**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

PATRÍCIA MADALENA SAN GREGÓRIO GUEDES

**Efeitos da restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e no tecido
ósseo em tíbias de ratos**

Ribeirão Preto

2018

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

PATRÍCIA MADALENA SAN GREGÓRIO GUEDES

Efeitos da restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e no tecido ósseo em tíbias de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon.

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Guedes, Patrícia Madalena San Gregório.

Efeitos da restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e no tecido ósseo em tíbias de ratos. Ribeirão Preto, 2018.

114 f.: Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Desnutrição. 2. Cartilagem de crescimento. 3. Tecido ósseo.
4. Ratos.

Esta dissertação foi redigida de acordo com as Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Parte IV (Vancouver).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Madalena San Gregório Guedes

Efeitos da restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e no tecido ósseo em tíbias de ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus

Agradeço pelo dom da vida, por ter me guiado ao longo dessa caminhada e por permitir a realização de mais essa conquista.

Aos meus pais, José Marcos Guedes e Nair Madalena San Gregório Guedes

A vocês que são meu exemplo de vida e, a quem eu devo tudo que sou, agradeço por todas as renúncias feitas para poderem me ajudar, por estarem ao meu lado em todos os momentos e por sonharem os meus sonhos... Por todo cuidado, carinho e amor.

Aos meus irmãos, Marcos Vinicius, Priscila Manuela, Semei Matheus

Por serem parte do que eu sou, meus melhores amigos, agradeço toda cumplicidade e amor.

Ao meu sobrinho Théo

Por ser minha maior inspiração, minha alegria, meu pedacinho de amor.

Ao meu noivo Alexandre

Por seu amor, companheirismo e paciência. Obrigada por sempre me apoiar na realização dos meus sonhos.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor **Dr. José B. Volpon**, pela essencial orientação nesta dissertação e pela contribuição ao meu crescimento pessoal, acadêmico e científico. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim e pelos bons momentos de convivência. Com certeza foi um privilégio tê-lo como orientador.

À **Dra. Ariane Zamarioli**, a qual me recebeu muito bem, auxiliando-me e orientando-me na realização deste trabalho. Obrigada pela receptividade, por todos os ensinamentos, pela paciência e confiança depositada em mim.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, pela oportunidade, especificamente **Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira Barbosa** pelo tempo dedicado aos alunos da pós-graduação.

À secretária do Programa de Pós-graduação, **Rita de Cássia Stela Cossalter** pela disponibilidade e por toda ajuda prestada.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP: **Ismar Ribeiro, Maria Teresinha de Moraes, Reginaldo Trevilato Silva**. Obrigada à todos pela ajuda prestada e pelos bons momentos de convivência. Em especial agradeço ao técnico e amigo **Francisco Carlos Mazzocato** que me apresentou à este laboratório e que tanto me ajudou ao longos desses dois anos.

Às amigas de laboratório: **Ana Paula Fratini, Beatriz Trani, Brígida Batista Brancaleon, Bruna Leonel Carlos, Carla T. Oliveira, Gabriela Rezende Yanagihara, Iara Inácio Botega, Jéssica Suzuki Yamanaka, Kelly Astolfo, Leonardo R. Battaglion, Marcela Paiva, Maysa de Souza Campos, Mariana Maloste Butezloff, Suelen Albertini**, agradeço imensamente a amizade, todo auxílio com os procedimentos deste trabalho e claro, a ótima convivência que tivemos durante esses anos.

À **Iara Inácio Botega**, amiga desde a graduação e que agora se tornou uma irmã! Aquela que me entende como ninguém, quem dividiu comigo todos os momentos dessa jornada e, partilhou todo o medo, insegurança, as conquistas, as lágrimas, e muitas risadas. Obrigada por todo apoio, paciência e companheirismo. Com certeza levarei sua amizade por toda vida, meu par de vaso! Rs

À **Mariana Maloste Butezloff**, agradeço pela ajuda com o procedimento experimental, por sempre me incentivar na realização deste trabalho, pelas conversas, conselhos e todas as risadas. Enfim, por ter se tornado uma grande amiga!

Ao professor **Dr. Antônio Carlos Shimano**, docente do departamento, agradeço pelos ensinamentos e colaboração na realização da parte técnica desta pesquisa, especialmente o ensaio mecânico.

Ao professor **Alceu A. Jordão Júnior**, docente do Curso de Nutrição e Metabolismo da FMRP/USP, agradeço por me receber prontamente em seu laboratório e por sanar várias dúvidas sobre esse experimento.

À professora **Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), agradeço pela disponibilização do Laboratório onde realizei parte da análise histológica, bem como aos técnicos **Marco Antônio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Jacinto Leite** pela ajuda com a parte técnica.

Ao professor **Dr. João Paulo Mardegan Issa** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por ceder o laboratório para parte das análises histológicas, pela colaboração e pelos ensinamentos. Aos técnicos **Dimitrius Leonardo Pitol** e à **Ana Paula Macedo** do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), pela importante contribuição com a parte técnica das análises histológicas.

À professora **Dra. Yara Terezinha Corrêa Silva Sousa**, pela disponibilidade do Laboratório de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) para realização das análises microtomográficas.

À Professora **Dra. Graziela Bianchi Leoni** e à Pós-graduanda **Ana Flávia Simões Barbosa**, pelo auxílio durante as análises microtomográficas.

Ao Pós-graduando **João Paulo Bianchi Ximenez**, pela importante colaboração em todas as etapas referente à análise de biologia molecular e estatística.

À amiga **Stella Fernandes**, por todo apoio.

À **CAPES** pelo apoio financeiro durante a pós-graduação.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.

(Charles Chaplin)

RESUMO

RESUMO

GUEDES, P. M. S. G. **Efeitos da restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e no tecido ósseo em tíbias de ratos**. 2018. 114 f. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018.

A desnutrição é uma condição clínica decorrente da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais para homeostase do organismo. Em crianças continua a ser um dos problemas mais graves de saúde pública no mundo, em virtude de sua grandeza e consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência, o acarretando graves comprometimentos na idade adulta. O osso é extremamente sensível a mudanças metabólicas, hormonais e nutricionais. Alterações internas e externas ao organismo podem interferir na aquisição de massa óssea máxima, levar a doenças osteometabólicas e afetar o crescimento de ossos longos. Uma alimentação adequada, com fornecimento de todos os nutrientes necessários ao organismo é crucial para o desenvolvimento do sistema esquelético. No entanto, os estudos de qualidade óssea e crescimento no desnutrido ainda são poucos na literatura. Sendo assim, o nosso objetivo foi avaliar os efeitos da restrição alimentar no tecido ósseo (trabecular e cortical) e na cartilagem de crescimento de ratos em crescimento. Neste estudo, a qualidade do tecido ósseo e da cartilagem de crescimento das tíbias foi analisada em ratos normais e desnutridos. Foram utilizados 72 ratos machos, com massa corpórea inicial de 70 a 80 gramas, que permaneceram alojados em gaiolas individuais e foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais com dois subgrupos cada, conforme o tempo de exposição à restrição alimentar: CON1: ratos normais, observados por 56 dias; RA1: ratos submetidos à restrição alimentar, observados por 56 dias; CON2: ratos normais, observados por 70 dias; RA1: ratos submetidos à restrição alimentar, observados por 70 dias. A desnutrição foi induzida por meio da restrição alimentar em 50%, ou seja, metade da quantidade ingerida pelos animais controles. Ao término do período experimental, após 56 e 70 dias, os ossos foram submetidos às análises macroscópica, microtomografia computadorizada (avaliação qualitativa e quantitativa da microestrutura óssea), densitometria óssea (DXA), microscopia óptica (caracterização dos tecidos), histomorfometria (quantificação de colágeno e volume trabecular), de expressão gênica e ensaio mecânico (avaliação da resistência mecânica). O nível de significância estatística foi de 5%. Embora a desnutrição não tenha resultado em alterações na expressão gênica, várias alterações fenotípicas foram observadas na cartilagem de crescimento (diminuição do volume; redução da área total, área de ossificação e espessura; alterações celulares nas zonas hipertrófica e proliferativa; tecido mais fraco na resistência ao cisalhamento), osso trabecular e cortical (redução no tamanho e massa óssea; menor densidade óssea; deterioração na microarquitetura trabecular e cortical e; menos trabéculas com menor deposição de colágeno). Concluiu-se que a restrição alimentar causou efeitos deletérios para a cartilagem de crescimento, osso trabecular e cortical, indicando interferência nos mecanismos de ossificação osteocondral e intramembranosa.

Palavras-chave: Desnutrição. Cartilagem de crescimento. Tecido ósseo. Ratos.

ABSTRACT

ABSTRACT

GUEDES, P. M. S. G. **The effects of food restriction on the growth plate and bone tissue in rats tibiae.** 2018. 114 s.[Dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2018.

Clinical undernutrition is characterized by the depletion of one or more nutrients that are essential for human homeostasis. Undernutrition in children results in a serious health impact due to the impairment in growth and bone quality in adulthood. Several factors may interfere with the peak mass achieved by an individual and interfere in growth and osteometabolic disorders. An adequate nutritional intake is an essential factor for bone development. However, few studies have investigated the relation between bone quality and growth in malnourished subjects. Therefore, we aimed to study the effects of food restriction on the growth plate and bone tissue (trabecular and cortical) in growing rats. 72 male Wistar rats weighing approximately 70-80g were randomly assigned into two groups and, subsequently subdivided into two subgroups according to the experimental follow-up: CON1: control rats followed by 56 days; RA1: food restricted rats followed by 56 days; CON2: control rats followed by 70 days and, RA2: food restricted rats followed by 70 days. After weaning, food restricted rats were fed 50% of the *ad libitum* food intake. At the end of each experimental period, the rats were euthanized and tibias were analyzed by morphological measurements, micro-computed tomography (qualitative and quantitative analysis of bone microstructure), dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), optical microscopy (tissue characterization), histomorphometry (trabeculae quantity and collagen deposition), gene expression and mechanical test (mechanical strength assessment). Statistical significance was set when $p < 0.05$. Although undernutrition did not alter gene expression, several phenotypic changes were seen at the growth plate (i.e. decreased in growth plate volume, reduction in total growth plate area and thickness, decrease in area of proliferative, hyperthrophic and ossified zones and, decrease in hyperthrophic cells and lesser mechanical resistance), trabecular and cortical bone (i.e. reduction in bone size and mass, bone density, deterioration at the trabecular and cortical microstructure, reduction in trabeculae bone and collagen deposition) of growing rats subjected to food restriction. We concluded that food restriction caused detrimental effects on growth plate, trabecular bone and cortical shaft, evidencing deleterious changes in the mechanisms of osteochondral and intramembranous bone formation.

Keywords: Malnutrition. Growth plate. Bone tissue. rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção microscópica longitudinal da placa de crescimento proximal da tíbia de rato 1. Zona de cartilagem em repouso. 2. Zona de proliferação. 3. Zona de cartilagem hipertrófica. 4. Zona de cartilagem calcificada 5. Zona de ossificação (Hematoxilina e eosina, 200x)	34
Figura 2. Esquema de utilização dos animais nos grupos e subgrupos.....	45
Figura 3. Fluxograma representando a divisão dos grupos e subgrupos experimentais (CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias; RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias).	45
Figura 4. Resumo do desenho experimental ao longo do período de exposição	46
Figura 5. Figura ilustrativa do exame de densitometria óssea. O detalhe mostra a tíbia escaneada e a região de interesse (metáfise proximal) demarcada com retângulo.	48
Figura 6. Figura ilustrativa da região trabecular de interesse na extremidade proximal da tíbia analisada pelo Micro-CT.	50
Figura 7. Figura ilustrativa da região cortical de interesse analisada pelo micro-CT	50
Figura 8. Figura ilustrativa da região de interesse (cartilagem de crescimento) analisada pelo Micro-CT.	51
Figura 9. Fotomicrografia ilustrando a área de seleção para análise histomorfométrica. A) Área do osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de separação em vermelho para exclusão da área da epífise proximal e parte da região cortical (tricroômico de Massom, 50x).	53
Figura 10. Fotomicrografia sob luz polarizada. A) Área de seleção da epífise proximal das tíbias B) Demarcação da área de colágeno. As fibras colágenas são expressas em vermelho-alaranjado e verde amarelado (picrosirius red, 50x).	53
Figura 11. Determinação da área total e espessura da cartilagem de crescimento delimitada pelo contorno e traço amarelo, como mostram as setas (tricroômico de Masson, 50x).	54
Figura 12. Etapas do preparo do espécime para o ensaio mecânico. A) Tíbia incluída em cilindro de acrílico, de modo a deixar 7 mm da região proximal do osso exposto; a epífise foi transfixada por um fio metálico de 6mm de diâmetro. B) o bloco foi preso ao estribo por meio da agulha.	55
Figura 13. Curva de massa corporal semanal dos animais de ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística entre a massa corpórea dos animais no início do experimento (A). Embora todos os animais tenham apresentado ganho de massa corpórea durante o seguimento longitudinal do estudo (B= 56; C= 70 dias de restrição alimentar), esse ganho foi superior (e tempo-dependente) nos animais do grupo controle quando comparados aos animais desnutridos ($p<0,05$). CON1: grupo controle, observado por 56 dias; RA1: grupo restrição alimentar, observado por 56 dias; CON2: grupo controle, observado por 70 dias; RA2: grupo restrição alimentar, observado por 70 dias.....	59

Figura 14. Comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos. O período de 70 dias de restrição alimentar resultou valores significativamente inferiores de DMO e CMO em comparação aos animais controle. As letras indicam diferença estatística significativa ($b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 61

Figura 15. Reconstruções tridimensionais de imagens de microtomográficas dos grupos experimentais. A figura ilustra a microarquitetura trabecular do osso metafisário próximo da cartilagem de crescimento. CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar. 62

Figura 16. Análise quantitativa da microarquitetura óssea trabecular. A restrição alimentar resultou em deterioração dos parâmetros quantitativos referentes à microestrutura trabecular, sendo mais expressiva no período de 70 dias (tempo-dependente). As letras indicam diferença estatística significativa ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 63

Figura 17. Reconstruções tridimensionais de imagens microtomográficas da microestrutura cortical. A figura ilustra a microestrutura do osso cortical da diáfise. CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar. 64

Figura 18. Análise quantitativa da microestrutura do osso cortical. A restrição alimentar reduziu os parâmetros quantitativos referentes à formação da microestrutura cortical, que foi mais pronunciado no maior tempo de exposição (tempo-dependente). As letras indicam diferença estatística significativa ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 64

Figura 19. Fotomicrografia sob luz polarizada da região proximal das tíbias mostrando as fibras de colágeno tipo 1 expressas em vermelho-alaranjado e as de tipo 3 em verde-amarelado. O percentual de fibras colágenas tipo 1 e 3 foi menor no grupos submetidos à restrição alimentar (picrosirius, 50x). CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar. 65

Figura 20. Percentual da área de colágeno na região proximal da tíbia, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada em μm^2 . As letras a e b indicam diferença estatística significativa, a letra a' significa tendência à diferença estatística ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2; $a' = p < 0,09$ vs CON1). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 66

Figura 21. Fotomicrografia do osso trabecular na região proximal das tíbias. Ambos os grupos submetidos à restrição alimentar apresentaram valores significativamente inferiores do percentual de osso trabecular, quando comparados aos grupos controles (tricroômico de Masson, 50x). CON: grupo controle; RA: grupo com restrição alimentar. 66

Figura 22. Percentual de osso trabecular, obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2 . A restrição alimentar resultou em menor percentual de osso trabecular em ambos os grupos ($p < 0,05$). As letras indicam diferença estatística significativa ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 67

Figura 23. Apesar de todas as alterações fenotípicas decorrentes da desnutrição, a expressão gênica de Col1A, Runx2, Osterix e Sos não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$)..... 67

Figura 24. Análise quantitativa do volume da cartilagem de crescimento. Nos dois períodos observados, a restrição alimentar causou diminuição do volume (TV). A letra a indica diferença estatística significativa; a letra b indica uma tendência à diferença estatística ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,06$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 68

Figura 25. Fotomicrografia da cartilagem de crescimento. Em ambos os períodos a restrição alimentar afetou a estrutura da cartilagem de crescimento (Hematoxilina e eosina, 200x). CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar..... 69

Figura 26. Gráficos representativos da área total (A), espessura B) e área da zona de ossificação (C) da cartilagem de crescimento. A restrição alimentar diminuiu a área total, área da zona ossificada e a espessura da cartilagem nos grupos submetidos à restrição alimentar. As letras indicam diferença estatística significativa ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 70

Figura 27. Limite da resistência mecânica (força máxima) e rigidez relativa da cartilagem de crescimento aos esforços de cisalhamento. As letras indicam diferença estatística ($a = p < 0,05$ vs CON1; $b = p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias. 70

Figura 28. Figura ilustrando o rompimento e destaque da cartilagem de crescimento após teste de cisalhamento 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas morfológicas das tíbias (média $\pm$ DP)	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBMR: *American Society for Bone and Mineral Research*

B.Ar: Área de osso

BS/BV: Superfície óssea

BV/TV: Fração de volume ósseo

CETEA: Comitê de Ética de Experimentação Animal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

cDNA: DNA complementar

CMO: Conteúdo mineral ósseo

Col.Ar: Área de colágeno

Col 1: Colágeno tipo 1

Col1a1: Colágeno tipo 1, alfa 1a

Col 3: Colágeno tipo 3

Ct.Th: Espessura da cortical

Ct.V: Volume total do osso cortical

CON: Controle

CONCEA: Conselho nacional de controle de experimentação animal

Conn.D: Densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas

Ct: *threshold cycle*

DMO: Densidade mineral óssea

DP: Desvio padrão

DXA: Densitometria óssea com dupla emissão de raios X

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FMRP-USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

GapDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GH: Hormônio do crescimento

HE: Hematoxilina-Eosina

IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1

Micro CT: Microtomografia computadorizada

mRNA: RNA mensageiro

Nº: Número

OMS: Organização mundial de Saúde

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RA: Restrição alimentar

ROI: Região de interesse

Runx2: Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2

Tb.N: Número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido ósseo

Tb.Sp: Espaçamento entre as trabéculas ósseas

Tb.Th: Espessuras das trabéculas ósseas

Tt.Ar: Área total

TV: Volume total

USP: Universidade de São Paulo

μ CT: Microtomografia computadorizada

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

‰: porcentagem

°: grau

°C: graus Celsius

μA: microampere

μL: microlitro

μm: micrômetro

μ²: micrômetro ao quadrado

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

g/cm²: grama por centímetro quadrado

kV: quilovolt

mg: miligrama

mm: milímetro

mm/min: milímetro por minuto

mm²: milímetro quadrado

mm³: milímetro cúbico

N: Newton

N/mm: Newton por milímetro

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	32
1.1	Cartilagem de crescimento	33
1.2	Tecido ósseo.....	35
1.3	Alterações ósseas decorrentes da restrição alimentar	36
2	HIPÓTESE.....	40
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Geral.....	42
3.2	Específicos.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	Tipo de estudo.....	44
4.2	Animais Experimentais.....	44
4.3	Grupos experimentais	44
4.4	Procedimento experimental - Dieta normal e restrição alimentar	46
4.5	Análises	47
4.5.1	<i>Análise morfológica do osso</i>	<i>47</i>
4.5.2	<i>Densitometria óssea (DXA)</i>	<i>47</i>
4.5.3	<i>Microtomografia computadorizada (μCT)</i>	<i>48</i>
4.5.3.1	<i>Análise da microarquitetura trabecular</i>	<i>49</i>
4.5.3.2	<i>Análise da microarquitetura cortical.....</i>	<i>50</i>
4.5.3.3	<i>Análise da cartilagem de crescimento.....</i>	<i>51</i>
4.5.4	<i>Avaliação histológica.....</i>	<i>51</i>
4.5.4.1	<i>Análise qualitativa da cartilagem de crescimento e do osso trabecular na região da metáfise proximal da tíbia.....</i>	<i>52</i>
4.5.4.2	<i>Quantificação do osso trabecular na região da metáfise proximal da tíbia</i>	<i>52</i>
4.5.4.3	<i>Quantificação do colágeno na região da metáfise proximal da tíbia</i>	<i>53</i>
4.5.4.4	<i>Mensuração da área total, área da zona de ossificação e espessura da cartilagem de crescimento.....</i>	<i>54</i>
4.5.5	<i>Análise mecânica.....</i>	<i>54</i>
4.5.6	<i>Análise molecular</i>	<i>56</i>
4.5.6.1	<i>Extração e quantificação do RNA</i>	<i>56</i>
4.5.6.2	<i>Sintetização do cDNA</i>	<i>56</i>
4.5.6.3	<i>Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)</i>	<i>57</i>
4.5.6.4	<i>Cálculo da expressão relativa do gene</i>	<i>57</i>
4.6	<i>Análise dos resultados</i>	<i>57</i>
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Massa Corporal.....	59
5.2	Análise óssea	60
5.2.1	<i>Análise Macroscópica.....</i>	<i>60</i>
5.2.2	<i>Análise densitométrica</i>	<i>60</i>
5.2.3	<i>Análise da microarquitetura óssea (μCT).....</i>	<i>61</i>
5.2.3.1	<i>Análise da microarquitetura do osso trabecular.....</i>	<i>61</i>
5.2.3.2	<i>Análise da microarquitetura do osso cortical</i>	<i>63</i>

5.2.4	<i>Histomorfometria</i>	65
5.2.4.1	<i>Fibras de colágeno na região metafisária proximal da tíbia</i>	65
5.2.4.2	<i>Ossos trabeculares na região metafisária proximal da tíbia</i>	66
5.2.5	<i>Biologia Molecular</i>	67
5.3	<i>Análise da cartilagem de crescimento</i>	68
5.3.1	<i>TV - Volume da cartilagem de crescimento (μCT)</i>	68
5.3.2	<i>Microscopia óptica</i>	68
5.3.2.1	<i>Cálculo da área total, área da zona de ossificação e espessura da cartilagem de crescimento</i>	69
5.3.3	<i>Avaliação mecânica da cartilagem de crescimento</i>	70
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXO.....	86
	APÊNDICE.....	88
	MANUSCRITO.....	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Embora o direito inalienável de todo ser humano de não padecer de fome e desnutrição tenha sido afirmado em conferências dos países membros das Nações Unidas, em 1948 (Declaração Universal dos Direitos Humanos) e, em 1974 (Conferência Mundial de Alimentação das Nações Unidas), a desnutrição infantil continua a ser um dos problemas mais graves de saúde pública no mundo, em virtude de sua grandeza e consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência da criança com sérios comprometimentos na idade adulta (1).

A desnutrição é uma condição clínica decorrente da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais para homeostase do organismo. Pode ser causada por ingestão calórica insuficiente, alterações fisiológicas relacionadas à idade, doenças do trato gastrointestinal, ou de natureza inflamatória e deficiências físicas (2–4). A mais comum é a desnutrição proteico-calórica manifestada sob duas formas clínicas extremas, Kwashiorkor e o Marasmo ou uma combinação das duas, o marasmo-kwashiorkor (5). A inanição representa a forma mais extrema de desnutrição, provocada por falta de alimentação, e que leva o corpo a consumir os próprios tecidos a fim de obter energia necessária para a manutenção da vida (6).

Pode ser ocasionada por excessos ou desequilíbrios na ingestão de energia e/ou nutrientes de um indivíduo e, aborda três grandes grupos de condições: desnutrição, que inclui perda de peso (baixo peso para altura), baixa estatura (baixa estatura para idade) e baixo peso (baixo peso para a idade), e a desnutrição relacionada a micronutrientes (carência de vitaminas e minerais importantes) ou excesso de micronutrientes; excesso de peso, obesidade e doenças não transmissíveis relacionadas à dieta (2,7).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo cerca de 462 milhões de adultos estão abaixo do peso ideal e 155 milhões de crianças têm atraso do crescimento, sendo que cerca de 45% das mortes entre crianças menores de cinco anos de idade estão correlacionadas com a desnutrição e ocorrem principalmente em países de média e baixa renda per capita. É fato que os impactos econômicos, sociais, médicos e de desenvolvimento no que diz respeito ao fardo global da desnutrição são múltiplos e sistêmicos, acarretando problemas sérios e permanentes para indivíduos e suas famílias, para as comunidades e países (7). Além disso, circunstâncias ambientais como pobreza e desastres naturais ou circunstâncias geopolíticas, tal como conflitos armados, podem contribuir para a escassez de alimentos. Isso ocorre com mais frequência nos países menos desenvolvidos. Nos países

desenvolvidos, as principais causas da fome são médicas. Distúrbios alimentares como a anorexia nervosa ou estados depressivos também podem levar à inadequação da ingesta (8,9).

Mesmo que existam muitos fatores genéticos e ambientais que possam afetar o crescimento, a desnutrição é considerada uma das principais causas de baixo peso e baixa estatura. Nos países em desenvolvimento em torno de 33% de todas as crianças menores de cinco anos de idade têm atraso do crescimento linear ou baixa estatura secundários à desnutrição crônica causada pela escassez de alimentos e por doenças infecciosas (10).

Como a estatura do indivíduo tem uma contribuição do comprimento dos ossos longos, cujo tamanho depende primariamente da atividade da cartilagem de crescimento, é interessante avaliar o estado do osso e dessa estrutura no desnutrido. Consultando a literatura verificamos escassa publicação que estudam esse aspecto. Portanto, torna-se necessário entender o processo de formação deste tecido, desde a infância até a vida adulta, onde a restrição alimentar foi vivenciada em todo período de desenvolvimento do sistema esquelético.

1.1 Cartilagem de crescimento

A cartilagem de crescimento é uma estrutura singular, que apenas existe nos ossos longos e curtos da criança, e é responsável pelo crescimento longitudinal do osso. Desaparece na idade adulta, fazendo cessar o crescimento ósseo. A eliminação dessas placas epifisárias (fechamento epifisário) ocorre em diferentes momentos de acordo com cada tipo de osso, sendo completa em todos os ossos por volta dos 20 anos de idade (11,12).

Está situada entre o núcleo de ossificação e a metáfise, em cada extremidade. Possui diferentes denominações na literatura, como cartilagem de conjugação, cartilagem de crescimento, placa de crescimento, disco epifisário e epífise de crescimento (12).

Vista microscopicamente, é uma estrutura estratificada, formada por camadas de células que se diferenciam da epífise para a metáfise e cuja etapa final é a ossificação que, por mecanismo aposicional, promove o crescimento longitudinal do osso (13). Pode ser dividida em camadas, conforme as características das células (14). O número e a nomenclatura das camadas varia conforme os autores, mas o mais comum é considerá-las como sendo cinco (Fig.1).

A camada de células mais próximas da epífise é chamada de cartilagem em repouso, na qual existe cartilagem hialina sem qualquer alteração morfológica. Atua como reservatório

celular e recebe nutrição dada pelos vasos epifisários. A camada seguinte é a seriada ou proliferativa e se caracteriza por fileiras longitudinais de células achatadas de núcleos grandes. Apresentam intenso metabolismo e divisão dos condrócitos. Em seguida, localiza-se a camada hipertrófica, representadas por células volumosas e arredondadas, com grandes depósitos citoplasmáticos de glicogênio e lipídios. Nesta zona os condrócitos entram em apoptose. A próxima camada, denominada de zona de cartilagem calcificada é onde ocorre mineralização dos delgados tabiques de matriz cartilaginosa e o término da apoptose dos condrócitos. A quinta e última zona é chamada de ossificação, região em que pode-se observar tecido ósseo neoformado e grande proliferação vascular. As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, que formam uma camada contínua sobre os restos da matriz cartilaginosa calcificada. Sobre esses restos de matriz cartilaginosa, os osteoblastos depositam a matriz óssea que se calcifica e aprisiona os osteoblastos, que se transformam em osteócitos. Desse modo, formam-se as espículas ósseas, com uma parte central de cartilagem calcificada e uma parte superficial de tecido ósseo primário (11,13,14).

Figura 1. Secção microscópica longitudinal da placa de crescimento proximal da tíbia de rato 1. Zona de cartilagem em repouso. 2. Zona de proliferação. 3. Zona de cartilagem hipertrófica. 4. Zona de cartilagem calcificada 5. Zona de ossificação (Hematoxilina e eosina, 200x)

1.2 Tecido ósseo

O osso atua na sustentação do corpo, na reserva homeostática de íons, na proteção de órgãos internos e medula óssea. Além disso, o esqueleto tem função primordial na locomoção do corpo pois descarrega o peso e serve como alavanca para a ação muscular (15).

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por células e por uma matriz extracelular, que possui a característica única de mineralizar. As principais células ósseas envolvidas na fisiologia óssea são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Juntos, esses três tipos celulares realizam o processo de remodelação e manutenção do metabolismo ósseo (16,17)

Os osteócitos representam o elemento celular maduro do osso, são as células mais abundantes e ficam localizados em cavidades ou lacunas que emitem finos prolongamentos situados em canalículos que comunicam com osteócitos vizinhos (15). Assim, essas células formam uma rede provida de sensores mecânicos que identificam microfraturas e atuam na reparação do osso. Originam-se de células imaturas - os osteoblastos - que se colocam na superfície das lamelas ósseas e relacionam-se diretamente com a produção de proteínas, o que é evidenciado por um núcleo grande e extensos aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Inicialmente os osteoblastos secretam a parte orgânica da matriz que sofre mineralização que resulta na formação de cristais de hidroxiapatita (11,16).

Os osteoclastos são células com grandes e múltiplos núcleos e resultam da diferenciação de células da linhagem mieloide da medula óssea (monócitos e macrófagos). São células móveis em que a face que fica em contato com o osso apresenta microvilosidades que ao aderirem ao osso formam um microambiente selado onde são liberados ácido clorídrico, collagenases e hidrolases que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de cálcio. A diferença entre elas está, basicamente, na origem, localização e função. Uma vez que, os osteoblastos e osteócitos originam-se de células tronco mesenquimais, já os osteoclastos têm origem hematopoiética. Os osteoblastos e osteoclastos estão localizados na superfície óssea, ao passo que os osteócitos localizam-se no seu interior. Por fim, os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea, enquanto os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, sendo que, a principal função dos osteócitos é a de manter a integridade funcional da matriz óssea (15,18).

Macroscopicamente, o tecido ósseo é formado por trabéculas ou lamelas que podem dispor-se paralelamente umas às outras, com pouco espaço entre elas e formando um tecido compactado, que predomina na região diafisária, e recebe o nome de osso compacto.

Contrariamente, na região metafisária, as trabéculas apresentam-se de maneira multidirecionada, formando grandes espaços entre si, que é preenchido pela medula óssea. É o osso esponjoso. Entretanto, embora a disposição das lamelas seja em diferentes orientações ela não é casual pois quando vistas em conjunto elas têm disposição comum que representa a descarga de força (11,15).

A aquisição de massa óssea ocorre, sobretudo, durante o crescimento, tendo o seu surto na puberdade. Após o pico de massa óssea, o osso passa por constante remodelação para manter a homeostase. Com o envelhecimento, há uma perda óssea natural decorrente do desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, sendo que em patologias como osteopenia ou osteoporose, essa perda é exacerbada, tornando os ossos mais frágeis (19).

1.3 Alterações ósseas decorrentes da restrição alimentar

Sabe-se que o esqueleto é submetido a adaptações estruturais rápidas de acordo com o crescimento corporal, manifestadas por alongamento e modelagem óssea, juntamente com as mudanças na composição mineral do osso cortical e arquitetura trabecular, além de alterações nas propriedades mecânicas. Alguns nutrientes como proteínas, lipídios e carboidratos constituem o arcabouço, enquanto outros desempenham papéis reguladores. De fato, uma alimentação adequada, com fornecimento de todos os nutrientes necessários ao organismo é crucial para este processo (20).

O osso é extremamente sensível a mudanças metabólicas, hormonais e nutricionais (19). Desse modo, alterações internas e externas ao organismo podem interferir na aquisição de massa óssea máxima, acelerar o processo de perda óssea natural ou afetar o equilíbrio do *turnover* ósseo, levando a doenças osteometabólicas e ao aumento do risco de fraturas patológicas (21).

A formação do osso durante o crescimento do esqueleto está relacionada a vários fatores como hereditariedade, atividade física e o ambiente (17). Uma alimentação balanceada com nutrientes específicos como cálcio, vitamina D e proteínas são essenciais para a biossíntese da matriz orgânica do tecido ósseo (22–24). Nas pesquisas de qualidade óssea esses nutrientes são os mais restringidos dentre os tipos de restrições advindas da dieta (23,25–31).

A desnutrição pode ocorrer durante o crescimento e causar variações na estrutura óssea (32,33). Sabe-se que há estreita relação entre o estado nutricional geral e o crescimento

ósseo longitudinal. Os nutrientes podem agir de duas formas; diretamente modificando a reparação óssea e indiretamente pela mudança na secreção do hormônio calciotrópico. A massa óssea é determinada no final do crescimento esquelético pela quantidade de osso acumulado (pico de massa óssea) e pela quantidade de osso perdido subsequentemente (34).

Dados epidemiológicos evidenciam que o aumento de 10% do pico de massa óssea pode diminuir pela metade o risco de fratura em adultos (35). No entanto, a desnutrição crônica, como a anorexia, durante a época de pico da massa óssea, aumenta o risco de fraturas e osteoporose. Além disso, outros dados apontam que nos Estados Unidos, Suécia, Austrália e Grã-Bretanha há um déficit no crescimento durante a vida fetal e na infância, devido à desnutrição, que está relacionado à diminuição da massa óssea na idade adulta (36). Embora a relação entre os quadros osteoporóticos e suas principais etiologias represente um tema muito estudado, os mecanismos e alterações ósseas decorrentes da desnutrição ocasionada pela restrição alimentar ainda não estão completamente elucidados (37).

Estudos prévios mostram que a desnutrição afeta o desenvolvimento de ossos longos, a privação de zinco, por exemplo, modifica a altura da placa de crescimento, o tamanho e o número dos condrócitos nas zonas hipertrófica e proliferativa (38,39).

O crescimento esquelético, por sua vez, depende de uma elaborada cascata de eventos que ocorre na cartilagem de crescimento (40), de modo que o crescimento longitudinal do osso é controlado por fatores sistêmicos e fatores locais, sendo eles, os hormônios e a matriz extracelular, respectivamente. Uma vez instalada algum processo crônico, como a desnutrição, todo o crescimento linear da criança ficará alterado (40,41).

Autores anteriores encontraram que, ratos submetidos à dieta restritiva apresentam atrofia dos ossos longos, perda significativa do osso cortical e esponjoso, e conteúdo mineral ósseo (CMO), além da redução da massa muscular (30,42,43). Além disso, já é conhecido que a deficiência específica, como a de vitamina D, leva à diminuição da densidade mineral óssea (DMO), da atividade e recrutamento dos osteoblastos, dos níveis de osteocalcina e IGF-1 (Insulin Growth Factor 1 ou Fator de crescimento semelhante à insulina-1), bem como da resistência mecânica e o contato osso-implante (28,29).

Embora a depleção de certos nutrientes tenha mostrado um impacto prejudicial no tecido esquelético, a desnutrição clínica frequentemente observada na população ocorre devido a uma redução geral na ingestão total de alimentos (31).

Efeitos prejudiciais do crescimento ósseo, analisados pelo comprimento, mineralização e marcadores bioquímicos foram encontrados na desnutrição advinda da restrição alimentar iniciada precocemente, ou seja, logo após o desmame (36,44). Em animais

mais velhos (idade adulta) a restrição alimentar produziu efeitos negativos na arquitetura e força óssea (33,45).

Em ratos jovens as pesquisas são mais escassas e pouco se sabe sobre o efeito da desnutrição no crescimento e desenvolvimento da estrutura óssea, tampouco da qualidade desse osso durante o desenvolvimento. Portanto, torna-se importante entender a relação entre a baixa ingestão calórica e as alterações no crescimento, bem como a diminuição da massa óssea durante esse período.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A hipótese desta investigação é que a desnutrição de animais imaturos afeta o crescimento e a qualidade do tecido ósseo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da restrição alimentar no osso longo de ratos.

3.2 Específicos

- Avaliar a influência da restrição alimentar na cartilagem de crescimento de ratos em crescimento.
 - Avaliar a influência da restrição alimentar nos tecidos ósseos trabecular e cortical de ratos em crescimento.
-

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Essa investigação é um estudo experimental em modelo animal.

4.2 Animais Experimentais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com protocolo nº 013/2016 (Anexo I).

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) e prole, fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram alojadas no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP durante o período de lactação (21 dias). Posteriormente, os filhotes foram separados da mãe e divididos aleatoriamente nos grupos experimentais. Em seguida as mães sofreram eutanásia.

Foram utilizados 72 ratos machos, com massa corpórea inicial de 70 a 80 gramas, que permaneceram alojados em gaiolas individuais, as quais tinham um compartimento para receber fezes e urina, e conservar limpo o ambiente onde o animal permanecia. Durante todo o período deste experimento os ratos foram mantidos com livre acesso à água, em temperatura ambiente de 20 a 24°C, controle de claro/escuro (12 x 12 horas) e controle da umidade relativa do ar em 55±10%. O ambiente das gaiolas era isolado, calmo e com pouca circulação de pessoas.

Diariamente foram avaliadas as condições de estresse do animal pelo aspecto do pelo, a presença ou não de pigmentos de porfirina ao redor dos olhos e focinho, além de observação do comportamento animal (autolimpeza, atividade espontânea, reatividade e sono) (46).

Os cuidados diários foram de acordo com o guia para cuidados e uso de animais de laboratório (*Animal models as tools in ethical biomedical research*, edição 2010).

4.3 Grupos experimentais

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais, com dois subgrupos cada, conforme o tempo de exposição à restrição alimentar (Fig. 2).

Figura 2. Esquema de utilização dos animais nos grupos e subgrupos.

Setenta e dois ratos foram destinados para esse experimento. Foram divididos em dois grupos experimentais ($n=36$), sendo um grupo controle (CON) alimentado com ração da Instituição, e o outro grupo sob restrição alimentar (RA) alimentado com a mesma ração, mas em quantidade 50% menor que o primeiro grupo ingerira no dia anterior. Não houve restrição de água em ambos os grupos. Cada grupo experimental foi subdividido em dois subgrupos experimentais, conforme o período de seguimento (Fig. 3).

Figura 3. Fluxograma representando a divisão dos grupos e subgrupos experimentais (CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias; RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias).

Nos subgrupos RA1 e CON1 (56 dias de acompanhamento) a eutanásia ocorreu com 11 semanas de vida, enquanto que os subgrupos RA2 e CON2 (70 dias de acompanhamento) foram eutanasiados com 13 semanas de vida, conforme esquema abaixo (Fig.4).

Figura 4. Resumo do desenho experimental ao longo do período de exposição

4.4 Procedimento experimental - Dieta normal e restrição alimentar

O efeito da restrição alimentar foi avaliado sobre a estrutura da cartilagem de crescimento e do osso trabecular e cortical. Para isso, após o desmame, em torno da terceira semana de vida, os filhotes machos foram separados e destinados para os grupos com e sem restrição alimentar. Ambos os grupos foram alimentados com ração padrão. Foi utilizada a ração da marca NUVILAB CR-1®. A composição básica do produto consiste em milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e antioxidante.

O cálculo estimado para consumo diário foi realizado, para o grupo Controle era fornecido sempre um valor superior para que os animais se saciassem. A quantidade restante era pesada e subtraída da quantidade fornecida, possibilitando o cálculo da ração consumida diariamente. Desta quantidade era fornecida a metade ao grupo sob restrição no dia seguinte.

A indução da desnutrição foi realizada por meio da restrição alimentar em 50% e foi comprovada pela avaliação do estado nutricional e pelos dados antropométricos (massa e comprimento do osso), massa corpórea, além dos sinais clínicos.

O acompanhamento da massa corpórea dos animais foi realizado diariamente.

4.5 Análises

A eutanásia ocorreu com dose excessiva do anestésico Tiopental sódico[®], aplicada por via intraperitoneal. Seguida à morte as tíbias foram dissecadas e armazenadas em solução própria para cada tipo de análise futura. As análises realizadas foram: macroscópica, densitométrica, microtomográfica, histológica, mecânica e biologia molecular.

4.5.1 *Análise morfológica do osso*

Após a dissecação as tíbias foram pesadas em balança de precisão. Em seguida, com paquímetro digital o comprimento das tíbias foi obtido pela medida entre as duas superfícies articulares do joelho e tornozelo. Para mensurar os diâmetros da diáfise e metáfise proximal foi utilizada uma linha de espessura grossa em torno da região de interesse e demarcado o comprimento do fio que era medido com paquímetro.

4.5.2 *Densitometria óssea (DXA)*

A densitometria óssea com dupla emissão de raios X foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, no densitômetro Lunar DPX-IQ (*Lunar; software version 4.7 e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom*), por meio do método por absorciometria bifotônica de raio-X (DXA: *Dual-energy X-ray absorptiometry*). Os ossos foram posicionados paralelamente um ao outro dentro de um recipiente plástico imersos em solução álcool 70% de 2,0 cm de profundidade. A densidade global foi analisada por meio de software específico para análise densitométrica do esqueleto apendicular de animais de pequeno porte (Fig. 5).

A análise foi realizada na metáfise proximal das tíbias. Para isso, foi utilizada como região de interesse áreas quadradas (ROI) de 0,09 cm² na metáfise proximal, posicionados imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento. Os valores de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) foram analisados com base na região de interesse avaliada. O coeficiente de variância foi de 4,5%.

Figura 5. Figura ilustrativa do exame de densitometria óssea. O detalhe mostra a tíbia escaneada e a região de interesse (metáfise proximal) demarcada com retângulo.

4.5.3 Microtomografia computadorizada (μ CT)

O microtomógrafo é composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100kV), um porta amostras onde um osso foi posicionado e um detector baseado em uma câmera CCD de 11Mp conectados a um computador para controle e aquisição de dados com software para reconstrução, visualização e análise quantitativa de imagens em 2D e em 3D.

Este método tridimensional permite a caracterização da microgeometria e densidade tecidual óssea. Além disso, analisa a microarquitetura trabecular e cortical independentemente (47).

Após a análise densitométrica, as tíbias direitas conservadas em etanol a 70% foram utilizadas na análise por microtomografia computadorizada (μ CT) com uso do microtomógrafo SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Belgium) do Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-UNAERP, Brasil. Os espécimes foram escaneados utilizando os parâmetros 65 kV e 357 μ A; filtro de alumínio com espessura de 1 mm para otimizar o contraste. Foi adotada rotação de 0,40° com média de um quadro e resolução isotrópica de 8,5 μ m. As imagens de cada espécime foram reconstruídas por meio de software específico (NRecon versão 1.6.9; Bruker-microCT) que permite a visualização e análise das estruturas internas das amostras.

As análises microtomográficas foram realizadas na tíbia para avaliação dos tecidos trabecular e cartilagem de crescimento (na metáfise proximal) e cortical (na região diafisária).

Inicialmente foi utilizado o software Data Viewer (Bruker-microCT, versão 1.5.4.6) para adequação do posicionamento do osso analisado. Em seguida, a análise morfométrica foi realizada por meio do software CTAn (Bruker-microCT, versão 1.13.2.1).

Todas as medidas morfométricas dos ossos e as nomenclaturas utilizadas seguiram as recomendações da *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) (48).

4.5.3.1 Análise da microarquitetura trabecular

A região metafisária foi selecionada manualmente pela extensão de 3,0 mm, iniciando imediatamente proximal à cartilagem de crescimento proximal da tíbia (Fig.6). O osso trabecular foi isolado manualmente do osso cortical através do *software* CTAn. Por meio deste software foi possível determinar o melhor *threshold*, a fim de excluir tecido mole e incluir tecido mineralizado. O mesmo *threshold* foi utilizado para todas as amostras, mas diferentes *thresholds* foram utilizados na avaliação do osso trabecular, cortical e para a cartilagem de crescimento. Para o osso trabecular foi utilizado *threshold* de 255-63.

A microarquitetura trabecular da metáfise proximal da tíbia foi caracterizada pela determinação do volume ósseo total (BV), em mm³; volume ocupado pelo osso trabecular, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas (BV/TV), em %; número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (TbN), em 1/mm; espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm; espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm ; densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D), em 1/mm³ e; superfície óssea (BS/BV), em mm³. Quanto maiores os valores de BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Conn.D, melhor a qualidade da estrutura do tecido ósseo. Por outro lado, quanto maiores os valores de Tb.Sp e BS/BV, pior a qualidade óssea.

Figura 6. Figura ilustrativa da região trabecular de interesse na extremidade proximal da tíbia analisada pelo Micro-CT.

4.5.3.2 Análise da microarquitetura cortical

A microarquitetura cortical foi analisada na diáfise da tíbia; 8mm proximal à cartilagem de crescimento proximal, pela extensão de 2mm (Fig.7). Para o osso cortical foi utilizado o *threshol*d de 255-73. Os parâmetros avaliados foram: volume cortical (Ct.V em mm³) e espessura cortical (Ct.Th em mm).

Figura 7. Figura ilustrativa da região cortical de interesse analisada pelo micro-CT

4.5.3.3 Análise da cartilagem de crescimento

A cartilagem de crescimento foi selecionada manualmente sendo isolada do tecido ósseo circundante em cortes coronais, por toda sua extensão (Fig. 8). O volume da cartilagem de crescimento foi obtido pela determinação do volume total (TV) em mm³ de toda a região de interesse selecionada. Para a cartilagem de crescimento foi utilizado o *threshol* de 255-63.

Figura 8. Figura ilustrativa da região de interesse (cartilagem de crescimento) analisada pelo Micro-CT.

4.5.4 Avaliação histológica

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Foi seguida técnica rotineira, com fixação em paraformaldeído 4%, descalcificação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – *ethylenediamine tetra acetic acid*) 10%, desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Para o corte o espécime incluído foi posicionado de modo que a face anterior da tíbia ficasse voltada para baixo. Os cortes foram realizados em sentido longitudinal no plano coronal, por toda região proximal da tíbia, na espessura de 5,0 micrômetros.

Foram coletados 72 cortes semisseriados, percorrendo toda a espessura da metáfise proximal da tíbia. Das 24 lâminas obtidas, seis foram coradas pela técnica hematoxilina e eosina (HE) e seis pela técnica de tricrômico de Masson que permite observar a cartilagem de crescimento, trabéculas ósseas e medula óssea. Seis lâminas foram coradas pela técnica de *picrosirius red* que permite observar fibras colágenas. Após a coleta de doze cortes, os 10

cortes subsequentes foram descartados e o procedimento foi repetido até percorrer todo o osso.

As secções foram analisadas sob microscopia de campo brilhante na região da placa de crescimento e metáfise proximal da tíbia, com ampliações de 50, 100 e 200 vezes.

A análise quantitativa foi realizada de forma padronizada na região metafisária do osso, com aumento de 50x para as lâminas coradas com tricrômico de Masson e *picrosirius red*, em microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) com câmera digital (Zeiss®) acoplada e pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Foi utilizado o mesmo microscópio óptico para a análise qualitativa. Essa análise foi realizada de forma padronizada na placa de crescimento e na metáfise proximal da tíbia, com ampliações de 50, 100 e 200x para as lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

4.5.4.1 Análise qualitativa da cartilagem de crescimento e do osso trabecular na região da metáfise proximal da tíbia

A análise qualitativa das células da placa de crescimento foi realizada nas lâminas coradas em HE, aumento de 50, 100 e 200 vezes. Foram analisadas as zonas da placa de crescimento, espessura da placa, organização das fileiras e formato das células; espessura, separação e quantidade de trabéculas ósseas.

4.5.4.2 Quantificação do osso trabecular na região da metáfise proximal da tíbia

A quantificação da área do osso trabecular da tíbia foi feita na coloração com tricrômico de Masson. Foi selecionada área de 3,5 x 2,5 mm, com aumento de 50 vezes. A tíbia foi analisada em uma imagem realizada imediatamente abaixo do disco epifisário. Por meio do programa Axiovision® foi selecionada a cor azul demarcando toda área referente ao osso trabecular (Fig. 9A), e foram excluídas as regiões que não representavam esse tipo de osso (Fig. 9B). A área foi expressa pela razão da área de osso sob a área total em porcentagem (B.Ar/Tt.Ar -%) (49).

Figura 9. Fotomicrografia ilustrando a área de seleção para análise histomorfométrica. A) Área do osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de separação em vermelho para exclusão da área da epífise proximal e parte da região cortical (tricrômico de Masson, 50x).

4.5.4.3 Quantificação do colágeno na região da metáfise proximal da tíbia

A quantificação da área de colágeno foi realizada nas lâminas coradas com *picrosirius red*. As lâminas foram analisadas com uso de luz polarizada e birrefringência que permitiu a observação das fibras colágenas na cor vermelho-alaranjado e verde-amarelado. A área avaliada foi de 3,5 x 2,5 mm, aumento de 50 vezes, imediatamente abaixo do disco epifisário (Fig. 10A). A análise quantitativa das fibras colágenas foi realizada com o programa Axiovision®, que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde através da luz polarizada para quantificar a somatória das áreas em μm^2 das diferentes fibras. A área foi expressa pela razão da área de colágeno sob a área total (Col.Ar/Tt.Ar -%) (49). Após a demarcação, essa região foi avaliada para comparar a quantidade de matriz colágena na estrutura óssea dos animais (Fig. 10B).

Figura 10. Fotomicrografia sob luz polarizada. A) Área de seleção da epífise proximal das tíbias B) Demarcação da área de colágeno. As fibras colágenas são expressas em vermelho-alaranjado e verde amarelado (*picrosirius red*, 50x).

4.5.4.4 Mensuração da área total, área da zona de ossificação e espessura da cartilagem de crescimento

A determinação da área total e espessura da cartilagem de crescimento foi realizada por meio do *software* Image J (NIH, versão 1.5n). Após calibração do *software* para mensuração em μ^2 , a área total, área da zona de ossificação e a espessura da cartilagem de crescimento foram selecionadas manualmente e expressas em mm^2 e μm , respectivamente (Fig. 11).

Figura 11. Determinação da área total e espessura da cartilagem de crescimento delimitada pelo contorno e traço amarelo, como mostram as setas (trícromico de Masson, 50x).

4.5.5 Análise mecânica

O ensaio mecânico foi realizado no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. O objetivo foi aplicar esforços de cisalhamento na placa de crescimento para registrar sua resistência. Primeiro, a tíbia foi seccionada de modo a obter um segmento de 25 mm de comprimento da região proximal até a região distal. A extremidade distal deste fragmento foi incluída em bloco cilíndrico de resina (polimetilmetacrilato), com comprimento de 18 milímetros. Assim, 7 mm de osso ficaram expostos para serem submetidos ao ensaio mecânico (Fig. 12A). O núcleo de ossificação da tíbia foi transfixado de medial para lateral por um fio de aço de 0,6 mm de diâmetro e comprimento de 17 milímetros. A tentativa foi colocar este fio o mais centralizado possível da epífise.

Para aplicação da força de cisalhamento foi construído um acessório metálico com base naquele descrito por Fontoura Filho, 2000 (Fig. 12B). Ele foi confeccionado em latão no formato de um estribo, com abertura de 15 mm e comprimento de 25 mm.

Perpendicularmente a cada extremidade do estribo foram conectados dois parafusos vazados para o encaixe dos fios metálicos ligados ao espécime. Os parafusos girados de modo a se aproximarem tensionam o fio, tornando-o resistente.

Para o ensaio, o cilindro de acrílico foi preso a uma morsa de modo a manter o osso na posição horizontal e com a face anterior voltada para cima. Depois, o estribo foi encaixado no fio de aço que foi conectado à célula de carga de 50N da máquina universal de ensaios mecânicos (EMIC® DL10.000; Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR) (Fig. 12C). Montado o conjunto, uma pré-carga de 5 N e um tempo de acomodação de 10 segundos foram adotados e aplicada força na velocidade de 10 mm/min, até a falência da placa de crescimento. Durante todo o ensaio a extremidade do osso foi mantida hidratada com soro fisiológico.

O programa Tesc® (versão 3.04) foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento. As propriedades mecânicas analisadas foram força máxima e rigidez.

Figura 12. Etapas do preparo do espécime para o ensaio mecânico. A) Tíbia incluída em cilindro de acrílico, de modo a deixar 7 mm da região proximal do osso exposto; a epífise foi transfixada por um fio metálico de 6mm de diâmetro. B) o bloco foi preso ao estribo por meio da agulha.

C) Etapa seguinte à da figura anterior ilustrando o cilindro acrílico fixado à morsa e o estribo à máquina de ensaio. À medida que o conjunto da máquina se desloca para cima há aplicação de cisalhamento na placa de crescimento. A seta mostra o bloco de resina com osso posicionado.

4.5.6 Análise molecular

Esta análise foi realizada nos subgrupos acompanhados por 56 dias (CON1 e RA1). Para isso, cada subgrupo contou com seis amostras, que foram armazenadas em recipiente próprio (*RNAse free*), imersas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80 °C até sua extração. O procedimento ocorreu no Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, e sua metodologia seguiu a seguinte ordem: 1) Extração e quantificação do RNA; 2) Sintetização de DNA complementar (cDNA); 3) quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA); 4) cálculo da expressão relativa do gene.

4.5.6.1 Extração e quantificação do RNA

As amostras do osso foram coletadas, trituradas e homogeneizadas em Trizol. Após foi realizada a extração do RNA utilizando o kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e a quantificação por espectrofotometria de absorção (260 a 280nm) (Eppendorf Biophometer, USA).

4.5.6.2 Sintetização do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.6.3 Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real para quantificação da expressão de mRNA foram realizadas utilizando o kit TaqMan® no termociclador StepOnePlus™ Real- Time PCR System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Para a análise de expressão gênica no processo de formação óssea os genes estudados foram: *Col1a1* (Colagenase 1a1- ID: Rn01463848_m1), *Osterix* (Fator de transcrição Sp7- ID: Rn02769744_s1), *Runx-2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica- ID: Rn01512300_m1) e *Sost* (Precursor da esclerostina, associada a ação dos osteócitos- ID: Rn00577971_m1). Estes genes foram normalizados com o gene endógeno GaPDH (ID: Rn01775763_g1).

4.5.6.4 Cálculo da expressão relativa do gene

A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$, cujo resultado representa a expressão relativa de mRNA, sendo:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{grupo}} - \Delta Ct_{\text{grupo controle}}$$

4.6 Análise dos resultados

As variáveis contínuas foram expressas com médias e desvios-padrão (DP). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para testar se os dados pertenciam ou não a uma curva de distribuição normal.

Todas as análises estatísticas foram feitas com RStudio 1.0.153 (RStudio, Inc., USA). Os dados foram submetidos ao teste *t-Student* e os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para a formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5® (GraphPad Software, Inc, São Paulo).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Não houve taxa de mortalidade durante a execução destes experimentos, ou seja, todos os 72 animais chegaram ao final dele e foram submetidos às análises.

5.1 Massa Corporal

Os valores médios da massa corpórea semanal dos grupos experimentais estão apresentados na figura abaixo. No dia 0 não foi observada diferença na massa corpórea entre os grupos (homogeneidade amostral inicial; $p>0,05$) (Marcação A; Fig. 13). Em todos os grupos foi observado aumento da massa corpórea durante o seguimento dos animais, mas em velocidade e valores absolutos menores para os animais submetidos à restrição alimentar. Esta diferença foi se acentuando nos períodos mais longos (Marcações B e C; Fig. 13). Ao final de 70 dias o grupo controle apresentava massa corporal média de 565,0 g e o grupo com alimentação restrita 269,0 g, ou seja, uma diferença de 52% ($p<0,05$).

Figura 13. Curva de massa corporal semanal dos animais de ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística entre a massa corpórea dos animais no início do experimento (A). Embora todos os animais tenham apresentado ganho de massa corpórea durante o seguimento longitudinal do estudo (B= 56; C= 70 dias de restrição alimentar), esse ganho foi superior (e tempo-dependente) nos animais do grupo controle quando comparados aos animais desnutridos ($p<0,05$). CON1: grupo controle, observado por 56 dias; RA1: grupo restrição alimentar, observado por 56 dias; CON2: grupo controle, observado por 70 dias; RA2: grupo restrição alimentar, observado por 70 dias.

5.2 Análise óssea

5.2.1 Análise Macroscópica

A tabela 1 apresenta as medidas de massa, comprimento, perímetros (metáfise proximal e diáfise) das tíbias. A restrição alimentar causou diminuição em todos os parâmetros macroscópicos, evidenciando alterações estruturais no osso, tanto no período de 56 dias como 70 dias ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Medidas morfológicas das tíbias (média $\pm$ DP)

	CON1	RA1	CON2	RA2
Massa óssea (g)	0,88 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,076 ^a	1,02 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,09 ^b
Comprimento (mm)	41,63 $\pm$ 1,80	38,01 $\pm$ 1,31 ^a	45,62 $\pm$ 1,57	39,31 $\pm$ 1,72 ^b
P. diáfise (mm)	11,68 $\pm$ 1,49	9,98 $\pm$ 1,11 ^a	11,60 $\pm$ 0,92	9,78 $\pm$ 0,57 ^b
P. metáfise (mm)	17,99 $\pm$ 0,83	15,69 $\pm$ 1,87 ^a	20,17 $\pm$ 2,94	15,03 $\pm$ 1,62 ^b

^a $p < 0,05$ vs CON1

^b $p < 0,05$ vs CON2

Medidas morfológicas das tíbias: massa, comprimento e perímetros (diáfise e metáfise proximal). As letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$). P. diáfise: perímetro da diáfise; P.metáfise: perímetro da metáfise proximal. CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias.

5.2.2 Análise densitométrica

A Figura 14 mostra a comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) nas metáfises proximais das tíbias (Fig.14). Os animais com restrição alimentar apresentaram valores significativamente menores de DMO e CMO aos 70 dias ($p < 0,05$). Embora sem diferença estatística entre os grupos observados por 56 dias, a restrição alimentar diminuiu os valores de DMO e CMO em 15% e 12%, respectivamente ($p > 0,05$).

Figura 14. Comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos. O período de 70 dias de restrição alimentar resultou valores significativamente inferiores de DMO e CMO em comparação aos animais controle. As letras indicam diferença estatística significativa (b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.2.3 Análise da microarquitetura óssea (μ CT)

5.2.3.1 Análise da microarquitetura do osso trabecular

As figuras 15 e 16 mostram que em ambos os períodos de restrição alimentar, foi observada significativa deterioração da microarquitetura trabecular ($p < 0,05$). No acompanhamento de 56 dias os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram redução significativa do volume ósseo (BV) em 59%, porcentagem de tecido ósseo (BV/TV) em 42%, quantidade de trabéculas (Tb.N) em 38%, densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D) em 76%, além de aumento do espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) em 39%. Resultados semelhantes, porém mais expressivos foram observados no período de 70 dias de restrição alimentar. Houve redução de 76% em BV, 59% em BV/TV, 54% em Tb.N, 66% em Conn.D, espessura trabecular (Tb.Th) em 14%, além de aumento em 15% na superfície óssea (BS/BV).

Figura 15. Reconstruções tridimensionais de imagens de microtomográficas dos grupos experimentais. A figura ilustra a microarquitetura trabecular do osso metafisário próximo da cartilagem de crescimento. CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar.

Figura 16. Análise quantitativa da microarquitetura óssea trabecular. A restrição alimentar resultou em deterioração dos parâmetros quantitativos referentes à microestrutura trabecular, sendo mais expressiva no período de 70 dias (tempo-dependente). As letras indicam diferença estatística significativa (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.2.3.2 Análise da microarquitetura do osso cortical

As Figuras 17 e 18 mostram que a restrição alimentar exerceu efeito deletério na microarquitetura do osso cortical nos seguimentos de 56 e 70 dias, principalmente no período mais longo de exposição à restrição. No acompanhamento de 56 dias a RA resultou em redução significativa do volume cortical (Ct.V) em 32%. Já em 70 dias houve redução de 44%, além de redução da espessura cortical (Ct.Th) em 14% ($p < 0,05$).

Figura 17. Reconstruções tridimensionais de imagens microtomográficas da microestrutura cortical. A figura ilustra a microestrutura do osso cortical da diáfise. CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar.

Figura 18. Análise quantitativa da microestrutura do osso cortical. A restrição alimentar reduziu os parâmetros quantitativos referentes à formação da microestrutura cortical, que foi mais pronunciado no maior tempo de exposição (tempo-dependente). As letras indicam diferença estatística significativa (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.2.4 Histomorfometria

5.2.4.1 Fibras de colágeno na região metafisária proximal da tíbia

O percentual de colágeno no tecido ósseo foi analisado pela histomorfometria (Fig. 19). Animais submetidos à restrição alimentar por 56 dias apresentaram menor deposição de colágeno tipo 1 (56% $p<0,03$). Aos 70 dias não houve diferença estatística, embora tenha havido redução de 19%.

Em relação à deposição do colágeno tipo 3, o grupo RA apresentou redução significativa de 58% ($p<0,001$) aos 70 dias. No acompanhamento de 56 dias houve tendência à diferença estatística e o percentual de colágeno 3 foi menor em 39% no grupo RA ($p<0,09$) (Fig.20).

Figura 19. Fotomicrografia sob luz polarizada da região proximal das tíbias mostrando as fibras de colágeno tipo 1 expressas em vermelho-alaranjado e as de tipo 3 em verde-amarelado. O percentual de fibras colágenas tipo 1 e 3 foi menor no grupos submetidos à restrição alimentar (*picrosirius red*, 50x). CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar.

Figura 20. Porcentual da área de colágeno na região proximal da tíbia, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada em μm^2 . As letras a e b indicam diferença estatística significativa, a letra a' significa tendência à diferença estatística (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2; a' = $p < 0,09$ vs CON1). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.2.4.2 Osso trabecular na região metafisária proximal da tíbia

Na figura 21 é possível observar o aspecto histológico das trabéculas ósseas coradas com tricrômico de Masson. O resultado da análise histomorfométrica mostrou que o percentual de osso trabecular nos grupos submetidos à RA foi 69% menor no período de 56 dias e 54% no período de 70 dias em comparação com os respectivos controles ($p < 0,05$) (Fig.22).

Figura 21. Fotomicrografia do osso trabecular na região proximal das tíbias. Ambos os grupos submetidos à restrição alimentar apresentaram valores significativamente inferiores do percentual de osso trabecular, quando comparados aos grupos controles (tricrômico de Masson, 50x). CON: grupo controle; RA: grupo com restrição alimentar.

Figura 22. Porcentual de osso trabecular, obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2 . A restrição alimentar resultou em menor porcentual de osso trabecular em ambos os grupos ($p < 0,05$). As letras indicam diferença estatística significativa (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.2.5 *Biologia Molecular*

Curiosamente apesar de todas as alterações fenotípicas, nossos dados de PCR não mostraram diferença em relação à expressão gênica devido à restrição alimentar.

Figura 23. Apesar de todas as alterações fenotípicas decorrentes da desnutrição, a expressão gênica de Col1A, Runx2, Osterix e Sos não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$).

5.3 Análise da cartilagem de crescimento

5.3.1 TV - Volume da cartilagem de crescimento (μCT)

A figura 24 mostra que a restrição alimentar reduziu de forma significativa o volume da cartilagem de crescimento (TV) após 56 dias de RA ($p<0,05$) e, após 70 dias houve tendência à redução estatística ($p<0,06$).

Figura 24. Análise quantitativa do volume da cartilagem de crescimento. Nos dois períodos observados, a restrição alimentar causou diminuição do volume (TV). A letra a indica diferença estatística significativa; a letra b indica uma tendência à diferença estatística (a = $p<0,05$ vs CON1; b = $p<0,06$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.3.2 Microscopia óptica

Foi observada redução qualitativa e quantitativa das células da cartilagem de crescimento dos ratos submetidos à restrição alimentar. As células das zonas proliferativa e hipertrófica parecem estar diminuídas e achatadas, além disso as fileiras das células estão desorganizadas; as trabéculas ósseas metafisárias são menos espessas e mais espaçadas (Fig. 25).

Figura 25. Fotomicrografia da cartilagem de crescimento. Em ambos os períodos a restrição alimentar afetou a estrutura da cartilagem de crescimento (Hematoxilina e eosina, 200x). CON: grupo controle; RA: grupo restrição alimentar.

5.3.2.1 Cálculo da área total, área da zona de ossificação e espessura da cartilagem de crescimento

Concordando com nossos resultados microtomográficos, a análise histomorfométrica mostrou alterações prejudiciais na anatomia da cartilagem de crescimento (Fig. 26). Em 56 dias os ratos restrição alimentar exibiram menor área total e espessura da cartilagem de crescimento ($p < 0,05$). Em 70 dias houve redução na área total, espessura e área da zona de ossificação ($p < 0,05$).

Figura 26. Gráficos representativos da área total (A), espessura B) e área da zona de ossificação (C) da cartilagem de crescimento. A restrição alimentar diminuiu a área total, área da zona ossificada e a espessura da cartilagem nos grupos submetidos à restrição alimentar. As letras indicam diferença estatística significativa (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

5.3.3 Avaliação mecânica da cartilagem de crescimento

Além das mudanças estruturais, a desnutrição também afetou a resistência mecânica das cartilagens de crescimento. No dia 56, a desnutrição reduziu a força máxima e a rigidez da cartilagem de crescimento em 50% e 22%, respectivamente ($p < 0,05$). No dia 70, essas reduções foram 40% para carga máxima e 42% para rigidez ($p < 0,05$) (Fig.27 e 28).

5.3.4

Figura 27. Limite da resistência mecânica (força máxima) e rigidez relativa da cartilagem de crescimento aos esforços de cisalhamento. As letras indicam diferença estatística (a = $p < 0,05$ vs CON1; b = $p < 0,05$ vs CON2). RA1: grupo restrição alimentar, acompanhado por 56 dias; CON1: grupo controle, acompanhado por 56 dias; RA2: grupo restrição alimentar, acompanhado por 70 dias; CON2: grupo controle, acompanhado por 70 dias.

Figura 28. Figura ilustrando o rompimento e destaque da cartilagem de crescimento após teste de cisalhamento

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o efeito da restrição alimentar no tecido esquelético (cartilagem de crescimento e ossos trabecular e cortical) de ratos em crescimento.

O assunto é pertinente e de grande interesse mundial, pois embora tenha ocorrido declínio prolongado da desnutrição nos últimos anos, estima-se que, ainda, 815 milhões de pessoas são desnutridas. Além disso, uma em cada quatro crianças menores de cinco anos de idade são afetadas e a taxa de mortalidade é bastante expressiva (50).

A desnutrição refere-se a um conjunto de desordens clínicas decorrentes da deficiência de energia e/ou ingestão inadequada de proteínas ou outros nutrientes essenciais para o organismo. Quando induzida por restrição alimentar e fome grave, estudos experimentais mostraram que a desnutrição provocou uma série de alterações metabólicas que levam à redução no peso corporal, depressão da imunocompetência, com reduzida resposta a processos infecciosos e cicatriciais, assim como função alterada do sistema digestivo, em especial do fígado e intestino delgado (4,51). Em crianças, na maioria dos casos, torna-se uma condição crônica, podendo instalar-se já durante a vida fetal, em virtude da desnutrição materna, produzindo recém-nascidos de baixo peso. Este período pré-natal pode estender-se à vida pós-natal. Depois do nascimento é frequentemente associada com atraso de crescimento (9).

O déficit estatural na infância (falha do crescimento linear) advindo da desnutrição está relacionado a muitas consequências adversas para a saúde, e a danos irreversíveis que podem estender-se à idade adulta (52). Dados de milhares de crianças avaliadas na África, Ásia e América Latina mostraram que a mortalidade naquelas que tinham baixa estatura e estavam abaixo do peso foi três vezes maior do que em crianças bem nutridas (53).

A relação entre desnutrição, atraso do crescimento e deterioração da qualidade óssea tem recebido grande destaque nos últimos anos (8,54,55). Uma das consequências mais sérias e prevalentes advindas da alimentação inadequada é a falha do crescimento linear na infância (56) e os efeitos deletérios à qualidade óssea (57). No entanto, ainda há escassez de evidências científicas sobre os efeitos da desnutrição no tecido cartilaginoso e ósseo, bem como de seus mecanismos responsáveis por tais alterações.

O objetivo desta investigação foi estudar o impacto da variável restrição alimentar sobre a cartilagem de crescimento e sobre o osso recém-formado em um modelo animal. O rato Wistar é um modelo atraente para a pesquisa clínica devido à boa correspondência entre anatomia, fisiologia e comportamento de ratos e humanos, por ser amplamente usado em

pesquisas sobre e altamente resistente a condições adversas. Além de gerar custo relativamente baixo, apresentar um padrão de crescimento bem conhecido e bastante homogêneo, além da facilidade de manuseio (58,59).

Quanto ao modelo de restrição alimentar (período e quantidade) há grande variação na literatura científica. Em relação à duração, há autores que fazem uso de protocolos de poucos dias, enquanto outros os mantêm por longos períodos (de vários meses). Quanto à quantidade, há autores que adotam o modelo de suspensão completa do alimento, mas a maioria utiliza modelos percentuais de restrição, que comumente varia de 20 a 50% da dieta controle (51), ou seja representativo da desnutrição crônica.

Experimentalmente, as alterações morfométricas como peso e altura são aceitas como elementos suficientes para o diagnóstico de desnutrição em modelos experimentais (25), com dispensa de exames laboratoriais. Entretanto, estes podem ser usados a depender do tipo de investigação, como, por exemplo, a deficiência seletiva de nutrientes específicos da dieta. Clinicamente, a OMS recomenda que as alterações antropométricas de peso e altura sejam suficientes para o diagnóstico da desnutrição (60).

Considerando que a desnutrição na maioria dos casos acompanha os indivíduos desde o seu nascimento, optamos por iniciar o experimento após o desmame dos animais e, conseqüente introdução de alimentação sólida. Aos 22 dias de idade (primeiro dia do experimento), os ratos estão em fase de crescimento linear, semelhante à fase da infância em humanos. Portanto, estabelecemos dois períodos de restrição alimentar com o objetivo de avaliar os efeitos da desnutrição em diferentes momentos da maturação esquelética. No experimento com prazo mais curto (56 dias de restrição alimentar), os ratos concluíram o período experimental com 11 semanas de idade, que representa fase de adultos-jovens. No experimento mais longo (70 dias de restrição), eles finalizam o estudo com 13 semanas de idade, ou fase adulta. Selecionamos esses dois períodos de crescimento em que ocorram surtos de crescimento na tíbia, com base nos estudos que empregaram avaliação alométrica do crescimento longitudinal (58). Portanto, a restrição imposta atingiu toda fase de crescimento, desde a infância até a vida adulta, simulando a realidade de crianças que se desenvolvem sob essas condições.

Esta investigação mostra que, quando ratos em crescimento são colocados em regime de restrição alimentar, há comprometimento significativo do tecido esquelético (cartilagem de crescimento, osso trabecular e osso cortical), de uma maneira tempo-dependente. As deficiências na cartilagem de crescimento estão relacionadas a alterações anatômicas em sua estrutura (ex. área, espessura e volume tridimensional), resultando em perda da resistência

mecânica ao cisalhamento (redução da força máxima e rigidez), ou seja, as conexões entre o disco epifisário e a metáfise tornaram-se mais tênues ao cisalhamento e, provavelmente a outras forças que atuam no local como compressão, tração e envergamento. Quando se aplica força de cisalhamento ao disco epifisário, geralmente a área de falência ocorre na camada de células hipertrofiadas. Com efeito, os achados histológicos mostram desarranjo celular das principais camadas dessa estrutura. Soma-se a isso a menor síntese de colágeno que pode ter contribuído para a menor aderência intercelular. Também, o osso metafisário estava estruturalmente muito afetado, com trabéculas menos espessas, e com menor número de ligações entre elas. Resumindo, a cartilagem de crescimento por ser local de alto metabolismo foi bastante afetada pela desnutrição, assim como o osso abaixo formado por ela (ossificação endocronal). Entretanto, houve diminuição da espessura óssea que recebe grande contribuição da ossificação subperiosteal (intramembranosa). Todas as avaliações mostram portanto comprometimento dos dois tipos de ossificação.

Estudos prévios também investigaram os efeitos da desnutrição no tecido esquelético (20,36,40,55,61,62). No entanto, a maioria se restringiu à eliminação ou redução seletiva de alguns nutrientes, como proteínas (54), vitamina D (28), cálcio (31) e zinco (38). Considerando que a desnutrição clínica incluiu, na maioria das vezes a redução geral na ingestão de alimentos, optamos por usar este modelo em nosso estudo.

Outros autores estudaram os efeitos da redução geral na ingestão de alimentos, tanto em cartilagens de crescimento (40) quanto em ossos (36,61), mas eles não avaliaram ambos os tecidos esqueléticos no mesmo estudo. Pando *et al.* (2014) combinaram os dois tecidos e avaliaram os efeitos da restrição alimentar de 40% na cartilagem de crescimento, trabéculas e osso cortical (55). Porém, a cartilagem de crescimento só foi avaliada em sua espessura. Os autores descobriram que a restrição alimentar induziu uma diminuição na espessura da cartilagem de crescimento, alterações no osso trabecular (diminuição no volume, número e deposição de colágeno tipo 1, associada a aumento na separação intertrabecular e número de osteoclastos) e osso cortical (espessura e área). No entanto, os autores apenas acompanharam os animais por 36 dias, onde o pico de massa óssea ainda não havia sido alcançado. Neste estudo, seguimos os animais durante todo o período de crescimento até atingir o pico de massa óssea. Além disso, Pando *et al.* analisaram marcadores séricos ósseos e encontraram diminuição na leptina, IGF-1 e fosfatase alcalina (55), todos marcadores para a formação óssea. No entanto, eles não avaliaram os mecanismos moleculares que levam a alterações cartilaginosas e ósseas devido à restrição alimentar. Em nosso estudo, avaliamos a expressão gênica para destacar os mecanismos que levam a todas as alterações fenotípicas prejudiciais

que encontramos. Nossa hipótese é que a desnutrição diminuiria a expressão do colágeno tipo 1 (*Coll1a1*), do fator de transcrição relacionado ao enodoo 2 (*Runx2*) e do *osterix*, uma vez que seus papéis na formação óssea endocondral são muito bem documentados na literatura (63–66). Além disso, nossos dados histomorfométricos evidenciaram menor deposição de colágeno e menos trabéculas nas tíbias de ratos com restrição alimentar. No entanto, não encontramos diferença significativa em relação à expressão gênica.

Rossi *et al.* (2001) avaliaram os efeitos da deficiência de zinco e restrição alimentar no metabolismo esquelético e na remodelação óssea em ratos machos logo após o desmame. Eles observaram diferenças semelhantes a que encontramos nesta pesquisa, como redução no comprimento de osso longos, tamanho reduzido da cartilagem de crescimento, além de alterações na microarquitetura trabecular (39). Em investigação realizada com frangos jovens, Wang *et al.* (2002) também encontraram efeitos negativos da deficiência de zinco na cartilagem de crescimento. Os autores mostraram que apenas três dias consumindo dieta deficitária de zinco foram suficientes para inibir dramaticamente a proliferação e diferenciação dos condrócitos, além de induzir à apoptose celular (38).

Corroborando com os achados das análises anteriores, as cartilagens de crescimento dos grupos desnutridos resistiram a menor carga no teste mecânico de cisalhamento. Em estudo experimental, Fontoura *et al.* (2000) também observaram que a deficiência proteica-calórica causa enfraquecimento da cartilagem de crescimento com perda da elasticidade e menor resistência mecânica. Os autores concluíram que essas perdas podem ser advindas das menores dimensões do disco epifisário (67).

Demonstramos neste estudo, por meio de diferentes análises metodológicas que o tecido ósseo é sensível às mudanças metabólicas nutricionais. A restrição alimentar em 50% prejudicou os mecanismos normais de crescimento ósseo e a qualidade dos tecidos cartilaginosos e ósseos.

Trabalhos futuros poderão ser conduzidos em animais desnutridos para investigar os efeitos da realimentação tanto na cartilagem de crescimento como nos ossos trabecular e cortical, ou efeito da desnutrição intraútero.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Embora a restrição alimentar de 50% não tenha resultado em alterações na expressão gênica, diversas alterações fenotípicas foram observadas. As demais análises realizadas neste estudo indicaram que, sob desnutrição pós-natal, houve redução expressiva da atividade e qualidade óssea e prejuízos ao crescimento longitudinal do osso longo, o que indica que tanto a ossificação endocondral quanto a intramembranosa foram afetadas.

Portanto, concluiu-se que a desnutrição causou efeitos deletérios à cartilagem de crescimento e aos tecidos ósseos trabecular e cortical.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Monte CMG. Malnutrition: a secular challenge to child nutrition. *J pediatr*. 2000;76(3):285–97.
 2. ACC/SCN. Nutrition throughout the life cycle. 4th Report the world nutrition situation. Geneva; ACC/SCN.World Health Organization. 2000.
 3. Dayer R, Brennan TC, Rizzoli R, Ammann P. PTH improves titanium implant fixation more than pamidronate or renutrition in osteopenic rats chronically fed a low protein diet. *Osteoporos Int*. 2010;21(6):957–67.
 4. Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr*. 1999;129(7):1340–6.
 5. Leite SN, Jordão Jr AA, Andrade TAM, Masson DS F MAC. Modelos experimentais de desnutrição e sua influência no trofismo cutâneo. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):681–8.
 6. Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr*. 2007;26(4):389–99.
 7. WHO - World Health Organization. Malnutrition [Internet]. 2018 [citado 9 de maio de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.
 8. Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M. Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*. 2013;106:83–9.
 9. Proos L, Gustafsson J. Is early puberty triggered by catch-up growth following undernutrition? *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(5):1791–809.
 10. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet*. 2007;369(9556):145–57.
 11. Mescher AL. Junqueira's Basic histology: text and atlas. 13 ed. McGraw-Hill education; 2013. Capítulo 8: Bone; p. 315-361.
 12. Gomes, LSM, Volpon JB. Estudo experimental do processo de reparação das lesões epifisárias tipo III e IV de Salter e Harris. *Rev Bras Ortop*. 1991;26(5):161–6.
 13. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*. 1994;28(6):505–19.
 14. Ballock RT, O'Keefe RJ. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003;69(2):123–43.
 15. Judas F, Palma P, Falacho R, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio para disciplina de ortopedia. Faculdade de Medicina de Coimbra; 2012.
 16. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ CP. Biology of bone tissue: Structure, function, and Factors That influence one cells. *BioMed Res Int*. 2015;421746.
-

17. Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO, Karsenty G, Rauch F. Bone health in children and adolescents. *Curr Probl Pediatr Adolesc Heal Care*. 2004;34(6):226–42.
 18. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L DA. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest*. 1999;79(2):83–94.
 19. Brandão CMA, Vieira JGH. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1999;43(6):401–8.
 20. Even-zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O, Phillip M, et al. Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1 α RNA levels in the growth plate. *Bone*. 2008;42(3):505–15.
 21. Yanagihara GR. Análise tecidual e biomecânica de ossos de ratas ovariectomizadas alimentadas com ração hiperlipídica [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2017.
 22. Balint JP. Physical findings in nutritional deficiencies. *Pediatr Clin North Am*. 1998;45(1):245–60.
 23. Alippi RM, Meta MD, Olivera I, Bozzini C, Schneider P, Meta IF, et al. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch Oral Biol*. 2002;47(1):47–53.
 24. Farnum CE, Lee AO, Hara KO, Wilsman NJ. Effect of Short-Term Fasting on Bone Elongation Rates: An Analysis of Catch-up Growth in Young Male Rats. *Int Pediatr Res Found*. 2003;53(1):25–9.
 25. Guarniero R, De Barros Filho TE, Tannuri U, Rodrigues CJ RJ. Study of fracture healing in protein malnutrition. *Rev Paul Med*. 1992;110(2):63–8.
 26. Bourrin S, Toromanoff A, Ammann P, Bonjour J, Rizzoli R. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged ale rats. *J Bone Miner Res*. 2000;15(8):10–2.
 27. Day SM, DeHeer DH. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2001;15(1):47–53.
 28. Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I. Vitamin D and bone physiology: Demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*. 2009;18(6):473–8.
 29. Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, et al. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 2014;61:102–8.
 30. Mehta G, Roach HI, Taylor P, Reading I, Oreffo ROC, Clarke NMP, et al. Intrauterine exposure to a maternal low protein diet reduces adult bone mass and alters growth plate morphology in rats. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(6):493–8.
 31. Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA. Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr*. 2012;142(6):1038–45.
-

32. Banu MJ, Orhii PB, Mejia W, Carter RJMMC, Mosekilde L, Thomsen JS, et al. Analysis of the effects of growth hormone , voluntary exercise , and food restriction on diaphyseal bone in female F344 rats. *Bone*. 1999;25(4):469–80.
 33. Banu J, Orhii PB, Okafor MC, Wang L, Kalu DN. Analysis of the effects of growth hormone , exercise and food restriction on cancellous bone in different bone sites in middle-aged female rats. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(8):849–64.
 34. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(5):813–29.
 35. Bonjour J, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci*. 2007;51:64–80.
 36. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Min Res*. 2010;25(9):2078–88.
 37. Heaney RP. Bone Mass, Nutrition, Factors. *Am J Med*. 1993;95(5A):29–33.
 38. Wang X, Fosmire GJ, Gay C V, Leach RM. Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J Nutr*. 2002;132(4):665–73.
 39. Rossi L, Migliaccio S, Corsi A, Marzia M, Bianco P, Teti A, et al. Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition. *J Nutr*. 2001;131(4):1142–6.
 40. Pando R, Even-zohar N, Shtaiif B, Edry L, Shomron N, Phillip M, et al. MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues : association between miR-140 and SIRT. *J Nutr Biochem*. 2012;23(11):1474–81.
 41. Boersma, B; Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev*. 1997;18(5):646–61.
 42. Turner C. International review article biomechanics of bone : Determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*. 2002;13(2):97–104.
 43. Merloz P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):1999–2001.
 44. Ahn H, Seo D, Sung H, Choue R. Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen- deficient rats. *Nutr Res*. 2014;34(8):707–13.
 45. Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA. Food restriction and simulated microgravity : effects on bone and serum leptin. *J Appl Physiol*. 2008;104(4):1086–93.
 46. Falcai MJ. Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
 47. Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2179–93.
-

48. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Mu R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro – computed tomography. *JBMR*. 2010;25(7):1468–86.
 49. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone Histomorphometry : Standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595–610.
 50. FAO et al. The state of food security and nutrition in the world. Rome: FAO; 2017.
 51. Ingram DK, de Cabo R. Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res Rev*. 2017;39:15–28.
 52. Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet*. 2007;369(9555):60–70.
 53. McDonald CM, Olofin I, Flaxman S, Fawzi WW, Spiegelman D, Caulfield LE. The effect of multiple anthropometric deficits on child mortality : meta-analysis of individual data in 10 prospective studies from developing countries. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(4):896–901.
 54. Reichling TD, German RZ. Bones , Muscles and Visceral Organs of Protein-Malnourished Rats (*Rattus norvegicus*) Grow More Slowly but for Longer Durations to Reach Normal Final Size. *J Nutr*. 2000;130(9):2326–32.
 55. Pando R, Masarwi M, Shtaiif B, Idelevich A, Monsonego-Ornan E, Shahar R, et al. Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth. *J Endocrinol*. 2014;223(3):227–39.
 56. UNICEF, WHO, The World Bank. Joint Child malnutrition estimates. (UNICEF, New York; WHO, Geneva; The World Bank, Washington); 2012.
 57. Keith J. Loud CMG. Adolescent Bone Health. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006;160(10):1026–32.
 58. Santiago HAR, De Pierro LR, Reis RM, Caluz AGRE, Ribeiro VB VJ. Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta cirúrgica Bras*. 2015;30(11):743–8.
 59. Filho CF, Volpon JB, Shimano AC. Ensaio de cisalhamento sobre a cartilagem de crescimento. *Acta Ortop Bras*. 1996;4(1):9–14.
 60. WHO - World Health Organization. WHO global database on child growth and malnutrition. Geneva; 1997. p. 1–67.
 61. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, BOZZINI C, ROIG MC, Compagnucci CV, et al. Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition : a morphometric , densitometric and mechanical study. *Br J Nutr*. 2005;93(5):663–9.
 62. Pando R, Shtaiif B, Phillip M, Gat-yablonski G. A serum component mediates food restriction–induced growth attenuation. *Endocrinology*. 2014;155(3):932–40.
-

63. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ, Wang Y, Brisson BK, Vogel LK, et al. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(6):621–31.
 64. von der Mark K von der MH. The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage. *J Bone Jt Surg Br.* 1977;59B(4):458–64.
 65. Wang T, Zhang X BD. Osteogenic differentiation of periosteal cells during fracture healing. *J Cell Physiol.* 2017;232(5):913–21.
 66. Yu MD, Su BH ZX. Morphologic and molecular alteration during tibia fracture healing in rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(5):1233–40.
 67. Filho CF. Efeito da deficiência protéico-calórica sobre a resistência mecânica de ossos de ratas. Estudo do cisalhamento sobre a placa de crescimento proximal da tíbia e da flexão sobre a diáfise femoral [Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.
-

ANEXO

ANEXO: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeito da restrição alimentar no tecido ósseo, cartilaginoso e no processo de consolidação óssea em ratos*”, registrado com o número **013/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Batista Volpon**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 31 de outubro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ratos Wistar machos pesando 70g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 31/10/2016 a 09/01/2018.

We certify that the Protocol *n° 013/2016*, entitled “*Effects of food restriction on bone, growth plate and bone healing in rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/31/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Wistar rats weighing 70g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/09/2018.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

APÊNDICES

APÊNDICE A: Média da massa corpórea dos animais (em g) de acordo com a idade pós-natal.

Idade (Semanas)	CON1	RA1	CON2	RA2
3	70	71	71	72
4	93	74	91	75
5	151	97	177	99
6	225	127	243	129
7	300	157	317	158
8	381	193	382	198
9	416	200	427	205
10	432	228	421	227
11	476	232	455	235
12			542	258
13			565	269

APÊNDICE B: Média semanal da quantidade de ração consumida pelos animais em gramas (g).

Semanas	CON	RA
1ª	17,09	8,54
2ª	25,91	12,95
3ª	30,99	15,49
4ª	36,68	18,34
5ª	37,11	18,55
6ª	36,9	18,45
7ª	29,96	14,98
8ª	37,13	18,56
9ª	40,37	20,18
10ª	36,13	18,06

APÊNDICE C: Composição da ração utilizada na alimentação dos animais

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO (NUBILAB CR1®)	
UMIDADE (MÁX)	125g/Kg
PROTEÍNA BRUTA (MIN)	220g/Kg
EXTRATO ETÉREO (MIN)	50g/Kg
MATERIAL MINERAL (MÁX)	90g/Kg
FIBRA BRUTA (MÁX)	70g/Kg
CÁLCIO (MIN-MÁX)	10-14g/Kg
FÓSFORO	6.000 mg/Kg

MANUSCRITO

Undernutrition significantly impaired the quality of growth plate, trabecular metaphyseal bone and cortical shaft in growing rats.

1- **Patrícia M. San Gregório Guedes**¹, PT. GUEDES, P.M.S.G.

2- **Ariane Zamarioli**^{1*}, PhD. ZAMARIOLI, A.

3- **Iara Inácio Botega**¹ PT. BOTEGA, I.I.

4- **João Paulo Bianchi Ximenez**², MSc. XIMENEZ, J.P.B.

5- **Mariana Maloste Butezloff**¹, MSc. BUTEZLOFF, M.M.

6- **Raquel Assed Bezerra da Silva**³, PhD. SILVA, R.A.B.

7- **Yara Terezinha Corrêa Silva Sousa**⁴, PhD. SOUSA, Y.T.C.S.

8 - **Antônio Carlos Shimano**¹, PhD. SHIMANO, A.C.

9- **José Batista Volpon**¹, PhD. VOLPON, J.B.

¹ School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

² School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

³ School of Dentistry of Ribeirão Preto of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

⁴ School of Dentistry of Ribeirão Preto of Ribeirão Preto, University of Ribeirão Preto, Brazil

*** Corresponding author: Ariane Zamarioli**

Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900.

Telephone: +55 16 33153272, Fax: +55 16 33153272.

E-mail: ariane_zamarioli@hotmail.com

Word count: 2851

Number of figures: 9

Number of tables: 2

29

30 **Running title:** Undernutrition impairs skeletal development

31

32 **Financial support:** The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher
33 Education Personnel (CAPES) for the financial funding in developing this study.

34

35 **Conflict of interest:** None for all authors

36 .

Abstract:

Background: An adequate nutritional intake is an essential factor to maximize the skeletal acquisition, which may reduce bone fracture risk and osteoporosis incidence later in life. Conversely, undernutrition has a negative impact on bone growth and development thus impairing its quality.

Objective: We aimed to investigate the effects of food restriction on the growth plate and bone tissue in growing rats.

Methods: 72 male Wistar rats were randomly assigned into two groups: (1) Control rats (Con) and; (2) food restricted rats (FRes). After weaning, food restricted rats were fed 50% of the control *ad libitum* food intake. All animals were subdivided into two subgroups according to the experimental follow-up: 56 and 70 days (n=18/subgroup). At the end of each experimental period, the rats were euthanized and tibias were analyzed by real time PCR, dual-energy X-ray absorptiometry, micro-computed tomography, histomorphometry and mechanical test. Statistical analysis was carried out by using the t-test, whence significance was set when $p < .05$.

Results: Although food restriction did not alter gene expression, several phenotypic changes were seen at the growth plate (i.e. decreased in growth plate volume; reduction in total growth plate area and height; decrease in the area of proliferative, hypertrophic and ossified zones; lesser amount of hypertrophic cells and; weaker tissue at resisting shear stress), trabecular and cortical bone (i.e. reduction in bone size and mass; lower bone density; deterioration at the trabecular and cortical microarchitecture and; fewer trabeculae with lower collagen deposition) of growing rats subjected to undernutrition.

Conclusions: Food restriction had detrimental effects on growth plate, trabecular bone and cortical shaft.

Keywords: Undernutrition, growth plate, trabecular bone, cortical bone, growing rats

1. Introduction

The growth plate cells are responsible for the longitudinal growth of long bones through a series of well-orchestrated events known as endochondral bone formation. Chondrocytes proliferate, differentiate, hypertrophy and then are removed and replaced by trabecular bone [1]. During skeletal growth, several structural changes occur at cartilaginous and bony tissues to adapt for the altered demands during bone elongation [2]. Therefore, a balanced food intake with specific nutrients such as calcium, vitamin D and proteins are essential not only for the optimum development of skeletal tissue, but also for the maturation of several tissues and organs (i.e. neurologic function, hormonal and endocrine activity) [3-6].

It has been previously shown that an adequate nutritional status during skeletal maturation may be a key factor to achieve an optimum peak bone mass and to decrease the incidence of osteoporosis later in life [7, 8]. Conversely, malnutrition affects the development of long bones and is the major cause of short stature, low weight [9] and lower peak bone mass [10, 11].

The term malnutrition refers to deficiencies, excesses or imbalances in an individual food intake. Undernutrition refers to the general reduction in nutrients intake and; specific micronutrient-related malnutrition refers to the lack of certain nutrients. Previous experimental studies have shown that protein deprivation decreased growth plate thickness, area and number of chondrocytes in the hypertrophic and proliferative zones [7, 12]. The deficiency of vitamin D led to poorer bone density, reduced osteoblast activity, lower whole bone mechanical integrity and fewer circulating markers for bone formation (i.e. osteocalcin and IGF-1) [13, 14].

Although the depletion of certain nutrients has shown detrimental impact at the skeletal tissue, the clinical undernutrition often seen in the population occurs due to a general reduction in total food intake [12]. Therefore, we aimed to investigate the effects of general food restriction on growth plate and bone tissue of growing rats. We

hypothesize that undernutrition alters the growth plate anatomy and function, thus impairing endochondral bone formation, which results in lower and poor bone quality.

2. Methods

2.1 Animal care

The animal protocol used in this study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of our Institution (protocol 013/2016) and was complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

After weaning, 21-days-old male Wistar rats were purchased from the animal facility of our institution. The rats were housed in separate individual cages enabling to calculate their daily food intake. A 3-day interval was allowed for adaptation to the laboratory, which consisted in a room with controlled conditions of humidity, temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and an artificial light/dark cycle of 12 hours.

72 rats were divided into two groups: (1) Con: weight-matched control rats with unlimited access to food and; (2) FRes: rats receiving a 50% of the *ad libitum* food intake control group. All rats had free access to water and were subdivided into two subgroups according to the experimental follow-up ($n=18/\text{subgroup}$); 56 and 70 days.

2.2 Experimental model for undernutrition

The 50% food restriction protocol was calculated by previously monitoring the daily food consumed by control rats, together with a daily assessment of their body weight. Similar protocol has been previously used in the scientific literature and was shown to be effective at inducing similar features to those seen in malnourished individuals [15].

2.3 Euthanasia and sample collection

On days 56 and 70 after food restriction (or *ad libitum* food intake), the rats were euthanized and tibias were dissected in preparation for morphometric

measurements, bone densitometry analysis, tridimensional microarchitecture assessment, histomorphometry, mechanical test and gene expression.

2.4 Gain in body weight during the study

Rats were daily weighed in order to monitor their body mass gain throughout the experiment.

2.5 Tibia morphometric measures

After dissection, tibias were weighed (in grams), measured in length (in millimeters), in shaft perimeter (in millimeters) and in proximal metaphyseal perimeter (in millimeter) (n=7/group).

2.6 Bone density assessment

Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were assessed by Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using a Lunar DPX-IQ densitometer (Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, United Kingdom). The entire tibia was scanned, but the BMD and BMC were calculated by using a standard region of interest at the proximal metaphysis. The scanning reproducibility (4%) was assessed by the root mean square coefficient of variation.

2.7 Tridimensional bone microarchitecture assessment

After DXA assessment, tibias were scanned using a Microcomputed Tomography (μ CT) device (SkyScan 1176; Bruker-microCT, Kontich, Belgium) with a 1-mm-thick aluminum filter to enhance contrast. A rotation step of $0,40^\circ$ with one-frame averaging were selected to obtain an isotropic resolution of $8,5 \mu\text{m}$. Images of each specimen were reconstructed with specific software (NRecon v.1.6.9). The growth plate, trabecular and cortical bone tissues were manually isolated and analyzed by using the CTAn software (CTAn v. 1.13.2.1).

The total volume of the growth cartilage, manually selected in its totality was measured (TV, in mm³) to assess its volume.

The trabecular microarchitecture in the secondary spongiosa was assessed in the proximal portion of tibia, starting immediately distally to the proximal growth plate and covering a total length of 3 mm. The following microstructural parameters were determined: bone volume (BV, in mm³); the bone volume fraction (BV/TV, in %); trabecular number (Tb.N, in 1/mm); trabecular thickness (Tb.Th, in mm); Connectivity density (Conn.D, in 1/mm³); specific bone surface (BS/BV, in mm³) and; trabecular separation, (Tb.Sp, in mm).

The cortical microarchitecture was assessed at the tibia shaft, starting 8 mm distally to the proximal growth plate and covering a total length of 2 mm. The following microstructural parameters were determined: cortical volume (Ct.V, in mm³) and cortical thickness (Ct.Th, in mm).

The data obtained by μ CT are expressed in accordance to standardized nomenclature [16].

2.8 Histology

Five tibias from each group were randomly selected for histological analysis. The whole bone was fixed in cold 4% paraformaldehyde, decalcified in cold 10% EDTA, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m, and placed on charged slides (Manco Inc., USA).

Histomorphometric analysis of growth plate

Coronal sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to allow the assessment of growth plate morphology. Sections were analyzed under bright field microscopy (Axiovert; Carl Zeiss, Germany), and images were captured with a CCD camera (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Germany) in the tibia proximal metaphysis, with magnifications of 50 and 200x. The *Image J* software was used to measure the total

growth plate area (in mm²); the areas of proliferative, hypertrophic and ossified zones (in mm²); the thickness or height (in µm) and the amount of hypertrophic cells.

Histomorphometric analysis of trabeculae

Adjacent sections were stained with Masson's trichrome and picrosirius red solution and analyzed under polarized light microscopy Axiolmager® Z2 (Zeiss, Germany). Images were captured with a digital camera (Zeiss) with magnifications of 50x. Histological slides stained with Masson's trichrome were used to measure the trabecular bone area, expressed by the total bone area (B.Ar/T.Ar, in %). Slides stained with picrosirius red were used to calculate the area of collagen type 1 and 3 deposition, expressed by the total area (Col1.Ar/Tt.Ar, in % and Col3.Ar/Tt.Ar, in %).

2.9 Assessment of growth plate strength

The growth plates were tested for shear failure using an universal testing machine (EMIC DL10.000, Brazil). For this, the distal segment of tibia was embedded in an acrylic resin block and the proximal epiphysis was transfixed with a 6-mm-steel-wire. The resin was fixed at the testing machine basis and a vertical force was applied at the wire resulting in shear stress failure at the growth plate (Figure 1). Bones were kept wet during the test with saline. Using the specific Tesc (3.04, Brazil), the load-displacement graphs were generated in order to calculate maximal load and stiffness.

2.10 RNA isolation and gene expression

Total RNA was extracted from the tibias (n=6/group) using SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instruction. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with 1 µg RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems) were used for quantifying *Col1a1* (assay ID: Rn01463848_m1),

Runx2 (Rn01512300_m1), *Osx* (Rn02769744_s1) and *Sost* (Rn00577971_m1) expression by quantitative PCR on an StepOnePlus PCR machine (Applied Biosystems) and were normalized to the expression of reference gene *GaPDH* (Rn01775763_g1). Samples were run in duplicates, and relative expression was calculated using 2^{-ddCT} , the ddCt was calculated as $dCt[goi_{FRes} - ref_{FRes}] - dCt[goi_{Con} - ref_{Con}]$ where *goi* are the genes of interest and *ref* is the reference gene. For the descriptive and statistical analyses, ddCT was applied as continuous variable. Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines were followed for designing and interpreting the results of quantitative real-time PCR [17].

2.11 Statistical analysis

Continuous variables were expressed as the means and standard deviations (SD). The results obtained in the groups were compared using T-Test where p values less than .05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with RStudio 1.0.153 (RStudio, Inc., USA).

3. Results

3.1 Undernutrition severely reduced gain in body weight and impaired the whole bone morphometric measures

Upon study entry (day 0), no difference was found between the groups ($p > .05$, Figure 2). As expected, food restricted rats gained much less weight than the controls on days 56 (231% versus 580%, $p < .05$) and 70 (284% versus 707%, $p < .05$).

Food restriction decreased all morphometrical parameters (length, bone mass and perimeters) of the whole tibia (Table 1).

3.2 Undernutrition deteriorated growth plate morphology and cell activity thus leading to a weaker tissue

Our uCT data (Table 2) evidenced a significant decrease in growth plate volume due to undernutrition. The growth plate volume of the food restricted rats was decreased by 39% on day 56 ($p=.06$) and by 40% on day 70 when compared to control rats ($p<.05$).

In agreement with the uCT results, our histomorphometric analysis showed that undernutrition caused significant detrimental changes in the anatomy of the growth plate (Figure 3). On day 56 food restricted rats exhibited thinner growth plates with lower area (total area and areas of proliferative and hypertrophic zones) and lesser amount of hypertrophic cells ($p<.05$). On day 70 the reductions were in area (total and proliferative and ossified zones) and thickness ($p<.05$).

Besides the structural changes, the undernutrition also affected the mechanical strength of growth plates (Figure 4). On day 56 the undernutrition reduced the maximal load and stiffness of the growth plate by 50% and 22%, respectively ($p<.05$). On day 70 these reductions were 40% for maximal load and, 42% for stiffness ($p<.05$).

3.3 The effects of undernutrition on bone tissue

Figure 5 shows a comparison of BMD and BMC at both 56 and 70 days. Significant difference ($p<.05$) was found after 70 days of food restriction, whence malnourished rats had less dense bones than controls.

Undernutrition reduced quantity and quality of trabecular bone

Our uCT data evidenced microstructural changes at the trabecular bone due to undernutrition (Figure 6). Furthermore, the deleterious changes were found to be time-dependent once they were higher on day 70. Table 2 shows all the microstructural parameters. On day 56 the animals submitted to food restriction exhibited a decrease in BV by 59%; in BV/TV by 42%; in Tb.N by 38%; in Conn.D by 76% and; an increase in Tb.Sp by 39% ($p<.05$). On day 70 these changes were higher: there was a decrease

in BV by 76%; in BV/TV by 59%; in Tb.Th by 14%; in Tb.N by 54%; in Conn.D by 66% and; an increase in BS/BV by 15% ($p < .05$).

Our histomorphometric findings showed that undernutrition resulted in lower trabeculae bone with lower collagen deposition. In figure 7 the slides stained with Masson's trichrome evidenced lower trabeculae bone in the food restricted group (-69% on day 56 and, -54% on day 70, $p < .05$). The figure 8 shows slides stained with picrosirius red solution, whence a decrease in collagen deposition was observed in the malnourished rats. On day 56 they exhibited a decrease in type 1 collagen by 56% ($p < .05$) and by 39% in type 3 ($p = .09$). On day 70, the type 1 collagen was decreased by 19% ($p > .05$) and the type 3 by 58% ($p < .05$).

Undernutrition negatively affected cortical bone

Our uCT results also evidenced microstructural changes at the cortical bone due to undernutrition (Figure 6), but to a lesser degree than those at the trabecular bone. Similarly to what occurred at the trabeculae, the deleterious changes at cortical bone were found to be time-dependent once they were higher on day 70. Table 2 shows all the microstructural parameters. On day 56 the animals submitted to food restriction exhibited a decrease in Ct.V by 32% ($p < .05$). On day 70 there was a decrease in Ct.V by 44% and in Ct.Th by 14% ($p < .05$).

3.8 Gene expression is not changes due to undernutrition

Curiously and in spite of all the phenotypes changes, our PCR data did not show any difference with regards to gene expression due to food restriction (Figure 9).

4. Discussion

Our results indicate severe changes at the skeletal tissue (growth plate, trabeculae and cortical bone) due to undernutrition, in a time-dependent manner. The impairments at the growth plate are related to anatomical changes in its structure (i.e.

area, height, cells quantity and tridimensional volume) and strength (maximal shearing load and stiffness). The detrimental changes at the growth plate may have significantly contributed for the bony changes, mainly due to endochondral bone formation. Therefore, reduction either at the quantity or cell function resulted in less bone formation. In this study we evidenced that undernutrition caused severe reduction in bone morphology (i.e. bone mass, length and perimeter), densitometry, disruption in microarchitecture (i.e. reduction in trabecular and cortical volume and thickness, decrease in trabecular number and connectivity density, increase in trabecular separation and bone surface density) and, fewer trabeculae with lower collagen deposition (types 1 and 3). Our results corroborate previous statements that bone keeps growing even under adverse conditions of undernutrition, but it costs a thinner and weaker cortices [18].

Previous studies have also investigated the effects of malnutrition on skeletal tissue [2, 5, 8, 19, 20]. However, most of them studied the depletion of specific nutrients, such as proteins [11], vitamin D [13], calcium [12] and zinc [1]. Considering that clinical undernutrition includes the general reduction in food intake, we chose to use this model in our study. Previous authors have also studied the effects of general reduction in food intake either on growth plates [20] or on bones [8, 19], but these authors did not assess both skeletal tissues at the same time. Pando et al. combined both tissues and assessed the effects of 40% food restriction on growth plate, trabeculae and cortical bone [2]. However, the growth plate was only assessed in its height by the authors. They found that food restriction induced a decrease in growth plate height, changes in trabecular bone (decrease in volume, number and collagen deposition, associated with an increase in separation and osteoclast number) and cortical bone (thickness and area). Nevertheless, the authors only followed-up the animals for 36 days, where the peak bone mass had not been achieved yet. In this study we followed the animals during the entire growth period until they achieved the peak bone mass. Furthermore, Pando et al. analyzed serum bone markers and found a

decrease in leptin, insulin-like growth factor 1 and alkaline phosphatase [2], all markers for bone formation. However, they did not assess the molecular mechanisms leading to cartilage and bone changes due to food restriction. In our study we assessed gene expression in order to highlight the mechanisms leading to all detrimental phenotypic changes we have found.

We hypothesized that undernutrition would downregulate the expression of type 1 collagen (Col1a1), Runt Related Transcription factor 2 (Runx2) and osterix, since their roles on endochondral bone formation are very well documented in literature [21-24]. Furthermore, our histomorphometric data evidenced lower deposition of collagen and fewer trabeculae at the tibias of food restricted rats. However, we did not find any significant difference with regards to gene expression on days 56 of undernutrition. In our unpublished data we showed that Col1a1 and Runx2 were downregulated in bone calluses of malnourished rats on day 14 post-fracture. We believe that we would have found similar results at the intact bone if we had assessed it in a more acute stage, thus leading to the phenotypic changes we found later on. Further studies should then be carried out to investigate the effects of food restriction on gene expression in early stages (i.e. 7 or 10 days).

In conclusion, 50% food restriction had detrimental effects on growth plate, trabecular bone and cortical shaft. Although undernutrition did not result in gene expression changes, several phenotypic changes were seen at the growth plate (i.e. decreased in growth plate volume, reduction in total growth plate area and thickness, decrease in area of proliferative, hypertrophic and ossification zones and, decrease in hypertrophic cells and lesser mechanical resistance), trabecular and cortical bone (i.e. reduction in bone size and mass, bone density, deterioration at the trabecular and cortical microstructure, reduction in trabecular bone,) of growing rats subjected to food restriction.

5. Acknowledgments

Author contributions

1. P.M.S.G.G., A.Z. and J.B.V. designed research (project conception, development of overall research plan, and study oversight).
2. P.M.S.G.G., I.I.B. and M.M.B. conducted research (hands-on conduct of the experiments and data collection).
3. A.Z., R.A.B.S., A.C.S. and J.B.V. provided essential reagents, or provided essential materials (applies to authors who contributed by providing animals, constructs, databases, etc., necessary for the research).
4. P.M.S.G.G., J.P.B.X., A.Z. and J.B.V. analyzed data or performed statistical analysis.
5. P.M.S.G.G., A.Z. and J.B.V. wrote paper (only authors who made a major contribution).
6. A.Z. and J.B.V. had primary responsibility for final content.
7. All authors have read and approved the final manuscript. For single-authored research papers and reviews, please state: The sole author had responsibility for all parts of the manuscript.

6. References

1. Wang X, Fosmire GJ, Gay CV, Leach RM, Jr.: **Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens.** *J Nutr* 2002, **132**:665-673.
2. Pando R, Masarwi M, Shtaiif B, Idevich A, Monsonogo-Ornan E, Shahar R, Phillip M, Gat-Yablonski G: **Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth.** *J Endocrinol* 2014, **223**:227-239.
3. Alippi RM, Meta MD, Olivera MI, Bozzini C, Schneider P, Meta IF, Bozzini CE: **Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible.** *Arch Oral Biol* 2002, **47**:47-53.
4. Balint JP: **Physical findings in nutritional deficiencies.** *Pediatr Clin North Am* 1998, **45**:245-260.
5. Even-Zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O, Phillip M, Gat-Yablonski G: **Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1alpha RNA levels in the growth plate.** *Bone* 2008, **42**:505-515.

6. Farnum CE, Lee AO, O'Hara K, Wilsman NJ: **Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats.** *Pediatr Res* 2003, **53**:33-41.
7. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D: **Childhood growth, physical activity, and peak bone mass in women.** *J Bone Miner Res* 1995, **10**:940-947.
8. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML: **Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice.** *J Bone Miner Res* 2010, **25**:2078-2088.
9. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, Carter JA, International Child Development Steering G: **Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries.** *Lancet* 2007, **369**:145-157.
10. Mullen JL, Gertner MH, Buzby GP, Goodhart GL, Rosato EF: **Implications of malnutrition in the surgical patient.** *Arch Surg* 1979, **114**:121-125.
11. Reichling TD, German RZ: **Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size.** *J Nutr* 2000, **130**:2326-2332.
12. Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA: **Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats.** *J Nutr* 2012, **142**:1038-1045.
13. Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I: **Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model.** *J Prosthodont* 2009, **18**:473-478.
14. Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H: **Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice.** *Bone* 2014, **61**:102-108.
15. Ahn H, Seo DH, Kim HS, Choue R: **Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats.** *Nutr Res* 2014, **34**:707-713.
16. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R: **Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.** *J Bone Miner Res* 2010, **25**:1468-1486.
17. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clin Chem* 2009, **55**:611-622.
18. McCance RA, Mount LE: **Severe undernutrition in growing and adult animals. 5. Metabolic rate and body temperature in the pig.** *Br J Nutr* 1960, **14**:509-518.
19. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci CV, Alippi RM: **Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition: a morphometric, densitometric and mechanical study.** *Br J Nutr* 2005, **93**:663-669.
20. Pando R, Even-Zohar N, Shtaiif B, Edry L, Shomron N, Phillip M, Gat-Yablonski G: **MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues: association between miR-140 and SIRT1.** *J Nutr Biochem* 2012, **23**:1474-1481.
21. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ, Wang Y, Brisson BK, Vogel LK, Hankenson KD, Adams SL: **Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone.** *Calcif Tissue Int* 2014, **94**:621-631.
22. von der Mark K, von der Mark H: **The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage.** *J Bone Joint Surg Br* 1977, **59-B**:458-464.
23. Wang T, Zhang X, Bikle DD: **Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing.** *J Cell Physiol* 2017, **232**:913-921.
24. Yu MD, Su BH, Zhang XX: **Morphologic and molecular alteration during tibia fracture healing in rat.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018, **22**:1233-1240.

Table legends

Table 1. Morphological measures of tibial mass, length and perimeters (proximal metaphysis and diaphysis). All parameters were significantly decreased by food restriction on both end point analysis. Different letters indicate significant difference ($p < .05$).

Table 2. Comparison of the microarchitecture parameters at growth plate, trabecular and cortical bone. Undernutrition resulted in detrimental changes at skeletal sites analyzed. Different letters indicate significant difference ($p < .05$).

Tables

Table 1

	Con 56d	FRes 56d	Con 70d	FRes 70d
Bone mass (g)	0.88±0.14	0.62±0.076 ^a	1.02±0.12	0.63±0.09 ^b
Length (mm)	41.63±1.80	38.01±1.31 ^a	45.62±1.57	39.31±1.72 ^b
Shaft perimeter (mm)	11.68±1.49	9.98±1.11 ^a	11.60±0.92	9.78±0.57 ^b
Proximal metaphyseal perimeter (mm)	17.99±0.83	15.69±1.87 ^a	20.17±2.94	15.03±1.62 ^b

^ap<.05 vs Con 56d

^bp<.05 vs Con 70d

Table 2

	Con 56d	FRes 56d	Con 70d	FRes 70d
Growth plate				
Volume (mm³)	6.3±2.1	3.9±0.3 ^{a'}	5.5 ±1.2	3.3±0.8 ^b
Proximal tibia				
(trabecular bone)				
BV (mm³)	3.4±1.3	1.4±0.6 ^a	3.2±1.1	0.8±0.5 ^b
BV/TV (%)	7.2±2.2	4.2±1.0 ^a	6.8±2.4	2.8±1.9 ^b
Tb.Th (mm)	0.1±0.01	0.04±0.01	0.1±0.01	0.1±0.003 ^b
Tb.N (mm)	1.3±0.2	0.8±0.2 ^a	1.1±0.4	0.5±0.4 ^b
Tb.Sp (mm)	0.6±0.1	0.9±0.2 ^a	1.0±0.4	1.2±0.5
Conn.D (1/mm)	888.9±156.6	208.6±94.0 ^a	693.3±258.1	235.1±122.1 ^b
BS/BV (mm)	85.3±9.3	89.1±11.3	76.7±7.9	88.1±7.3 ^b
Midshaft tibia				
(cortical bone)				
Ct.V (mm³)	9.3±0.6	6.31±0.7 ^a	10.0±1.0	5.7±0.9 ^b
Ct.Th (mm)	0.3±0.01	0.3±0.02	0.3±0.02	0.2±0.01 ^b

^ap<.05 versus Con 56d

^bp<.05 versus Con 70d

^{a'}p<.06 versus Con 56d

Figure legends

Figure 1. Tibia preparation for shearing mechanical test at the growth plate. Distal segment was embedded in an acrylic resin (up to mid-shaft) and the proximal epiphysis was transfixed with a 6-mm-k-wire. The resin was fixed at the testing machine basis and a vertical force was applied at the k-wire resulting in shear stress at the growth plate.

Figure 2. Comparison of body mass (in grams) among groups. A: Upon study entry (day 0), body mass was similar among all groups ($p>.05$). B: On day 56 the food restricted rats exhibited lower body mass than the controls ($p<.05$) and their gain since day 0 was only of 231% (versus 580% in controls). C: On day 70 the body weight difference between groups was even higher. Food restricted rats only gained 284% of body throughout the experiment and the controls gained 707% ($p<.05$).

Figure 3. A: Histological slides of tibias stained with HE at magnifications of 200x. B: Food restriction decreased the growth plate area at both end point analysis ($p<.05$). C: Growth plate thickness was decreased by undernutrition on both 56 and 70 days ($p<.05$). D: On day 70 a significant decrease of ossified zone was seen in the food restricted group ($p<.05$). Asterisks indicate significant difference as $p<.05$.

Figure 4. The shear mechanical test indicated that food restriction decreased maximal load and stiffness on both end point analysis. Asterisks indicate significant differences ($p<.05$).

Figure 5. Comparison of BMD (in g/cm²) and BMC (in g) of the tibial metaphysis on days 56 and 70 (DXA assessment). Food restriction resulted in decreased BMD and BMC (only at 70 days of follow-up). Asterisks indicate significant differences ($p < .05$).

Figure 6. Coronal μ CT images of tibias with tridimensional isolated trabecular and cortical bones. Undernutrition resulted in microstructural changes on both trabecular and cortical bones.

Figure 7. A: Histological slides of tibias stained with Masson's trichrome at magnification of 50x. B: Food restriction decreased the area of trabecular bone on both end point analysis ($p < .05$).

Figure 8. A: Histological slides of tibias stained with picrosirius red solution at magnification of 50x, evidencing a decrease in collagen deposition in the malnourished rats. On day 56 they exhibited a decrease in type 1 (B) collagen and in type 3 (C). No difference was seen at the type 1 collagen on day 70 (D), whereas on day 70 there was a significant decrease (E).

Figure 9. In spite of all phenotypic changes due to undernutrition, the gene expression of Col1A, Runx2, Osterix and Sos did not differ between the groups ($p > .05$).

Figures

Figure 1

Figure 2

Figure 3 **Figure 4** **Figure 5**

Figure 6 **Figure 7**

Figure 8 **Figure 9**