. **How nutrition improves**. Geneva: United Nations Administrative Committee on Coordination/ Sub-Committee on Nutrition (ACC/SCN), 1996. (State-of-the-Art Nutrition Policy Discussion Paper nº 15).

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, p. 449-56, 2010.

HIANE, P. A.; MACEDO, L. R.; SILVA, G. M.; BRAGA, J. A. N. Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos wistar em crescimento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 191-206, 2006.

HOWELL, D. S.; DEAN, D. D. The Biology, chemistry, and biochemistry of the mammalian growth plate. **Disorders of Bone and Mineral Metabolism**, v. 14, p. 313-353, 1992.

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, p. 298-307, 2012.

HUGHES, L. C.; ARCHER, C. W.; GWYNN, I. The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarized light and scanning electron microscope study and review. **European Cells and Materials**, v. 9, p. 68-84, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. (IBGE). 2015. Disponível em: <www.ine.gov.mz>. Acesso em: 15 jan. 2014.

INSTRULAB. **Instrumentos para laboratório**. Giolas metabólicas para roedores. 2012. Disponível em: <<http://www.instrulab.com.br/detalhes.php?id=32>>. Acesso em 10 ago. 2013

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.

LI, H.; STEIN, A. D.; BARNHART, H. X.; RAMAKRISHNAN, U.; MARTORELL, R.. Associations between prenatal and postnatal growth and adult body size and composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p.1498-1505, 2003.

LUKE, D. A.; TONGE, C. H.; REID, D. J. Medical analysis of growth in the jaws and teeth of normal, protein deficient and calorie deficient pigs. **Journal of Anatomy**, v. 129, p. 449-457, 1979.

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

MAGA, J. A.; LORENZ, K.; ONAUEMI, O. Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of in vitro proteolysis. **Journal Food Science**, v. 38, p. 173-174, 1973.

MEHTA, G.; ROACH, S.; LANGLEY-EVANS, S.; TAYLOR, P.; READING, I.; OREFFO, R. O. C.; AIIIE-SAYER, A.; CLARKE, N. M. P.; COOPER, C. Intrauterine exposure to a maternal low protein diet reduces adult bone mass and alters growth plate morphology in rats. **Calcified Tissue International**, v. 71, p. 493-498, 2002.

MENDONÇA, L. P. **Repercussões morfológicas da subnutrição proteica e da dieta padrão de Moçambique no nervo isquiático de ratos nos períodos pré e pós-natal**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MININA, E.; KRESCHER, C.; NASKI, M. C.; ORNITZ, D. M.; VORTKAMP, A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. **Developmental Cell**, v. 3, p. 439-449, 2002.

MIRANDA, C. M. **Repercussões morfológicas da desnutrição proteica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a lâmina epifisial e a cartilagem de ossos longos de ratos Wistar**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos avançados**, v. 9, n. 24, p. 1995-1207, 1995.

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

MORAES, V. V. **Efeito da desnutrição proteica precocemente corrigida na morfologia da epífise de crescimento de coelhos** (Nova Zelândia). 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.
- 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, p.166-73, 2010.
- NILSSON, O.; MARINO, R.; DE LUCA, F.; PHILLIP, M.; BARON, J. Endocrine regulation of the growth plate, **Hormone Research**, v. 64, p. 157–165, 2005.
- NÓBREGA, F. J. **Desnutrição intrauterina e pós-natal**. 2. ed. Curitiba: Panamed, 1986. 567 p.
- OH, J. H.; PARK, S. Y.; CROMBRUGGHE, B.; KIM, J. E. Chondrocyte-specific ablation of osterix leads to impaired endochondral ossification. **Biophysical Research communications**, v. 418, p. 634 – 640, 2012.
- 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, p. 1094–1105, 2007.
- PINE, A. P.; JESSOP, N. S. Maternal protein reserves and their influence on lactation performance in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 71. p. 13-27, 1994.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.
- PLATT, B. S.; STEWART, R. J. C. Effects of protein-calorie deficiency on dogs 1. Reproduction, growth and behavior. **Developmental Medicine e Child Neurology**, v. 10, p. 3-24, 1968.
- REICHLING, T. D., GERMAN, R. Z. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2326-2332, 2000.
- ROSE, D.; TSCHIRLEY, D. Predicting dietary intakes with simple food recall information: a case study from rural Mozambique. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1212–1221, 2003.
- SANZ-SAMPELAYO, M. R.; FENOLLA, J.; EXTREMERA, F. G. factors effecting the food intake, growth and protein utilization in the *helix aspersa* snail. Protein content of the diet and animal age. **Laboratory Animals**, v. 25, p. 291-298, 1991.
- SGARBIERI, V. C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: Almed, 1987. p. 250-261.

SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue. **Journal of Nutrition**, v. 99, p. 401-412, 1969.

SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Skeletal development in rats as affected by maternal protein deprivation and postnatal food supply. **Journal of Nutrition**, v. 103, p. 792-801, 1973

SHAPIRO, B.; PIMSTONE, B. The histology and in vivo sulphate uptake of epiphyseal cartilage in protein-depleted rats. **British Journal of Nutrition**, v. 38, p. 513-518, 1977.

SMITH, E. P.; BOYD, J.; FRANK, G. R.; TAKAHASHI, H.; COHEN R. M.; SPECKER B.; WILLIAMS T. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man, **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 1056-1061, 1994.

STRATTON, J. R.; HACKSTON, A.; LONGMORE, D.; DIXON, R.; PRICE, S.; STROUD, M.; KING, C.; ELIA, M. Malnutrition in hospital outpatients and inpatients: prevalence, concurrent validity and ease of use of the 'malnutrition universal screening tool' ('MUST') for adults. **Journal of Nutrition**, v. 92, p. 799-808, 2004.

STRATTON, R. J. "Elucidating effective ways to identify and treat malnutrition", **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, p. 305-311, 2005.

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, p. 270 - 273, 2004.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. (UNCF). **The state of the world's children**. 2015. Disponível em: <
http://www.unicef.org/publications/files/SOWC_2015_Summary_and_Tables.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2015.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocrinology Reviews**, v. 24, p. 782-801, 2003.

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, p. 401-410, 2007.

VIAU, V.; BINGHAM, B.; DAVIS, J.; LEE, P.; WONG, M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 137-146, 2005.

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

WANG, W.; KIRSCH, T. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. **The Journal of Cell Biology**, v. 157, p. 1061–1069, 2002.

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.

WORLD FOOD PROGRAMME. (WFP). **Hunger** 2013. Disponível em: <<http://www.wfp.org/hunger>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

WORLD FOOD PROGRAMME. (WFP). **Hunger map**. 2011. Disponível em: <<http://www.wfp.org/students-and-teachers/teachers/blog/new-teaching-tool-hungermap-2011>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

WORLD FOOD PROGRAMME. (WFP). **Hunger map**. 2015. Disponível em: <http://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/communications/wfp268_726.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **Nutrition Landscape Information System**. 2010. Disponível em: Acesso em 10 fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO); United Nations Children's Fund (UNICEF); World Food Programme. (WFP) **Community-based management of severe acute malnutrition**. 2007. Disponível em: <[http://www.concernusa.org/media/pdf/2007/10/Community-Based%20Management%20of%20Severe % 20Acute%20Malnutrition.pdf](http://www.concernusa.org/media/pdf/2007/10/Community-Based%20Management%20of%20Severe%20Acute%20Malnutrition.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2014.

WOODROOF, J. G. Composition and nutritive value of peanuts. In: AUTOR, **A. B. Peanut production, processing, products**. 3. ed. United Kingdom: Avi Publishing Co, 1983. p. 165-179.

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 e Rheumatism**, v. 64, p. 1899-1908, 2012.

YAMATO, T.; SHIMADA, S.; GOTO, M.; OHOYA, N. Effect of maternal protein malnutrition on the developing cerebral cortex of mouse embryo: an electron microscopic study. **Experimental Neurology**, v. 68, p. 228-239, 1980.

YAYHA, Z. A. H.; MILLWARD, D. J. Dietary protein and the regulation of long bone and muscle growth in the rat. **Clinical Science**, v. 87, p. 213–224, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Figura do teste de hipótese de dupla comparação entre os grupos experimentais referentes as medidas das camadas da lâmina epifisial do úmero

APÊNDICE B – Figura do teste de hipótese de dupla comparação entre os grupos experimentais referentes as medidas das camadas da lâmina epifisial da tibia

APÊNDICE C – Figura do teste de hipótese de dupla comparação entre os grupos experimentais referentes as medidas das camadas da cartilagem articular do úmero

APÊNDICE D – Figura do teste de hipótese de dupla comparação entre os grupos experimentais referentes as medidas das camadas da cartilagem articular da tíbia