UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E METABOLISMO

BEATRIZ COIMBRA ROMANO

Impacto metabólico e ósseo da dieta hiperproteica em ratas submetidas à restrição calórica

RIBEIRÃO PRETO

2021

BEATRIZ COIMBRA ROMANO

Impacto metabólico e ósseo da dieta hiperproteica em ratas submetidas à restrição calórica

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição e Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula.

RIBEIRÃO PRETO

2021

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.

Romano, Beatriz Coimbra

Impacto metabólico e ósseo da dieta hiperproteica em ratas submetidas à restrição calórica. Ribeirão Preto, 2021.

81 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP. Área de concentração: Nutrição e Metabolismo.

Orientador: José Albuquerque de Paula, Francisco.

1. Dieta Rica em Proteínas. 2. Restrição Calórica. 3. Tecido Ósseo. 4. Medula Óssea. 5. Tecidos Adiposos. 6. Osteoclastos.

Nome: ROMANO, Beatriz Coimbra

Título: Impacto metabólico e ósseo da dieta hiperproteica em ratas submetidas à restrição calórica.

Dissertação de Mestrado apresentada Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ de _____ de 2021.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus Pais, Ana Maria e José Marcos, aos meus irmãos Marília e William e ao meu companheiro de vida Gabriel pelo incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.”

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), por meio da concessão de auxílio ao projeto de pesquisa, nº de processo 1838/2018.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela capacidade de aprender e por me conduzir diante deste propósito, por sua constante presença e amor infinito.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, pela oportunidade de conhecer e participar do seu grupo de pesquisa de grande relevância e competência. Por toda paciência, dedicação e ensinamentos, contribuindo para meu crescimento científico e profissional.

À minha companheira nessa jornada do mestrado, Me. Luciana Tabajara Parreiras e Silva pelo acolhimento, direcionamento e acompanhamento de todos os meus passos para realizar este trabalho, compartilhando comigo muitos momentos de alegria, angústia e conquistas, você se tornou uma grande amiga, minha gratidão por você é infinita. Agradeço também à Dra. Iana Mizumukai de Araújo por todo auxílio na execução deste trabalho, pela dedicação e paciência. Você se tornou uma grande amiga e será sempre especial para mim. Aos meus colegas de trabalho, Felipe Manoel Porto e Sandra Viviana Zorro Rodriguez, por todo auxílio, dedicação e amizade neste período. Às demais colegas do grupo de pesquisa pela convivência e auxílio na execução deste trabalho.

Aos profissionais dos laboratórios USP que me acolheram, pelos ensinamentos e contribuição grandiosa em todo o processo da coleta de dados deste trabalho:

À Profa. Dra. Sandra Y. Fukada, Dra. Mariana S. P. Ribeiro e demais colegas do Laboratório de Biologia Óssea da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, Dr. Rodrigo Abuna e ao Me. Roger R. Fernandes e demais colegas do Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano e Jéssica Suzuki Yamanaka e demais colegas do Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia da FMRP-USP. Aos profissionais Roni Charles Fabbris e Carlos Antônio Burin do Biotério do Departamento de Clínica Médica por todo auxílio no período experimental.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior e Renata Cristina Lataro do Laboratório de Ciência dos Alimentos FMRP.

À Profa. Dra. Vanda Jorgetti do Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Pereira do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe.

À Dra. Ingrid Dick de Paula pela parceria e grande contribuição profissional na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ana Maria Coimbra Romano e José Marcos Romano, por cuidar e zelar pela minha vida em todos os dias, pelos ensinamentos e valores aprendidos, vocês são meu porto seguro.

Aos meus irmãos, Marília e William, pela contribuição em minha educação, amor e amizade. Às minhas queridas sobrinhas, Amarílis e Alice, pelo amor e alegria que sempre me proporcionaram.

Ao meu companheiro de vida, Gabriel de Souza, pelo amor e companheirismo, por me apoiar em todos os meus sonhos e me incentivar em todos os momentos.

À minha amiga querida Naiara Laís Siqueira pela grande amizade e por estar presente em minha vida em todos os momentos, me oferecendo sempre seu conforto, amor e companheirismo.

Às minhas queridas amigas Gabriela Pap e Letícia Fernandes por sempre acreditar em mim, me incentivar, me inspirar e estar comigo em todos os momentos, agradeço a todo suporte emocional e profissional.

Às minhas queridas amigas, Ana Vitória Barban Margutti e Ana Carolina Bloemer, por acreditarem em mim e por todo apoio profissional, emocional e amizade ao longo desta caminhada.

À Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP pelo incentivo profissional e oportunidades de crescimento. À todos os alunos que vivenciaram esta etapa comigo, pelos desabafos e motivação para seguir em frente.

À companheira de trabalho e amiga, Profa. Dra. Telma Maria Braga Costa, pelo incentivo, confiança e amizade. Por me acompanhar durante toda esta jornada, me auxiliar e não medir esforços para possibilitar a execução deste trabalho, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Às amigas de trabalho Patrícia Fagnolli, Jussara Pavei Pizzolo, Beatriz Dias, Ana Paula Bento Lucca e ao meu amigo Alex Conrado, por toda amizade, apoio emocional e colaboração para execução deste trabalho.

Às amigas de trabalho Dra. Andresa de Toledo Triffoni Melo por todo apoio, incentivo e parceria. À Dra. Alessandra Pereira Junqueira por todo incentivo e conselhos e aos demais professores e funcionários que me acompanharam ao longo desta caminhada.

À todos que direto ou indiretamente dedicaram seu tempo para execução e realização deste trabalho.

“Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança. ”

Autor Desconhecido

RESUMO

ROMANO, Beatriz Coimbra. **Impacto metabólico e ósseo da dieta hiperproteica em ratas submetidas à restrição calórica**. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A restrição calórica e o aumento da ingestão proteica são frequentemente utilizados tanto para aprimoramento do perfil de composição corporal quanto para tratamento de comorbidades. Diante disso, este trabalho pretendeu analisar o impacto da dieta hipocalórica/hiperproteica sobre o tecido ósseo e a adiposidade da medula óssea em ratas. Foram utilizadas 30 ratas fêmeas da linhagem *Wistar Hannover*, com oito semanas de idade, divididas em três grupos (n=10): a) GC = recebeu dieta padrão AIN-93M *ad libitum*, b) GR30% = recebeu dieta de restrição calórica total de 30% e c) GRH40% = alimentadas com dieta de restrição calórica total de 30%, sendo hiperproteica em 40%/kg de dieta, durante oito semanas. A quantidade de dieta consumida (g) pelos dois grupos de restrição foi pareada pela do GC. Os animais foram pesados uma vez ao dia. As glicemias foram avaliadas nos períodos basal, 2^a, 5^a e 8^a semanas. Os tecidos adiposos brancos das áreas subcutânea (sTAB) e retroperitoneal (rTAB), bem como o marrom (TAM) e o fígado foram retirados e pesados (n=10/grupo). A tíbia direita foi utilizada para análise histomorfométrica (n=6/grupo). A tíbia esquerda foi utilizada para análise de densitometria óssea (n=6/grupo). A cultura de osteoclastos foi realizada a partir de lavado da medula óssea utilizando *pool* de células de fêmur (n=3/grupo) e outro considerando somente o fêmur (n=1/grupo). O grupo controle ganhou peso ao longo do experimento. Enquanto que o GR30% apresentou manutenção de peso e o GRH40% mostrou perda de peso corporal, porém os dois grupos de restrição apresentaram efeito final semelhante. Os grupos GR30% e GRH40% mostraram menores valores de tecidos adiposos branco (sTAB e rTAB) e fígado em relação ao GC. Somente o GRH40% apresentou queda significativa no peso do TAM. A partir da glicemia basal, o GC manteve sua glicemia estável ao longo das oito semanas e superior em relação aos outros grupos de restrição (GR30% e GRH40%), enquanto que os grupos GR30% e GRH40% apresentaram queda e diferenças significativas a partir da 2^o semana, porém apresentaram efeito final semelhante. A histomorfometria óssea mostrou significativo comprometimento ósseo dos grupos GR30% e GRH40%, traduzidos por menor volume ósseo, número de trabéculas e maior separação trabecular. O número de osteoblastos mostrou-se menor nos dois grupos de restrição, com diminuição acentuada significativa do grupo GRH40%. O número de osteoclastos mostrou-se diminuído somente no GR30% em relação ao GC. As análises de densitometria das tíbias mostraram que o GRH40% apresentou menor DMO proximal que o GC. A cultura de

osteoclastos mostrou que o GRH40% apresentou maior número de osteoclastos e a área de osteoclastos quando comparados aos grupos GC e GR30%. Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento do teor proteico em condições de restrição calórica não apresenta benefício metabólico, na composição corporal e esquelético, durante o intervalo de oito semanas. Os dados encorajam a realização de outros estudos para elucidar o papel do aumento de proteínas sobre o potencial osteoclastogênico de células progenitoras.

Palavras-chave: Dieta Rica em Proteínas. Restrição Calórica. Tecido Ósseo. Medula Óssea. Tecidos Adiposos. Osteoclastos.

ABSTRACT

ROMANO, Beatriz Coimbra. **Metabolic and bone impact of a high-protein diet in rats subjected to caloric restriction.** 2021. 81 f. Master's Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Caloric restriction and increased protein intake are often used both to improve the profile of body composition and to treat comorbidities. Therefore, this study aimed to analyze the impact of a low-calorie / high-protein diet on bone tissue and bone marrow adiposity in female rats. Thirty female Wistar Hannover rats, eight weeks old, were used, divided into three groups (n = 10): a) GC = received a standard diet AIN-93M ad libitum, b) GR30% = received a total calorie restriction diet of 30% and c) GRH40% = fed a total calorie restricted diet of 30%, being hyperproteic in 40% / kg of diet, for eight weeks. The amount of diet consumed (g) by the two restriction groups was matched by that of the CG. The animals were weighed once a day. Blood glucose levels were assessed at baseline, 2nd, 5th and 8th weeks. The white adipose tissues of the subcutaneous (sTAB) and retroperitoneal (rTAB) areas, as well as the brown (TAM) and the liver were removed and weighed (n=10/group). The right tibia was used for histomorphometric analysis (n = 6/group). The left tibia was used to analyse bone densitometry (n= 6/group). The osteoclast culture was performed from the bone marrow lavage using a pool of femur cells (n=3/group) and another considering only the femur (n= 1/group). The control group gained weight throughout the experiment. While the GR30% showed weight maintenance and the GRH40% showed loss of body weight, however the two restriction groups had a similar final effect. The groups GR30% and GRH40% showed lower values of white adipose tissues (sTAB and rTAB) and liver compared to the CG. Only the GRH40% showed a significant drop in the weight of TAM. From baseline glycemia, the CG maintained its glycemia stable over the eight weeks and higher in relation to the other restriction groups (GR30% and GRH40%), while the groups GR30% and GRH40% showed a significant decrease and differences from of the 2nd week, however they presented a similar final effect. Bone histomorphometry showed significant bone impairment in the GR30% and GRH40% groups, translated by lower bone volume, number of trabeculae and greater trabecular separation. The number of osteoblasts was lower in both restriction groups, with a significant decrease in the GRH40% group. The number of osteoclasts was shown to be reduced only in the GR30% compared to the CG. The analyzes of densitometry of the tibias showed that the GRH40% had a lower proximal BMD than the CG. The culture of osteoclasts showed that the GRH40% had a higher number of osteoclasts and the area of osteoclasts when compared to the CG and

GR30% groups. In conclusion, the results of the present study suggest that the increase in protein content in conditions of caloric restriction has no metabolic benefit, in body and skeletal composition, during the eight-week interval. The data encourage further studies to elucidate the role of protein increase in the osteoclastogenic potential of progenitor cells.

Keywords: High Protein Diet. Caloric restriction. Bone tissue. Bone Marrow. Adipose Tissues. Osteoclasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimentos realizados durante as oito semanas do período experimental.....	34
Figura 2 – Localização anatômica dos nichos de tecido adiposo branco, subcutâneo, retroperitoneal e tecido adiposo marrom em ratos.....	35
Figura 3 – Evolução do peso corporal (g) dos três grupos de animais (n=10/grupo) durante oito semanas do período experimental.....	41
Figura 4 – Variação de peso (g) dos três grupos de animais (n=10/grupo) durante oito semanas do período experimental.....	42
Figura 5 – Peso absoluto e relativo dos tecidos adiposos branco das áreas (A-A1) subcutâneo (sTAB); (B-B1) retroperitoneal (rTAB); (C-C1) tecido adiposo marrom (TAM) e (D-D1) fígado, dos três grupos experimentais (n=10/grupo).....	44
Figura 6 – Evolução dos parâmetros de glicemia dos três grupos de animais (n=10/grupo) nos períodos: basal, 2 ^a , 5 ^a e 8 ^a semana do período experimental.....	46
Figura 7 – Parâmetros histomorfométricos analisados (A) BV/TV: volume ósseo/volume total (%); (B) Tb.N: n° de trabéculas (n°/mm ²); (C) Tb.Sp: separação trabecular (µm); (D) Tb.Th: espessura trabecular (µm); (E) Nob/Tar: n° de osteoblastos (/mm, mm ²); (F) Noc/Tar: n° de osteoclastos (/mm, mm ²), nas tíbias diretas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).....	48
Figura 8 – Figuras representativas das lâminas de histomorfometria da medula óssea dos três grupos experimentais (n=1/grupo) demonstrando o osso trabecular e adipócitos: (A) GC; (B) GR30% e (C) GRH40% na resolução de 10x e 40x.....	49
Figura 9 – Parâmetros de (A) DMO Tíbia Proximal (g/cm ²); (B) DMO Tíbia Medial (g/cm ²); (C) CMO Tíbia Proximal (g); (D) CMO Tíbia Medial (g) das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).....	51
Figura 10 – Parâmetros de (A) comprimento (mm) e (B) peso (g) das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).....	52
Figura 11 – Primeira cultura de pré-osteoclastos derivados de macrófagos de <i>pool</i> de células da medula óssea do fêmur dos três grupos experimentais (n=3/grupo), cultivados com RANKL (50ng/mL) e M-CSF (30ng/mL). As figuras A-C representam osteoclastos de animais corados com TRAP, (D) representa o número de células TRAP positivas contendo mais de 3 núcleos contabilizados, (E) representa a área de osteoclastos.....	53
Figura 12 – Segunda cultura de pré-osteoclastos derivados de macrófagos de células da medula óssea do fêmur dos três grupos experimentais (n=1/grupo), cultivados com RANKL (50ng/mL) e M-CSF (30ng/mL). As figuras A-C representam osteoclastos de animais corados com TRAP, (D) representa o número de células TRAP positivas contendo mais de 3 núcleos contabilizados, (E) representa a área de osteoclastos.....	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição nutricional das dietas controle (AIN 93M), restrição calórica (30%) e restrição calórica (30%) hiperproteica (40%) (g/kg de dieta) oferecidas durante oito semanas do período experimental..... 32
- Tabela 2** – Análise bromatológica das dietas (C) controle AIN 93M, (R30%) restrição calórica de 30% e (RH40%) restrição calórica (30%) hiperproteica (40%) em comparação à composição nutricional apresentada pela empresa Prag.Soluções (P.S) (g/100g de dieta)..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AL	<i>Ad libitum</i>
AN	Anorexia nervosa
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCK	Colecistoquinina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CMO	Conteúdo mineral ósseo
DMO	Densidade mineral óssea
DV	Desvio padrão
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
Tb.Th	Espessura trabecular
FMRP	Faculdade de medicina de ribeirão preto
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TRACP5b	Fosfatase ácida resistente ao tartarato isoforma-5b
BSAP	Fosfatase alcalina específica do osso
GC	Grupo controle
GRH40%	Grupo hiperproteico
GR30%	Grupo restrição
HP	<i>High protein</i>
HC	Hospital das clínicas
IMC	Índice de massa corporal
DRI's	Ingestão dietética de referência
RDA	Ingestão dietética recomendada
IOM	<i>Institute of medicine</i>
ICB	Instituto de ciências biomédicas
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa b
IHLs	Lipídeos intra-hepáticos
LP	<i>Low protein</i>
mCT	Microtomografia computadorizada

NP	<i>Normal protein</i>
N.Ob/BS	Número de osteoblastos
Nob/Tar	Número de osteoblastos por milímetro de tecido
N.Oc/BS	Número de osteoclastos
Noc/Tar	Número de osteoclastos por milímetro de tecido
Tb.N	Número de trabéculas
OCN	Osteocalcina
PTH	Paratormônio
pH	Potencial hidrogeniônico
PUSP-RP	Prefeitura do campus usp de ribeirão preto
ROI	Região de interesse do objeto
RC	Restrição calórica
Tb.Sp	Separação de trabéculas
PBS	Solução de tampão de fosfato de salina
TAB	Tecido adiposo branco
eTAB	Tecido adiposo branco epididimal
rTAB	Tecido adiposo branco retroperitoneal
sTAB	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAMO	Tecido adiposo da medula óssea
TAMOc	Tecido adiposo da medula óssea constitutivo
TAMOr	Tecido adiposo da medula óssea regulado
TAM	Tecido adiposo marrom
TAV	Tecido adiposo visceral
CTX	Telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1
USP	Universidade de são Paulo
VET	Valor energético total
BV/TV	Volume ósseo
WP	<i>Whey protein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	Cálcio
PO ₄ ³⁻	Fosfato
P	Fósforo
g	Gramas
g/cm ²	Gramas por centímetro quadrado
g/kg	Gramas por quilograma
° C	Graus celsius
±	Mais ou menos
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/Dl	Miligramas por decilitro
Mm	Milímetro
/mm, mm ²	Milímetro / milímetro quadrado
ng/ml	Nanogramas por mililitro
n°/mm ²	Número/ milímetro quadrado
peso/100g de peso	Peso do tecido em 100g de peso total do animal
%	Porcentagem
Kcal	Quilocaloria
Kcal/kg	Quilocaloria / quilograma
Kg	Quilograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	TECIDO ÓSSEO	19
1.2	TECIDO ADIPOSEO DA MEDULA ÓSSEA	20
1.3	RELAÇÃO ENTRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO E O DA MEDULA ÓSSEA ..	21
1.4	INTERAÇÃO DOS NUTRIENTES NO TECIDO ÓSSEO	23
1.5	IMPACTO DA DIETA HIPERPROTEICA NO TECIDO ÓSSEO	26
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	31
4.2	IDENTIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO	35
4.3	GLICEMIA	36
4.4	HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA.....	36
4.5	DENSITOMETRIA ÓSSEA.....	38
4.6	CULTURA CELULAR DE OSTEOCLASTOS	39
4.6.1	Determinação do número de osteoclastos pela reação de TRAP	39
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	PESO CORPORAL.....	41
5.2	CONSUMO ALIMENTAR	42
5.3	TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO.....	43
5.4	GLICEMIA	45
5.5	HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA.....	47
5.6	DENSITOMETRIA ÓSSEA.....	50
5.7	CULTURA CELULAR DE OSTEOCLASTOS	52
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO	558
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A – Tabelas Suplementares	79
	ANEXO A – Aprovação pela Comissão Ética no Uso de Animais	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto humano e desempenha funções vitais para sobrevivência e adaptação ao meio ambiente, fornecendo proteção para órgãos vitais, suporte para os tecidos moles, sendo fundamental para sustentação corporal, mobilidade e realização de atividades motoras. Este tecido corresponde a um tipo especializado de tecido conjuntivo, distinguindo-se por seu material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012).

As principais células envolvidas no desenvolvimento e na manutenção do tecido ósseo são os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos. As primeiras são responsáveis pela síntese do componente orgânico da matriz, enquanto as segundas caracterizam-se por ser células móveis e multinucleadas, as quais são encarregadas de promover reabsorção tecidual. Na realidade, o tecido ósseo é o único tecido que conta com uma célula própria cuja função é fazer sua destruição. O terceiro tipo celular, o osteócito, corresponde a osteoblastos terminalmente diferenciados e que ficaram enclausurados no interior da matriz óssea durante o processo de mineralização. Estas últimas células têm papel crucial na regulação da atividade de remodelação agindo como sensor mecânico e bioquímico do tecido ósseo (MAROM et al., 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012).

Reabsorção e formação óssea são atividades celulares acopladas, as quais são agrupadas de forma sequencial no processo de remodelação óssea. Estas atividades são submetidas a controle fisiológico em diversos níveis e atendem a duas principais funções, renovação óssea e homeostase do cálcio (Ca). Frequentemente, a necessidade da estabilidade do cálcio circulatório é mantida em detrimento da manutenção da massa óssea. A remodelação óssea ocorre simultaneamente em diversos pontos do esqueleto, sendo que ao final de um ano cerca de 10% do esqueleto é completamente renovado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012; SINGH et al., 2012).

Durante a vida, a evolução da massa óssea é composta por fases distintas, sendo as primeiras três décadas a de aquisição óssea, até que se atinge o pico de massa óssea. Esta fase tem papel crucial na determinação da futura saúde óssea (BONJOUR et al., 2007). Dados epidemiológicos sugerem que um aumento de 10% no pico de massa óssea pode levar a diminuição do risco de fratura em mulheres após a menopausa em até 50% (WHO, 1994; MARSHALL; JOHNELL; WEDEL, 1996). Após o pico de massa óssea ser alcançado, as

próximas duas décadas correspondem a um período de relativa estabilidade, quando então passa a ocorrer um declínio persistente de quantidade e qualidade óssea (BAILEY, 1997). Existe grande interesse na investigação dos fatores que favorecem o ganho de massa óssea na primeira fase, a estabilidade na segunda, assim como os que podem reduzir a taxa de perda óssea durante o envelhecimento (BONJOUR et al., 2007).

Um aspecto que chama atenção é a influência do estado nutricional e do metabolismo energético sobre o metabolismo ósseo. Inicialmente, considerado um tecido pouco dinâmico, com atividade metabólica restrita, e função limitada à atividade mecânica e metabolismo mineral, o tecido ósseo na realidade está também integrado a todo organismo na modulação do sistema energético. Atualmente, a percepção sobre o funcionamento do sistema endócrino mudou significativamente, tendo em vista que diversas evidências mostram que a produção hormonal não se restringe às clássicas glândulas endócrinas. Os tecidos mesenquimais (adiposo, muscular e ósseo) estão interligados por uma rede de interação mútua, compondo o complexo sistema de regulação do metabolismo energético (DE PAULA; ROSEN, 2013).

Neste contexto, vários fatores de interação entre os tecidos ósseo e adiposo passaram a ser recentemente reconhecidos, podendo interagir diretamente na modulação ou indiretamente por meio do sistema nervoso central. Desta forma, passou a existir um crescente interesse na investigação do papel do tecido adiposo, bem como, a influência do estado nutricional e do consumo de nutrientes sobre o tecido ósseo (DE PAULA; ROSEN, 2018).

1.2 TECIDO ADIPOSE DA MEDULA ÓSSEA

Além das variadas funções do tecido ósseo, este também é responsável pelo alojamento e proteção da medula óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012). A medula óssea abriga um rico conjunto de células pluripotenciais, incluindo células de linhagem mesenquimal e hematopoiéticas (HARDOUIN; PANSINI; CORTET, 2014).

A medula óssea é um tecido dinâmico que apresenta mudança contínua durante a vida e de acordo com a necessidade de hematopoese. A medula óssea se diferencia entre medula óssea vermelha e amarela. A medula vermelha recebe esse nome por ser rica em hemácias e apresentar adipócitos distribuídos de forma a dividir espaço e caracteristicamente é rica em sinusóides vasculares. Ela está presente nos corpos vertebrais, nos ossos chatos do crânio, esterno, escápula, costelas e bacia, bem como nas extremidades dos ossos longos. A medula amarela é basicamente composta por adipócitos, é pobremente vascularizada e está presente primariamente no esqueleto apendicular caracterizado pelos membros superiores e inferiores.

Diferenças funcionais entre a medula óssea vermelha e amarela foram descritas anteriormente, mas só recentemente elas passaram a ser consideradas no contexto de sua interação com a remodelação óssea e o metabolismo energético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012). Scheller et al. (2015) sugeriram uma caracterização didática, denominando a medula amarela como TAMO constitutiva (TAMOc) e o tecido adiposo da medula vermelha de regulada (TAMOr). A primeira se desenvolve rapidamente após o nascimento e tem pouca resposta adaptativa aos estímulos fisiológicos, esta capacidade seria encontrada no TAMOr. Esta última varia de acordo com estímulos nutricionais ou mesmo em resposta à variação de temperatura.

Estudos mostram que algumas condições fisiológicas ou mesmo doenças podem prejudicar o desenvolvimento de massa óssea, acelerando a expansão do TAMO e limitando o ganho de massa óssea (ECKLUND et al., 2017). Adipócitos da medula óssea e osteoblastos compartilham origem comum a partir de uma mesma célula, a célula tronco estromal da medula óssea. Possivelmente, a diferenciação da célula progenitora em um tipo celular ocorra em detrimento da outra. Em diversas situações isto se aplica, por exemplo, no envelhecimento (DE PAULA; ROSEN, 2018; DE PAULA; ROSEN, 2020) e no uso crônico de glicocorticoide (VANDE BERG et al., 1999). No entanto, existem situações em que o aumento de massa óssea se concilia com o de TAMO, uma vez que, a substituição da medula óssea vermelha pela amarela inicia-se precocemente após o nascimento e persiste ao longo da vida, incluindo a fase de crescimento (EMERY; FOLLETT, 1964). Além disto, diversos estudos indicam que indivíduos do sexo masculino apresentam maior quantidade de TAMO que do sexo feminino (DUDA et al., 1995) e os corpos vertebrais inferiores apresentam maior massa óssea e TAMO que os superiores (SCHELLER et al., 2015). Portanto, é possível que o TAMO possa influenciar de forma positiva ou negativa a remodelação óssea a depender da circunstância (DE PAULA; ROSEN, 2018). Outro aspecto que tem despertado interesse é a participação do TAMO no controle do metabolismo energético. A quantidade de TAMO não é desprezível e em geral corresponde a cerca de 10% do conteúdo de tecido adiposo corporal, mas pode em situações de restrição calórica corresponder a 32% (CAWTHORN et al., 2014; DE PAULA; ROSEN, 2018; SCHELLER; ROSEN, 2014).

1.3 RELAÇÃO ENTRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO E O DA MEDULA ÓSSEA

O tecido adiposo é caracteristicamente um tecido heterogêneo e de grande plasticidade funcional. Primariamente ligado ao armazenamento de gordura, na realidade o tecido adiposo

possui rica atividade endócrina produzindo uma variedade significativa de peptídeos, os quais atuam nos mais diversos órgãos e sistemas do organismo. Adicionalmente, sua atividade endócrina varia na medida em que a célula adiposa se enche de lipídios, passando a apresentar um perfil inflamatório de secreção. Não existe questionamento que o tecido adiposo pode circunstancialmente ser gerador de saúde ou de doença. Embora apresente grande capacidade de armazenamento de lipídios, esta capacidade não é ilimitada; uma vez atingido o limite há liberação e deposição ectópica de lipídios (LEE; MOTTILLO; GRANNEMAN, 2014; DE PAULA; ROSEN, 2018). O acúmulo ectópico de gordura gera inflamação, distúrbio funcional e desestruturação tecidual. Esta ocorrência em músculo, fígado e pâncreas é geradora de resistência insulínica, esteatohepatite não alcoólica e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (DE PAULA; ROSEN, 2018; PETERSEN et al., 2002; SAMUEL; SHULMAN, 2016).

A relação entre consumo de nutrientes e o tecido adiposo da medula óssea ainda é pouco conhecida, entretanto, os dados existentes indicam considerável diferença na resposta adaptativa do TAMO à variação no consumo de alimentos. Em particular, estudos experimentais e clínicos mostram que, diferentemente do tecido adiposo branco (TAB), o TAMO expande em situação de restrição alimentar (DEVLIN et al., 2010; ROMERO et al., 2009).

A anorexia nervosa (AN) é um transtorno psiquiátrico que ocorre autoimposição de jejum e, conseqüentemente, perda significativa de peso e depleção grave de gordura corporal (MISRA et al., 2003). Paradoxalmente, estudos mostram que mulheres com AN apresentaram aumento de TAMO (BREDELLA et al., 2009). Em estudo realizado com 70 adolescentes com AN foi investigado a associação entre o TAMO e marcadores de gravidade da doença. Os dados revelaram que o TAMO mostra relação inversa com o índice de massa corporal (IMC) e densidade mineral óssea (DMO) (ECKLUND et al., 2017).

Da mesma forma, a restrição calórica em animais provocou o mesmo padrão de alteração, ou seja, redução de TAB e aumento de TAMO. Ainda, os autores sugeriram que as alterações de TAMO e massa óssea podem estar relacionadas à redução dos níveis de leptina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) (DEVLIN et al., 2010). Estudos com indivíduos saudáveis de ambos os sexos mostram uma relação negativa entre a massa óssea e a TAMO da coluna lombar (DE PAULA; ROSEN, 2018).

Enquanto se observa resposta paradoxal de aumento de TAMO, tanto em roedores como no ser humano em condições de restrição calórica, a resposta à exposição de excesso de energia parece ser diferente na investigação experimental e clínica. Camundongos submetidos à dieta rica em gordura apresentaram aumento de TAMO (DOUCETTE et al., 2015). Enquanto isso,

diversos estudos clínicos não mostraram relação entre peso e tecido adiposo com TAMO em indivíduos normais, obesos e com diabetes *mellitus* tipo 2 (DE ARAÚJO et al., 2017; DE PAULA et al., 2015; LIMA et al., 2017).

Outro ponto que realça diferença no comportamento entre TAMO e TAB é o padrão de recuperação do estado de desnutrição ou o suporte nutricional em pacientes desnutridos. Mulheres jovens recuperadas de AN apresentam menor quantidade de TAMO que as com doença ativa (FAZELI et al., 2012).

Em um estudo recente, foi descrito que indivíduos desnutridos devido à síndrome de intestino curto, mas em tratamento com nutrição parenteral, não apresentam expansão de TAMO como observada em mulheres com AN ativa (PARREIRAS E SILVA et al., 2018). Diferentemente, dos indivíduos com AN ativa que rejeitam a terapêutica alimentar, pacientes com síndrome do intestino curto tem no tratamento nutricional a base de sua recuperação clínica. Estes resultados permitem fazer a hipótese que o tratamento nutricional em desnutridos serve para mitigar a perda e/ou recompor o TAB, mas tem efeito limitador de expansão de TAMO no desnutrido. Adicionalmente, este estudo mostrou que indivíduos controle apresentam a clássica correlação significativa e negativa entre massa óssea e TAMO. Ao contrário, no grupo com síndrome do intestino curto se observa relação positiva entre estes dois parâmetros, embora sem significância estatística (PARREIRAS E SILVA et al., 2018). Este aspecto sugere que o TAMO potencialmente pode ter efeito positivo ou negativo sobre a massa óssea e que o acesso a nutrientes pode mudar a relação entre TAMO e tecido ósseo em desnutridos. Estas considerações reforçam a crescente ligação fisiológica entre o osso e a gordura (GIMBLE et al., 2006).

1.4 INTERAÇÃO DOS NUTRIENTES NO TECIDO ÓSSEO

A nutrição é um fator importante e modificável para o desenvolvimento e manutenção da massa óssea. Existe farta literatura sobre a importância de cálcio, fósforo (P) e da vitamina D neste processo. Em relação a outros nutrientes os dados são mais escassos e muitas vezes contraditórios. A homeostase óssea pode ter influência do consumo de nutrientes por diversos meios, como a variedade alimentar, aumento da ingestão, déficit calórico, ganho ou perda de peso e mudanças na composição corpórea (MORAIS; BURGOS, 2007).

Diante do cenário de pandemia global de obesidade e suas comorbidades, o desenvolvimento de estratégias para perda e prevenção do ganho de peso tem sido estimulado de maneira crescente, com ampla divulgação tanto pelo meio científico quanto pela mídia leiga

(WHO, 2000). A restrição calórica (RC) e modificações na composição da dieta são amplamente testadas na busca de eficiência de indução de perda de peso, mas também com o objetivo de prevenir complicações ligadas à obesidade (GOLBIDI et al., 2017).

A restrição dietética é caracterizada pela diminuição da ingestão particular ou global de nutrientes sem causar desnutrição. A RC consiste em uma intervenção alimentar por meio da redução de 20 a 40% da ingestão de alimentos em comparação com a necessidade diária de calorias. A diminuição do número de calorias pode ser realizada por diferentes maneiras como pela redução do valor calórico total da dieta ou modulações de nutrientes específicos que fornecem energia como carboidratos, lipídios e proteínas. Alternativamente, pode-se estimar a redução em gramas de uma dieta normocalórica com base no consumo de um grupo considerado padrão, em casos de estudos experimentais (LEE; LONGO, 2016; MAIR; DILLIN, 2008).

Diversos estudos têm mostrado que a RC, a longo prazo, promove benefícios metabólicos para saúde e aumento da longevidade (GOLBIDI et al., 2017; ROTH et al., 2002). A redução de peso melhora a sensibilidade à insulina (HEILBRONN et al., 2006), previne diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (LANE; INGRAM; ROTH, 1999) e câncer (HURSTING et al., 2001).

A variação na composição da dieta também tem despertado interesse no sentido de aprimorar a perda de peso e a prevenção de doenças. O aumento no consumo de proteínas vem sendo associado positivamente com a melhora da saúde de maneira geral, sendo mais eficaz na redução e manutenção do peso devido à maior saciedade e melhora da composição corporal (CLIFTON, 2012; WESTERTERP-PLANTENGA; LEMMENS; WESTERTERP, 2012). Considerando o efeito positivo proposto de dietas ricas em proteínas, é importante levar em consideração que a energia dos macronutrientes pode ser perdida em diferentes extensões pelo calor gerado em seu processamento. O efeito térmico dos nutrientes representa o custo energético de absorção, processamento e armazenamento de nutrientes para síntese de compostos como triglicérides, glicogênio e proteínas. Considerando os efeitos térmicos estabelecidos de lipídios e carboidratos dentro da faixa de 2-3% e 6-8%, respectivamente, a proteína possui alta capacidade termogênica relatado entre 25-30%, alta hierarquia de oxidação e capacidade de saciedade, podendo favorecer maior gasto de energia e influenciando maior perda de peso frente ao gasto de metabolização dos demais nutrientes (JÉQUIER, 2002).

A principal recomendação dietética para o bom funcionamento do organismo é manter uma dieta saudável e equilibrada que contemple todos os nutrientes de acordo com as recomendações nutricionais individuais. A recomendação diária para proporção de energia proveniente de macronutrientes de acordo com a ingestão dietética de referência (DRI's) é de

45 a 65% de carboidratos, 20 a 35% de lipídios e 10 a 35% de proteínas. Em relação ao consumo em gramas, a ingestão dietética recomendada (RDA) para carboidratos é de 130g/dia para adultos e crianças, fibra total de 38g/dia (homens) e 25g/dia mulheres e 0,8g/kg de proteína para adultos levemente ativos ou sedentários (IOM, 2005), no caso de atletas o consumo é estabelecido na faixa de 1,2 a 2,0 g/kg/dia para atender a maior demanda energética (JÄGER et al., 2017). Não há definição de necessidades diárias em gramas de gordura devido à grande variação da porcentagem de energia consumida deste nutriente (IOM, 2005).

A ingestão adequada de nutrientes influencia nos processos de remodelação e densidade mineral óssea, promovendo a redução no risco de fraturas. Um dos principais papéis metabólicos do tecido ósseo é o armazenamento de minerais, como cálcio (Ca), fosfato (PO_4^{3-}) e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, a fim de manter constante a concentração destes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KARSENTY; FERRON, 2012).

O peso corporal também é um fator nutricional determinante para o desenvolvimento e manutenção da massa óssea. Diversos estudos têm demonstrado associação positiva entre o peso corporal e a massa óssea. Por exemplo, Reid (2010) observou que em mulheres na pós-menopausa, tanto o peso quanto o IMC apresentaram uma correlação positiva com a massa óssea do fêmur proximal e por muitos anos a obesidade foi vista como fator de proteção para fratura o que não foi confirmado por estudos prospectivos (COMPSTON et al., 2011; PREMAOR et al., 2010). Enquanto isto, é bem reconhecido que valores baixos de IMC conferem maior risco de fratura, independentemente do sexo (DE LAET et al., 2005). Ainda, a perda de peso rápida e acentuada, como a que ocorre após cirurgia bariátrica, provoca perda de massa óssea (YU, E.W, 2014).

Nesta linha de investigação dois aspectos são relevantes, como o papel dos nutrientes e a relação especial entre o tecido adiposo e ósseo, sendo que este último abriga o seu próprio tecido adiposo, o TAMO. Antes considerado um tecido inerte que teria apenas função de preenchimento de espaço na medida em que a necessidade de hematopoese reduzia, o TAMO possivelmente tem influência não só local sobre as células óssea, mas possivelmente na regulação metabólica (DE PAULA; ROSEN, 2013; HARDOUIN; PANSINI; CORTET, 2014).

Sabe-se hoje que o TAMO se adapta de forma diversa do tecido adiposo quanto à variação na oferta de nutrientes, em particular ocorre expansão em condições de restrição calórica. Em paralelo à expansão de TAMO ocorre perda de massa, existindo correlação negativa entre massa óssea e TAMO (DEVLIN et al., 2010; ECKLUND et al., 2010). Por outro lado, indivíduos desnutridos com síndrome do intestino curto, submetidos a nutrição parenteral

apresentam inibição da expansão de TAMO (PARREIRAS E SILVA et al., 2018). Portanto, a oferta de nutrientes tem grande importância na regulação da adipogênese da medula óssea, no entanto existem poucos dados sobre a influência da variação na oferta de nutrientes sobre o TAMO, em particular do efeito das proteínas. A seguir estes aspectos serão especificamente discutidos (DE PAULA; ROSEN, 2013).

1.5 IMPACTO DA DIETA HIPERPROTEICA NO TECIDO ÓSSEO

O consumo adequado dos nutrientes pode prevenir ou reduzir a incidência de doenças ósseas. A aquisição de massa óssea depende de múltiplos fatores, como genético, atividade física, hormonal e nutricional. No entanto, também é necessária uma ingestão suficiente de macronutrientes, como carboidratos, proteínas e lipídeos, para uma melhor formação esquelética (GREER; KREBS; COMMITTEE ON NUTRITION, 2006).

A dieta que ultrapassa a recomendação de ingestão de proteínas é caracterizada como dieta hiperproteica, esta é amplamente utilizada para estimular a perda, manutenção de peso, hipertrofia muscular e recuperação pós-exercício. Entretanto, este tipo de dieta vem ganhando destaque em propagandas pela imprensa leiga como facilitadora de perda de peso, em curto período de tempo, contribuindo para a divulgação de conceitos errôneos a respeito da saúde em busca de melhor aparência física e corpo saudável. Muitas vezes essas dietas apresentam inadequações de nutrientes, promovendo alterações metabólicas que podem comprometer o estado nutricional e a saúde dos indivíduos em muitos aspectos (FARIA; SOUZA, 2017).

A fonte de proteína pode ser encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, como leites, queijos, iogurtes, carnes, ovos, feijões, leguminosas e oleaginosas. De acordo com pirâmide alimentar brasileira, para os alimentos proteicos denominados construtores, orienta-se o consumo de três porções diárias de leites e derivados, uma porção de carne e ovos e uma porção de leguminosas (PHILIPPI et al., 1999). A recomendação de ingestão de proteína alimentar diária pode ser facilmente atingida em uma dieta variada. Levando em consideração o valor de 0,8g/kg de peso recomendado, um indivíduo de 70 kg deve consumir 56g de proteína no seu dia (PHILIPPI et al., 1999).

O consumo excessivo de proteína, bem como, de qualquer outro nutriente, pode desencadear alterações metabólicas e afetar a saúde, inclusive óssea e renal (RYLANDER et al., 2006). Isso porque as proteínas de origem animal são ricas em aminoácidos sulfurados que produzem íons de amônia, estes promovem a redução do pH sanguíneo induzindo a acidose metabólica de baixo grau, levando a hipercalcúria. Os mecanismos envolvidos neste

processo incluem diminuição da reabsorção tubular renal de cálcio e perda de carbonato e citrato de cálcio ósseo. Neste caso, o esqueleto auxilia no processo de tamponamento, neutralizando o excesso de ácidos. Este processo se dá por aumento de reabsorção óssea e dissolução direta físico-química do osso (CAO, 2017; MORAIS; BURGOS, 2007; RYLANDER et al., 2006).

Muitos estudos apresentam aspectos controversos sobre a influência do alto teor proteico no metabolismo do cálcio e o equilíbrio ósseo (CAO; JOHNSON; HUNT, 2011). De um lado, existe relato que o consumo excessivo de proteínas possa provocar aumento na reabsorção, levando à perda de massa óssea (ANDERSON; METZ, 1995; METZ; ANDERSON; GALLAGHER, 1993). Esta possibilidade contrasta com estudos epidemiológicos mostrando relação positiva significativa entre a ingestão de proteína e a densidade óssea (HANNAN et al., 2000). Diversos estudos sugerem que a proteína dietética é um nutriente essencial para a saúde óssea durante todas as fases da vida, promovendo desenvolvimento ou manutenção da massa óssea, respectivamente, em crianças e adultos (BONJOUR, 2005).

Diversas evidências fortalecem a hipótese do papel benéfico da dieta hiperproteica sobre o osso, entre as quais o aumento de IGF-1 (DAWSON-HUGHES et al., 2004), aumento da absorção intestinal de cálcio (KERSTETTER et al., 2005; HUNT; JOHNSON; FARIBA ROUGHHEAD, 2009), redução de paratormônio (PTH) (CEGLIA et al., 2009; KERSTETTER et al., 1997) e melhora da performance muscular (WOLFE, 2006).

Estudos em que se avaliou a absorção intestinal de cálcio revelaram que há uma maior absorção e aproveitamento de cálcio por indivíduos que consomem dietas ricas em proteínas (ROUGHHEAD et al., 2003). Inclusive, esta ocorrência foi especialmente observada quando o conteúdo de cálcio da dieta é menor (SAHNI et al., 2010). Um ensaio clínico controlado randomizado, que contou com 82 pacientes com fratura de quadril aguda, avaliou o efeito da suplementação de 20g de proteínas (cinco dias da semana, durante seis meses). Todos receberam suplementação de cálcio (550 mg / dia) e uma dose de vitamina D, (200.000 UI). Os autores observaram que o grupo tratado com suplemento proteico apresentou maiores taxas de IGF1 circulante, um fator de crescimento anabólico para osso e músculo. Além disso, este mesmo grupo mostrou atenuação da perda óssea da região proximal do fêmur. Estes dados sugerem que o aumento do consumo de proteína pode trazer benefícios na recuperação óssea após fratura (SCHÜRCH et al., 1998). É importante observar também as possíveis interações entre a ingestão de proteína e os vários componentes da dieta, especificamente, dietas que contrabalançam a carga de ácida devido a ingestão de proteína dietética. Em estudo metabólico

realizado, mostrou-se que o aumento da ingestão de proteína aumentou de maneira significativa a concentração sérica média de IGF-I, como esperado, entretanto, este aumento do IGF-I tornou-se maior com a coadministração do agente alcalinizante bicarbonato de potássio do que com placebo, promovendo atenuação do aumento da excreção urinária de nitrogênio induzido por dietas com alto teor de proteínas (CEGLIA et al., 2009; DAWSON-HUGHES, 2017). Esses dados sugerem que a proteína possa ser mais anabólica em indivíduos com dietas que possuam um amplo conteúdo de frutas e legumes, que possuem efeitos neutralizantes, do que em dietas com baixo teor de frutas e vegetais, mas essa hipótese ainda precisa ser mais investigada (DAWSON-HUGHES, 2017).

Na mesma linha, estudos pré-clínicos têm mostrado que o consumo de uma dieta com baixo teor proteico promove alterações na geometria e microestrutura óssea que resultam na diminuição da massa e resistência óssea (BOURRIN et al., 2000). Ammann et al. (2015) investigaram a influência de dietas isocalóricas, com baixa proteína (LP: caseína 2,5%) e proteína normal (NP: caseína 15%), na resposta anabólica óssea ao PTH intermitente em ratas de seis meses de idade tratadas com 5- ou 40- $\mu\text{g/kg}$ de PTH humano recombinante fragmento aminoterminal 1-34, diariamente, ou com veículo por 4 semanas. Ammann et al. (2015) observaram que os efeitos anabólicos ósseos do PTH- (1–34) foram atenuados em ratos alimentados com dieta LP quando comparado aos observados no grupo alimentado com dieta NP. Esses resultados indicam a importância de uma ingestão proteica adequada para que se obtenha resposta adequada ao tratamento com PTH (1-34).

Os estudos acima demonstram a importância do perfil alimentar para a saúde óssea e a complexidade da definição do papel de um nutriente único, como a proteína, no contexto de variação dos outros componentes da dieta. Nesta linha de investigação, procura-se compreender o papel que uma dieta hiperproteica pode exercer sobre a qualidade óssea e adipogênese da medula óssea. Em particular quanto ao potencial influenciador do conteúdo proteico em condições de restrição de calorias totais da dieta (DE PAULA; ROSEN, 2013; KERSTETTER; KENNY; INSOGNA, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A restrição calórica é frequentemente utilizada na prática clínica não só por profissionais da saúde para tratamento de doenças metabólicas como também por leigos que buscam mudanças no seu padrão de composição corporal. Não raramente o aumento do consumo de proteínas é utilizado empiricamente para se alcançar mais rapidamente estes objetivos. Porém é importante levar em consideração que a perda de peso compromete a massa óssea e que não existem dados na literatura, se, nestas condições, a elevação do consumo de proteína promove melhora metabólica e óssea. Assim, o presente estudo pretendeu avaliar se o aumento do teor proteico é capaz de modificar a influência metabólica, o padrão de mudança de composição corporal e óssea em condições de restrição calórica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o impacto da dieta hipocalórica/hiperproteica sobre o tecido ósseo e a adiposidade da medula óssea em ratas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o impacto da dieta hipocalórica/hiperproteica sobre:

A composição corporal e glicemia.

A densidade mineral óssea.

A microestrutura óssea, a atividade de remodelação óssea e adiposidade da medula óssea por meio de histomorfometria óssea.

O potencial de osteoclastogênese de células tronco hematopoiéticas da medula óssea.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto/SP – Brasil, parecer nº 83/2018 (ANEXO A). A pesquisa trata-se de um estudo pré-clínico prospectivo em animais.

Foram utilizadas 30 ratas fêmeas da linhagem *Wistar Hannover* ao longo de todo o projeto de pesquisa, com idade de oito semanas, sendo classificadas como adultos jovens. Os animais foram alojados em uma sala do Biotério do Departamento de Clínica Médica, em caixas plásticas individuais (30 x 20 x 13cm) com maravalha (serragem seca), sob condições controladas de umidade e temperatura ambiente ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e com um ciclo de iluminação artificial de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas: 6h00min e apagadas às 18h00min). O experimento foi realizado de acordo com diretrizes internacionais, conforme recomendado no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

O presente estudo investigou os efeitos de duas dietas com restrição calórica, sendo a primeira com restrição calórica total de 30% e a segunda com a mesma porcentagem de restrição calórica total com aumento do conteúdo proteico em 40% do peso da dieta. A intervenção dietética teve duração total de oito semanas. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos, composto por dez animais, onde cada grupo recebeu uma dieta com composição nutricional diferente, em formato de pellets e acesso *ad libitum* (à vontade) à água da torneira, como descrito a seguir:

- **Grupo controle (GC)** – Composto por dez ratas que receberam dieta padrão (AIN-93M, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil), *ad libitum* no período de oito semanas.

- **Grupo restrição (GR30%)** - Composto por dez ratas que receberam dieta com conteúdo calórico reduzido em 30% (AIN-93M mod. 30% de restrição kcal, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil) no período de oito semanas.

- **Grupo hiperproteico (GRH40%)** - Composto por dez ratas que receberam dieta padrão com restrição calórica de 30% e aumento do conteúdo proteico em 40% (AIN-93M Mod 30% de restrição kcal + 40% de proteína p/p, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil) no período de oito semanas. As composições nutricionais das três dietas oferecidas durante o período experimental estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas controle (AIN 93M), restrição calórica (30%) e restrição calórica (30%) hiperproteica (40%) (g/kg de dieta) oferecidas durante oito semanas do período experimental.

Nutrientes	Dieta Controle AIN 93M	Dieta Restrição Calórica (30%)	Dieta Restrição Calórica Hiperproteica (40%)
Amido de milho (g/kg)	465,7	295,1	68,0
Caseína (g/kg)	140,0	140,0	460,0
Amido dextrinizado (g/kg)	155,0	92,4	49,2
Sacarose (g/kg)	100,0	67,0	34,6
Óleo de soja (g/kg)	40,0	30,0	20,0
Celulose microcristalina (g/kg)	50,0	326,2	313,7
Mix mineral AIN 93 (g/kg)	35,0	35,0	35,0
Mix vit AIN 93 (g/kg)	10,0	10,0	10,0
L-cistina (g/kg)	1,8	1,8	7,0
Bitartarato de colina (g/kg)	2,5	2,5	2,5
BHT (g/kg)	0,008	0,008	0,008
Kcal/kg	3850	2695	2695
g Carboidratos (g/kg)	730,7	464,50	161,8
g Lipídios (g/kg)	40	30	20
g Proteína (g/kg)	141,8	141,8	467
% Kcal Carboidratos (g/kg)	75,9	68,9	24,0
% Kcal Lipídios (g/kg)	9,4	10,0	6,7
% Kcal Proteína (g/kg)	14,7	21,1	69,3

Abreviaturas: g = gramas, kg = quilogramas; BHT = Butil-hidroxi-tolueno; % = porcentagem.

Fonte: Pragsoluções - Jaú/SP.

No planejamento da restrição calórica, as duas dietas hipocalóricas tiveram suas composições modificadas tendo como base o valor calórico total da dieta AIN-93M de 3850 kcal/kg de dieta. Assim, as duas dietas de restrição ficaram isocalóricas, apresentando 2695 kcal/kg de dieta, o que corresponde a 30% de restrição calórica em relação à dieta AIN-93M. Os dois grupos que fizeram restrição calórica tiveram oferta de dieta controlada. Diariamente, a quantidade de dieta que foi oferecida aos grupos GR30% e GRH40% foi calculada a partir da diferença de peso entre a dieta oferecida e resíduo após 24 horas do consumo do GC.

A taxa de proteínas recomendada para ratos na fase de manutenção é de 14% (140g de caseína/kg de dieta) e 1,8g de L-cistina/kg de dieta (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Esta taxa foi a utilizada na dieta dos grupos GC e GR30%. Enquanto que a dieta do grupo GRH40% foi ajustada para 47% de proteína, sendo utilizada a caseína como fonte proteica. Porém a caseína corresponde a cerca de 85% de proteína bruta, sendo assim, a taxa de 47% representa 400g de proteína/kg da dieta, correspondendo ao aumento de 40% de proteína por kg da dieta no GRH40%.

Em relação aos componentes da dieta como mix mineral, mix vitamínico, bitartarato de colina e BHT (Butil-hidroxi-tolueno) foram mantidos em quantidades iguais entre as três dietas experimentais.

A fim de avaliar a composição nutricional das dietas oferecidas aos grupos experimentais, foi realizado a análise bromatológica dos três tipos de dietas, por meio da

determinação de umidade pelo método de secagem direta em estufa à 105°C (IAL, 2008); cinzas pelo método de resíduo por incineração em forno mufla à 550°C (AOAC, 1996); proteínas totais pelo método de Micro-Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006); lipídios totais pelo método de Bligh-Dyer (BLIGH; DYER, 1959). A determinação de carboidratos e fibras totais foi determinada por diferença entre percentual total (100) e a somatória dos percentuais das análises anteriores (umidade, cinzas, proteínas e lipídios totais) (IAL, 2008).

O experimento foi dividido em três momentos. No primeiro, realizado de janeiro à março de 2019, foram utilizados nove animais, sendo três animais de cada grupo. No segundo momento, realizado de abril a maio de 2019, também foram utilizados nove animais, sendo três animais de cada grupo. No último, realizado de junho a agosto de 2019 foram utilizados 12 animais, sendo quatro animais de cada grupo, totalizando o número de 30 animais como proposto no protocolo experimental, mantendo a intervenção dietética de oito semanas em cada grupo.

O primeiro grupo de animais foi obtido junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, com sete semanas de idade, peso médio aproximado de $161 \pm 5,58$ g. Após o período de adaptação, no qual todos os animais receberam o mesmo tipo de dieta controle (AIN-93M, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil), o procedimento experimental foi iniciado quando os animais apresentaram peso corporal entre 180 a 200g, com cerca de oito semanas de idade. O segundo e terceiro grupos de animais foram obtidos junto ao Serviço de Biotério da PUSP-RP, Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto com sete semanas de idade e peso médio de aproximadamente 158g ($\pm 10,43$) no segundo grupo e 147g ($\pm 9,55$) no terceiro grupo. Após o período de adaptação, o procedimento experimental foi iniciado quando os animais se aproximaram do peso de 180 a 200g com cerca de oito semanas de idade.

As condições clínicas dos animais foram avaliadas diariamente, com aferição de peso, troca de água e oferta diária de dieta, no período da manhã. No período basal (1ª semana) e na 2ª, 5ª e 8ª semana de experimento foi realizada a aferição de glicemia dos animais, por meio da coleta de gotículas de sangue da cauda dos animais e verificação em tiras teste de aparelho monitor de glicemia (Accu-Chek® Performa, Roche, Jaguaré, SP, Brasil). Duas doses de tetraciclina (oxitetraciclina (di-hidratada), Terramicina®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Guarulhos, SP, Brasil) foram aplicadas sete e dois dias antes da morte de todos os animais, com o objetivo de marcar a frente de mineralização óssea em exame de histomorfometria. A dose, em cada aplicação intraperitoneal, foi de 20 mg/kg de peso corporal.

Após a oitava semana, os animais foram mortos pelo método de decapitação, utilizando uma guilhotina. Subsequentemente, foi realizada a coleta do sangue, sendo os tubos de coletas mantidos em resfriamento até a centrifugação, em centrífuga refrigerada. O soro foi separado e as alíquotas foram armazenadas a -70°C para futuras determinações bioquímicas. O tecido adiposo branco das áreas retroperitoneal e subcutâneo, tecido adiposo marrom e fígado foram retirados e pesados em balança de precisão. Por fim, foram retirados e armazenados os fêmures e tíbias (direita e esquerda) de todos os animais.

Os fêmures esquerdos e as tíbias direitas foram removidas com músculo e imersas em tubo falcon contendo álcool 70%, e mantido em refrigerador até o dia de sua utilização. Os fêmures esquerdos foram reservados para futura realização da análise de microtomografia computadorizada (mCT), as tíbias direitas foram utilizadas para análise de histomorfometria óssea.

As tíbias esquerdas foram removidas e limpas das partes moles, envolvidas em gazes com soro fisiológico e posteriormente refrigeradas a 10°C para análise de densitometria óssea. Os fêmures direitos de três animais de cada grupo, foram assepticamente removidos e imediatamente utilizados para realização de cultura celular e diferenciação de osteoclastos. Em um primeiro ensaio a cultura foi realizada após formação de um *pool* de células provenientes dos três fêmures direitos dos animais de cada grupo. O segundo ensaio foi realizado utilizando apenas um fêmur direito de cada grupo.

Todos os procedimentos realizados durante as oito semanas e após o período de experimento estão descritos na Figura 1:

Figura 1 – Procedimentos realizados durante as oito semanas do período experimental.

Abreviaturas: S = semana

Fonte: próprio autor.

4.2 IDENTIFICAÇÃO E MENSURAÇÃO DE TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO

A mensuração do tecido adiposo dos animais foi realizada no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, por meio de coleta de tecido adiposo branco (TAB) das áreas subcutânea (sTAB) e retroperitoneal (rTAB), tecido adiposo marrom (TAM) e o fígado dos 10 animais de cada grupo. Estes tecidos foram dissecados, retirados e sua massa foi estimada em balança de precisão em gramas. Abaixo, a Figura 2 mostra a localização anatômica dos nichos de tecido adiposo coletados.

Figura 2 – Localização anatômica dos nichos de tecido adiposo branco, subcutâneo, retroperitoneal e tecido adiposo marrom em ratos.

Fonte: adaptado de Schoettl, Fischer e Ussar (2018).

O TAB se distribui em diversos depósitos que são classificados anatomicamente como subcutâneo e visceral. O depósito subcutâneo posterior considera o TAB dorso-lômbar, glútea e TAB inguinal (anexado dorsalmente ao longo da pelve para a coxa do membro posterior (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; WALDÉN et al., 2012).

O tecido adiposo visceral (TAV) é depositado próximo às vísceras na cavidade abdominal, representado pelo TAB retroperitoneal (localizado dentro da cavidade abdominal ao longo da parede dorsal do abdômen atrás do rim) (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; WALDÉN et al., 2012).

Já o TAM está localizado nas regiões interescapular, sub-escapular e cervical, sendo do lado anterior superior do tronco e do pescoço (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; WALDÉN et al., 2012).

4.3 GLICEMIA

A aferição da glicemia foi realizada no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, Brasil, em todos os animais durante os períodos basal, 2^a, 5^a e 8^a semana do experimento (n=10/grupo). Inicialmente, os animais foram colocados em uma caixa aquecedora de madeira com maravalha, por aproximadamente 1 minuto. Uma lâmpada incandescente no interior da caixa promove um leve aquecimento, a fim de aumentar o fluxo sanguíneo da cauda dos animais. Em seguida, o animal foi imobilizado manualmente e sua cauda foi perfurada com a ponta de uma agulha fina, quando se recolhia uma gotícula de sangue em tiras-teste acopladas a um glicosímetro (Accu-Chek® Performa, Roche, Jaguaré, São Paulo, Brasil). Os resultados de glicemia foram expressos em mg/dL.

4.4 HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

A análise histomorfométrica foi realizada em seis animais de cada grupo, utilizando a tíbia direita. A administração de tetraciclina permitiu a avaliação de parâmetros dinâmicos da remodelação óssea. Duas doses de tetraciclina (oxitetraciclina, Terramicina®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Guarulhos, SP, Brasil) de 20 mg/kg de peso corporal (cerca de 0,1ml/200g) foram administradas nos intervalos de sete e dois dias antes da morte dos animais. Após a decapitação a tíbia direita foi cuidadosamente dissecada e removida com músculo, colocadas imersas em etanol a 70% e armazenadas em refrigerador para posterior utilização nas análises (PEREIRA et al. 2009). A tíbia foi cortada na região média da diáfise e desgastadas frontalmente na epífise proximal, sendo este fragmento submetido às seguintes etapas de processamento: preparação do bloco, microtomia, desplastificação e coloração.

A preparação do bloco foi realizada da seguinte forma: os fragmentos ósseos eram imersos em etanol a 70% em frascos individuais e mantidos à temperatura de 4° C por 7 dias para fixação. Após este período, os fragmentos ósseos eram imersos em etanol a 100% em frascos individuais, mantidos à temperatura de 4° C por mais 7 dias para fixação. Em seguida, os fragmentos ósseos permaneciam imersos em tolueno por 1 dia à temperatura de 4° C.

Subsequentemente, os fragmentos ósseos eram imersos por 7 dias à temperatura de 4° C em solução A de Metilmetacrilato ($C_5H_8O_2$, nº 814157; Merck), em frascos individuais e identificados para penetração de resina. Nos próximos 7 dias, os fragmentos ósseos eram mantidos submersos na solução A + 1 % de peróxido de benzoíla ($C_{14}H_{10}O_4$, nº B2030; Sigma), em frascos individuais e identificados. Após esses procedimentos os fragmentos ósseos foram submetidos à inclusão em uma “pré-base”, ou seja, em um frasco de vidro 20 ml com tampa, com cerca de 5 ml de solução A + 25% de Peróxido de Benzoíla, já polimerizada (essa solução polimeriza em estufa à 37°C) e identificados. Após a remoção do vidro, foi confeccionado um bloco retangular com auxílio de uma serra, em seguida lixado e levado para microtomia.

Os cortes no tecido ósseo para confecção das lâminas de histomorfometria foram efetuados em um micrótomo de impacto com navalha de Tungstênio (Jung Polycut S, Leica, Heidelberg, Alemanha). De cada bloco foram obtidos seis cortes histológicos de 5 µm. Os cortes foram colocados em lâmina de gelatina (Solução a 2% - gelatina branca, em torno de 2g dissolvidas em 100 ml de água destilada em placa aquecedora), esticadas com pincel, utilizando álcool 50% e 100%. Após microtomia, as lâminas foram desplastificadas e coradas com azul de Toluidina a 0,1%. Todas as lâminas eram identificadas individualmente. Após a microtomia e montagem das lâminas, as mesmas permaneceram em estufa a 37°C por 12 horas. A desplastificação foi realizada com a colocação das lâminas em metilmetacrilato a 100% por 20 minutos, após que os cortes foram desidratados em etanol a 50% e reidratados em água destilada. No processo de coloração as lâminas foram expostas ao azul de Toluidina a 0,1% (pH= 6,4) por cerca de 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram secadas cuidadosamente em lenço de papel, passadas em álcool butílico e clareadas em tolueno. Posteriormente, uma lamínula era colocada sobre o corte corado e identificado. As lâminas com coloração inadequada ou com presença de artefatos foram substituídas por confecção de novos cortes e coloração para análise histomorfométrica.

Para a análise histomorfométrica foi utilizado o microscópio (Nikon Eclipse 50i, Japão) acoplado a um sistema de histomorfometria (*Osteomeasure* v.1.0.3.0, *Osteometrics*, Inc. Atlanta, GA, USA).

Os parâmetros histomorfométricos estudados seguiram a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research* (DEMPSTER et al., 2013) traduzida para o português, com exceção das abreviações, que foram mantidas as originais.

Os parâmetros na tíbia foram analisados na esponjosa imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento e determinada com objetiva 20x. As variáveis foram determinadas

em um total de 15 campos, de área ($590\mu\text{m} \times 590\mu\text{m}$). Todos os dados foram obtidos com medições às cegas.

Os parâmetros histomorfométricos avaliados foram:

Volume ósseo - BV/TV (%) – é o volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas.

Espessura trabecular – Tb.Th (μm) – é a espessura das trabéculas ósseas, expressa em micra.

Separação de trabéculas – Tb.Sp (μm) – é a distância entre os pontos médios das trabéculas ósseas, expressa em micra.

Número de trabéculas – Tb.N ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$) – é o número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido.

Superfície osteoblástica – Nob/Tar (/mm, mm^2) – é o número de superfície trabecular total que apresenta osteoblastos por milímetro de tecido.

Superfície osteoclásticas – Noc/Tar (/mm, mm^2) - é o número de superfície trabecular total que apresenta osteoclastos por milímetro de tecido.

O preparo do bloco, do corte histológico e da coloração das lâminas foram realizados no LIM 15, Departamento de Nefrologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil. As análises das lâminas de histomorfometria foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

4.5 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO) foram avaliados por densitometria nas tíbias esquerdas de seis animais de cada grupo experimental. Após a retirada das tíbias estas foram limpas das partes moles, envolvidas em gazes com soro fisiológico e posteriormente refrigeradas a 10°C . A densitometria foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios-X (Lunar®, modelo DPX-IQ, USA) no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, SP, Brasil. No dia da análise de densitometria, as tíbias foram retiradas da geladeira duas horas antes do início. Os ensaios foram realizados com as amostras em temperatura ambiente. Todas tíbias foram identificadas, pesadas (g) em balança de precisão e medidos o comprimento (mm) com paquímetro.

Foi utilizado o programa para exames em pequenos animais em modo de alta resolução. As tíbias foram imersas sob profundidade de 2 cm de álcool 70% em um recipiente plástico.

Para estabilizar o posicionamento durante o exame, as tíbias foram fixadas com cera ortodôntica em sua extremidade distal. Dessa forma, a incidência de raios-X foi no sentido médio-lateral.

Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens, foi realizada a análise dos exames. Usando a ferramenta de seleção manual, os ossos foram demarcados na região de interesse do objeto (ROI) com área de 0,043 cm², sendo 1 ROI abaixo do disco epifisário e 1 ROI na região e medial da tíbia, colhendo as informações de DMO e CMO. Os procedimentos foram realizados de acordo com Yamanaka et al. (2018).

4.6 CULTURA CELULAR DE OSTEOCLASTOS

A diferenciação de osteoclastos de ratas foi realizada no Laboratório de Biologia Óssea da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, a partir de cultura primária utilizando células da medula óssea do fêmur direito. Para tanto, foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro com *pool* de células considerando três fêmures direitos de cada grupo e o segundo utilizando um fêmur direito de cada animal por grupo. Estes foram assepticamente removidos e as células da medula óssea extraídas e cultivadas em meio de cultura α -MEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementada com 10% soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA) na presença de 30 ng/mL de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (R&D Systems).

Após 3 dias de cultivo, as células não aderidas foram descartadas, e as células aderidas (pré-osteoclastos) foram cultivadas na presença de 30 ng/mL de M-CSF e 50 ng/mL de ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (R&D Systems) por diferentes tempos de acordo com o protocolo de estudo. Foi utilizado o ensaio de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para avaliar a diferenciação dos osteoclastos. Para este ensaio, 20.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 96 poços e cultivadas na presença de M-CSF e de RANKL por 4 dias. Em seguida foi realizado o ensaio histoquímico de coloração de células multinucleadas sensíveis ao TRAP. Os procedimentos de diferenciação de osteoclastos em ratos foram adaptados com base nos estudos de Liu et al. (2018) e Lou et al. (2019).

4.6.1 Determinação do número de osteoclastos pela reação de TRAP

A detecção de osteoclastos foi realizada pela reação de TRAP. As células foram fixadas com tampão de citrato por 20 minutos, lavadas com solução de tampão de fosfato de salina

(PBS) e incubadas a 37° C na solução corante contendo tartarato por 40 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, os osteoclastos foram fotografados e as células coradas contendo 3 ou mais núcleos foram quantificados quanto ao número e tamanho das células utilizando o programa de imagens (ImageJ software).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo Serviço de Bioestatística FMRP-USP, utilizando os softwares: *R Core Team* (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria e *SAS Statistical Software* (version 9.3; *SAS Institute, Inc.* Cary, NC).

O tratamento dos dados longitudinais de peso corporal e glicemia para comparação dos grupos em cada momento foi utilizado modelo de regressão linear com efeitos mistos para análise das variáveis. Este modelo considera um efeito aleatório por indivíduo, informando que o indivíduo possui medidas tomadas longitudinalmente (momento basal, 2ª, 5ª e 8ª semanas). Foram apresentadas as diferenças estimadas com seus respectivos valores p e intervalos de confiança 95%.

Os dados exploratórios como: peso dos tecidos adiposos (sTAB, rTAB e TAM), peso do fígado, histomorfometria óssea, densitometria óssea e cultura de células foi realizada uma comparação entre os grupos no momento da morte por meio da análise ANOVA *one-way*. Os valores de p menores do que o nível de significância adotado de 5% trazem evidência de que pelo menos um dos grupos se difere dos demais. Para evidenciar essas diferenças foi feito o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL

Os três grupos apresentaram comportamentos diferentes de variação de peso ao longo das oito semanas. O GC apresentou maior ganho absoluto de peso nas primeiras três semanas, tendo ganho cerca de 10g por semana neste período e subsequentemente passou a ter uma variação positiva de peso de 2 a 5g por semana até a oitava semana. O peso final foi de $235 \pm 21,66g$, correspondendo a um ganho de peso total de $47 \pm 16,5g$ em relação ao seu peso basal ($188 \pm 13,35g$). O GR30% apresentou pequena perda de peso nas duas primeiras semanas e a partir daí passou a apresentar variação positiva de peso basal ($192 \pm 8,02g$) foi insignificante, uma vez que correspondeu a $190 \pm 10,64g$ na terceira e a $193 \pm 12,08g$ na oitava semana, correspondendo a uma variação positiva de apenas $1 \pm 2,2g$. Já o GRH40%, apresentou perda significativa de peso nas duas primeiras semanas (1ª semana: $183 \pm 10,30g$; 2ª semana: $179 \pm 10,58g$) e subsequentemente passou a apresentar estabilidade de peso neste patamar mais baixo até o final da oitava semana ($181 \pm 13,17g$), considerando seu peso basal de $189 \pm 11,50g$ a perda final foi de $8 \pm 3,0g$. Ao observar os dois grupos de restrição (GR30% e GRH40%) o peso final do GRH40% ($181 \pm 13,17g$) tendeu a ser menor que do GR30% ($193 \pm 12,08g$; $p = 0,0513$) apresentando efeito final semelhante (Figura 3). Estes resultados podem consultados com mais detalhes na Tabela A1 (Apêndice A).

Figura 3 - Evolução do peso corporal (g) dos três grupos de animais (n=10/grupo) durante oito semanas do período experimental.

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

& = significa diferença estatística no GC em relação ao seu peso basal $p < 0,05$.

* = significa diferença estatística entre o grupo GR30% vs GC, $p < 0,05$.

** = significa diferença estatística no GR30% em relação ao seu peso basal $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o GRH40% vs GC, $p < 0,05$.

¶¶ = significa diferença estatística no GRH40% em relação ao seu peso basal $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

A Figura 4 expressa a variação de peso total ao longo do estudo em relação ao basal. Esta variação representou um ganho de 25% (47g) no GC, 0,5% (1g) no GR30% e uma perda de 4,2% (8g) no GRH40%.

Figura 4 – Variação de peso (g) dos três grupos de animais (n=10/grupo) durante oito semanas do período experimental.

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

5.2 CONSUMO ALIMENTAR

A média de consumo diário dos animais do GC durante todo experimento foi de 11g. Diante disso, em 11g do consumo diário das dietas foi fornecido 42 kcal totais da dieta controle e 30 kcal das duas dietas de restrição. Portanto, as dietas de restrição tiveram uma diminuição de 12 kcal em relação à dieta controle, correspondendo a uma restrição de 30% da ingestão de calorias totais.

Ao considerar o consumo médio diário de 11g de dieta nos três grupos experimentais, nota-se que o GC e GR30% tiveram a ingestão média de 1,6g de proteína, enquanto que o GRH40% consumiu 5g, apresentando um consumo de proteína três vezes maior em relação aos

demais grupos experimentais.

A partir da análise bromatológica dos três tipos de dietas, foi observado que os valores encontrados apresentaram-se similares aos dados de composição nutricional das dietas fornecidas pela empresa Pragsoluções - Jaú/SP (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise bromatológica das dietas (C) controle AIN 93M, (R30%) restrição calórica de 30% e (RH40%) restrição calórica (30%) hiperproteica (40%) em comparação à composição nutricional apresentada pela empresa Prag.Soluções (P.S) (g/100g de dieta).

Dietas	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)		Lipídeos (%)		Carboidratos e Fibras (%)*	
	Análise	Análise	Análise	P.S	Análise	P.S	Análise	P.S
C	4,00 ± 0,80	2,72 ± 0,10	14,33 ± 0,64	14,18	4,26 ± 0,11	4,00	74,69 ± 1,10	78,07
R30%	3,22 ± 0,32	2,18 ± 0,14	14,95 ± 0,65	14,18	3,27 ± 0,06	3,00	76,38 ± 0,24	79,07
RH40%	4,26 ± 0,10	2,42 ± 0,12	45,71 ± 1,28	46,7	3,00 ± 0,27	2,00	44,60 ± 1,65	47,55

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DV).

Abreviaturas: g: gramas; %: porcentagem; P.S: Pragsoluções.

(*) Determinação por soma de carboidratos e fibras e diferença das análises anteriores.

Fonte: próprio autor e Pragsoluções - Jaú/SP.

5.3 TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO

Após a morte dos animais, foi realizada a retirada e pesagem do tecido adiposo branco (TAB) da região subcutânea (sTAB), retroperitoneal (rTAB), tecido adiposo marrom (TAM) e fígado. Os valores foram expressos em peso absoluto (g) e peso relativo (peso/100g de peso corporal). Os grupos de restrição (GR30% e GRH40%) mostraram menores valores de peso absoluto e peso relativo, de sTAB (GC= 3,27 ± 0,66g e 1,26 ± 0,50g vs GR30%= 2,09 ± 0,63g e 1,07 ± 0,27g vs GRH40%= 1,78 ± 0,64g e 0,97 ± 0,31g), rTAB (GC= 2,70 ± 0,97g e 1,14 ± 0,34g vs GR30%= 1,02 ± 0,58g e 0,51 ± 0,27g vs GRH40%= 0,78 ± 0,65g e 0,42 ± 0,33g), do que o GC, não havendo diferenças significativas entre os dois grupos de restrição (GR30% e GRH40%) (Figura 5 A-B1).

Quanto ao TAM somente o GRH40% apresentou o menor peso absoluto e relativo (GRH40%= 0,14 ± 0,04g; 0,08 ± 0,02g) em relação ao GC (GC= 0,28 ± 0,09g e 0,12 ± 0,04g). Não havendo diferenças significativas entre o GR30% (GR30%= 0,17 ± 0,04g e 0,09 ± 0,02g) e o GC, e nem entre o GR30% e GRH40% nos pesos absolutos e relativos analisados (Figura 5 C-C1).

Em relação ao peso do fígado, os grupos GR30% e GRH40% mostraram menores pesos absolutos (GC= 6,26 ± 1,13g; GR30%= 4,28 ± 0,62g; GRH40%= 4,23 ± 0,54g) em relação ao GC (Figura 4 D-D1). Entretanto, apenas o GR30% apresentou menor peso relativo significativo (2,21 ± 0,26g) em relação ao GC (2,67 ± 0,46g). O GRH40% (2,33 ± 0,17g) não apresentou

diferenças estatísticas em relação ao GC e GR30% (Figura 5 - D1). Estes resultados podem ser consultados com mais detalhes na Tabela A2 (Apêndice A).

Figura 5 – Peso absoluto e relativo dos tecidos adiposos branco das áreas (A-A1) subcutâneo (sTAB); (B-B1) retroperitoneal (rTAB); (C-C1) tecido adiposo marrom (TAM) e (D-D1) fígado, dos três grupos experimentais (n=10/grupo).

(C) PESO ABSOLUTO **(C1) PESO RELATIVO** **(D) PESO ABSOLUTO** **(D1) PESO RELATIVO**

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico; sTAB: subcutâneo; rTAB: retroperitoneal; TAM: tecido adiposo marrom; g: gramas.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

5.4 GLICEMIA

Durante o período experimental foram determinados os valores de glicemia de todos os animais nos períodos basal, 2ª, 5ª e 8ª semanas. O GC manteve valores glicêmicos estáveis ao longo das primeiras cinco semanas (basal= $120 \pm 13,55$ mg/dL; 5ª semana= $126 \pm 7,84$ mg/dL). Na oitava semana este grupo apresentou glicemia menor ($117 \pm 7,01$ mg/dL) que a observada na quinta semana ($126 \pm 7,84$ mg/dL). A partir da segunda semana as taxas glicêmicas deste

grupo foram maiores ($123 \pm 10,78$ mg/dL) que a dos outros dois grupos de restrição (GR30% = $112 \pm 13,11$ mg/dL; GRH40% = $98 \pm 10,36$ mg/dL) (Figura 6).

O GR30% apresentou diminuição de glicemia, continuamente, do período basal ($123 \pm 15,65$ mg/dL) até a oitava semana ($94 \pm 8,97$ mg/dL). Entretanto, apenas no período da quinta ($99 \pm 6,00$ mg/dL) para a oitava semana ($94 \pm 8,97$ mg/dL) a queda não foi significativa ($p=0,2465$) (Figura 6).

O GRH40% apresentou diminuição acentuada de glicemia nas duas primeiras semanas do experimento (basal = $111 \pm 5,46$ mg/dL; 2ª semana = $98 \pm 10,36$ mg/dL). No decorrer das próximas semanas a queda foi mais discreta, porém com diferenças significativas entre a segunda semana em relação à quinta e oitava semana (5ª semana = $92 \pm 13,17$ mg/dL; 8ª semana = $91 \pm 12,19$ mg/dL). Entre as três últimas semanas (5ª e 8ª semana) não houve queda significativas ($p=0,873$). Vale salientar que a glicemia na segunda, quinta e oitava semana foram menores que a glicemia basal (Figura 6).

Em relação ao GC, observa-se que os dois grupos em restrição calórica (GR30% e GRH40%) apresentaram glicemias menores da segunda até a oitava semana (Figura 6). A avaliação comparativa do efeito das duas dietas restritivas sobre a glicemia mostra que, apesar de um maior efeito inicial de queda de glicose circulante da dieta hiperprotéica, ao final do estudo não houve diferença significativa nas glicemias do GR30% e GRH40% (8ª semana = GR30%: $94 \pm 8,97$ mg/dL; GRH40%: $91 \pm 12,19$ mg/dL) (Figura 6). Estes resultados podem consultados com mais detalhes na Tabela A3 (Apêndice A).

Figura 6 – Evolução dos parâmetros de glicemia dos três grupos de animais ($n=10$ /grupo) nos períodos: basal, 2ª, 5ª e 8ª semana do período experimental.

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: mg/dL: miligramas por decilitro; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

* = significa diferença estatística entre o grupo de restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

** = significa diferença estatística no GR30% em relação à glicemia basal, $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶¶ = significa diferença estatística no GRH40% em relação à glicemia basal, $p < 0,05$.

= significa diferença estatística entre o grupo de restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

5.5 HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

Os parâmetros histomorfométricos mostram que houve significativo comprometimento ósseo dos dois grupos submetidos à restrição calórica (GR30% e GRH40%), traduzidos por menor volume ósseo (BV/TV= GC: $42,20 \pm 5,66$; GR30%: $27,43 \pm 4,48$; GRH40%: $23,48 \pm 9,97$ %) (Figura 7-A), número de trabéculas (Tb.N= GC: $4,84 \pm 0,37$; GR30%: $3,39 \pm 0,70$; GRH40%: $2,87 \pm 0,74$ n°/mm²) (Figura 7-B), e maior separação entre trabéculas (Tb.Sp= GC: $120,68 \pm 20,66$; GR30%: $222,92 \pm 51,27$; GRH40%: $287,88 \pm 101,44$ µm) (Figura 7-C), do que GC. Não houve diferença entre a espessura trabecular entre os três grupos experimentais (Tb.Th= GC: $86,96 \pm 6,95$; GR30%: $82,09 \pm 11,10$; GRH40%: $79,24 \pm 16,74$ µm) (Figura 7-D). De acordo com os resultados descritos acima, observa-se que o aumento de proteína não minimiza o prejuízo ósseo provocado pela restrição calórica, ao contrário, o grupo GRH40% apresentou tendência em ter maior perda óssea que o GR30%, embora não significativo.

Em relação ao número de osteoblastos, o GRH40% apresentou menor valor que os outros dois grupos (Nob/Tar: GC= $8,81 \pm 1,56$; GR30%= $7,70 \pm 1,71$; GRH40%= $3,95 \pm 1,31$ /mm, mm²) (Figura 7-E). Enquanto isto, o número de osteoclastos, foi menor apenas no grupo GR30% (Noc/Tar= $1,45 \pm 0,71$ /mm, mm²) que no GC ($2,54 \pm 0,75$ /mm, mm²). Não houve diferenças significativas entre os dois grupos de restrição (GR30% e GRH40%), bem como entre o GRH40% ($1,63 \pm 0,28$ /mm, mm²) e GC (Figura 7-F). Todos estes resultados podem ser consultados com mais detalhes na Tabela A4 (Apêndice A).

Figura 7 – Parâmetros histomorfométricos analisados (A) BV/TV: volume ósseo/volume total (%); (B) Tb.N: n° de trabéculas (n°/mm^2); (C) Tb.Sp: separação trabecular (μm); (D) Tb.Th: espessura trabecular (μm); (E) Nob/Tar: n° de osteoblastos ($/mm$, mm^2); (F) Noc/Tar: n° de osteoclastos ($/mm$, mm^2), nas tíbias diretas dos três grupos experimentais ($n=6/grupo$).

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: BV/TV= volume ósseo/volume total; %: porcentagem; Tb.N= número de trabéculas; Tb.Sp= separação trabecular; Tb.Th= espessura trabecular; μ m: micrômetro; n°: número; mm2: milímetro quadrado; Nob/Tar= número de osteoblastos; Noc/Tar= número de osteoclastos; mm: milímetro; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

= significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

A Figura 8 mostra que os dois grupos submetidos à restrição calórica (GR30% e GRH40%) apresentaram maior adiposidade de medula que o GC. É possível que o aumento do teor de proteína acentue o efeito adipogênico da restrição calórica em ratas.

Figura 8 – Figuras representativas das lâminas de histomorfometria da medula óssea dos três grupos experimentais (n=1/grupo) demonstrando o osso trabecular e adipócitos: (A) GC; (B) GR30% e (C) GRH40% na resolução de 10x e 40x.

Abreviaturas: GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico;
 Fonte: próprio autor.

5.6 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A Figura 9 mostra as determinações de DMO e CMO das regiões proximal (Figura 9 A-C) e medial (Figura 9 B-D) das tíbias. O GRH40% apresentou menor DMO proximal ($0,142 \pm 0,02 \text{ g/cm}^2$) que o GC ($0,175 \pm 0,02 \text{ g/cm}^2$) (Figura 9-A). Quanto a avaliação de DMO medial (GC: $0,169 \pm 0,01$; GR30%: $0,172 \pm 0,02$; GRH40%: $0,151 \pm 0,01 \text{ g/cm}^2$) (Figura 9-B), as análises de CMO nas áreas proximal (GC: $0,013 \pm 0,00$; GR30%: $0,012 \pm 0,00$; GRH40%: $0,010 \pm 0,00\text{g}$) (Figura 9-C) e CMO medial (GC: $0,009 \pm 0,00$; GR30%: $0,009 \pm 0,00$; GRH40%: $0,008 \pm 0,00\text{g}$) (Figura 9-D) não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos experimentais. Estes resultados podem ser consultados com mais detalhes na Tabela A5 (Apêndice A).

Figura 9 – Parâmetros de (A) DMO Tíbia Proximal (g/cm^2); (B) DMO Tíbia Medial (g/cm^2); (C) CMO Tíbia Proximal (g); (D) CMO Tíbia Medial (g) das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais ($n=6/\text{grupo}$).

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: g: gramas; cm^2 : centímetro quadrado; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

Não houve diferenças significativas nos comprimentos das tíbias dos animais dos três grupos (GC: $37,93 \pm 1,31$; GR30%: $36,91 \pm 0,81$; GRH40%: $36,85 \pm 0,63$ mm) (Figura 10-A). No entanto, o peso das tíbias foi significativamente menor no GRH40% ($0,50 \pm 0,02\text{g}$), em relação ao GC ($0,68 \pm 0,07\text{g}$) (Figura 10-B). Estes resultados podem ser consultados com mais detalhes na Tabela A6 (Apêndice A).

Figura 10 – Parâmetros de (A) comprimento (mm) e (B) peso (g) das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: mm: milímetro; g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

‡ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

5.7 CULTURA CELULAR DE OSTEOCLASTOS

Foram realizadas culturas de células de origem hematopoiéticas provenientes da medula óssea de animais dos três grupos experimentais. Neste processo, as células foram estimuladas para diferenciação em osteoclastos com RANKL (50ng/mL) e M-CSF (30ng/mL). Os osteoclastos foram fixados e marcados com TRAP após 96h de estímulo. As células TRAP positivas apresentando mais do que 3 núcleos foram considerados osteoclastos. As imagens da Figura 11 (A-C) representam a primeira cultura de osteoclastos, realizada em um *pool* de células da medula óssea do fêmur de três animais de cada grupo. Observa-se que o número de osteoclastos e a área de osteoclastos do GRH40% são maiores (n° osteoclastos/poço: $130 \pm 50,83$; área: $1,61 \pm 0,75\text{mm}^2$) (Figura 11 – C) que do grupo GC (n° osteoclastos/poço: $105 \pm 32,21$; área: $1,25 \pm 0,47\text{mm}^2$) e GR30% (n° osteoclastos/poço: $19 \pm 6,98$; área: $0,14 \pm 0,06\text{mm}^2$) (Figura 11 – A - B). Além disso, observa-se menor número e área de osteoclastos, de maneira acentuada, do grupo GR30% em comparação ao grupo GC e GRH40% (Figura 11 – D e E).

As imagens da Figura 12 (A - C) mostram a segunda cultura de osteoclastos de fêmur de animais dos três grupos experimentais (n=1/grupo). Os dados são compatíveis com os resultados apresentados anteriormente, nota-se que o número de osteoclastos e a área de

osteoclastos do GRH40% (Figura 12 – C) são maiores (nº osteoclastos/poço: $349 \pm 35,94$; área: $7,01 \pm 0,52\text{mm}^2$) em comparação com os do grupo GC (nº osteoclastos/poço: $197 \pm 11,82$; área: $4,45 \pm 0,56\text{mm}^2$) e GR30% (nº osteoclastos/poço: $121 \pm 20,42$; área: $2,28 \pm 0,25\text{mm}^2$) (Figura 12 – A - B). Também foi observado menor número e área de osteoclastos do grupo GR30%, de maneira acentuada, em comparação ao grupo GC e GRH40% (Figura 12 – D e E).

Figura 11 – Primeira cultura de pré-osteoclastos derivados de macrófagos de *pool* de células da medula óssea do fêmur dos três grupos experimentais (n=3/grupo), cultivados com RANKL (50ng/mL) e M-CSF (30ng/mL). As figuras A-C representam osteoclastos de animais corados com TRAP, (D) representa o número de células TRAP positivas contendo mais de 3 núcleos contabilizados, (E) representa a área de osteoclastos.

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: mm2: milímetro quadrado; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

= significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

Figura 12 – Segunda cultura de pré-osteoclastos derivados de macrófagos de células da medula óssea do fêmur dos três grupos experimentais (n=1/grupo), cultivados com RANKL (50ng/mL) e M-CSF (30ng/mL). As figuras A-C representam osteoclastos de animais corados com TRAP, (D) representa o número de células TRAP positivas contendo mais de 3 núcleos contabilizados, (E) representa a área de osteoclastos.

Os valores são expressos como média e desvio padrão (DV).

Abreviaturas: mm2: milímetro quadrado; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

= significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

6 DISCUSSÃO

A restrição calórica com aumento do teor proteico vem sendo utilizada de maneira crescente por sua possível influência favorável no padrão de perda de peso, em parâmetros metabólicos e benefícios no tratamento de diversas doenças. Não por acaso, surgiu também interesse na investigação do papel do consumo de dieta hiperproteica sobre a massa óssea em condições de restrição calórica (CLIFTON, 2012; GOLBIDI et al., 2017; HEILBRONN et al., 2006; WESTERTEP-PLANTENGA; LEMMENS; WESTERTEP, 2012). Estudos em roedores indicam que a restrição calórica afeta adversamente a massa óssea, levando a prejuízos no CMO e DMO (BEHRENDT et al., 2016; HATTORI et al., 2014; LAMOTHE; HEPPLÉ; ZERNICKE, 2003; SANDERSON et al., 1997; TALBOTT; ROTHKOPF; SHAPSES, 1998). Do mesmo modo, estudos clínicos mostram que a perda de massa óssea é uma das mais importantes consequências na AN, uma doença marcada pela auto imposição de controle alimentar (MISRA et al., 2003).

O consumo de proteína é necessário para que ocorra crescimento esquelético, bem como para aquisição de resistência óssea (RIZZOLI; BONJOUR; CHEVALLEY, 2007). O fornecimento de aminoácidos essenciais pela proteína da dieta é fundamental para a síntese de matriz óssea, em paralelo, provê condições para que ocorra síntese de fatores de crescimento osteogênicos como IGF1 (THISSEN; KETELSLEGERS; UNDERWOOD, 1994). Em vista disso, é razoável e esperar que o aumento da ingestão proteica possa ter benefícios esqueléticos. Entretanto, existem estudos que sugerem que o aumento da ingestão proteínas pode ter influência negativa na homeostase do cálcio, promovendo perda óssea (AMANZADEH et al., 2003; CAO; JOHNSON; HUNT, 2011; CHAN; SWAMINATHAN, 1994). Portanto, ainda está por ser melhor conhecido o impacto do aumento de consumo de proteínas sobre o tecido ósseo (MARDON et al., 2008a). Em particular, são escassos os dados sobre o papel do conteúdo proteico, em uma dieta restritiva, sobre o esqueleto. Diante disso, este estudo investigou o impacto da dieta hipocalórica/hiperproteica sobre o tecido ósseo e a adiposidade da medula óssea em ratas da linhagem *Wistar Hannover*. A oferta de alimentos para os grupos de animais em restrição calórica foi baseada no consumo diário dos animais do GC. Assim foi possível controlar a ingestão calórica diária, atendendo o planejamento experimental de restrição de 30% de calorias. Estudos anteriores sugerem que o maior consumo protéico pode ter maior efeito sobre a saciedade alimentar (SILVA, 2013). Neste sentido, existem estudos sugerindo que a proteína pode estimular a liberação de hormônios anorexígenos pelo intestino, [p.ex. colecistoquinina (CCK)] (FAIPOUX et al., 2008; PUPOVAC; ANDERSON, 2002; WANG et

al., 2017). No entanto, este efeito não foi observado no presente estudo. É possível que as condições metabólicas presentes na condição de restrição calórica sejam mais importantes que o papel saciogênico do aumento dietético de proteínas.

Como esperado, a variação de peso dos três grupos foi heterogênea. O GC mostrou ganho de peso contínuo, sendo o aumento final de 25% (47g) em relação ao seu peso basal. Enquanto isso, o GR30% manteve estabilidade ponderal, sendo a variação positiva de apenas 0,5% (1g) e o GRH40% teve uma perda de peso final de 4,2% (8g). Ao final do estudo, o GRH40% tendeu a apresentar menor peso que o GR30%, $p = 0,0513$. Estudos anteriores mostram que o peso corporal é um importante determinante da massa óssea (DE LAET et al., 2005). Os resultados do presente estudo foram compatíveis com estudos em modelos experimentais anteriores que avaliaram a influência sobre o peso corporal no aumento do teor de proteína em dietas de restrição calórica. Mardon et al. (2008a, 2008b) submeteram ratos machos *wistar* adultos (16 semanas de idade) a tratamento com dieta restritiva (40%) e hiperproteica (26%) ou normoproteica (13%). Os animais em restrição calórica exibiram uma diminuição significativa no peso corporal em comparação com os animais alimentados com dieta normocalórica. Em concordância com os resultados do presente estudo, não houve diferença no peso corporal final entre os dois grupos submetidos à restrição calórica independentemente do nível proteico das dietas (MARDON et al., 2008a; MARDON et al., 2008b).

Dados semelhantes foram também obtidos em investigação clínica por Witjaksono et al. (2018) que avaliaram o efeito de duas dietas hipocalóricas, sendo uma com proteína padrão e outra com alto teor de proteínas, durante oito semanas, em indivíduos com histórico de obesidade. Como indicador de obesidade foi avaliada a circunferência da cintura. Os voluntários tinham histórico de ciclo de variação de peso, ou seja, perda de pelo menos 2 kg e posterior recuperação de peso ou superação do peso anterior, pelo menos duas vezes nos últimos 5 anos. Os participantes fizeram uma redução de ingestão energética diária de 500 a 1000 kcal, a partir da ingestão habitual, sendo com a mínima ingestão possível de 1000 kcal/dia. Os participantes do grupo hiperprotéico receberam fonte de macronutrientes com uma composição de 22 a 30% de proteínas, 50 a 55% de carboidratos e 20 a 25% de gordura, enquanto os participantes do grupo normoprotéico receberam dieta contendo de 12 a 20% de proteínas, 55–60% de carboidratos e 20–30% de gorduras. Em concordância com os resultados do presente estudo, não houve diferença na redução de cintura abdominal entre os grupos. Porém, no estudo clínico o grupo com dieta restritiva e conteúdo proteico normal apresentou

mais tendência de perda de medida que o que recebeu dieta hiperproteica (WITJAKSONO et al., 2018).

Enquanto o presente estudo avaliou o impacto de uma dieta hiperproteica em condições de restrição calórica, utilizando somente a caseína como fonte de proteína, Duque et al. (2020) compararam o efeito da caseína e da proteína de soja, em ratos *sprague dawley* machos idosos (8 meses) na perda óssea induzida por 12 semanas de restrição calórica (40%). Os autores observaram que os animais idosos que fizeram restrição calórica, com ambas as fontes de proteínas associadas, com taxa de 20%, mostraram uma diminuição significativa de peso corporal (g) e IMC (g/cm²) em relação aos animais alimentados *ad libitum* com caseína ou soja. No entanto, não houve diferenças significativas no peso dos animais que consumiram as diferentes fontes proteicas tanto em condições *ad libitum* quanto em restrição calórica.

Portanto, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com dados anteriores da literatura que indicam que o aumento do conteúdo proteico não interfere significativamente na perda de peso induzida pela restrição calórica.

A composição corporal tem influência direta em inúmeros processos metabólicos no organismo, neste cenário, o entendimento sobre a relação entre o tecido adiposo e ósseo só mais recentemente começou a ser entendido. O tecido adiposo tem importante papel endócrino, uma vez que diversas substâncias biologicamente ativas secretadas pelo adipócito possuem ações locais ou sistêmicas que influenciam vários processos fisiológicos, como a ingestão alimentar, metabolismo energético, função neuroendócrina, angiogênese, reprodução, resposta imunológica e função cardiovascular (KERSAHAW; FLIER, 2004; REID, 2010). O aumento da massa de tecido adiposo é característica fenotípica mais visível da obesidade, a distribuição corporal do tecido adiposo é considerada tanto ou mais importante do que a quantidade total de gordura na determinação de saúde (WEISS, 2007). Estudos recentes sugerem que os benefícios fisiológicos da RC podem ser mediados em parte pelo tecido adiposo (ROTH et al., 2002). Dessa forma, após a morte dos animais, foram os TAB das áreas subcutânea (sTAB), retroperitoneal (rTAB) e tecido adiposo marrom (TAM) foram extraídos. Os resultados mostraram que os grupos de restrição tiveram menores pesos de sTAB e rTAB que o GC. Quanto ao TAM, o GRH40% apresentou menor peso que os outros dois grupos. Da mesma forma, o peso do fígado dos animais foi aferido, sendo o peso absoluto do fígado significativamente menor nos dois grupos de restrição do que no GC. Enquanto isto, apenas o grupo GR30% apresentou peso relativo de fígado significativamente menor que o GC. Vale salientar que não houve diferenças significativas nos pesos dos tecidos mencionados entre os dois grupos submetidos à restrição calórica (GR30% e GRH40%).

Os dados do presente estudo estão de acordo com resultados anteriores apresentados por Okita et al. (2012), que avaliou a respostas do TAB e TAM, em ratos machos *wistar* (12 semanas de idade) submetidos à restrição calórica (70% da ingestão de energia *ad libitum*), no período de seis meses. Os autores observaram uma redução significativa de 69% de peso absoluto do tecido adiposo epididimal (TAE) em animais em restrição calórica em relação ao seu grupo controle. Para comparação, no presente estudo os animais apresentaram redução de peso regional de tecido adiposo na ordem sTAB (GR30%: 36% e GRH40: 46%) e rTAB (GR30%: 62% e GRH40%: 71%) em relação ao GC, no período de 8 semanas. Estes dados também encontram apoio em estudo realizado por Narita et al. (2018) o qual estimou os nichos de tecido adiposo retroperitoneal, epididimal e subcutâneo, bem como o coração e fígado. Vale salientar, que em concordância com os resultados do presente estudo, Narita et al. (2018) observaram que o tecido adiposo retroperitoneal apresentou maior redução de massa que o epididimal e o subcutâneo. Os dados sugerem que o depósito de gordura visceral é mais sensível à restrição calórica que os outros nichos de tecido adiposo, reforçando a importância desta opção de tratamento no controle da obesidade centrípeta. No entanto, o aumento de consumo de proteína não altera significativamente a perda de tecido adiposo induzida pela diminuição de ingestão de calorias.

Quanto ao TAM, Okita et al. (2012) e Narita et al (2018) observaram redução significativa de peso absoluto TAM em animais submetidos à restrição calórica, em relação ao seu grupo controle. Porém, Okita et al. (2012) não observaram diferença significativa no peso relativo de TAM dos dois grupos. No presente estudo, somente os animais que fizeram restrição com alto teor de proteína (GRH40%) apresentaram menor peso de TAM, sendo significativamente menor tanto em relação ao GC quanto ao GR30%. Este padrão foi observado tanto em relação ao peso absoluto quanto relativo.

O TAM, em adultos, é menos ativo nos mais velhos e em obesos do que em nos mais jovens e magros, sendo inversamente proporcional ao IMC (TRAYHURN, 2017; YONESHIO, et al., 2011). Em animais em jejum prolongado foi observado um aumento da taxa de autofagia mitocondrial, entretanto, não há estudos que verificaram o mesmo fenômeno em animais submetidos à RC (HAILEY et al., 2010). É importante ressaltar também que considerar somente o peso da massa do tecido adiposo não é um indicador útil da atividade do TAM ou do estado termogênico. Adicionalmente, é necessário considerar o conteúdo mitocondrial, que está diretamente ligado a termogênese, bem como, o recrutamento de mitocôndrias que atuam no aumento da capacidade oxidativa e termogênica no tecido (TRAYHURN, 2017).

A redução do gasto energético de repouso é uma adaptação fisiológica comum em condições de jejum e restrição energética. O declínio da taxa metabólica possibilita menor mobilização de substratos energéticos, tais como ácidos graxos dos triacilgliceróis, em resposta à menor demanda de energia. De forma diferente do jejum, em uma dieta hipocalórica ainda há o fornecimento de substratos exógenos, inclusive glicose, que estimula a secreção da insulina e limita a elevação nas taxas de lipólise e oxidação de ácidos graxos livres (AGL) (TRAYHURN, 2017). Os dados de medida de TAM no presente estudo estão de acordo com resultados anteriores da literatura, adicionalmente, estimulam a realização de outros estudos para se investigar o papel do aumento de conteúdo protéico da dieta sobre TAM em condições de restrição calórica e suas possíveis consequências metabólicas.

Em relação ao peso absoluto do fígado, o estudo de Narita et al. (2018) não mostrou diferenças significativas entre os animais submetidos à restrição calórica de 30% e entre os alimentados *ad libitum*. Ao contrário, no presente estudo o GR30% mostrou menor peso absoluto e relativo do fígado em relação ao GC. Contudo, não houve diferenças entre os dois grupos de restrição (GR30% e GRH40%). Não existe uma explicação clara para as diferenças dos resultados, mas o atual estudo não é diretamente comparável ao de Narita et al. (2018), tendo em vista que naquele estudo foram utilizados animais machos e não fêmeas. Dados na literatura mostram dimorfismo sexual em composição corporal e adaptações metabólicas.

Diversas possibilidades podem estar relacionadas com a redução de peso e tamanho do fígado dos grupos de restrição em relação ao GC, observada no presente estudo, como a perda de peso, maior consumo de glicogênio, redução de água, desnutrição (NARAYANAN et al., 2010), discreta fibrose pericelular hepática, como observada em alguns pacientes com AN (KOGA et al., 2020) e autofagia de hepatócitos induzida por inanição (ROSEN et al., 2017; KHELOUFI et al., 2014). Estas ocorrências podem ser adaptações metabólicas à privação de alimentos. Ela envolve a busca de recursos energéticos em estoques de lipídeos e proteínas, por meio dos processos de gliconeogênese e cetogênese. O aumento da proteólise e canalização de precursores de aminoácidos para gliconeogênese em condições de jejum prolongado pode limitar a secreção de apolipoproteína B-100, que pode contribuir para o acúmulo de lipídeos intra-hepáticos (IHLs) em pacientes que fazem jejum prolongado (GAN; WATTS, 2008). Moller et al. (2008) que avaliaram oito homens jovens não obesos, antes e depois de 12 ou 36 horas de jejum, utilizando análise de ressonância magnética mostrou que os níveis de IHLs podem aumentar após 36 horas de jejum e isso foi relacionado com o aumento de 3-hidroxibutirato, podendo ocorrer inflamação e até disfunção hepática em casos de jejum mais

intenso (GAN; WATTS, 2008). Portanto, os dados acima sugerem que diversos mecanismos devem participar nas mudanças hepáticas que ocorrem em resposta à RC.

Em relação aos dados dos tecidos adiposos analisados, os resultados do presente estudo estão de acordo com a literatura discutida anteriormente sobre diminuição do TAB em condições de restrição calórica, o presente estudo complementa estes achados, mostrando que o alto teor de proteínas em dietas de restrição favorece o menor peso de TAM em relação à restrição calórica normoproteica e que as duas dietas de restrição também podem acarretar diminuição do peso do fígado.

As dietas de restrição calórica geralmente apresentam menor conteúdo de carboidratos, o tipo e a quantidade da ingestão deste nutriente possuem efeito direto na concentração de glicose no sangue e consequente secreção de insulina. Com a redução dos níveis de glicose sérica, aumenta a participação dos AGL no provimento de energia para os tecidos periféricos. A lipólise no tecido adiposo passa a ser um importante provedor de substrato energético para o organismo, consequentemente há perda de peso (WILLIAMS et al., 2007). No presente estudo, foi verificado a evolução de glicemia ao longo da intervenção dietética, nos períodos basal, 2^a, 5^a e 8^a semanas de todos os grupos experimentais. Ao final do experimento a restrição calórica com teor padrão ou elevado de proteína provocou redução significativa na glicemia basal dos animais, porém não houve diferenças de efeito final entre elas. Os dados do presente estudo mostram claramente que o GC apresentou estabilidade do controle glicêmico, com diferença de apenas 3%. Enquanto isto, os outros dois grupos de restrição tiveram queda significativa com taxas de variação de 29% no grupo de restrição normoproteica e 20% em relação a restrição hiperproteica. Os dados mostram que o aumento do teor de proteína, em uma dieta restritiva, não altera significativamente o comportamento glicêmico dos animais em um intervalo de 8 semanas.

French et al. (2017) avaliaram ratos machos obesos da linhagem *Zucker* (12 semanas de idade) tratados com dietas com níveis moderados (20%) e altos (40%) de proteína. Os autores não observaram diferença nos níveis de glicemia de jejum entre ratos magros e obesos ou entre os tratamentos dietéticos propostos. Portanto os autores sugerem que a alteração no teor de proteína em uma dieta normocalórica não é capaz de promover alterações nos parâmetros de glicemia de jejum em animais. De forma complementar, no presente estudo foi demonstrado que a diferença no teor de proteína entre duas dietas com restrição calórica também não foi suficiente para promover alterações significativas nos valores de glicemia final avaliados.

Os dados do presente estudo são diferentes dos observados por Solon-Biet et al. (2015), que avaliaram diferentes níveis de proteína em condições de restrição calórica. O protocolo

experimental comparou os resultados metabólicos de camundongos machos (C57BL6 - 3 semanas de idade) em relação à proporção de proteína sobre carboidratos e restrição calórica de 40%. Foi avaliado o comportamento de 6 grupos de animais, com três tipos de dietas variando na proporção de proteína, sendo HPLC (alta proporção de proteína (60%) para carboidratos), MPMC (média proporção de proteína (33%) para carboidratos) e LPHC (baixa proporção de proteína (5%) para carboidratos) avaliadas tanto em condições *ad libitum* quanto em RC (40%). Diferentemente dos resultados do presente estudo, os autores observaram que os animais em restrição calórica e aumento do conteúdo proteico (60%) apresentaram menores níveis de glicemia durante o teste de tolerância à glicose. Os dados do estudo acima, não são diretamente comparáveis aos do presente estudo, por utilizar camundongos machos, Solon-Biet et al. (2015) não incluíram o grupo controle utilizando dieta padrão e as taxas de proteína nas diferentes dietas não são semelhantes a empregada no presente estudo.

Em outro estudo, Margolis et al. (2016) avaliaram ratos *Sprague-Dawley*, com 12 semanas de idade, submetido aos seguintes regimes alimentares: (a) *ad libitum* com nível padrão de proteínas (10%) (b) *ad libitum* com alto nível (32%) de proteínas, (c) RC com nível padrão de proteínas (10%) e (d) RC com alto nível (32%) de proteínas à base de leite por 16 semanas. Os resultados da análise inicial mostraram que a variação no perfil alimentar calórico e de proteínas não afetou a glicemia dos animais. No entanto, os autores chamam atenção que uma segunda análise, excluindo os valores glicêmicos > 2 desvios-padrão da média, os animais com dieta hiperproteica, seja em dieta restritiva ou padrão apresentaram menores taxas glicêmicas. Portanto, nesta última análise, os dados obtidos pelos autores não são semelhantes ao presente estudo.

Os resultados do presente estudo, em conjunto com os já publicados na literatura, mostram que a ingestão de dietas de restrição calórica, como esperado, provoca redução nas taxas circulantes de glicose. Adicionalmente, o aumento do conteúdo protéico não altera o efeito da restrição em dieta padrão.

Também é importante levar em consideração que a fibra alimentar impacta no comportamento glicêmico e na resposta insulínica pós-prandial. A diminuição dos níveis de glicose e insulina pós-prandial que se observa após o consumo de fibra, possui relação com a redução do esvaziamento gástrico ou absorção retardada de glicose no intestino delgado, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com DM2. É necessário ressaltar que a literatura contempla maior número de estudos com fibras solúveis do que insolúveis (REYNOLDS; AKERMAN; MANN, 2020; YU K. et al., 2014). Em estudo anterior Bégin et al. (1989), que avaliou o efeito de diferentes fibras dietéticas na glicemia e insulinemia e na função

gastrointestinal em ratos, mostraram que a fibra insolúvel não influencia a glicemia e a insulinemia. Portanto, é possível que o principal componente para diminuição de glicemia nos animais se deve à redução da ingestão de calorias e não a quantidade de fibras e proteínas nas duas dietas de restrição.

A fim de avaliar os possíveis impactos da restrição calórica com ou sem aumento de proteína no processo de remodelação óssea, foi realizada a análise de histomorfometria óssea. Esta é uma das técnicas convencionais para estudo da microarquitetura óssea trabecular, sendo amplamente utilizada em modelos experimentais, apesar de ser uma técnica laboriosa e necessite de profissionais especializados (LESPESSAILLES et al., 2006).

Os animais dos dois grupos submetidos à restrição calórica apresentaram prejuízo ósseo, traduzido por menor volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N) e maior separação trabecular (Tb.Sp) em relação ao GC. Não houve diferença significativa entre a restrição energética e restrição calórica com aumento do conteúdo proteico. Quanto à espessura trabecular (Tb.Th) não houve diferenças entre os três grupos experimentais. A histomorfometria mostrou menor número de osteoblastos em tíbias do GRH40% tanto em relação ao GC como ao GR30%. Enquanto que o GR30% mostrou número de osteoclastos significativamente menor que o GC, não havendo diferenças estatísticas entre os dois grupos de restrição (GR30% e GRH40%).

Os resultados do presente estudo estão, em grande parte, de acordo com os dados encontrados por Devlin et al. (2010) que avaliaram o efeito da restrição calórica de 30% sobre o tecido ósseo, durante três e nove semanas, em camundongos machos C57Bl/6J jovens com 6 e 12 semanas de idade. Os dados histomorfométricos do fêmur distal sugeriram a ocorrência de diminuição de formação óssea, resultando em menor volume ósseo trabecular (BV/TV), diminuição no número de trabéculas (Tb.N) e aumento da separação trabecular (Tb.Sp) nos animais submetidos à restrição elementar. Adicionalmente, o presente estudo indica que o aumento do conteúdo protéico em dietas de restrição calórica não previne as alterações ósseas provocadas pela restrição calórica. Na realidade, a dieta hiperproteica, em condições de restrição calórica, mostrou tendência em provocar maior prejuízo ósseo, embora não significativo. Entretanto, o padrão celular de distribuição de osteoblastos e osteoclastos observados no estudo de Devlin et al. (2010) é diferente do presente estudo, em diversos aspectos. Enquanto Devlin et al. (2010) observaram redução no número de osteoblastos (N.Ob/BS) e aumento do número de osteoclastos (N.Oc/BS) no grupo de restrição calórica em relação ao grupo controle, o presente estudo mostrou número de osteoblastos normais e redução de osteoclastos no GR30%. Portanto, enquanto os parâmetros histomorfométricos daquele

estudo sugerem um desacoplamento de remodelação óssea, o presente estudo sugere uma diminuição deste processo. Além disso, observamos que a dieta restritiva e hiperproteica provocou redução de osteoblastos e tendência de redução osteoclastos em relação ao GC. Estes últimos resultados, sugerem que o aumento de proteínas em dietas restritivas acentua a tendência de redução na taxa de remodelação óssea em condições de privação alimentar. Embora não exista uma clara explicação sobre as diferenças observadas entre os dois estudos, é possível que as diferenças entre raça e sexo dos animais avaliados sejam, pelo menos em parte, responsáveis por esta ocorrência.

O valor nutricional da proteína para manutenção da saúde é tão importante que existem estudos que avaliaram não só mudanças no teor como também na fonte proteica. Por exemplo, Mardon et al. (2008b) compararam o impacto da caseína com *whey protein* sobre o tecido ósseo. Para tanto, Mardon et al. (2008b) analisaram o efeito esquelético da restrição calórica, por cinco meses em ratos, machos com 16 meses de idade alimentados com uma dieta normal contendo caseína (N-C) ou *whey protein* (N-WP). Adicionalmente, avaliaram grupos que receberam dieta com 40% de restrição de energia. A ingestão de proteínas foi mantida no nível dos grupos N-C e N-WP (17%). De forma semelhante ao presente estudo, os dados de Mardon et al. (2008b) mostraram prejuízo ósseo produzido pela restrição calórica, traduzido por redução do volume ósseo trabecular (BV/TV), além disso não observaram efeitos diferentes com o consumo das duas fontes de proteínas avaliadas. Diferentemente dos nossos resultados, estes autores verificaram redução significativa de espessura (Tb.Th), sem diferenças significativa no número trabéculas (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp) nos animais com restrição calórica. Vale salientar que no estudo de Mardon et al. (2008b) a avaliação da variação alimentar sobre o osso se limitou à restrição calórica e qualidade proteica e não houve análise do aumento do consumo de proteínas. Os autores concluíram que os parâmetros trabeculares ósseos tiveram efeito mais pronunciado da restrição calórica do que da qualidade da proteína. Já no presente estudo foi observado que a restrição calórica é o maior determinante de prejuízo ósseo e que o aumento do consumo de proteína não reduz o seu impacto negativo.

A fim de investigar se a alteração da fonte de proteína animal ou vegetal na dieta de ratos *sprague dawley* machos idosos (oito meses) poderiam minimizar ou impedir a perda óssea induzida por 12 semanas de restrição calórica (40%), Duque et al. (2020) avaliaram o efeito de dietas *ad libitum* e restritas com associação de caseína (C) ou soja (S) na qualidade óssea tibial. Os resultados mostraram que os animais que fizeram RC tanto com caseína ou proteína de soja apresentaram uma diminuição significativa (~ 20%) de volume ósseo (% BV/TV) quando comparado aos animais alimentados *ad libitum* tendo a caseína ou soja como fonte proteica.

Adicionalmente, os animais que receberam a dieta *ad libitum* com proteína de soja apresentaram um aumento significativo de 20% de volume ósseo em relação aos outros três grupos de animais idosos avaliados (DUQUE et al., 2020). Com base nesses resultados pode-se observar que as diferentes fontes de proteína não afetaram o prejuízo ósseo causado pela restrição energética, enquanto que em condições *ad libitum* a proteína de soja apresentou vantagens em relação à caseína. Estes últimos resultados apoiam evidências anteriores sobre o efeito positivo do consumo de soja na melhora de parâmetros ósseos em modelo animal de osteoporose alimentado *ad libitum* (SOUNG et al., 2006). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão claros, porém tem sido atribuído ao possível efeito fitoestrogênico da isoflavona da soja no osso (HINTON et al., 2018).

Ao avaliar a condição óssea em dietas com maior carga proteica, Amanzadeh et al. (2003) realizaram um experimento com ratos machos *Sprague-Dawley* de oito semanas de idade, alimentados em pares com dietas com alto (48% - HC) e baixo (12% - LC) teor de caseína. Com base na análise histomorfométrica de fêmur, o grupo com alto índice proteico mostrou aumento acentuado na reabsorção óssea, justificados pelo aumento da superfície erodida (ES / BS), superfície osteoclástica (OcS / BS), em 3 vezes, e diminuição da superfície osteoblástica (ObS / BS). Neste trabalho, os autores sugeriram que o aumento do conteúdo proteico em dieta normocalórica favoreceu a perda óssea nestes animais. No entanto, o aumento do conteúdo proteico em dietas de restrição no presente estudo não acentuou o prejuízo causado pelo consumo de uma dieta restrita normoproteica. Portanto, os dados atuais contribuem nesta linha de pesquisa mostrando que o aumento de conteúdo proteico em uma dieta não minimiza os efeitos prejudiciais da restrição calórica sobre o osso em ratas adultas jovens.

A densitometria óssea é considerada padrão ouro para avaliar clinicamente fragilidade óssea, entretanto pode não ser a melhor forma de esclarecer, isoladamente, suscetibilidade à fratura. Os resultados de densitometria óssea do presente estudo mostraram que o grupo hiperproteico (GRH40%) apresentou menor DMO proximal e menor peso das tíbias em relação ao GC. Os demais parâmetros analisados como: DMO medial, CMO proximal e medial e comprimento das tíbias não mostraram diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais.

Estudos anteriores mostram que mudanças na ingestão de nutrientes prejudicam a qualidade e a força óssea em modelos de roedores. Resultados obtidos por Mardon et al. (2008a), Mardon et al. (2008b) e Mardon et al. (2009) mostraram que a restrição energética de 40% afetou negativamente o CMO, DMO e as propriedades mecânicas femorais em ratos machos idosos. Mardon et al. (2008a e 2009) não observaram diferenças significativas na

densitometria do fêmur entre os grupos normoproteicos e hiperproteicos em condições de restrição calórica. Enquanto isto, no presente estudo o grupo de animais com maior teor de proteína apresentou queda significativa de DMO proximal da tíbia e tendência a menores valores de DMO medial e CMO proximal e medial. Porém é importante considerar o maior teor de proteínas (40% vs 26%) utilizado no presente estudo, em relação aos estudos de Mardon et al (2008a e 2009). Vale também comentar o estudo em Mardon et al (2008b) avaliaram ratos machos idosos tratados com dieta restritiva em 40%, mas variando o tipo de proteína, caseína ou *whey protein*, em condições normoproteicas (17%). As medidas de DMO femoral total, diafisária e metafisária foram menores nos grupos em restrição calórica. Em relação às diferentes fontes proteicas analisadas, os animais alimentados com caseína tenderam a ter uma DMO mais alta do que aqueles alimentados com *whey protein*. No presente estudo não foram avaliadas diferentes fontes proteicas, porém os animais que fizeram restrição calórica com nível de 14% de caseína apresentaram tendência em ter maior DMO do que o grupo hiperprotéico com 40% de caseína. Portanto os resultados do presente estudo sugerem que a restrição calórica normo e hiperproteica influenciam negativamente o osso como observado em exame de histomorfometria óssea. Ainda, a densitometria óssea foi capaz de capturar alterações significativas de DMO na região proximal das tíbias do grupo em restrição com alto teor proteico na dieta, sugerindo que o acréscimo de proteína não mitiga, ao contrário pode piorar o comprometimento induzido pela restrição calórica sendo mais danoso para o tecido.

Com o propósito de compreender os fatores envolvidos com as alterações ósseas na restrição calórica e a possível interferência do aumento de consumo de proteína neste processo o presente estudo avaliou células tronco hematopoiéticas em osteoclastos. Os dados mostram que a restrição calórica exerce profundo efeito inibitório no potencial de diferenciação de células progenitoras da medula óssea em osteoclastos. Além disso, foi observado que, nesta condição, o aumento do conteúdo proteico reverte este padrão e os animais passaram a apresentar maior atividade de diferenciação osteoclastogênica que o GC. Existem poucos trabalhos realizados sobre a relação do consumo de dietas de restrição, em especial hiperproteica, com a atividade de células envolvidas na remodelação óssea. Em apoio aos nossos resultados, Robertson et al. (2014) sugeriram que a atividade de remodelação óssea está reduzida de maneira global em animais submetidos à restrição calórica. Estes autores observaram redução dos níveis séricos de osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato isoforma-5b (TRACP5b) que são, respectivamente, marcadores de formação e reabsorção óssea. Eles também observaram perda óssea após 90 e 180 dias de restrição calórica.

Estudos clínicos também mostram comprometimento ósseo na restrição calórica. Villareal et al. (2016) avaliaram adultos jovens com idade entre 38 a 45 anos em RC de 25% (em relação ao valor energético total (VET), durante 24 meses). Os autores avaliaram os marcadores de reabsorção, como Telopectídeo C-terminal do colágeno tipo I (CTX), TRAP5b e marcadores de formação óssea como fosfatase alcalina específica do osso (BSAP). Os indivíduos apresentaram aumento de marcadores de reabsorção no primeiro ano e tendência de queda no segundo ano, enquanto que os níveis séricos de BSAP tiveram queda mantida a partir de 6 meses. Esses achados sugerem que a perda de peso induzida pela restrição de energia estimula o aumento dos marcadores de reabsorção óssea e paralelamente reduz a formação óssea. Os dados obtidos por Villareal et al (2016) não são comparáveis aos apresentados no presente estudo, neste se mediu potencial osteoclastogênico de células tronco hematopoiéticas da medula, enquanto aqueles avaliaram parâmetros indiretos de atividade de remodelação óssea.

Existem poucos estudos sobre cultura de osteoclastos na restrição calórica e o efeito de proteínas neste processo. No entanto, existem resultados quanto a ação da proteína do soro do leite (*whey protein*). Takada et al. (1997) utilizaram dois sistemas biológicos para avaliar os efeitos da proteína do soro do leite na reabsorção óssea e na formação de células osteoclásticas. O primeiro utilizando osteoclastos pré-existentes e recém-formados, por meio de um sistema de cultura de células ósseas em fatias de dentina. Estas foram preparadas a partir de ossos femorais de camundongos com 13 dias de idade. Neste primeiro ensaio a proteína do soro reduziu, em cerca de 2,4 vezes, a área de cavidade formada pelos osteoclastos, em comparação com o controle. Na segunda avaliação, realizada a partir de cultura de células hematopoiéticas do baço de camundongos BDF1 fêmeas de seis semanas de idade. A proteína de soro de leite suprimiu a formação de osteoclastos. Esses resultados sugerem existir um componente ativo na fonte proteica do soro do leite (*whey protein*) capaz de suprimir a reabsorção óssea mediada por osteoclastos e a diferenciação de precursores em células osteoclásticas (TAKADA et al., 1997). Contudo, os dados do presente estudo sugerem que a restrição normoproteica parece reduzir o potencial osteoclastogênico de células tronco hematopoiéticas da medula óssea, a qual é estimulada quando a dieta restritiva contém alto teor protéico. Portanto, é possível que, ao invés de benefícios, a dieta hiperprotéica em condições de restrição calórica acentue a promoção de osteoporose reconhecidamente associada à redução de consumo de macronutrientes. Em perspectiva, estes achados encorajam novos estudos para investigação da quantidade ideal de proteínas da dieta nas diferentes fases da vida, bem como nas mais diversas doenças metabólicas.

Em síntese, nossos dados mostram que o aumento do conteúdo proteico em condições de restrição calórica não apresentou vantagens diante da restrição calórica normoproteica. O aumento da proteína em condições restritas de energia não é capaz de reverter as alterações metabólicas relacionadas à perda de peso induzida pelo balanço energético negativo. Diante do aumento global de indivíduos que sofrem de osteoporose e de doenças associadas à fragilidade óssea, fatores modificáveis, como os componentes da dieta, devem ser amplamente investigados, visando estabelecer formas efetivas de promoção de saúde esquelética.

7 CONCLUSÃO

O aumento do teor proteico (40%) em dieta restritiva (30%) não influencia significativamente a perda de peso corporal, de depósitos de tecido adiposo branco (subcutâneo, retroperitoneal) e do fígado em ratas. Entretanto, nossos resultados sugerem impacto da dieta hiperproteica sobre o TAM, o mesmo não foi observado com o grupo em restrição calórica normoproteica. Adicionalmente, nossos dados sugerem que o aumento do conteúdo de proteína em uma dieta restritiva não modifica significativamente a evolução das alterações provocadas pela restrição calórica na glicemia, microestrutura óssea e densidade mineral óssea em ratas. Apesar disso, houve significativa diferença no potencial de diferenciação de células progenitoras de osteoclastos nos dois grupos com restrição calórica. Enquanto a restrição normoproteica provocou redução da osteoclastogênese, a hiperproteica se associou ao aumento significativo de osteoclastos. Além disso, a dieta hipocalórica com maior teor proteico parece favorecer maior adipogênese na medula óssea. Portanto, nossos resultados sugerem que o aumento do teor proteico em condições de restrição calórica não tem nenhum benefício metabólico, na composição corporal e nem esquelético. Os dados encorajam a realização de novos estudos, inclusive clínicos, para esclarecer o papel da influência da dieta hiperproteica em diversas condições de oferta calórica tanto no metabolismo energético quanto osteomineral, em longo prazo.

REFERÊNCIAS

- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 900.02)**. Arlington: A.O.A.C., cap. 44. p. 3, 1996.
- AMANZADEH, J. et al. Effect of high protein diet on stone-forming propensity and bone loss in rats. **Kidney Int**, v. 64, n. 6, p. 2142–2149, Dec. 2003.
- AMMANN, P. et al. Protein malnutrition attenuates bone anabolic response to pth in female rats. **Endocrinology**, v. 156, n. 2, p. 419–428, Feb. 2015.
- ANDERSON, J. J.; METZ, J. A. Adverse association of high protein intake to bone density. **Challenges of Modern Medicine**, v. 7, p. 407–412, 1995.
- BAILEY, D. A. The Saskatchewan Pediatric Bone Mineral Accrual Study: bone mineral acquisition during the growing years. **Int J Sports Med**, v. 18 (suppl. 3), p. S191–194, July 1997.
- BEHRENDT, A. K. et al. Dietary Restriction-Induced Alterations in Bone Phenotype: Effects of Lifelong Versus Short-Term Caloric Restriction on Femoral and Vertebral Bone in C57BL/6 Mice. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 4, p. 852–63, Apr. 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911–917, Aug. 1959.
- BONJOUR, J. P. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. **J Am Coll Nutr**, v. 24, n. 6, p. 526S–536S, Dec. 2005.
- BONJOUR, J. P. et al. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. **Med Sport Sci**, Basel, Karger, v. 51, p. 64–80, 2007.
- BOURRIN, S. et al. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. **J Bone Miner Res**, v. 15, n. 8, p. 1555–63, Aug. 2000.
- BÉGIN, F. et al. Effect of dietary fibers on glycemia and insulinemia and on gastrointestinal function in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 67, n. 10, p. 1265–71, Oct. 1989.
- BREDELLA, M. A. et al. Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab.**, Boston, Massachusetts, v. 6, n. 94, p. 2129–2136, June 2009.
- CAO, J. J. High Dietary Protein Intake and Protein-Related Acid Load on Bone Health. **Curr Osteoporos Rep**, v. 15, n. 5, p. 571–576, Dec. 2017.
- CAO, J. J.; JOHNSON, L. K.; HUNT, J. R. A Diet High in Meat Protein and Potential Renal Acid Load Increases Fractional Calcium Absorption and Urinary Calcium Excretion without Affecting Markers of Bone Resorption or Formation in Postmenopausal Women. **J. Nutr**, v. 141, n. 3, p. 391–397, Mar. 2011.

CAWTHORN, W. P. et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. **Cell Metab.**, v. 20, n. 2, p. 368-375, Aug. 2014.

CHAN, E. L.; SWAMINATHAN, R. The effect of high protein and high salt intake for 4 months on calcium and hydroxyproline excretion in normal and oophorectomized rats. **J Lab Clin Med**, v. 124, n. 1, p. 37–41, July 1994.

CEGLIA, L. et al. Potassium bicarbonate attenuates the urinary nitrogen excretion that accompanies an increase in dietary protein and may promote calcium absorption. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 94, n. 2, p. 645-653, Feb. 2009.

CLIFTON, P. Effects of a high protein diet on body weight and comorbidities associated with obesity. **Br J Nutr**, v. 108, p. S122-9, Aug. 2012.

COMPSTON, J. E. et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. **Am J Med.**, v. 124, n. 11, p. 1043-1050, Nov. 2011.

DAWSON-HUGHES, B. et al. Effect of dietary protein supplements on calcium excretion in healthy older men and women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 89, n. 3, p. 1169–1173, Mar. 2004.

DAWSON-HUGHES, B. Challenges in defining the role of dietary protein in bone health. **Am J Clin Nutr.**, v. 105, n. 6, p. 1257–1258, June 2017

DE ARAÚJO, I. M. et al. Marrow adipose tissue spectrum in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol.**, v. 176, n. 1, p. 21-30, Jan. 2017.

DE LAET, C. et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. **Osteoporos Int.**, v. 16, n. 11, p. 1330-1338, Nov. 2005.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 1, p. 2-17, Jan. 2013.

DE PAULA, F. J. A.; ROSEN, C. J. Bone Remodeling and Energy Metabolism: New Perspectives. **Bone Res.**, v. 29, n. 1, p. 72-84, Mar. 2013.

DE PAULA, F. J. A.; ROSEN, C. J. Structure and Function of Bone Marrow Adipocytes. **Compr Physiol.**, v. 12, n. 8, p. 315-349, Jan. 2018.

DE PAULA, F. J. A; ROSEN, C. J. Marrow Adipocytes: Origin, Structure, and Function. **Annu Rev Physiol.**, v. 82, p. 461-484, Feb. 2020.

DE PAULA, F. J. A. et al. The Relationship of Fat Distribution and Insulin Resistance with Lumbar Spine Bone Mass in Women. **PLoS One**, v. 10, n. 6, Jun. 2015.

DEVLIN, M. J. et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. **J Bone Miner Res.**, v. 25, p. 2078–2088, Sept. 2010.

- DOUCETTE, C. R. et al. A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice. **J Cell Physiol.**, v. 230, n. 9, p. 2032-7, Sept. 2015.
- DUDA, S. H. et al. Normal bone marrow in the sacrum of young adults: differences between the sexes seen on chemical-shift MR imaging. **AJR Am J Roentgenol.**, v. 164, n. 4, p. 935-40, Apr. 1995.
- DUQUE, G. et al. Differential Effects of Long-Term Caloric Restriction and Dietary Protein Source on Bone and Marrow Fat of the Aging Rat. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 75, n. 11, p. 2031-2036, Oct. 2020.
- ECKLUND, K. et al. Bone marrow fat content in 70 adolescent girls with anorexia nervosa: Magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy assessment. **Pediatr Radiol.**, v. 47, p. 952–962, Apr. 2017.
- ECKLUND, K. et al. Bone marrow changes in adolescent girls with anorexia nervosa. **J Bone Miner Res.**, v. 25, n. 2, p. 298-304, Feb. 2010.
- EMERY, J. L.; FOLLETT, G. F. Regression of bone-marrow hematopoiesis from the terminal digits in the foetus and infant. **Br J Haematol.**, n. 10, p. 485-489, Oct. 1964.
- FAIPOUX, R. et al. Proteins activate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. **J Nutr**, v. 138, n. 6, p. 1172-8, June 2008.
- FARIA, N. F.; SOUZA, A. A. Análise nutricional quantitativa de uma dieta da proteína destinada a todos os públicos. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v. 12, n. 10, p. 385-398, 2017.
- FAZELI, P. K. et al. Marrow fat and preadipocyte factor-1 levels decrease with recovery in women with anorexia nervosa. **J Bone Miner Res.**, v. 27, n. 9, p. 1864-71, Sept. 2012.
- FRENCH, W. W. et al. A High-Protein Diet Reduces Weight Gain, Decreases Food Intake, Decreases Liver Fat Deposition, and Improves Markers of Muscle Metabolism in Obese Zucker Rats. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 587, June 2017.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **EMBRAPA**, Corumbá, p. 1-9, maio 2006.
- GAN, S. K.; WATTS, G. F. Is adipose tissue lipolysis always an adaptive response to starvation?: implications for non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Science**, v. 114, n. 8, p. 543-545, Apr. 2008.
- GIMBLE, J. M. et al. Playing with bone and fat. **J Cell Biochem.** v. 98, n. 15, p. 251–266, May 2006.
- GOLBIDI, S. et al. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. **Curr Diab Rep**, v. 17, n. 12 p. 123, Oct. 2017.

GREER, F. R.; KREBS, N. F.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON NUTRITION. Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children, and adolescents. **Pediatrics**, v. 117, n. 2, p. 578–585, Feb. 2006.

HAILEY, D. W. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656–667, May 2010.

HANNAN, M. T. et al. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. **J Bone Miner Res**, v. 15, n. 12, p. 2504–2512, Dec. 2000.

HARDOUIN, P.; PANSINI, V.; CORTET, B. Bone marrow fat. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 4, p. 313–9, July 2014.

HATTORI, S. et al. Food restriction causes low bone strength and microarchitectural deterioration in exercised growing male rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 60, n. 1, p. 35–42, Apr. 2014.

HEILBRONN, L. K. et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 295, n. 13, p. 1539–48, Apr. 2006.

HINTON, P. S. et al. Soy protein improves tibial whole-bone and tissue-level biomechanical properties in ovariectomized and ovary-intact, low-fit female rats. **Bone Rep**, v. 8, p. 244–254, May 2018.

HUNT, J. R.; JOHNSON, L. K.; FARIBA ROUGHEAD, Z. K. Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 5, p. 1357–1365, May 2009.

HURSTING, S. D. et al. Diet and cancer prevention studies in p53-deficient mice. **J Nutr**, v. 131, n. 11, p. 3092S–3094S, Nov. 2001.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2008. p. 98.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Washington: The National Academies Press, 2005.

JÄGER, R. et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 14, n. 20, p. 1–25, June 2017.

JÉQUIER, E. Pathways to obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, p. S12–7, Sept. 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 131–148.

KARSENTY, G.; FERRON, M. The contribution of bone to whole- organism physiology. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 314-20, Jan. 2012.

KERSAHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, June 2004.

KERSTETTER, J. E.; KENNY, A. M.; INSOGNA, K. L. Dietary protein and skeletal health: a review of recente human research. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 1, p. 16-20, Feb. 2011.

KERSTETTER, J. E. et al. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 1, p. 26–31, Jan. 2005.

KERSTETTER, J. E. et al. Increased circulating concentrations of parathyroid hormone in healthy, young women consuming a protein-restricted diet. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 5, p. 1188–1196, Nov. 1997.

KHELOUFI, M. et al. Liver autophagy in anorexia nervosa and acute liver injury. **Biomed Res Int**, n. 8, Aug. 2014.

KOGA, A. et al. Portal hypertension in prolonged anorexia nervosa with laxative abuse: a case report with liver and kidney biopsy data. **Eat Weight Disord**, Apr. 2020.

LAMOTHE, J. M.; HEPPLER, R. T.; ZERNICKE, R. F. Selected contribution: bone adaptation with aging and long-term caloric restriction in Fischer 344 Brown-Norway F1-hybrid rats. **J Appl Physiol**, v. 95, n. 4, p. 1739–1745, Oct. 2003.

LANE, M. A.; INGRAM, D. K.; ROTH, G. S. Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. **Toxicol Sci**, v. 52 (2 Suppl), p. 41-48, Dec. 1999.

LEE, C.; LONGO, V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. **F1000Research**, v. 177, n. 5, Feb. 2016.

LEE, Y. H.; MOTTILLO, E. P.; GRANNEMAN, J. G. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 358-369, Mar. 2014.

LESPESSAILLES, E. et al. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 3, p. 254-61, May 2006.

LIMA, J. G. et al. Normal bone density and trabecular bone score, but high serum sclerostin in congenital generalized lipodystrophy. **Bone**, v. 101, p. 21-21, Aug. 2017.

LIU, L. et al. 17 β -estradiol attenuates ovariectomy-induced bone deterioration through the suppression of the ephA2/ephrinA2 signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 17, n. 1, p. 1609-1616, Jan. 2018.

LOU, Z. et al. miR-142-5p promotes the osteoclast differentiation of bone marrow-derived macrophages via PTEN/PI3K/AKT/FoxO1 pathway. **J Bone Miner Metab**, v. 37, n. 5, p. 815-824, Mar. 2019.

MAIR, W; DILLIN, A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 727-754, Mar. 2008.

MARDON, J. et al. Dietary Protein Supplementation Increases Peak Bone Mass Acquisition in Energy-Restricted Growing Rats. **Pediatric Research**, v. 66, n. 5, p. 513–518, June 2009.

MARDON, J. et al. Influence of high and low protein intakes on age-related bone loss in rats submitted to adequate or restricted energy conditions. **Calcif Tissue Int**, v. 82, n. 5, p. 373–382, May 2008a.

MARDON, J. et al. Impact of energy and casein or whey protein intake on bone status in a rat model of age-related bone loss. **Br J Nutr**, v. 99, n. 4, p. 764-72, Apr. 2008b.

MARGOLIS, L. M. et al. Calorie Restricted High Protein Diets Downregulate Lipogenesis and Lower Intrahepatic Triglyceride Concentrations in Male Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 571, Sept. 2016.

MAROM, R. et al. Characterization of Adhesion and Differentiation Markers of Osteogenic Marrow Stromal Cells. **J Cell Physiol**, v. 202, n. 1, p. 41-48, Jan. 2005.

MARSHALL, D.; JOHNNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **BMJ**, v. 312, n. 7041, p. 1254-9, May 1996.

METZ, J. A.; ANDERSON, J. J.; GALLAGHER, P. N. JR. Intakes of calcium, phosphorus, and protein, and physical-activity level are related to radial bone mass in young adult women. **Am J Clin Nutr**, v. 58, p. 537–542, Apr. 1993.

MISRA, M. et al. Regional body composition in adolescents with anorexia nervosa and changes with weight recovery. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 6, p. 1361–1367, June 2003.

MOLLER, L. et al. Fasting in healthy subjects is associated with intrahepatic accumulation of lipids as assessed by ¹H-magnetic resonance spectroscopy. **Clinical Science**, v. 114, n. 8, p. 547-552, Apr. 2008.

MORAIS, G. Q.; BURGOS, M. G. P de A. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. **Rev Bras Ortop**, v. 42, n. 7, p. 189-94, July 2007.

NARITA, T. et al. Differential response to caloric restriction of retroperitoneal, epididymal, and subcutaneous adipose tissue depots in rats. **Exp Gerontol**, v. 104, p. 127-137, Apr. 2018.

NARAYANAN, V. et al. Liver function test abnormalities in anorexia nervosa—cause or effect. **Int J Eating Disord**, v. 43, n. 4, p. 378–381, May 2010.

OKITA, N. et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. **Mech Ageing Dev**, v. 133, n. 5, p. 255-66, May 2012.

PARREIRAS E SILVA, L. T. et al. Short bowel syndrome: influence of nutritional therapy and incretin GLP1 on bone marrow adipose tissue. **Ann N Y Acad Sci**, v. 141, n. 1, p. 47-56, Mar. 2018.

PEREIRA, F. A. et al. Etiopathogenesis of hepatic osteodystrophy in Wistar rats with cholestatic liver disease. **Calcif Tissue Int**, v. 85, n. 1, p. 75-83, July 2009.

PETERSEN, K. F. et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. **J Clin Invest**, v. 109, n. 10, p. 1345-1350, May 2002.

PREMAOR M. O. et al. Obesity and fractures in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 2, p. 292-297, Feb. 2010.

PHILIPPI, S. T. et al. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos adapted food pyramid: a guide for a right food choice. **Rev. Nutr**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 65-80, jan./abr. 1999.

PUPOVAC, J.; ANDERSON, G. H. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. **J Nutr**, v. 132, n. 9, p. 2775-80, Sept. 2002.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

REID, I. R. Fat and Bone. **Arch Biochem Biophys**, v. 503, n. 1, p. 20-27, Nov. 2010.

REYNOLDS, A. N.; AKERMAN, A. P.; MANN, J. Dietary fibre and whole grains in diabetes management: Systematic review and meta-analyses. **PLoS Med**, v. 17, n. 3, p. 1-22, Mar. 2020.

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J. P.; CHEVALLEY, T. Dietary protein intakes and bone growth. **Int Congr Ser**, v. 1297, p. 50-59, Mar. 2007.

ROBERTSON, K. L.; ROWLAND, N. E.; KRIGBAUM, J. Effects of caloric restriction on nitrogen and carbon stable isotope ratios in adult rat bone. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 28, n. 19, p. 2065-2074, Oct. 2014.

ROMERO, M. D. M. et al. Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in white adipose tissue sites in the rat. **Cardiovasc Diabetol**, v. 30, n. 8, p. 8-42, July 2009.

ROUGHEAD, Z. K. et al. Controlled high meat diets do not affect calcium retention or indices of bone status in healthy postmenopausal women. **J Nutr**, v. 133, n. 4, p. 1020-1026, Apr. 2003.

ROSEN, E. et al. Hepatic Complications of Anorexia Nervosa. **Dig Dis Sci**, v. 62, n. 11, p. 2977-2981, Nov. 2017.

ROTH, G. S. et al. Biomarkers of Caloric Restriction May Predict Longevity in Humans. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 811, Aug. 2002.

RYLANDER, R. et al. Acid-base status affects renal magnesium losses in healthy, elderly persons. **J Nutr**, v. 136, n. 9, p. 2374-2377, Sept. 2006.

- SAHNI, S. et al. Protective effect of high protein and calcium intake on the risk of hip fracture in the Framingham Offspring Cohort. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 12, p. 2770-2776, Dec. 2010.
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**, v. 126, n. 1, p. 12-22, Jan. 2016.
- SANDERSON, J. P. et al. Influence of fat intake and caloric restriction on bone in aging male rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 52, n. 1, p. B20–B25, Jan. 1997.
- SCHELLER, E. L. et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. **Nat Commun**, v. 6, n. 7808, p. 1-13, Aug. 2015.
- SCHELLER, E. L.; ROSEN, C. J. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1311, n. 1, p. 14-30, Apr. 2014.
- SCHOETTL, T.; FISCHER, I. P.; USSAR, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **J Exp Biol**, v. 221, Mar. 2018.
- SCHÜRCH, M. A. et al. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 128, n. 10, p. 801-9, May 1998.
- SILVA, Z. N. **Efeito da Dieta da Proteína no metabolismo ósseo em ratas Wistar Adultas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.
- SINGH, A. et al. Immunoregulation of bone remodelling. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 2, n. 2, p. 75–81, May/Aug. 2012.
- SOUNG, D. Y. et al. Soy affects trabecular microarchitecture and favorably alters select bone-specific gene expressions in a male rat model of osteoporosis. **Calcif Tissue Int**, v. 78, n. 6, p. 385-391, June 2006.
- SOLON-BIET, S. M. et al. Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice. **Cell Rep**, v. 11, n. 10, p. 1529-34, June 2015.
- TAKADA, Y. et al. Whey Protein Suppresses the Osteoclast-mediated Bone Resorption and Osteoclast Cell Formation. **Int. Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 821-825, Nov. 1997.
- TALBOTT, S. M.; ROTHKOPF, M. M.; SHAPSES, S. A. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in younger and older female rats. **J Nutr**, v. 128, n. 3, p. 640–645, Mar. 1998.
- TRAYHURN, P. Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. **Biochimie**, v. 134, p. 62-70, Mar. 2017.

THISSEN, J. P.; KETELSLEGERS, J. M.; UNDERWOOD, L. E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr Rev**, v. 15, n. 1, p. 80–101, Feb. 1994.

VANDE BERG, B. C. et al. Fat conversion of femoral marrow in glucocorticoid-treated patients: a cross-sectional and longitudinal study with magnetic resonance imaging. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 7, p. 1405–1411, July 1999.

VILLAREAL, D. T. et al. Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 1, p. 40–51, Jan. 2016.

WALDÉN, T. B. et al. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 1, p. E19–E31, Jan. 2012.

WANG, L. et al. High-protein diet improves sensitivity to cholecystokinin and shifts the cecal microbiome without altering brain inflammation in diet-induced obesity in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 313, n. 4, p. R473–R486, Oct. 2017.

WEISS, R. Fat distribution and storage: how much, where, and how?. **European Journal Endocrinology**, v. 157, p. 39–45, Aug. 2007.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; LEMMENS, S. G.; WESTERTERP, K. R. Dietary protein - its role in satiety, energetics, weight loss and health. **Br J Nutr**, v. 108, p. S105–S112, Aug. 2012.

WITJAKSONO, F. et al. Comparison of low calorie high protein and low calorie standard protein diet on waist circumference of adults with visceral obesity and weight cycling. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 674, p. 1–5, Sept. 2018.

WILLIAMS, E. A. et al. Carbohydrate versus energy restriction: effects on weight loss, body composition and metabolism. **Ann Nutr Metab**, v. 51, n. 3, p. 232–43, June 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis**: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. WHO technical Report Series, 843, p. 1–130, Geneva, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Defining the problem of overweight and obesity. In: World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a Who Consultation**. WHO Technical Report Series, 894, p. 252, Geneva, 2000.

WOLFE, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 84, n. 3, p. 475–482, Sept. 2006.

YAMANAKA, J. S. A high-fat diet can affect bone healing in growing rats. **J Bone Miner Metab**, v. 36, n. 3, p. 255–263, May 2018.

YONESHIRO, T. et al. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 1, p. 13–16, Jan. 2011.

YU, E. W. Bone metabolism after bariatric surgery. **J Bone Miner Res**, v. 29, n. 7, p. 1507–1518, July 2014.

YU, K. et al. The impact of soluble dietary fibre on gastric emptying, postprandial blood glucose and insulin in patients with type 2 diabetes. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 23, n. 2, p. 210–8, June 2014.

APÊNDICE A – Tabelas Suplementares

Tabela A1 – Peso corporal (g) dos três grupos de animais (n=10/grupo) durante oito semanas do período experimental.

Períodos	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV
Basal	188 ± 13,35	192 ± 8,02	189 ± 11,50
1ª semana (g)	197 ± 15,22	188 ± 8,39	183 ± 10,30
2ª semana (g)	206 ± 17,48 &	187 ± 9,23 * **	179 ± 10,58 ¶ ¶¶
3ª semana (g)	217 ± 20,54	190 ± 10,64 *	180 ± 11,65 ¶
4ª semana (g)	222 ± 19,76	191 ± 10,69 *	181 ± 9,99 ¶
5ª semana (g)	226 ± 20,04 &	190 ± 10,71 *	180 ± 13,19 ¶ ¶¶
6ª semana (g)	229 ± 23,29	193 ± 11,20 *	183 ± 12,95 ¶
7ª semana (g)	233 ± 22,62	193 ± 11,01 *	182 ± 12,33 ¶
8ª semana (g)	235 ± 21,66 &	193 ± 12,08 *	181 ± 13,17 ¶ ¶¶

Abreviaturas: g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40% grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

& = significa diferença estatística no GC em relação ao seu peso basal p<0,05.

* = significa diferença estatística entre o grupo GR30% vs GC, p<0,05.

** = significa diferença estatística no GR30% em relação ao seu peso basal p<0,05.

¶ = significa diferença estatística entre o GRH40% vs GC, p<0,05.

¶¶ = significa diferença estatística no GRH40% em relação ao seu peso basal p<0,05.

Fonte: próprio autor.

Tabela A2 – Peso corporal (g) e dos tecidos adiposos branco, marrom e fígado expressos em peso absoluto (g) e relativo (peso/100g de peso) dos três grupos experimentais (n=10/grupo).

Peso corporal e tecidos	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV	p valor
Peso corporal final (g)	235 ± 21,66	193 ± 12,08 *	181 ± 13,17 ¶	0,0001
sTAB (g)	3,27 ± 0,66	2,09 ± 0,63 *	1,78 ± 0,64 ¶	0,0014
sTAB (peso/100g de peso)	1,26 ± 0,50	1,07 ± 0,27 *	0,97 ± 0,31 ¶	0,0061
rTAB (g)	2,70 ± 0,97	1,02 ± 0,58 *	0,78 ± 0,65 ¶	0,0003
rTAB (peso/100g de peso)	1,14 ± 0,34	0,51 ± 0,27 *	0,42 ± 0,33 ¶	0,0000
TAM (g)	0,28 ± 0,09	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,04 ¶	0,0019
TAM (peso/100g de peso)	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02 ¶	0,0057
Fígado (g)	6,26 ± 1,13	4,28 ± 0,62 *	4,23 ± 0,54 ¶	0,0015
Fígado (peso/100g de peso)	2,67 ± 0,46	2,21 ± 0,26 *	2,33 ± 0,17	0,0082

p valor: teste *one-way* ANOVA.

Abreviaturas: g: gramas; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40% grupo hiperproteico; TAB: tecido adiposo branco; sTAB: subcutâneo; rTAB: retroperitoneal; TAM: tecido adiposo marrom; DV: desvio padrão.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), p<0,05.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), p<0,05.

Fonte: próprio autor.

Tabela A3 – Parâmetros de glicemia (mg/dL) dos três grupos experimentais (n=10/grupo) nos períodos basal, 2ª, 5ª e 8ª semana do período experimental.

Períodos	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV
Basal (mg/dL)	120 ± 13,55	123 ± 15,65 #	111 ± 5,46
2ª semana (mg/dL)	123 ± 10,78	112 ± 13,11 * ** #	98 ± 10,36 ¶ ¶¶
5ª semana (mg/dL)	126 ± 7,84	99 ± 6,00 * **	92 ± 13,17 ¶ ¶¶
8ª semana (mg/dL)	117 ± 7,01	94 ± 8,97 * **	91 ± 12,19 ¶ ¶¶

Abreviaturas: mg/dL: miligramas por decilitro; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40% grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

* = significa diferença estatística entre o grupo de restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.
 ** = significa diferença estatística no GR30% em relação à glicemia basal, $p < 0,05$.
 ¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.
 ¶¶ = significa diferença estatística no GRH40% em relação à glicemia basal, $p < 0,05$.
 # = significa diferença estatística entre o grupo de restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%).
 $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

Tabela A4 – Parâmetros histomorfométricos analisados nas tíbias diretas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).

Parâmetros Ósseos	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV	p valor
BV/TV (%)	42,20 ± 5,66	27,43 ± 4,48 *	23,48 ± 9,97 ¶	0,0009
Tb.N (n°/mm ²)	4,84 ± 0,37	3,39 ± 0,70 *	2,87 ± 0,74 ¶	0,0002
Tb.Sp (µm)	120,68 ± 20,66	222,92 ± 51,27 *	287,88 ± 101,44 ¶	0,0021
Tb.Th (µm)	86,96 ± 6,95	82,09 ± 11,10	79,24 ± 16,74	0,5574
Nob/Tar (/mm, mm ²)	8,81 ± 1,56	7,70 ± 1,71 #	3,95 ± 1,31 ¶	0,0002
Noc/Tar (/mm, mm ²)	2,54 ± 0,75	1,45 ± 0,71 *	1,63 ± 0,28	0,0181

p valor: teste *one-way* ANOVA.

Abreviaturas: BV/TV= volume ósseo/volume total; %: porcentagem; Tb.N= número de trabéculas; Tb.Sp= separação trabecular; Tb.Th= espessura trabecular; n°: número; mm²: milímetro quadrado; µm: micrômetro; Nob/Tar= número de osteoblastos; Noc/Tar= número de osteoclastos; mm: milímetro; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

* = significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

= significa diferença estatística entre o grupo restrição (GR30%) vs grupo hiperproteico (GRH40%), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

Tabela A5 – Parâmetros de DMO (g/cm²) e CMO (g) das áreas proximal e medial das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).

Parâmetros	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV	p valor
DMO Tíbia Proximal (g/cm ²)	0,175 ± 0,02	0,159 ± 0,02	0,142 ± 0,02 ¶	0,0498
DMO Tíbia Medial (g/cm ²)	0,169 ± 0,01	0,172 ± 0,02	0,151 ± 0,01	0,0672
CMO Tíbia Proximal (g)	0,013 ± 0,00	0,012 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,0775
CMO Tíbia Medial (g)	0,009 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,008 ± 0,00	0,2500

p valor: teste *one-way* ANOVA.

Abreviaturas: g: gramas; cm²: centímetro quadrado; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

Tabela A6 – Parâmetros de comprimento (mm) e peso (g) das tíbias esquerdas dos três grupos experimentais (n=6/grupo).

Parâmetros	GC Média ± DV	GR30% Média ± DV	GRH40% Média ± DV	p valor
Comprimento (mm)	37,93 ± 1,31	36,91 ± 0,81	36,85 ± 0,63	0,2291
Peso (g)	0,68 ± 0,07	0,58 ± 0,04	0,50 ± 0,02 ¶	0,0012

p valor: teste *one-way* ANOVA.

Abreviaturas: g: gramas; mm: milímetro; GC: grupo controle; GR30%: grupo restrição; GRH40%: grupo hiperproteico; DV: desvio padrão.

¶ = significa diferença estatística entre o grupo hiperproteico (GRH40%) vs grupo controle (GC), $p < 0,05$.

Fonte: próprio autor.

ANEXO A – Aprovação pela Comissão Ética no Uso de Animais

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado *"Impacto da dieta hiperproteica sobre o tecido ósseo e a adiposidade da medula óssea em ratos submetidos à restrição alimentar"*, registrado com o número 083/2018, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Jose Albuquerque de Paula**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *fillo Chordata, subfillo 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 26 de novembro de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 30 ratos Wistar-OLD fêmeas pesando 200g oriundos do ICB - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/11/2018 a 16/07/2019.

We certify that the Protocol nº 083/2018, entitled *"Impact of hyperproteic diet on bone tissue and adiposity of bone marrow in rats submitted to food restriction"*, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for 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 11/26/2018. 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 30 female Wistar -OLD rats weighing 200g from the ICB - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/16/2019.

Ribeirão Preto, 26 de novembro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP-USP