

---

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

**IARA INÁCIO BOTEGA**

**Realimentação e consolidação óssea em ratos desnutridos**

**Ribeirão Preto  
2023**

---

---

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

IARA INÁCIO BOTEGA

**Realimentação e consolidação óssea em ratos desnutridos**

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

Orientador: Prof. Dr. José Batista Volpon.

**Ribeirão Preto  
2023**

---

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Botega, Iara Inácio.  
Realimentação e consolidação óssea em ratos desnutridos.  
Ribeirão Preto, 2023.  
136 f.: Il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto/USP.  
Orientador: Volpon, José Batista.

1. Desnutrição. 2. Osteoporose. 3. Fraturas ósseas. 4. Calo ósseo.  
5. Ratos.

---

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

---

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Iara Inácio Botega

Título: Realimentação e consolidação óssea em ratos desnutridos.

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

---

---

# *DEDICATÓRIA*

---

---

***A Deus,***

*Por me guiar em todos os momentos e pela força concedida nesta trajetória.*

***Aos meus pais, Sidney Ângelo Botega e Genilda Inácio Botega***

*Que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida e sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos. Agradeço pelo amor incondicional, por todas as renúncias feitas para me ajudar, pelo cuidado e carinho. A vocês devo tudo que sou.*

***Aos meus irmãos, Ivan Inácio Botega e Ilton Antônio Botega***

*Pelo apoio, incentivo e amizade. Por se alegrarem com minhas conquistas e sempre estarem ao meu lado. Vocês sempre serão meus maiores exemplos.*

***Ao meu noivo, Denis Bignardi***

*Pelo amor, companheirismo e compreensão. Por ser o meu ponto de paz e oferecer tranquilidade em todas as situações. Sua amizade e carinho fizeram diferença para a conclusão deste trabalho.*

***Aos meus sobrinhos, Cecília Ferreira Botega, Guilherme Sponchiado Botega e Ísis Sponchiado Botega***

*Por preencherem minha vida com amor, por alegrar meus dias e serem minha maior inspiração.*

**Dedico este trabalho**

---

---

# *AGRADECIMENTOS*

---



---

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*Ao professor **Dr. José B. Volpon**, por sua importante orientação nesta Tese e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, serei sempre grata por ter me proporcionado a oportunidade de crescer academicamente. Obrigada por toda paciência e compreensão, levarei para sempre comigo todos os aprendizados. Meus sinceros agradecimentos.*

---

---

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, pela oportunidade, especificamente ao **Prof. Dr. Luís Vicente Garcia** e ao **Prof. Dr. Carlos Fernando P. S. Herrero**. À secretária, **Rita de Cássia Stela Cossalter**, que sempre me foi muito prestativa na orientação geral das normas e procedimentos do programa.

À **Dra. Ariane Zamarioli**, que foi a porta de entrada ao programa de pós-graduação, dando oportunidade de cursar o mestrado e posteriormente o doutorado, auxiliando-me e orientando-me na realização destes trabalhos.

Ao professor **Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior**, pela orientação quanto a dieta restritiva, por ser solícito e ajudar no estabelecimento da metodologia aplicada.

Aos funcionários do laboratório de bioengenharia da FMRP/USP: **Francisco Carlos Mazzocato, Ismar Ribeiro e Maria Teresinha de Moraes**. Obrigada pela ótima convivência e ajuda prestada do início ao fim do doutorado.

Aos amigos de laboratório: **Ana Clara de Oliveira, Bruna Leonel Carlos, Jéssica Suzuki Yamanaka, Leonardo Rigobello Battaglion e Suelen Albertini**, pelo auxílio com os procedimentos deste trabalho, convivência e risadas.

À **Patrícia Madalena San Gregório Guedes**, pela amizade e parceria. Foram 13 anos de convivência entre graduação, mestrado e doutorado, construímos juntas a nossa carreira profissional, nesta jornada dividimos não só os nossos sofrimentos, dificuldades e tristezas, mas também muitos momentos de alegria e várias conquistas. Obrigada por tudo!

À **Dra. Roberta Carminati Shimano**, que ao longo do tempo, tornou-se uma grande parceira de pesquisa. Obrigada pela ajuda com o procedimento experimental, análises e por sempre ser prestativa, grande parte deste trabalho contou com sua ajuda. Obrigada.

Ao professor **Dr. Antônio Carlos Shimano**, pelos ensinamentos e colaboração na realização da parte técnica desta pesquisa.

À professora **Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela disponibilização do laboratório onde realizei parte da análise histológica,

---

---

*bem como aos técnicos: **Marco Antônio dos Santos e Nilza Letícia Magalhães**, pela ajuda na análise histológica.*

*Ao professor **Dr. João Paulo Mardegan Issa** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela colaboração e ensinamentos sobre a análise histológica. Ao técnico **Dimitrius Leonardo Pitol** do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela contribuição com a análise histológica.*

*À **Dra. Ana Paula Macedo**, pela importante contribuição na realização do ensaio mecânico.*

*Ao professor **Dr. João Paulo Bianchi Ximenez**, pela importante colaboração em todas as etapas referente à análise estatística.*

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

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

---

---

*“Faça o teu melhor,  
na condição que você tem,  
enquanto você não tem condições  
melhores, para fazer melhor ainda!”.*

*Mário Sérgio Cortella*

---

---

*RESUMO*

---

---

## RESUMO

BOTEGA, I. I. **Realimentação e consolidação óssea em ratos desnutridos**. 2023. 136 f. Tese [Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023.

*Fundamento:* A ingestão nutricional adequada desempenha papel crucial na maximização da aquisição esquelética, enquanto a desnutrição é uma condição bem documentada que está associada à má qualidade óssea.

*Justificativa:* Embora os efeitos da nutrição na consolidação da fratura tenham sido estudados, ainda há uma compreensão limitada dos mecanismos específicos afetados pela restrição alimentar e melhorados pela realimentação.

*Objetivo:* Avaliar o impacto da restrição alimentar e realimentação no processo de consolidação óssea e qualidade do calo ósseo.

*Material e Métodos:* Foram utilizados 94 ratos machos Wistar Hannover, com massa corporal inicial de aproximadamente 60 gramas, divididos em três grupos experimentais: (1) CON: ratos controle submetidos somente à fratura óssea; (2) DFD (desnutrição-fratura-desnutrição): ratos submetidos à restrição alimentar e após a fratura óssea continuaram com a mesma dieta restritiva e; (3) DFR (desnutrição-fratura-realimentação): ratos submetidos à restrição alimentar e após a fratura óssea foram realimentados com a dieta normal. Os dois primeiros grupos foram subdivididos em dois e o último em quatro, totalizando oito subgrupos. Os subgrupos se diferenciaram de acordo como período de observação pós-fratura; 5 dias, 2, 4 e 6 semanas, correspondentes, ao período em que a cadeia de eventos do processo de consolidação óssea está mais ativa, e às fases de calo ósseo mole, calo ósseo duro e remodelação óssea, respectivamente. Durante o experimento, os animais foram alojados em gaiolas individuais. A restrição alimentar foi de 50% em relação à ingesta dos controles, imposta por seis semanas a partir do desmame. A fratura foi realizada na diáfise femoral pelo método fechado e fixada com implante intramedular. Ao término do período experimental, os ossos foram submetidos às análises macroscópica, microtomográfica (avaliação qualitativa e quantitativa do calo ósseo), densitométrica (DXA), histomorfométrica (quantificação de tecido neoformado, colágeno e osteoclastos), imunoistoquímica (RANK, RANKL e OPG), de expressão gênica (*Col1a1*, *SP7*, *IGF1* e *Runx-2*) e resistência mecânica. O nível de significância estatística foi de 5%.

*Resultados:* A restrição alimentar resultou em alterações fenotípicas significativas no calo ósseo, caracterizadas por deterioração da microestrutura, redução da deposição de colágeno, densidade mineral óssea e resistência mecânica. Além disso, uma maior taxa de osso imaturo indicou atraso observado no processo de remodelação. Por outro lado, a realimentação estimulou a formação de calo ósseo, reduziu a reabsorção local e restaurou efetivamente as alterações microestruturais e mecânicas causadas pela restrição alimentar. Apesar desses efeitos positivos, a densidade do calo ósseo permaneceu inalterada e a análise da expressão gênica não evidenciou diferenças significativas entre os grupos CON, DFD e DFR 5 dias após a fratura óssea.

*Conclusão:* A restrição alimentar afetou negativamente a consolidação óssea. No entanto, esses efeitos foram parcialmente revertidos pela realimentação. Com base nesses achados, novas pesquisas podem ser desenvolvidas para criar estratégias nutricionais direcionadas para tratar e melhorar a consolidação de fraturas.

**Palavras-chave:** Desnutrição. Osteoporose. Fraturas ósseas. Calo ósseo. Ratos.

---

---

*ABSTRACT*

---

---

## ABSTRACT

BOTEGA, I. I. **Refeeding and bone healing in rats undernourished.** 2023. 136 s. Thesis [Doctorate degree]. Ribeirao Preto: University of Sao Paulo, Ribeirao Preto Medical School, 2023.

*Background:* Adequate nutritional intake plays a crucial role in maximizing skeletal acquisition, while undernutrition is a well-documented condition associated with poor bone quality.

*Justification:* Although the effects of nutrition on fracture healing have been studied, there is still limited understanding of the specific mechanisms affected by food restriction and improved with refeeding.

*Purpose:* To assess the impact of food restriction and refeeding on the bone healing process and quality of bone callus.

*Materials and methods:* Ninety-four male Wistar Hannover rats, weighing approximately 60 grams, were divided into three experimental groups: (1) CON: control rats subjected to bone fracture; (2) UFU (undernutrition-fracture-undernutrition): rats subjected to food restriction and maintained on the same restricted diet after bone fracture; and (3) UFR (undernutrition-fracture-refeeding): rats subjected to food restriction and re-fed with a normal diet after bone fracture. The first two groups were further subdivided into two, and the last group into four, totaling eight subgroups. The subgroups differed according to the post-fracture observation period: 5 days, 2, 4, and 6 weeks, corresponding to the periods when the chain of events in the bone healing process is most active, and to the stages of soft bone callus, hard bone callus, and bone remodeling, respectively. Throughout the experiment, the animals were housed individually in cages. Food restriction was set at 50% of the control group's intake, maintained for six weeks starting from weaning. The femoral shaft fracture was performed using a closed method and fixed with an intramedullary implant. At the end of the experimental period, the bones were subjected to macroscopic analysis, microtomography (qualitative and quantitative analysis of the bone callus), densitometry (DXA), histomorphometry (quantity of newly formed bone, collagen deposition, and osteoclasts), immunohistochemistry (RANK, RANKL and OPG), gene expression assessment (*Col1a1*, *SP7*, *IGF1* and *Runx-2*), and mechanical test. Statistical significance was set at 5%.

*Results:* Food restriction resulted in significant phenotypic changes in the bone callus, characterized by deterioration in microstructure, reduced collagen deposition, bone mineral density, and mechanical strength. Moreover, a higher rate of immature bone indicated an observed delay in the remodeling process. On the other hand, refeeding stimulated bone callus formation, reduced local resorption, and effectively restored the microstructural and mechanical changes caused by food restriction. Despite these positive effects, the density of the bone callus remained unimproved, and gene expression analysis did not evidence any significant difference among the CON, UFU, and UFR groups 5 days post-fracture.

*Conclusion:* Food restriction had detrimental effects on osseous healing. However, these effects can be partially improved by refeeding. Based on these findings, new research can be developed to create targeted nutritional strategies to treat and improve fracture healing.

**Keywords:** Malnutrition. Osteoporosis. Bone fractures. Bony callus. Rats.

---



---

# *LISTA DE FIGURAS*

---

---

Figura 1- Diagrama da divisão dos grupos e subgrupos.....	47
Figura 2- Representação esquemática do desenho experimental.....	49
Figura 3- Alavanca inter-resistente desenvolvida para confecção da fratura. ....	50
Figura 4- Sequência dos principais passos técnicos para produção e fixação da fratura. ....	51
Figura 5- Radiografia em incidência em perfil realizada após o término da cirurgia para avaliação final da adequação da fratura, sua localização e fixação.....	52
Figura 6- Sequência radiográfica para acompanhamento da consolidação da fratura. ....	53
Figura 7- Posicionamento dos ossos na plataforma para realização da densitometria óssea. ....	54
Figura 8- Análise densitométrica para determinação da DMO, CMO e área do calo. ....	55
Figura 9- Imagens coradas com tricrômico de Masson. ....	56
Figura 10- Fotomicrografias sob luz polarizada do calo ósseo.....	57
Figura 11- Imagens coradas com TRAP. ....	58
Figura 12- Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcção de OPG (A), RANK (B) e RANKL (C). As marcações positivas estão indicadas pelas setas.....	59
Figura 13- Ilustração da região do calo ósseo selecionada.....	61
Figura 14- Etapas para fixação das extremidades femorais para o ensaio de torção.....	62
Figura 15- Ensaio mecânico de torção. ....	63
Figura 16- Curvas da evolução da massa corporal dos grupos experimentais. ....	68
Figura 17- Comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo entre os grupos seis semanas pós-fratura. ....	70
Figura 18- Comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo entre os grupos realimentados pós-fratura. ....	71
Figura 19- Cortes histológicos longitudinais do calo ósseo.....	72
Figura 20- Cortes histológicos longitudinais do calo ósseo corados com <i>picrosirius red</i> . ....	73
Figura 21- Porcentual de tecido ósseo neoformado obtido por meio da razão da área de osso pela área total. ....	74
Figura 22- Porcentual de tecido ósseo neoformado nos subgrupos realimentados. ....	74
Figura 23- Fotomicrografia do tecido neoformado na região da fratura.....	75

---

---

Figura 24- Fotomicrografia das fibras de colágeno expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado sob luz polarizada, na região do calo ósseo.....	76
Figura 25- O gráfico mostra o percentual da área de colágeno na região do calo ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total.....	77
Figura 26- O gráfico mostra o percentual da área de colágeno na região do calo ósseo entre os animais realimentados, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total. ....	77
Figura 27- Gráfico com a quantificação da atividade osteoclástica dos grupos seguidos por 6 semanas pós-fratura, obtida por imagens histológicas coradas com TRAP.....	78
Figura 28- Fotomicrografia da área de reabsorção do calo ósseo seis semanas pós-fratura.....	79
Figura 29- Gráfico com a quantificação da atividade osteoclástica dos subgrupos realimentados acompanhados por 2, 4 e 6 semanas pós-fratura, obtida por imagens histológicas coradas com TRAP. ....	79
Figura 30- Os gráficos mostram o percentual da área de imunomarcação positiva para RANK, RANKL e OPG em todos os subgrupos avaliados.....	81
Figura 31- A figura apresenta a área de imunomarcação positiva para RANK, RANKL e OPG, indicadas por setas verdes. ....	82
Figura 32- Imagens do calo ósseo obtidas pelo $\mu$ CT. ....	83
Figura 33- Análise quantitativa da microestrutura do calo ósseo obtida pela microtomografia computadorizada. ....	84
Figura 34- Índice de modelo estrutural do calo ósseo entre os grupos.....	86
Figura 35- Parâmetros avaliados pelo ensaio mecânico de torção 6 semanas pós-fratura. ....	87
Figura 36- Parâmetros avaliados pelo ensaio mecânico de torção nos subgrupos realimentados.....	88
Figura 37- Expressão gênica na consolidação óssea. ....	89

---

---

# *LISTA DE QUADRO*

---

---

Quadro 1- Caracterização dos grupos experimentais .....	48
---	----

---

---

# *LISTA DE TABELA*

---

---

Tabela 1- Mensurações dos fêmures 6 semanas pós-fratura (média $\pm$ DP). .....	69
Tabela 2- Mensurações dos fêmures dos subgrupos realimentados pós-fratura (média $\pm$ DP).....	69
Tabela 3- Análise quantitativa da microestrutura do calo ósseo obtida pela microtomografia computadorizada (média $\pm$ DP).....	85

---

---

*LISTA DE ABREVIATURAS  
E SIGLAS*

---



---

ASBMR: *American Society for Bone and Mineral Research*

B.Ar: Área de osso

BMPs: Proteínas morfogenéticas ósseas

BV: Volume ósseo

CETEA: Comitê de Ética de Experimentação Animal

ConnD- Densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas

CON: Grupo controle

CMO: Conteúdo mineral ósseo

Col1: Colágeno tipo 1

Col1a1: Colágeno tipo1, alfa 1a

Col3: Colágeno tipo 3

Col.Ar: Área de colágeno

Ct: *threshold cycle*

cDNA: DNA complementar

DAB: Diaminobenzidina

DEPC: Dietilpirocarbonato

DFD: Desnutrição/fratura/desnutrição

DFR: Desnutrição/fratura/realimentação

DMO: Densidade mineral óssea

DP: Desvio padrão

DXA: Densitometria óssea com dupla emissão de raios X

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

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

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

GaPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

HE: Hematoxilina-Eosina

HRP: *horseradish peroxidase*

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

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

M-CSF: Fator de estimulação de colônias de macrófagos

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: Cloreto de sódio

---

---

OMS: Organização Mundial da Saúde  
OPG: Osteoprotegerina  
PBS: Salina tamponada com fosfato  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
PDGF: Fator de crescimento derivados de plaquetas  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
RANK: Receptor ativador do fator nuclear kappa B  
RANK-L: Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B  
Runx2: Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2  
RA: Restrição Alimentar  
SMI: Índice de modelo estrutural  
Tb.N: Número de trabéculas ósseas  
Tb.Th: Espessura das trabéculas ósseas  
Tb.Sp: Espaçamento entre as trabéculas ósseas  
TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento beta  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  
TRAP: Fosfatase ácida resistente ao tartarato  
Tt.Ar: Área total  
TV: Volume total  
USP: Universidade de São Paulo  
 $\mu$ -CT: Microtomografia computadorizada  
2D: bidimensional  
3D: tridimensional

---

---

*LISTA DE SÍMBOLO E  
UNIDADE*

---

---

°: grau  
°C: grau Celsius  
°/min: grau por minuto  
%: porcentagem  
cm: centímetro  
cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado  
g: grama  
kg: quilograma  
kV: quilovolt  
J: Joule  
mJ: milijoule  
mg: miligrama  
mg/kg: miligrama por quilograma  
mL: mililitro  
mm: milímetro  
mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico  
ms: milissegundo  
nm: nanômetro  
Mp: megapixel  
N: Newton  
N/m: Newton por metro  
μA: microampere  
μg: micrograma  
μL: microlitro  
μm: micrômetro  
μm<sup>2</sup>: micrômetro ao quadrado  
rpm: rotação por minuto  
V: volt

---

---

# *SUMÁRIO*

---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>33</b>
1.1	Desnutrição	34
1.2	Tecido Ósseo e Remodelação	35
1.3	Consolidação óssea normal	36
1.4	Consolidação óssea na desnutrição e na dieta enriquecida	38
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
4.1	Tipo de estudo	46
4.2	Animais experimentais	46
4.3	Grupos experimentais	46
4.4	Procedimento experimental: Dieta Padrão e Restrição Alimentar	48
4.5	Procedimento experimental: produção da fratura do fêmur	50
4.6	Eutanásia e coleta de amostras	53
4.6.1	<i>Mensuração macroscópica</i>	53
4.6.2	<i>Análise Densitométrica</i>	54
4.6.3	<i>Análise Histológica</i>	55
4.6.3.1	<i>Quantificação do osso neoformado</i>	56
4.6.3.2	<i>Quantificação do colágeno no calo ósseo</i>	57
4.6.3.3	<i>Quantificação da atividade de reabsorção no calo ósseo</i>	57
4.6.4	<i>Análise Imunoistoquímica</i>	58
4.6.4.1	<i>Quantificação dos imunomarcadores</i>	59
4.6.5	<i>Microtomografia computadorizada (<math>\mu</math>-CT)</i>	59
4.6.5.1	<i>Análise da microarquitetura do calo ósseo</i>	60
4.6.6	<i>Análise mecânica</i>	61
4.6.7	<i>Análise molecular</i>	63
4.6.7.1	<i>Extração e quantificação do RNA</i>	63
4.6.7.2	<i>Verificação da integridade do RNA</i>	64
4.6.7.3	<i>Sintetização do cDNA</i>	64
4.6.7.4	<i>Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)</i>	65
4.6.7.5	<i>Cálculo da expressão relativa do gene</i>	65
4.7	<i>Análise dos dados</i>	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>67</b>
5.1	Massa Corporal	67
5.2	Análise morfométrica	68
5.3	Densitometria óssea	70
5.4	Microscopia óptica	71
5.4.1	<i>Volume de osso neoformado</i>	73
5.4.2	<i>Fibras de colágeno no calo ósseo</i>	75
5.4.3	<i>Atividade osteoclástica no calo ósseo</i>	78
5.5	Imunoistoquímica	80
5.6	Microarquitetura do calo ósseo	82
5.7	Ensaio Mecânico	86
5.8	Biologia Molecular	88
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>

---

---

6.1	Resposta regenerativa .....	93
7	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS .....	99
	ANEXO.....	105
	APÊNDICES.....	107
	MANUSCRITO .....	111

---

---

# *INTRODUÇÃO*

---



## 1 INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas são eventos de grande relevância, frequentemente desencadeados por incidentes traumáticos, com sobrecargas significativas nos âmbitos financeiro, físico e psicológico (1). Tais ocorrências encontram-se frequentemente associadas a acidentes de trânsito e à violência geral na sociedade. Além disso, o aumento do número de fraturas patológicas também está ligado ao melhor manejo das doenças crônicas que antes eram fatais, e ao aumento da expectativa de vida que contribuem para o crescimento da população afetada pela osteoporose.

Maximizar a aquisição de massa óssea durante a maturação esquelética é de suma importância para atenuar as taxas de fratura ao longo da vida adulta e na senescência. Vários fatores contribuem significativamente para o incremento da massa esquelética, incluindo fatores hereditários e condições ambientais como a adequada ingestão nutricional (2,3). Por outro lado, a desnutrição tem sido associada a deficiências de crescimento, perda de massa óssea e maior incidência de fraturas (3,4). Embora o não padecer de fome, seja reconhecido como um direito humano fundamental, a insegurança alimentar grave continua sendo uma implacável realidade em escala global, especialmente em nações de baixa e média renda (5,6).

Dada a associação entre restrição alimentar (RA) e o comprometimento da qualidade óssea (3,7–10), e considerando a necessidade de um microambiente ósseo saudável, não surpreende que a desnutrição possa prejudicar o processo de reparo ósseo, contribuindo, assim, para a formação tardia de calo ósseo associado à qualidade inferior. Vários estudos investigaram os efeitos das restrições de nutrientes na saúde óssea, analisando tanto a depleção de macronutrientes (como proteínas), quanto de micronutrientes específicos (como cálcio ou vitamina D) (9,11–19). No entanto, é relevante notar que a desnutrição em contextos clínicos geralmente envolve uma ingestão alimentar limitada, resultando na restrição de vários nutrientes, o que é mais adequadamente representado por um modelo experimental de restrição alimentar global.

Investigações prévias conduzidas pelo nosso grupo de pesquisa forneceram evidências indicando que a desnutrição impacta a qualidade tanto do osso trabecular, quanto cortical, levando a uma reparação óssea comprometida nos períodos de formação tanto do calo ósseo mole, quanto duro. Nossos resultados indicaram que animais submetidos à restrição alimentar apresentam atrasos no desenvolvimento do calo ósseo, fenômeno que pode ser atribuído a vários

---

fatores, incluindo atraso na proliferação e diferenciação celular, bem como a deterioração da microestrutura (4,20).

Atualmente, várias estratégias são empregadas para o tratamento dos distúrbios de cicatrização óssea, abrangendo o desenvolvimento de novos implantes, intervenções farmacológicas, vários tipos de enxertia óssea, ou aplicação de ortobiológicos. Embora essas abordagens tenham mostrado resultados promissores, elas estão associadas a limitações, como custos elevados, potenciais efeitos colaterais (1) e pouco custo/benefício.

Pesquisas experimentais têm se dedicado a examinar dietas ricas em nutrientes específicos, com o intuito de investigar métodos menos invasivos para potencializar a atividade das células ósseas. Estas medidas incluem enriquecimento com proteínas, carboidratos de digestão lenta ou rápida, vitamina D, cálcio e fósforo (13,18,19,21–25).

No entanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da restrição alimentar geral seguida de realimentação com monitoramento próximo do processo de consolidação óssea, até a fase de remodelação. Apesar do reconhecimento da influência direta da desnutrição sobre a consolidação óssea e a qualidade do calo ósseo, persistem lacunas no conhecimento sobre o impacto da restrição alimentar seguida de realimentação no calo ósseo da fratura. O processo de consolidação de uma fratura é um caracterizado pelo intenso metabolismo local e significativa incorporação de proteínas e minerais essenciais, além de depender de uma regulação sistêmica mediada por hormônios e fatores de crescimento. Nesse sentido, é essencial a compreensão das implicações da desnutrição na reparação óssea, bem como quais mudanças ocorrem quando uma alimentação adequada é reintroduzida em um indivíduo desnutrido.

## **1.1 Desnutrição**

A desnutrição representa uma condição clínica que resulta da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais para a manutenção do equilíbrio metabólico do organismo. Geralmente, ela resulta da ingestão insuficiente, ou da má-absorção de alimentos. Ao longo do tempo, a desnutrição tem sido frequentemente associada ou até mesmo considerada um problema social, pois afeta principalmente grupos econômicos com menor poder aquisitivo e, por vezes, sendo usada como um indicador de pobreza (26,27).

A inanição é a forma mais grave de desnutrição, caracterizada pela escassez alimentar que leva o organismo a consumir seus próprios tecidos para obter a energia necessária para a sobrevivência (28). No entanto, é importante ressaltar que o fator econômico não é o único elemento associado à falta de oferta de alimentos ou a causa exclusiva dessa condição. Existem

---

várias situações que podem levar à redução da quantidade de nutrientes absorvidos pelo indivíduo, incluindo mudanças fisiológicas relacionadas à idade, doenças do trato gastrointestinal ou de natureza inflamatória, questões psicossociais e deficiências físicas (29,30).

Além disso, fatores ambientais, tais como desastres naturais ou circunstâncias geopolíticas, como conflitos armados, podem agravar a escassez de alimentos. Tal contexto é mais comum em regiões marcadas por conflitos geopolíticos e situações de guerra. Já em países desenvolvidos, as principais causas da ingestão alimentar deficiente são geralmente de natureza médica, incluindo distúrbios alimentares relacionados a condições como estados depressivos e anorexia nervosa (31,32).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de pessoas afetadas pela fome aumentou em cerca de 150 milhões após a pandemia, e atualmente, globalmente, 828 milhões de indivíduos estão expostos à insegurança alimentar grave (5). No Brasil, o inquérito nacional que contextualiza a pandemia revelou que a fome atinge cerca de 33 milhões de brasileiros (33). Contudo, é importante destacar que possivelmente esses números estejam subestimados, dada a incerteza na coleta de dados decorrentes das restrições impostas pela pandemia. Além disso, confrontamo-nos com múltiplas crises sobrepostas, como a guerra Russo-ucraniana e os impactos de condições climáticas extremas que influenciam diretamente na incidência da desnutrição, ao interferirem na oferta global de alimentos. Essas circunstâncias resultam em complicações sistêmicas e no aumento das taxas de mortalidade e comorbidades, com efeitos adversos em vários tecidos, incluindo o ósseo, objeto deste estudo.

## **1.2 Tecido Ósseo e Remodelação**

O tecido ósseo configura-se como uma estrutura complexa e metabolicamente ativa, desempenhando um papel de suma importância na constituição do esqueleto. Exerce funções vitais, tais como prover suporte aos músculos e outros tecidos moles, conferir proteção aos órgãos vitais, e atuar como uma reserva homeostática, principalmente para íons de cálcio e fósforo. A matriz do tecido ósseo é constituída por células e material extracelular calcificado. Entre as células proeminentes nesse tecido estão os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (34).

Enquanto os osteócitos são células maduras encontradas em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea, originando-se de células tronco mesenquimais, os osteoblastos e osteoclastos localizam-se na superfície óssea, sendo o primeiro também originário de células

---

tronco mesenquimais, enquanto que o último tem origem hematopoiética (34). Com funções antagônicas, os osteoblastos são os responsáveis pela produção da matriz orgânica (posteriormente se transformam em osteócitos) e os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo. Os osteócitos desempenham um importante papel na manutenção da integridade da matriz óssea. De forma integrada, esses três tipos celulares atuam no processo de remodelação e manutenção do metabolismo ósseo (35).

Após alcançar o pico de massa óssea, que normalmente ocorre em torno da metade da terceira década de vida, o osso entra em um processo contínuo de remodelação, a fim de manter a homeostase (36). É importante ressaltar que a remodelação óssea é um fenômeno constante nesse tecido, envolvendo a formação de osso novo combinada com a reabsorção do osso pré-existente. Como resultado, aproximadamente 10% de todo o osso no adulto é substituído anualmente.

### **1.3 Consolidação óssea normal**

O tecido ósseo é um material complexo composto por uma microestrutura multifásica, heterogênea e anisotrópica. Esses atributos desempenham um papel essencial no processo de consolidação óssea após uma fratura (37). As principais consequências da fratura de um osso longo são a perda da continuidade óssea e, conseqüentemente, da integridade mecânica (38), que são restauradas pelo processo de consolidação. Esse evento envolve a ação coordenada de vários tipos de células (39–41). Assim, com a ocorrência da fratura, as prioridades se modificam e todo o processo inicial de reparação é direcionado para a osteogênese, para que seja formado o calo ósseo, cujo objetivo principal é restabelecer a continuidade do segmento fraturado e restaurar a integridade mecânica do osso.

O processo de consolidação óssea ocorre em etapas sequenciais e sobrepostas. Inicialmente, forma-se um hematoma em resposta à lesão tecidual, e subsequentemente, o perióstio é ativado e, por meio de formação óssea intramembranosa, delimita e isola o local fraturado. A partir da medula óssea, perióstio e tecidos moles, são recrutadas células osteoprogenitoras que migram para o local da lesão, onde se multiplicam e diferenciam-se em condrócitos e osteoblastos. Os condrócitos desempenham um papel importante, produzindo a cartilagem que servirá de base ao calo ósseo mole. Com o decorrer do tempo, o calo ósseo sofre calcificação, tornando-se mais resistente e protegendo efetivamente a região fraturada (41).

---

Simultaneamente com a apoptose dos condrócitos, os osteoclastos começam a absorver tecido cartilaginoso mineralizado que é substituído por tecido ósseo jovem. A etapa final e de longo prazo, envolve a remodelação óssea, que tem como objetivo restaurar a anatomia e função originais do osso. A remodelação óssea resulta de um processo dinâmico, tanto de formação, quanto de reabsorção do tecido ósseo. Enquanto a reabsorção causa a degradação do tecido ósseo, a formação é responsável por sua reconstrução e fortalecimento (40,41).

Sob uma perspectiva mecânica, o processo em cascata desencadeado após uma fratura desempenha um papel importante na restauração das extremidades ósseas fraturadas, por meio da combinação da ossificação endocondral e intramembranosa (42,43). A ossificação intramembranosa ocorre pela contribuição do periósteo, onde células localizadas em sua camada mais profunda diferenciam-se em fibroblastos e, em seguida, em osteoblastos. Esse processo resulta na formação de um calo ósseo primitivo que aumenta do sentido periférico ao centro da fratura. Essa peculiar estruturação proporciona ao calo uma maior eficiência na estabilização mecânica (41).

Por outro lado, a ossificação endocondral ocorre a partir de um arcabouço cartilaginoso. De maneira mais detalhada, após a fratura é imediatamente formado um hematoma devido às lesões nos tecidos. Esse evento desencadeia a liberação de fatores de crescimento provenientes da matriz extracelular, incluindo a regulação de citocinas e migração de células inflamatórias e endoteliais para a área fraturada. As células envolvidas no processo de reparação podem ser categorizadas em três grupos: citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento (TGF- $\beta$ ) e fatores angiogênicos. O início da cascata de eventos ocorre pela ação das Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e pelo fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Além disso, os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e as prostaglandinas (PGE2) também participam deste processo. Suas ações combinadas resultam na formação da cartilagem imatura que servirá como arcabouço para a ossificação. Com o tempo, essas células diferenciam-se em tecido cartilaginoso que, mais tarde, sofre apoptose, fornecendo os elementos necessários para a formação do tecido ósseo imaturo (41).

A transformação de cartilagem em osso imaturo envolve a liberação de vários fatores, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de insulina, osteocalcina, e diferentes tipos de colágeno (1, 5 e 11) (41,44). Progressivamente, pela ação coordenada de osteoblastos e osteoclastos, o osso imaturo desenvolve lamelas mais organizadas e mais definidas (45). Nesta fase, a expressão das interleucinas IL-1 e de IL-6 aumentam a atividade de remodelação óssea, juntamente com o aumento do TNF- $\alpha$ , que ativa o receptor do fator nuclear kappa (RANK-L), e do fator de

---

estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF). Esses eventos levam à reabsorção da cartilagem mineralizada, o recrutamento de células mesenquimais e a apoptose dos condrócitos. Simultaneamente, a concentração de BMPs aumentam durante esse processo e promovem a formação de células osteoblásticas (41).

Após a consolidação inicial, o osso recupera sua continuidade e grande parte de suas propriedades mecânicas. Ao longo do tempo, a remodelação óssea assume um papel predominante, sendo mediada principalmente pela atividade coordenada de osteoblastos e osteoclastos, e influenciada pelas forças mecânicas aplicadas ao osso. Com isso, o calo inicial, caracterizado por diferentes orientações trabeculares (*wovenbone*, ou osso entrelaçado) passa por remodelação, e as trabéculas antigas são gradualmente substituídas por novas, orientadas de acordo com as demandas mecânicas locais. Essa fase representa o estágio final da consolidação óssea e é concluída em um estágio tardio (40,41).

#### **1.4 Consolidação óssea na desnutrição e na dieta enriquecida**

O tecido ósseo é altamente suscetível a variações metabólicas, hormonais e nutricionais (46). Portanto, mudanças internas e externas ao organismo podem influenciar a formação da massa óssea, acelerar a perda óssea natural ou afetar o equilíbrio do *turnover* ósseo. Essas alterações podem resultar em doenças osteometabólicas e aumentar o risco de fraturas patológicas (47).

A nutrição desempenha um papel significativo na regulação tanto do ganho, quanto na perda de massa óssea. Os nutrientes podem exercer influência de duas formas: diretamente, modificando o processo de reparação óssea, e indiretamente, ao alterar a secreção de hormônios relacionados ao metabolismo do cálcio (36). Entre as restrições dietéticas estudadas para a qualidade óssea, as mais frequentes são aquelas relacionadas ao cálcio, proteínas e vitamina D (11,13,14,17–19,48).

Em estudo conduzido por Pollak *et al.* (1986), a restrição proteica em ratos submetidos à uma osteotomia induziu ao atraso na consolidação e à formação de um calo ósseo menos resistente. Além disso, a dieta rica em proteína não mostrou melhora significativa no processo de consolidação no período estudado. Portanto, não foi capaz de melhorar as propriedades mecânicas. Entretanto, nesse estudo houve limitações em virtude dos poucos recursos utilizados para análise e não foi possível aprofundar a investigação dos mecanismos subjacentes a esse processo (13).

---

Einhorn *et al.* (1986) em investigação semelhante a anterior, obtiveram os mesmos resultados ao avaliar as propriedades mecânicas dos animais que receberam dieta hipoproteica pós-fratura, ou seja, a redução da resistência mecânica do calo ósseo. Além disso, os que receberam a dieta suplementada não apresentaram melhora significativa. Porém, o modelo experimental foi diferente, no último a fratura óssea foi completa e fixada por fio intramedular (19). Em ambos os estudos, a restrição proteica foi iniciada após o procedimento cirúrgico para produção da fratura, além disso, a dieta enriquecida foi introduzida em animais não desnutridos, o que não mimetiza o restabelecimento nutricional.

Hughes *et al.* (2006) estabeleceram a restrição proteica 5 semanas antes da produção da fratura óssea, que foi realizada na diáfise do fêmur e fixada com haste intramedular. Depois, os animais receberam dietas: hipoproteica, normoproteica ou hiperproteica com aminoácidos condicionalmente essenciais. O Calo ósseo foi avaliado por diferentes períodos pós-fratura, por meio da análise densitométrica, histomorfométrica e pelo teste de torção. Como resultado, a dieta enriquecida obteve efeitos anabólicos na mineralização óssea dos animais desnutridos aumentando a densidade mineral óssea (DMO) do calo, porém não foi encontrada melhora nas propriedades mecânicas (22).

A redução da resistência mecânica, recorrentes em vários estudos, pode ser explicada pelas alterações prejudiciais encontradas em pesquisas que avaliaram a reparação óssea diante da desnutrição proteica, as quais, observaram a diminuição das atividades dos osteoblastos e condroblastos, bem como um aumento na quantidade de tecido fibroso em relação ao osso neoformado (18,48).

Em investigações de osteointegração, a deficiência de vitamina D causou diminuição da densidade mineral óssea (DMO), do recrutamento dos osteoblastos, dos níveis de osteocalcina e IGF-1, além de afetar a resistência mecânica e o contato osso-implante (11,17). Dietas enriquecidas com cálcio e vitamina D em ratos previamente alimentados com dieta deficiente, mostraram melhora no processo de consolidação avaliado por testes histológicos e mecânicos (24). Em pesquisas que avaliaram os ossos íntegros de ratos, a deficiência proteica levou à diminuição dos níveis de IGF-1, juntamente com a redução da DMO, e da massa óssea, tanto no osso cortical, quanto no trabecular (14). Já a deficiência de nutrientes gerada pela restrição calórica, levou à diminuição dos níveis séricos de leptina e IGF-1, do volume do osso trabecular e da massa óssea cortical, juntamente com a alta adiposidade medular (3).

Efeitos prejudiciais na arquitetura óssea foram apresentados em pesquisas com restrição alimentar em animais mais velhos (6– 13 meses), provavelmente pela atividade osteoblástica reprimida (7,49). Em animais mais jovens (3-13 semanas) o maior prejuízo foi observado no

---

crescimento ósseo, analisado pelo comprimento, marcadores bioquímicos e a mineralização (3,4,50).

Contudo, as pesquisas que exploraram a interação entre o estado nutricional e a reparação óssea focaram de forma isolada um único nutriente ou vitamina. Essa abordagem não reproduz adequadamente o panorama clínico da desnutrição. Na prática, a privação alimentar afeta a disponibilidade simultânea de diversos nutrientes, cenário que é mais fielmente reproduzido por um modelo experimental de restrição alimentar global. Do mesmo modo, investigações anteriores relacionadas a realimentação após fraturas empregaram dietas especiais suplementadas com excesso de nutrientes específicos, um modelo que também não retrata o restabelecimento real da ingesta nutricional. Por último, nenhum dos estudos anteriores avaliou a combinação da desnutrição causada por restrição alimentar, com a posterior realimentação pós-fratura, bem como não acompanharam o processo de consolidação até a fase de remodelação óssea.

---



---

*HIPÓTESE*

---

## **2 HIPÓTESE**

A hipótese desta investigação é que a desnutrição seja capaz de comprometer a consolidação óssea, desequilibrando a relação entre a formação e a reabsorção óssea, além de inibir a diferenciação celular no local da fratura. Como resultado, antecipamos que a realimentação possua a capacidade de reverter, totalmente ou parcialmente, os efeitos adversos causados pela desnutrição.

---

---

# *OBJETIVOS*

---

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar a influência da restrição alimentar no processo de consolidação óssea e na qualidade do calo ósseo.

Analisar o papel da realimentação após a fratura, e a sua repercussão sobre os efeitos adversos causados pela desnutrição até a fase de remodelação óssea.

---

---

# *MATERIAS E MÉTODOS*

---

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Este estudo consiste em uma pesquisa experimental em modelo animal.

### **4.2 Animais experimentais**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com protocolo nº 220/2018 (Anexo A).

Ratos fêmeas da linhagem Wistar Hannover, juntamente com seus filhotes machos recém-nascidos foram fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e alojadas no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP durante todo período de lactação (21 dias de idade). Após o desmame, os filhotes foram separados da mãe e distribuídos aleatoriamente aos grupos experimentais. Em seguida, as mães foram submetidas à eutanásia pela mesma técnica a ser descrita neste documento.

Foram utilizados 108 ratos machos, com massa corporal inicial de aproximadamente 60 gramas que permaneceram alojados em gaiolas individuais, com compartimento para receber fezes e urina. Durante todo o experimento os animais permaneceram com livre acesso à água, em ambiente calmo, isolado e com pouca circulação de pessoas, em temperatura ambiente de 20 a 24°C e controle de claro/escuro (12 x 12 horas).

Os cuidados diários seguiram rigorosamente as diretrizes estabelecidas no guia para cuidados e uso de animais de laboratório (*Animal models as tools in ethical biomedical research*, edição 2010).

As condições de estresse do animal foram avaliadas pela presença ou não de pigmentos de porfirina ao redor dos olhos e focinho, além da observação do comportamento geral (atividade espontânea, autolimpeza, reatividade e sono) (51).

### **4.3 Grupos experimentais**

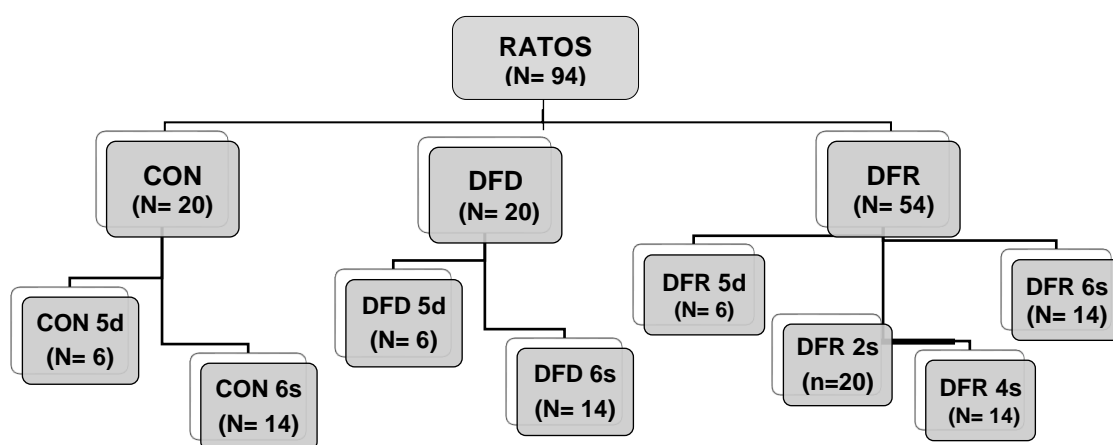
Compuseram o estudo 94 animais que foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

---

- 1- CON (Controle): Ratos controle submetidos apenas à fratura do fêmur com 9 semanas de idade.
- 2- DFD (Desnutrição-Fratura-Desnutrição): Ratos com restrição alimentar durante 6 semanas, desde o desmame (3 s). Fratura do fêmur com 9 semanas de idade e manutenção da restrição após a fratura.
- 3- DFR (Desnutrição-Fratura-Realimentação): Ratos com restrição alimentar durante 6 semanas, desde o desmame (3 s). Fratura do fêmur com 9 semanas de idade e realimentação, por diferentes períodos, conforme o subgrupo.

Os grupos CON e DFD foram subdivididos em dois, já o grupo DFR foi subdividido em quatro, totalizando oito subgrupos (Fig.1). Nos subgrupos com cinco dias foi analisada a expressão gênica por se tratar de um período em que a cadeia de eventos do processo de consolidação óssea está mais ativa. Para as análises da estrutura óssea utilizamos os períodos de: 2 semanas, por corresponder a formação do calo ósseo mole (período em que também foi realizada a análise de expressão gênica); 4 semanas, por corresponder à formação do calo ósseo duro; e 6 semanas por corresponder à fase de remodelação óssea (Quadro 1).

**Figura 1-** Diagrama da divisão dos grupos e subgrupos.



CON: grupo controle; DFD: grupo desnutrição, fratura e desnutrição; DFR: grupo desnutrição, fratura e realimentação; CON 5d: controle seguido por 5 dias após a fratura; CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 5d (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 5 dias após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 5d (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 5 dias após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura.

**Quadro 1-** Caracterização dos grupos experimentais

Grupos	Intervenção	Subgrupos	
<b>CON</b> (não desnutridos) (n=20)	Fratura do fêmur com 9 semanas de idade	CON 5d (n=6)	Seguimento por 5 dias pós-fratura. Eutanásia com 9 semanas e 5 dias de idade.
		CON 6s (n=14)	Seguimento por 6 semanas pós-fratura. Eutanásia com 15 semanas de idade.
<b>DFD</b> (grupo com desnutrição) (n=20)	Ratos com restrição alimentar durante 6 semanas, desde o desmame (3 s). Fratura do fêmur com 9 semanas de idade e manutenção da restrição pós-fratura	DFD 5d (n=6)	Seguimento por 5 dias pós-fratura. Eutanásia com 9 semanas e 5 dias de idade.
		DFD 6s (n=14)	Seguimento por 6 semanas pós-fratura. Eutanásia com 15 semanas de idade.
<b>DFR</b> (grupo desnutrido com realimentação pós-fratura) (n=54)	Ratos com restrição alimentar durante 6 semanas, desde o desmame (3 s). Fratura do fêmur com 9 semanas de idade e realimentação, por diferentes períodos, conforme o subgrupo	DFR 5d (n=6)	Realimentação com dieta normal durante 5 dias pós-fratura. Eutanásia com 9 semanas e 5 dias de idade.
		DFR 2s (n=20)	Realimentação com dieta normal durante 2 semanas pós-fratura. Eutanásia com 11 semanas de idade
		DFR 4s (n=14)	Realimentação com dieta normal durante 4 semanas pós-fratura. Eutanásia com 13 semanas de idade
		DFR 6s (n=14)	Realimentação com dieta normal durante 6 semanas pós-fratura. Eutanásia com 15 semanas de idade

#### 4.4 Procedimento experimental: Dieta Padrão e Restrição Alimentar

A restrição alimentar foi o método utilizado para induzir a desnutrição. O grupo CON recebeu quantidade de ração *ad libitum*, o grupo DFD permaneceu em restrição alimentar antes e depois da fratura, e o grupo DFR permaneceu em restrição alimentar antes da fratura e após foi restabelecida a dieta *ad libitum*, até a eutanásia. A restrição alimentar foi de 50% da quantidade de ração ingerida pelos controles no dia anterior (20,52).

Todos os grupos foram alimentados com ração padrão, marca NUVILAB CR-1<sup>®</sup>. A composição básica do produto consiste em milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, óleo vegetal, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina,



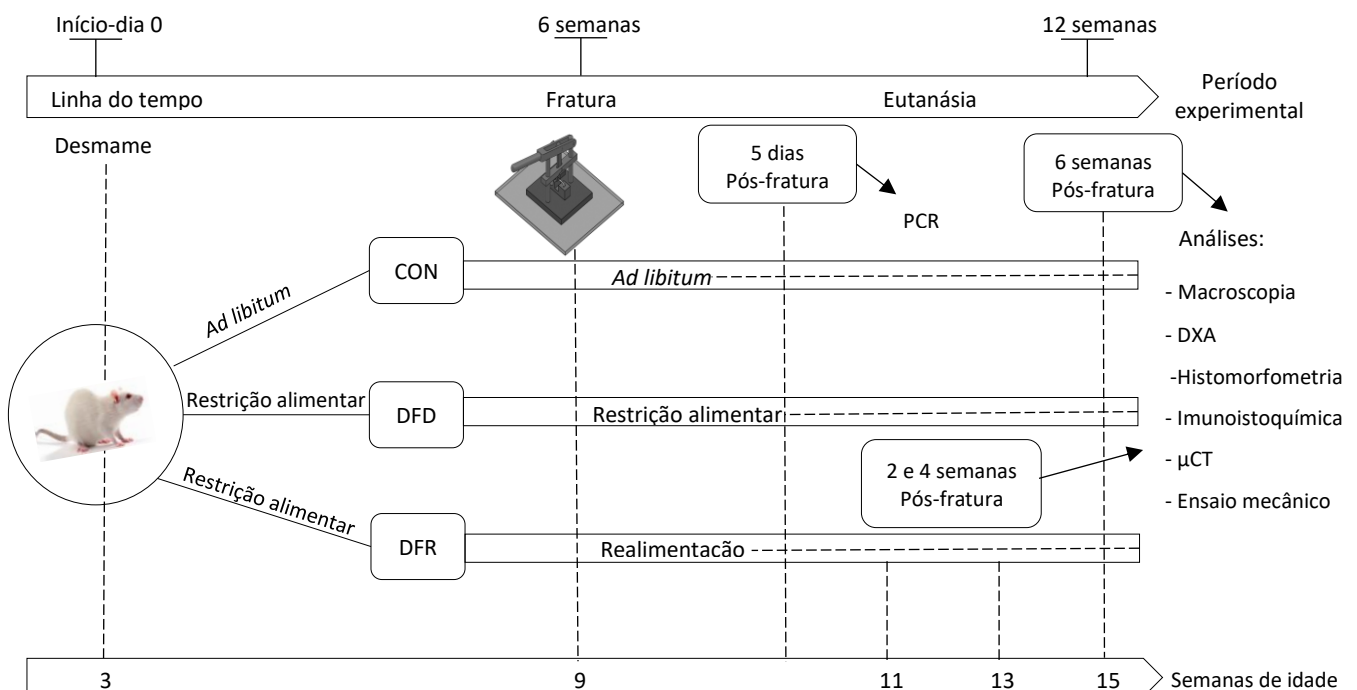
pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e antioxidante (BHT).

Foi calculado o consumo diário de ração, sendo que para o grupo CON era fornecido sempre um valor superior para que os animais se mantivessem saciados. A quantidade restante não consumida era pesada e subtraída da quantidade inicial fornecida, permitindo assim calcular a quantidade de ração efetivamente consumida por dia. A restrição alimentar foi aplicada com uma redução de 50% em relação ao grupo CON e manteve-se por um período de 6 semanas (até os animais atingirem 9 semanas de idade). Após esse período foi realizada a fratura óssea. O grupo DFD continuou com a dieta restritiva por mais 6 semanas e o grupo DFR foi realimentado com a mesma quantidade de ração ofertada para grupo controle, de acordo com sua respectiva idade. Os animais realimentados foram subdivididos em quatro (DFR 5d; DFR 2s; DFR 4s e DFR 6s) conforme o tempo de restabelecimento da dieta (5 dias; 2, 4, e 6 semanas pós-fratura) (Fig.2).

A confirmação da desnutrição foi obtida por meio da avaliação do estado nutricional, que incluiu a história alimentar pré-estabelecida pela restrição, a observação dos sinais clínicos e a avaliação dos dados antropométricos (massa, comprimento e perímetro do osso).

O monitoramento da massa corporal dos animais foi conduzido diariamente.

**Figura 2-** Representação esquemática do desenho experimental.

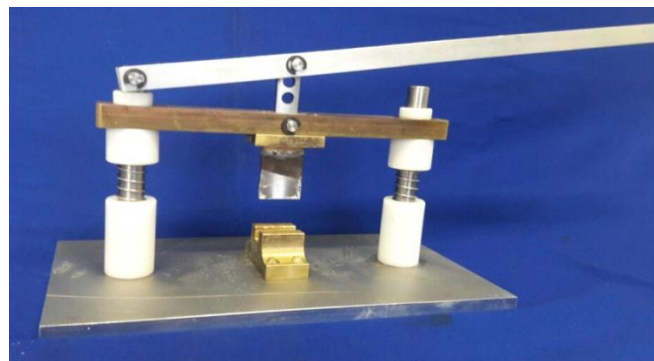


#### 4.5 Procedimento experimental: produção da fratura do fêmur

Após 6 semanas do início do protocolo de restrição alimentar (nove semanas de idade), os animais foram anestesiados por meio da combinação (1:1; 0,1 mg/100 g) de xilazina (6 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg), associada à acepromazina (0,6 mg/kg). A mistura das soluções foi aplicada por via intramuscular na região glútea. Em seguida, foi administrada a associação dos antibióticos amoxicilina e ácido clavulânico por via intraperitoneal, na dose de 2 mg/100 g de massa corporal. Todo o membro pélvico direito foi tricotomizado e recebeu a aplicação de solução antisséptica alcoólica 1 % de polivinil-pirrolidona-iodo.

A fratura foi realizada pelo método fechado na diáfise do fêmur direito, por meio de uma guilhotina confeccionada para esse propósito (Fig.3). O animal foi colocado em decúbito dorsal de modo que as extremidades da coxa ficassem apoiadas em dois suportes metálicos com vão livre de 10,0 mm e posicionadas de maneira que seu terço médio ficasse sob a porção romba da guilhotina que foi baixada manualmente até a perda da resistência, geralmente acompanhada de um ruído típico do osso quebrando (Fig.4A). Este modelo de fratura (53,54) tem a vantagem de não expor o osso na região da fratura, manter a conexão das partes moles com os fragmentos e não provocar desvios grosseiros dos fragmentos.

**Figura 3-** Alavanca inter-resistente desenvolvida para confecção da fratura.



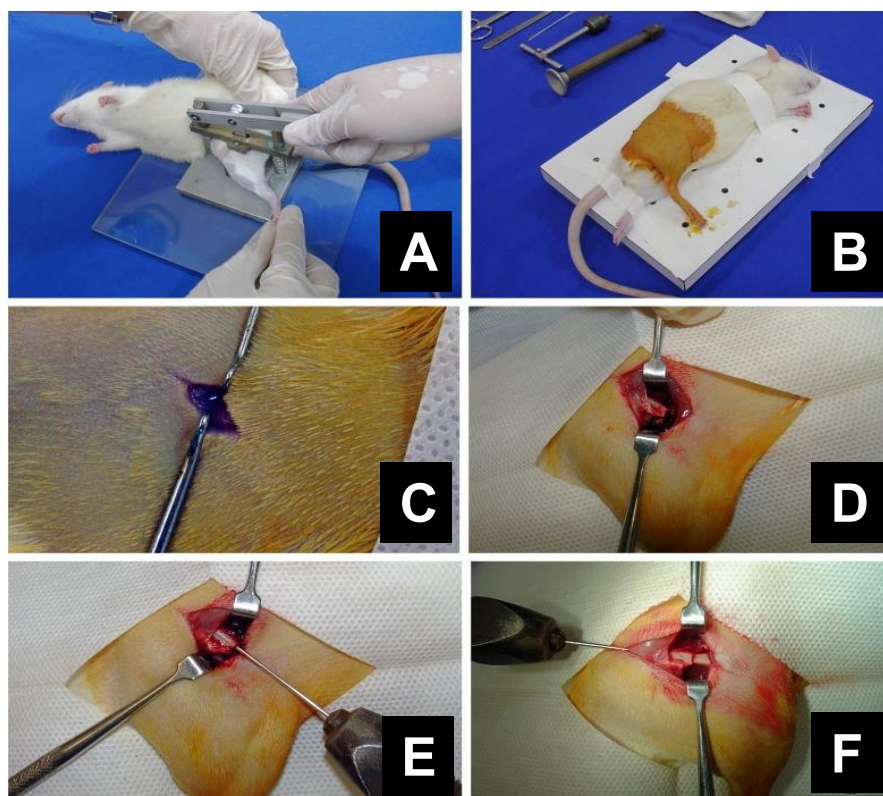
Fonte: Imagens do Laboratório de Bioengenharia, FMRP-USP.

A coxa do animal é firmemente fixada entre os suportes metálicos e o braço da alavanca é abaixado até a ocorrência da fratura.

Em seguida, o animal foi transportado para uma mesa cirúrgica, onde foi feita antissepsia de todo o membro pélvico direito com solução alcoólica polivinil-pirrolidona-iodo (Fig. 4B). Foi realizada uma mini-incisão na face lateral da coxa (Fig. 4C), sobre a região da fratura. A incisão foi aprofundada pelo septo intermuscular até a profundidade dos fragmentos ósseos que foram minimamente expostos. Nesse momento, foi analisada a adequação da fratura

(Fig. 4D). Em seguida, um fio de Kirschner de 1,0 mm de espessura foi introduzido pelo canal medular do fragmento proximal, até que saísse pela pele nas partes moles na região trocantérica (Fig. 4E). A fratura foi reduzida por observação direta e o fio de Kirschner foi avançado em sentido contrário pelo canal medular do fragmento distal até a extremidade ser sentida do côndilo femoral (Fig. 4F). Depois, foi levemente recuado para que não protraísse.

**Figura 4-** Sequência dos principais passos técnicos para produção e fixação da fratura.



Fonte: Imagens do Laboratório de Bioengenharia, FMRP-USP.

A- produção da fratura com auxílio da guilhotina de lâmina romba. B- posicionamento do rato para abordagem cirúrgica da fratura. C- incisão retilínea cutânea na face lateral da coxa, sobre a região da fratura. D- visualização direta dos fragmentos ósseos para a verificação da adequação da fratura. E- primeiro passo da fixação com introdução do fio de Kirschner no canal medular do fragmento proximal. F- redução da fratura e avanço do fio pelo canal do fragmento distal até a região dos côndilos.

A adequação da redução da fratura e a estabilidade da fixação foram conferidas sob visão direta. O excesso do fio de Kirschner que saiu pela região pélvica foi cortado rente à pele, sua extremidade foi dobrada em forma de gancho e introduzida sob a musculatura, junto do trocanter maior. Ainda com o animal anestesiado, foi feita a radiografia do fêmur (Fig.5) com o objetivo de comprovar as adequações da fratura e da fixação (incidência em perfil). Foi usado um aparelho portátil de radiografias (Siemens- Unimax 2B, - Rio de Janeiro- Brasil). A técnica usou a distância de 115 cm entre foco e o chasis (cassete) digital (Kodak-View, 24x30 cm,

Estados Unidos), com parâmetros de 5 mA e 44 kV. O fechamento da incisão foi realizado pela aproximação da musculatura e pele, com fios absorvíveis 4-0. A sutura cutânea ficou exposta.

**Figura 5-** Radiografia em incidência em perfil realizada após o término da cirurgia para avaliação final da adequação da fratura, sua localização e fixação.



Fonte: Arquivo próprio.

Os animais recuperam-se da anestesia em ambiente aquecido e receberam dipirona (80  $\mu$ L de diluição 1:5 em solução estéril de 0,9 % de NaCl) por via subcutânea, administrada a cada oito horas por cinco dias após a fratura. A primeira dose de dipirona foi administrada 15 minutos antes da produção da fratura. Uma vez recuperados, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, de acordo com as normas técnicas do biotério e aplicada substância líquida antimutilante sobre a sutura (Adestro, SP, Brazil<sup>1</sup>) para impedir a autofagia.

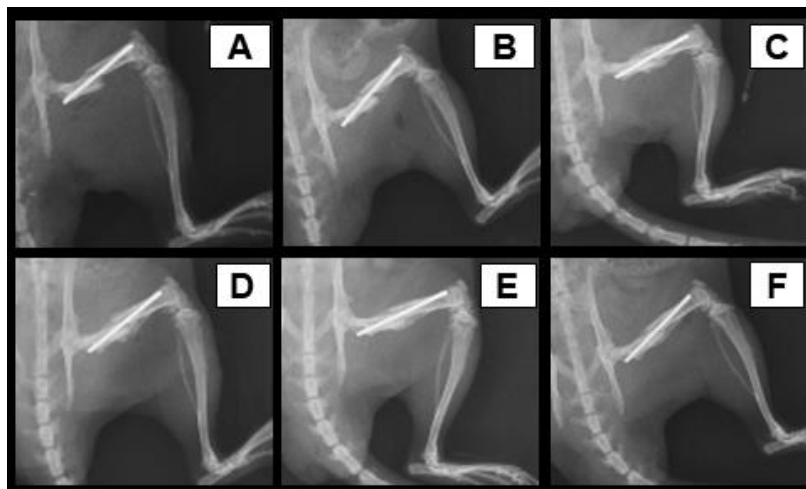
A radiografia foi realizada imediatamente após a produção da fratura, com o animal ainda sob efeito da anestesia, e semanalmente com o animal também anestesiado, para acompanhamento do processo de consolidação (Fig.6).

---

<sup>1</sup> Composto de água deionizada, propilenoglicol, benzoato de denatônio e metilparabeno.

---

**Figura 6-** Sequência radiográfica para acompanhamento da consolidação da fratura.



Fonte: Arquivo próprio.

Imagens radiográficas obtidas em: A) 1 semana pós-fratura, B) 2 semanas pós-fratura, C) 3 semanas pós-fratura, D) 4 semanas pós-fratura, E) 5 semanas pós-fratura e F) 6 semanas pós-fratura.

#### **4.6 Eutanásia e coleta de amostras**

Foi administrado cloridrato de lidocaína (5 mg/kg), via intraperitoneal, 10 minutos antes da eutanásia, que foi realizada com dose excessiva do anestésico (Tiopental<sup>®</sup>), aplicada por via intraperitoneal. Imediatamente após a morte foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue (cerca de 6-8 mL) que foi centrifugado (3000 rpm) para a separação do soro e mantido em -80 °C. Após a coleta do sangue, os fêmures foram colhidos, limpos das partes moles e armazenados em álcool 70 %, paraformaldeído 4 %, ou em freezer -80 °C, de acordo com a análise futura. As avaliações realizadas foram: mensuração macroscópica, densitométrica, histológica, imunoistoquímica, microtomográfica, de biologia molecular e resistência mecânica. Para mensuração macroscópica, densitométrica, resistência mecânica, análise histológica e imunoistoquímica foram utilizados sete animais. Para a análise de biologia molecular foram utilizadas seis amostras.

##### **4.6.1 Mensuração macroscópica**

Após a dissecação, o fio de Kirschner foi retirado e os fêmures foram pesados em balança de precisão. Em seguida, com paquímetro, foram mensurados o comprimento femoral, o diâmetro da região central diafisária, da metáfise proximal e distal.

#### 4.6.2 Análise Densitométrica

A densitometria com dupla emissão de raios X foi conduzida no Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, utilizando o densitômetro Lunar DPX-IQ (*Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom*), pelo método de absorciometria bifotônica de raio-X (DXA: *Dual-energy X-ray absorptiometry*). Os ossos foram posicionados em um recipiente plástico e imersos em etanol 70 % à profundidade de 2,0 cm (Fig.7). A densidade óssea global foi analisada por meio de software específico para pequenas amostras (Fig.8).

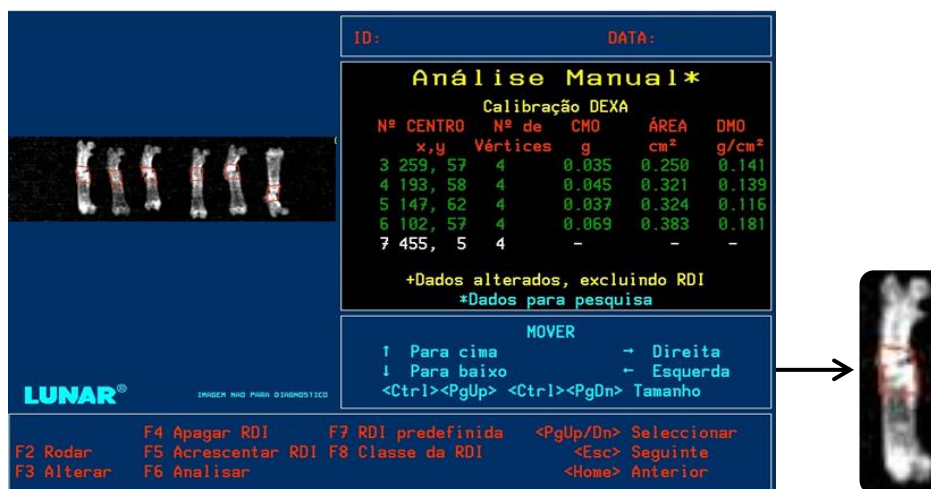
Na imagem obtida, para avaliar o calo ósseo, foi delimitada uma região de interesse localizada na diáfise dos fêmures fraturados. Figuras geométricas com tamanhos e formas variáveis foram utilizadas para garantir que a região de interesse abrangesse todo o calo ósseo. Foram obtidos os valores de DMO (densidade mineral óssea), CMO (conteúdo mineral ósseo) e área do calo ósseo foram analisados.

**Figura 7-** Posicionamento dos ossos na plataforma para realização da densitometria óssea.



Fonte: Arquivo próprio.

**Figura 8-** Análise densitométrica para determinação da DMO, CMO e área do calo.



Fonte: Arquivo próprio.

Ilustração das figuras obtidas pelo escaneamento dos fêmures para análise da densidade mineral óssea (tela geral). O detalhe mostra o fêmur fraturado e a região de interesse (calo ósseo) demarcada com o retângulo.

#### 4.6.3 Análise Histológica

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi usada técnica rotineira com fixação em paraformaldeído 4 %, descalcificação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 %, desidratação em concentrações crescentes de etanol e diafanização em xilol.

Os ossos foram incluídos em blocos retangulares de parafina, sendo posicionados de modo que a face anterior do fêmur ficasse voltada inferiormente. Os cortes histológicos, com espessura de 5,0 micrômetros, foram realizados em sentido longitudinal no plano coronal, abrangendo toda a região diafisária do fêmur. De cada espécime, foram coletados 72 cortes semisseriados, onde após selecionar 12 cortes, os 10 cortes subsequentes foram descartados, e o procedimento repetido até que todo o calo ósseo fosse percorrido.

Em cada lâmina de vidro revestida com polilisina foram colocados três cortes histológicos, totalizando 24 lâminas. Destas, seis foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e outras seis por tricrômico de Masson, técnicas que permitem a observação das trabéculas e da medula óssea. A técnica de *picrosirius red* e a coloração fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) também foram em número de seis lâminas, essas colorações permitiram a identificação e quantificação das fibras colágenas e dos osteoclastos, respectivamente.

As secções foram analisadas sob microscopia de campo brilhante (Axiovert, Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens capturadas com o auxílio de uma câmera CCD (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Alemanha) na região do calo ósseo, com ampliações de 12,5; 50 e 100x. A análise

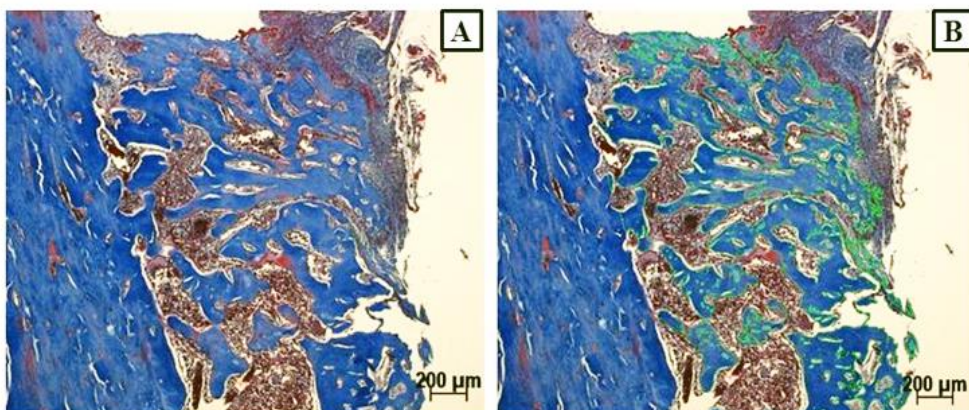
quantitativa foi realizada de forma padronizada na região diafisária do osso, com aumento de 50x para as lâminas coradas com tricrômico de Masson e *picrosirius red* e 100x para as lâminas coradas com TRAP, em microscópios óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) com câmera digital (Zeiss®) acoplada, pertencentes ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP e ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

#### 4.6.3.1 Quantificação do osso neoformado

Nas amostras coradas com HE, a avaliação da área de osso neoformado foi conduzida de forma descritiva. A quantificação deste tecido foi realizada nas amostras coradas com tricrômico de Masson. Para isso, foi utilizado o aumento de 50x e delimitados quatro quadrantes locais, onde quatro imagens foram capturadas com o objetivo de abranger toda área do calo ósseo.

A análise das imagens foi realizada por meio do programa Axiovision®, utilizando a seleção da cor azul para demarcar toda a área reconhecida como trabecular, sendo posteriormente excluídas as regiões que não correspondiam a este tecido, resultando somente a demarcação do tecido ósseo neoformado (Fig.9). A área foi expressa pela razão da área de osso sob a área total, em porcentagem ( $B.Ar/Tt.Ar - \%$ ) (55).

**Figura 9-** Imagens coradas com tricrômico de Masson.



Fonte: Arquivo próprio.

A) Fotomicrografia da área de seleção do calo ósseo (quadrante), B) Fotomicrografia do corte histológico do calo para identificação do osso neoformado. A região verde corresponde ao tecido de interesse para análise histomorfométrica obtida pelo programa Axiovision a partir da demarcação dos tons de azul com exclusão da área cortical (coloração tricrômico de Masson, 50x).

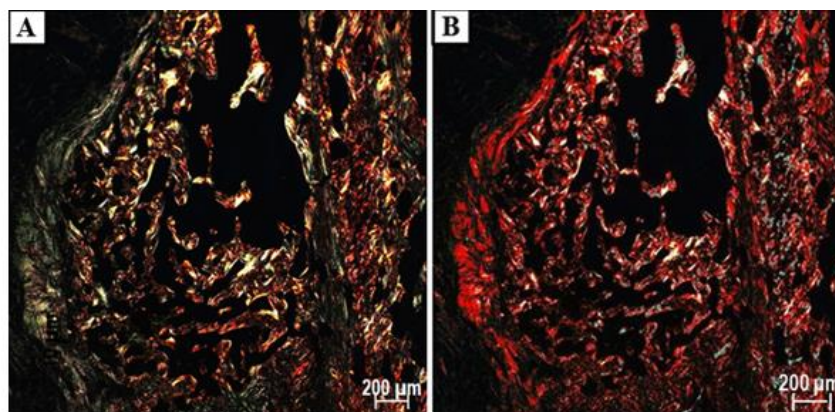


#### 4.6.3.2 Quantificação do colágeno no calo ósseo

A quantificação da área do colágeno presente no calo ósseo foi realizada nos cortes corados em *picrosirius red*. A análise foi realizada com luz polarizada e birrefringência, o que permitiu a observação das fibras colágenas na cor vermelho-alaranjada e verde-amarelada. A área avaliada foi de 3,5 X 2,5 mm, com aumento de 50 vezes. Para isso, foi necessária a divisão do calo ósseo em quatro quadrantes, onde quatro imagens foram capturadas com o objetivo de abranger a extensão total do calo.

A análise quantitativa das fibras colágenas foi realizada com o programa Axiovision® que é capaz de captar diferentes tonalidades de vermelho e verde com a luz polarizada, permitindo a quantificação da área das fibras colágenas ( $\mu\text{m}^2$ ), área expressa, pela razão da área de colágeno sob a área total (Col.Ar/Tt.Ar -%) (55). Após a demarcação, as seleções fora da região de interesse foram excluídas da quantificação, resultando a imagem final somente com a seleção necessária para avaliar a quantidade de matriz colágena no calo ósseo (Fig.10).

**Figura 10-** Fotomicrografias sob luz polarizada do calo ósseo.



Fonte: Arquivo próprio.

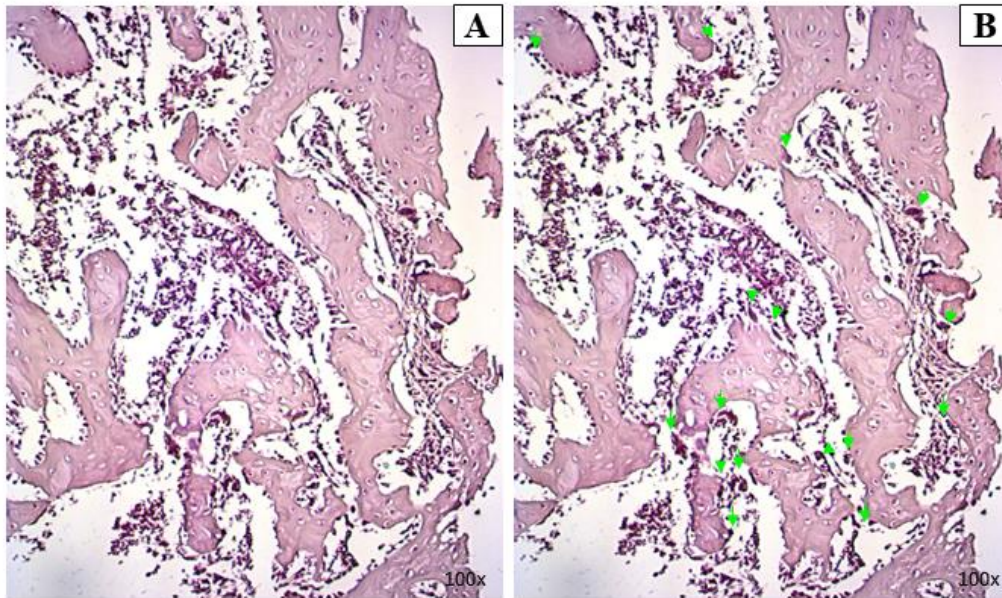
A) Fotomicrografia da área de seleção do calo ósseo (quadrante), B) Fotomicrografia do calo no quadrante, identificando as fibras colágenas, expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado (coloração *picrosirius red*, 50x).

#### 4.6.3.3 Quantificação da atividade de reabsorção no calo ósseo

A quantificação da atividade de reabsorção óssea foi realizada nas amostras coradas com TRAP através do software ImageJ (NIH, versão 1.52a). Foram capturadas imagens do calo ósseo no aumento de 100x. O programa utilizado identificou e quantificou os osteoclastos,

células demarcadas em vermelho. Os resultados foram expressos em porcentagem de área (Fig.11).

**Figura 11-** Imagens coradas com TRAP.



Fonte: Arquivo próprio.

A) Fotomicrografia da área de seleção do calo ósseo (quadrante), B) Fotomicrografia do calo no quadrante, identificando os osteoclastos com marcações em vermelho identificadas pelas setas verdes (coloração TRAP, 100x).

#### 4.6.4 Análise Imunoistoquímica

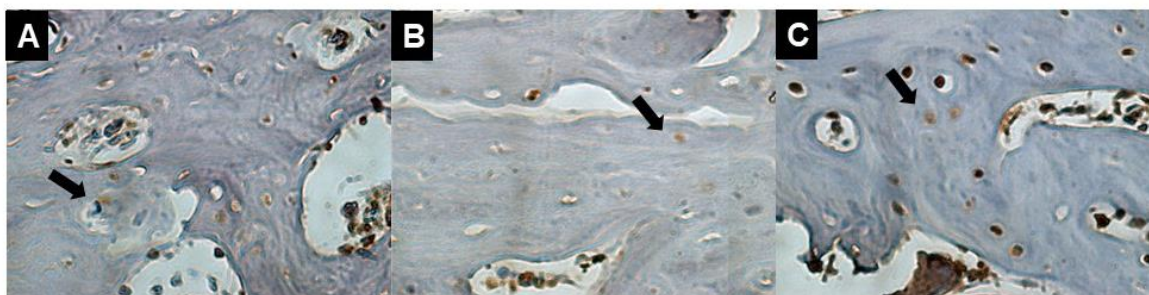
As lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em séries decrescentes de álcoois e mantidas em salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, foram submetidas à recuperação dos apítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0) aquecido em forno micro-ondas, por meio de 7 disparos de 17 segundos, com intervalos de 2 minutos entre os disparos. Após a estabilização da temperatura, foram realizadas lavagens em PBS por 3 minutos (3x) e o bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS por 3 minutos (3x) e o bloqueio de proteínas foi realizado por 10 minutos. Depois, foi realizada a lavagem em PBS por 3 minutos (3x) e os tecidos foram incubados com anticorpos primários para osteoprotegerina (OPG, A2100, anti-rabbit, Woburn, MA, EUA) em diluição 1:200, para o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK, A12997, anti-rabbit, Woburn, MA, EUA) e para o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL, A2550, anti-rabbit, Woburn, MA, EUA) em diluição de 1:100, a 4 °C, *overnight*. A seguir, os

tecidos foram lavados em PBS 4x por 3 minutos e incubados em *horseradish peroxidase* (HRP) por 15 minutos, seguidos de 4 lavagens de PBS por 3 minutos cada. 3,3- Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como substrato enzimático por 5 minutos; as lâminas foram lavadas em PBS, contracoradas com hematoxilina de Harris por 4 minutos, lavadas com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e montadas. Como controle negativo, as amostras foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se apenas a utilização dos anticorpos.

#### 4.6.4.1 *Quantificação dos imunomarcadores*

As áreas positivas de imunomarcação (OPG-positivas, RANK-positivas e RANKL-positivas) foram expressas na cor acastanhada. A região do calo ósseo foi a área de interesse avaliada, nela foram selecionados dois quadrantes próximos a córtex da fratura. As fotomicrografias foram obtidas com amplia o de 400x, em microscópio óptico Axion Observer Z1 (Oberkochen, BW, Alemanha) acoplado a câmera digital. Imunomarca es positivas foram avaliadas quantitativamente com o software ImageJ (NIH, versão 1.52a) e os resultados expressos em porcentagem da  rea (Fig.12).

**Figura 12-** Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarca o de OPG (A), RANK (B) e RANKL (C). As marca es positivas estão indicadas pelas setas.



Fonte: Arquivo próprio.

#### 4.6.5 *Microtomografia computadorizada ( $\mu$ -CT)*

O Microtomógrafo   composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100kV), um porta amostras onde um osso foi posicionado e um detector que utiliza uma câmera CCD de 11 Mp, todos conectados a um computador para controle e aquisi o de dados. O software especializado permite a reconstru o, visualiza o e análise quantitativa de imagens

em 2D e 3D. Esta imagem tridimensional gerada possibilita a caracterização da microgeometria óssea e a avaliação do tecido ósseo neoformado (56).

Após a análise densitométrica, os fêmures conservados em etanol 70% foram submetidos à análise de microtomografia computadorizada ( $\mu$ -CT). Esse procedimento foi realizado no microtomógrafo GE Phoenix v|tome|x S240 (Phoenix-micro-CT, German), localizado no Centro para Documentação da Biodiversidade da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Brasil. Durante a execução do exame  $\mu$ -CT foram selecionados os seguintes parâmetros: 60 Kv, 150  $\mu$ A, 1000 projeções com média de quatro exposições de 333ms cada, o que garantiu uma resolução de 16  $\mu$ m. O detector utilizado foi o DXR250RT, com uma matriz de 1000x1000 pixels. O processamento da imagem e a reconstrução tridimensional foram realizados por meio do *software* GE Phoenix datos|x2.

Inicialmente, o software Data Viewer (Bruker-microCT, versão 1.5.1.2) foi empregado para posicionar corretamente o osso analisado. Em seguida, a análise morfométrica de delimitação do calo ósseo foi realizada por meio do software CTAn (Bruker-microCT, versão 2.2.1).

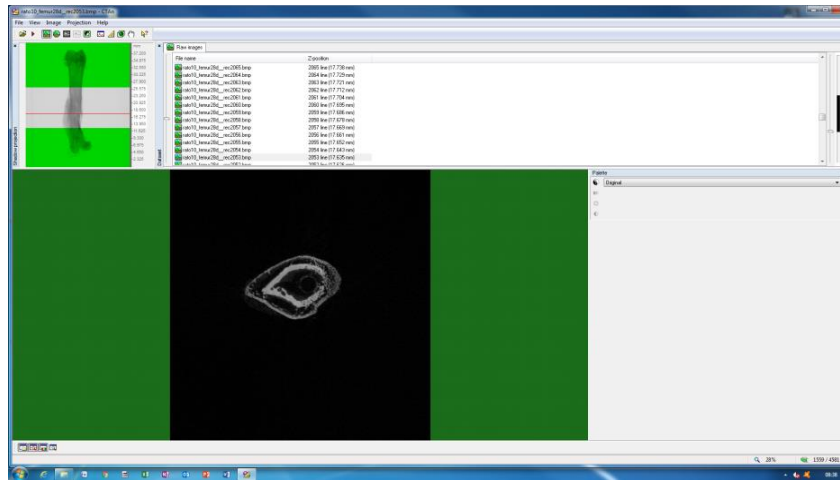
Todas as medidas morfométricas dos ossos e as nomenclaturas utilizadas seguiram as recomendações da *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) (57).

#### **4.6.5.1 Análise da microarquitetura do calo ósseo**

A análise tridimensional do calo ósseo foi realizada com o *software* CTAn (Fig.13). Diversos parâmetros foram mensurados, incluindo o volume total do calo ósseo (BV), em  $\text{mm}^3$ ; a razão de volume ósseo pelo volume total (BV/TV), em %; o número de trabéculas ósseas formadas no calo por milímetro de tecido (Tb.N), em 1/mm; as espessuras das trabéculas ósseas do calo (Tb.Th), em mm; o espaçamento entre o tecido ósseo formado no calo (Tb.Sp), em mm; a densidade de conexão entre tecido formado no calo (ConnD), em  $1/\text{mm}^3$ ; e o índice de modelo estrutural (SMI). Para isso, foi selecionado o calo ósseo em sua totalidade como região de interesse e, após, utilizado o *threshold* de 255-32.

---

Figura 13- Ilustração da região do calo ósseo selecionada.



Fonte: Arquivo próprio.

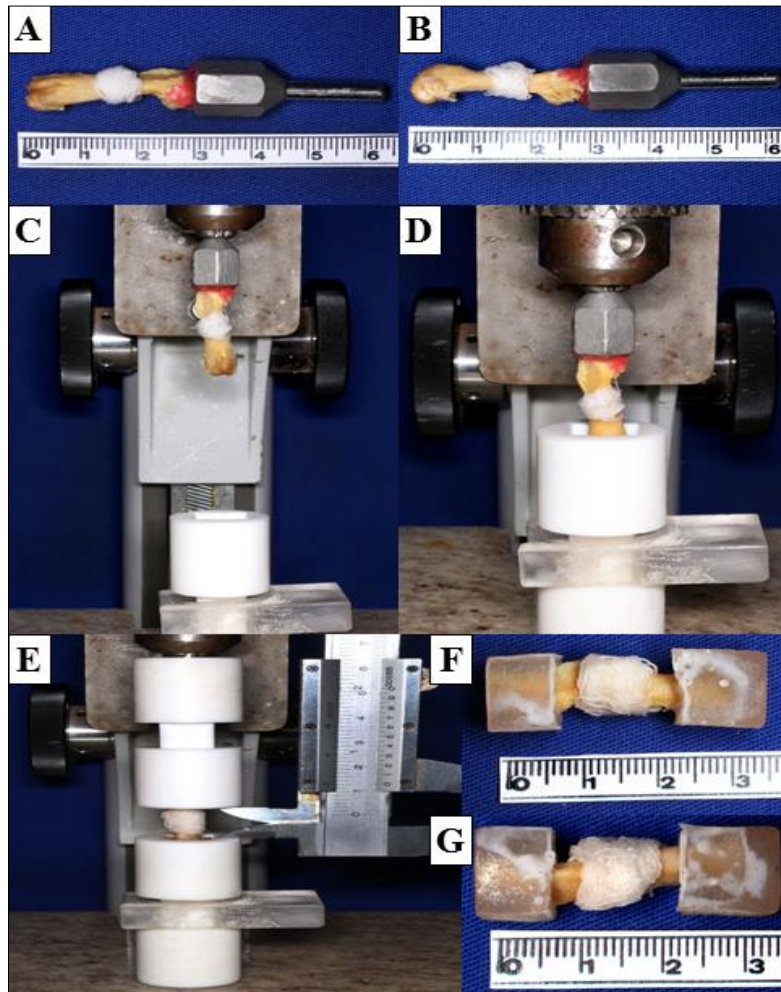
A figura ilustrativa mostra a região de interesse correspondente ao calo ósseo analisada pelo  $\mu$ -CT.

#### 4.6.6 *Análise mecânica*

Após a realização da densitometria óssea e do  $\mu$ -CT, os fêmures foram submetidos à análise mecânica na máquina INSTRON<sup>®</sup> 55MT, no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Para a análise, foi utilizado o ensaio de torção em baixa velocidade, com célula de carga de 2 Nm e velocidade de 30 %/min. Ambas as extremidades femorais foram incluídas em resina acrílica com auxílio de um paralelômetro que garantiu o correto alinhamento e posicionamento do osso na máquina (Fig.14). O calo ósseo ficou exposto entre as extremidades com resina, com vão livre padronizado de 13 mm. A amostra foi posicionada com a parte proximal do fêmur mantida fixa e, na parte distal do fêmur foi aplicada a carga no sentido anti-horário até ocorrer a falência mecânica (Fig.15). Os parâmetros estudados foram: torque máximo, energia, ângulo no torque máximo e rigidez.

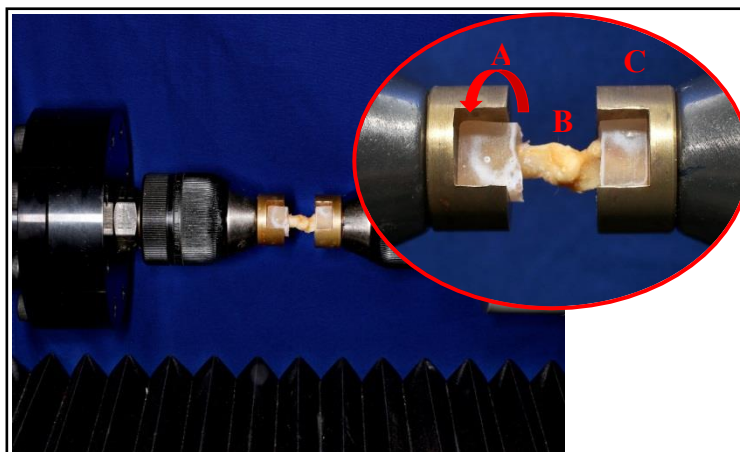
**Figura 14-** Etapas para fixação das extremidades femorais para o ensaio de torção.



Fonte: Arquivo próprio.

(A) Posicionamento da região proximal do fêmur em dispositivo a ser acoplado no paralelômetro; (B) Conferência da centralização do fêmur; (C) Fêmur posicionado no paralelômetro para fixação da região distal, com auxílio da matriz de teflon; (D) Fixação da região distal; (E) Fixação da região proximal, agora com a região distal acoplada na outra matriz de teflon posicionada superiormente ao paralelômetro; (F) e (G) Fêmur com as extremidades presas de frente e perfil.

**Figura 15-** Ensaio mecânico de torção.



Fonte: Arquivo próprio.

A imagem ilustrativa mostra: (A) parte móvel que roda em sentido anti-horário; (B) Fêmur e (C) parte fixa. Interposto está o calo ósseo submetido ao esforço mecânico.

#### **4.6.7 Análise molecular**

Esta análise foi realizada nos subgrupos acompanhados por 5 dias e 2 semanas pós-fratura. Para isso, os fêmures fraturados de cada animal, imediatamente após dissecados, foram transversalmente cortados em ambiente estéril, conforme a região de interesse (calo ósseo). Em seguida as amostras foram armazenadas em recipiente próprio com solução inativadora de RNase (RNAlater®, Sigma Aldrich®), imersas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80 °C até sua extração. O procedimento ocorreu no Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, e sua metodologia seguiu a seguinte ordem: 1) Extração e quantificação do RNA; 2) Verificação da integridade do RNA; 3) Sintetização de DNA complementar (cDNA); 4) quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA); 5) cálculo da expressão relativa do gene.

##### **4.6.7.1 Extração e quantificação do RNA**

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido utilizando um gral e pistilo. Posteriormente, foram colocadas em microtubos contendo 500 µL de trizol (Life Technologies®, USA) e novamente colocados no freezer -80 °C.

Após homogeneização em Trizol foi adicionado clorofórmio (100 µL), a amostra foi novamente homogeneizada, repousada por 15 minutos, e centrifugada a 4 °C com rotação de 12000 força centrífuga relativa (g) por minuto. Após foi apresentado a separação de fases, da

qual o RNA foi isolado. Em seguida, foram adicionados 250 µL de isopropanol, mantida em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 4 °C, em 12000 g por minuto. O líquido sobrenadante foi desprezado, seguido por 3 lavagens com álcool 75 % (500 µL). As amostras foram mantidas em ar ambiente para secar por 10 minutos, o *pellet* de RNA obtido e diluído em 30 µL de água ultra-pura tratada com dietilpirocarbonato livre (DEPC).

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria de absorção (230, 260 e 280 nm) em o aparelho Multiskan GO® (Thermo Scientific®, USA). Em seguida, o RNA foi submetido ao tratamento com DNase I, seguindo as instruções do fabricante. Cada 1 µg de RNA foi tratado com 1 U de DNase I (Sigma®, USA), por um período de 30 minutos (37 °C). Para inativar a ação da DNase I foi adicionado 1 µL de EDTA 0,5 M. Por fim, a quantificação do RNA foi novamente realizada.

#### **4.6.7.2 Verificação da integridade do RNA**

Foi preparado gel de agarose com concentração de 0,8% dissolvido em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A mistura foi aquecida em forno micro-ondas para facilitar a solubilização e, em seguida, foi depositada na cuba de eletroforese horizontal. Após seco, o gel foi recoberto com tampão TAE e as amostras foram aplicadas (2 µL) juntamente com *loading buffer*, azul de bromofenol e xileno cianol (2 µL) e gel *red* diluído 1:500 (2 µL). A eletroforese foi realizada com diferença de potencial (80 V a 150 V) por min. A visualização foi realizada em um aparelho transiluminador ultravioleta e o gel foi foto documentado.

#### **4.6.7.3 Sintetização do cDNA**

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems®, USA), em 1 µg da amostra foi adicionado 5,8 µL do kit de transcrição (2 µL de *RT buffer*, 0,8 µL de *DNTP mix*, 2,0 µL de *RT Random Primer*, 1,0 µL de *Multi Scribe Reverse Transcription*) e água DEPC para totalizar 20 µL de reação. As amostras foram submetidas a ciclos de temperatura em um termociclador (25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min). Após, armazenadas em freezer -20 °C.

---



#### 4.6.7.4 Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)

As reações de PCR em tempo real (*Polymerase Chain Reaction*) para quantificação da expressão de mRNA foram realizadas utilizando o kit TaqMan® no termociclador StepOnePlus™ Real- Time PCR System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Os genes estudados para a análise de expressão gênica no processo de formação óssea foram: *Colla1* (Colagenase 1a1- ID: Rn01463848\_m1), *Osterix* (Fator de transcrição Sp7- ID: Rn02769744\_s1), *Runx-2* (fator 2 de transcrição associado com diferenciação osteoblástica- ID: Rn01512300\_m1) e *IGF1* (*insulin like growth factor 1* ID: Rn00710306-m1). Estes genes foram normalizados com o gene endógeno GaPDH (ID: Rn01775763\_g1).

#### 4.6.7.5 Cálculo da expressão relativa do gene

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

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

### 4.7 Análise dos dados

Todas as análises estatísticas foram feitas com RStudio 1.0.153 (RStudio, Inc., EUA). As variáveis contínuas foram apresentadas com médias e desvios-padrão (DP). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk e, para comparar os dados entre os grupos, foi empregado o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

---

---

# *RESULTADOS*

---

## 5 RESULTADOS

Os resultados apresentados foram obtidos do total de 94 ratos que chegaram ao final do experimento. As taxas de mortalidade e exclusão foram de aproximadamente 13 %. Dos 108 animais submetidos à fratura, catorze morreram durante a indução anestésica, sendo onze para a produção da fratura óssea, e os outros três na indução anestésica que antecede o acompanhamento radiográfico do processo de consolidação. Não houve perdas de animais em decorrência de falhas técnicas relativas ao procedimento cirúrgico (fratura mal localizada, cominuição excessiva de fragmentos, soltura do fio de Kirschner, infecção), ou da desnutrição. Porém, vale ressaltar que todos os animais que morreram passaram pela restrição alimentar.

### 5.1 Massa Corporal

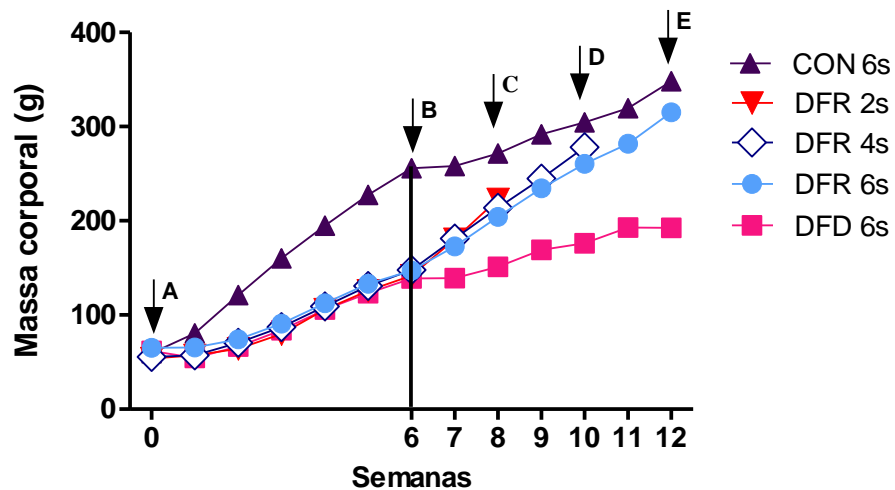
Os valores médios semanais da massa corporal estão apresentados na Fig.16. No dia zero não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (homogeneidade amostral inicial;  $p>0,05$ ) (Fig. 16-A). Ao longo do período de observação, todos os ratos ganharam peso, porém com curvas diferentes. Esta diferença foi evidenciada logo na segunda semana, onde o grupo CON 6s apresentou maior massa corporal do que os grupos com restrição alimentar neste mesmo período ( $p<0,001$ ). Na 6ª semana, data em que a fratura foi produzida, ela foi aproximadamente 45 % menor no grupo DFD 6s e nos subgrupos DFR 2s, DFR 4s e DFR 6s ( $p<0,001$ , Fig. 16-B). Na 8ª semana o grupo desnutrição (DFD 6s) apresentou uma diminuição de 44 % quando comparado ao grupo CON 6s ( $p<0,001$ ). Já os grupos realimentação reduziram em média 21 % ( $p<0,032$ ) (Fig. 16-C). Na décima semana a redução entre os animais desnutridos e o grupo controle foi de 42 % ( $p<0,001$ ), e para os subgrupos realimentação foi de 12 % ( $p<0,033$ ) (Fig. 16-D). No último período de observação pós-fratura, o grupo desnutrido apresentou redução de 45 % da massa corporal ( $p<0,001$ ), enquanto o grupo realimentação (DFR 6s) apresentou a redução de apenas de 9 % ( $p<0,034$ ) (Fig. 16-E), onde a massa corporal média foi de 348 g para os animais controle e 315 g para os animais realimentação.

Os animais realimentados e o grupo desnutrido apresentaram curvas semelhantes antes da produção da fratura óssea (período em que ambos recebiam dieta restritiva). Após a 6ª semana houve um aumento esperado da massa corporal nos subgrupos realimentação que os diferenciaram dos animais com restrição alimentar. No entanto, os animais com realimentação continuaram com o crescente ganho estatisticamente semelhante entre eles, diferindo apenas na

---

comparação de seus pontos finais, com o acréscimo de 25 % entre 2 semanas a 4 semanas e de 13 % entre 4 semanas a 6 semanas pós-fratura ( $p < 0,001$ ).

**Figura 16-** Curvas da evolução da massa corporal dos grupos experimentais.



Não foi observada diferença estatística entre a massa corporal no dia zero (A). Embora todos os animais tenham apresentado aumento de massa ao longo do tempo aqueles com a restrição alimentar e realimentação apresentaram ganho inferior em relação aos controles, tanto antes, como depois da fratura. (B= 6 semanas; C=8 semanas; D= 10 semanas; E= 12 semanas após indução da dieta alimentar). O Traço vertical representa o dia da fratura. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura.

## 5.2 Análise morfométrica

A tabela 1 apresenta as medidas de massa, comprimento e perímetros (diáfise, metáfise proximal e metáfise distal) dos fêmures direito e esquerdo, dos animais acompanhados no período de seis semanas pós-fratura. A restrição alimentar causou diminuição em todos os parâmetros macroscópicos, mostrando alterações no tecido ósseo quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os animais realimentados apresentaram aumento de massa, comprimento e circunferência metafisária proximal e distal, quando comparados aos animais desnutridos ( $p < 0,05$ ). Apenas a circunferência diafisária do calo ósseo foi semelhante entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1-** Mensurações dos fêmures 6 semanas pós-fratura (média ± DP).

	CON 6s		DFD 6s		DFR 6s	
	D	E	D	E	D	E
Massa óssea (g)	1,02±0,14	0,90±0,09	0,66±0,06 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>b</sup>	0,81±0,12 <sup>a,c</sup>	0,78±0,06 <sup>b,d</sup>
Comprimento (mm)	35,98±1,03	36,00±1,00	31,43±1,41 <sup>a</sup>	31,46±0,95 <sup>b</sup>	33,58±0,92 <sup>a,c</sup>	34,75±0,70 <sup>b,d</sup>
P. Diáfise (mm)	20,28±2,59	12,95±0,49	15,15±1,72 <sup>a</sup>	11,11±0,56 <sup>b</sup>	17,21±2,12	12,28±0,33 <sup>b,d</sup>
P. Metáfise proximal (mm)	15,38±0,69	15,76±0,64	13,83±0,66 <sup>a</sup>	13,04±0,57 <sup>b</sup>	14,51±0,33 <sup>a,c</sup>	14,14±0,70 <sup>b,d</sup>
P. Metáfise distal (mm)	16,49±0,41	17,38±0,61	14,72±0,81 <sup>a</sup>	14,58±0,47 <sup>b</sup>	15,71±0,75 <sup>a,c</sup>	15,74±0,84 <sup>b,d</sup>

A tabela mostra os valores da massa óssea, comprimento e perímetros (diáfise, metáfise proximal e distal) dos fêmures (D- direito e E- esquerdo). CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística, (a= p<0,05) vs CON 6s (D - Fêmur direito); (b= p<0,05) vs CON 6s (E - Fêmur esquerdo); (c= p<0,05) vs DFD 6s (D - Fêmur direito); (d= p<0,05) vs DFD 6s (E - Fêmur esquerdo).

A tabela 2 apresenta os valores macroscópicos dos subgrupos realimentados (2, 4 e 6 semanas pós-fratura). A realimentação resultou em melhora dos parâmetros nas primeiras semanas pós-fratura em ambos os fêmures. Os animais do subgrupo DFR 2s possuíam menores valores que aumentaram no subgrupo DFR 4s (p<0,05), porém ao comparar os subgrupos DFR 4s e DFR 6s foi observado resultados semelhantes em todos os parâmetros analisados (p>0,05), evidenciando um possível estacionamento do aumento destes valores. Apenas o perímetro da diáfise no calo ósseo não apresentou diferença estatística significativa em todos os períodos observados (p>0,05).

**Tabela 2-** Mensurações dos fêmures dos subgrupos realimentados pós-fratura (média ± DP).

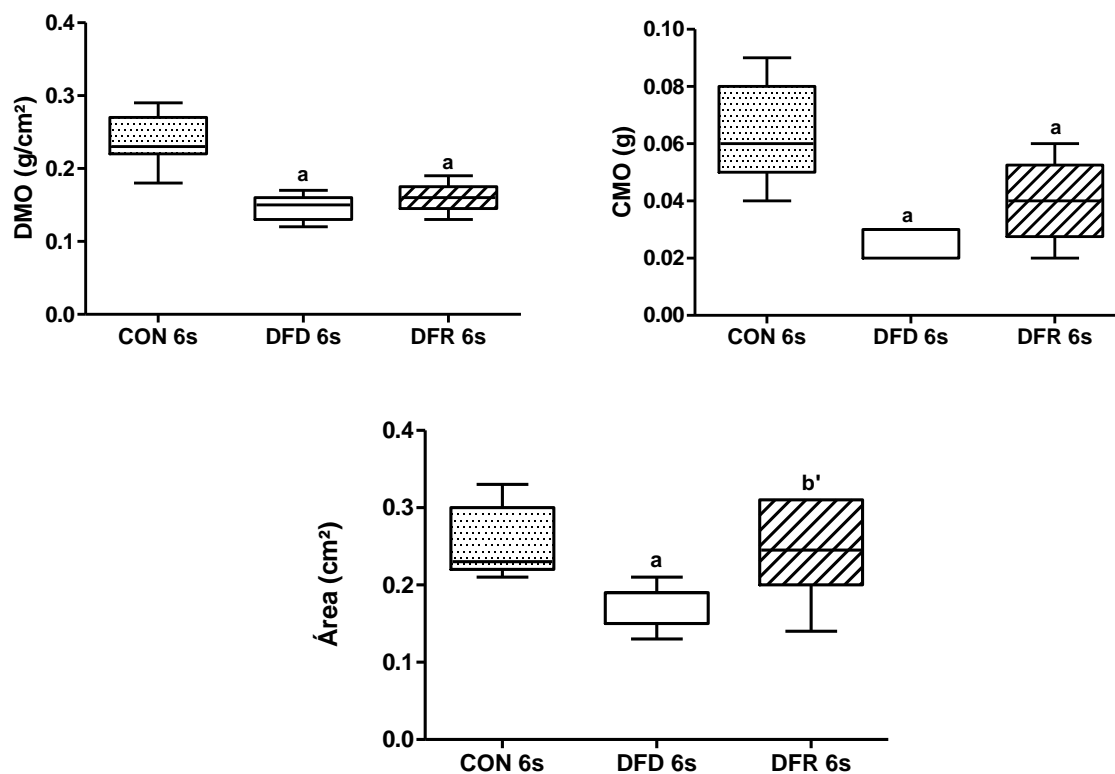
	DFR 2s		DFR 4s		DFR 6s	
	D	E	D	E	D	E
Massa óssea (g)	0,64±0,04	0,58±0,06	0,79±0,10 <sup>a</sup>	0,71±0,08 <sup>b</sup>	0,81±0,12 <sup>a</sup>	0,78±0,06 <sup>b</sup>
Comprimento (mm)	29,62±0,67	30,29±1,02	33,57±0,88 <sup>a</sup>	33,67±1,04 <sup>b</sup>	33,58±0,92 <sup>a</sup>	34,75±0,70 <sup>b</sup>
P. Diáfise (mm)	17,92±2,35	10,64±0,47	17,61±1,89	11,54±0,77 <sup>b</sup>	17,21±2,12	12,28±0,33 <sup>b</sup>
P. Metáfise proximal (mm)	13,55±0,62	12,84±0,61	14,71±0,49 <sup>a</sup>	13,84±0,89 <sup>b</sup>	14,51±0,33 <sup>a</sup>	14,14±0,70 <sup>b</sup>
P. Metáfise distal (mm)	14,03±0,60	14,28±1,12	15,12±0,52 <sup>a</sup>	15,80±0,78 <sup>b</sup>	15,71±0,75 <sup>a</sup>	15,74±0,84 <sup>b</sup>

A tabela mostra os valores da massa óssea, comprimento e perímetros (diáfise, metáfise proximal e distal) dos fêmures (D- direito e E- esquerdo). DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística, (a= p<0,05) vs DFR 2s (D - Fêmur direito); (b= p<0,05) vs DFR 2s (E - Fêmur esquerdo).

### 5.3 Densitometria óssea

A figura 17 mostra a comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo nos grupos acompanhados seis semanas pós-fratura. Neste período a DMO ( $p<0,001$ ), o CMO ( $p<0,001$ ) e a área do calo ( $p=0,01$ ) dos animais com restrição alimentar foram significativamente inferiores aos valores controles. Por outro lado, os animais realimentados apresentaram tendência à diferença estatística para a área do calo ósseo quando comparados aos animais desnutridos ( $p=0,067$ ). No entanto, apesar dessa diferença o grupo DFD 6s e DFR 6s apresentaram valores semelhantes para CMO e DMO ( $p>0,05$ ), indicando que a densidade mineral óssea permaneceu inalterada após a realimentação.

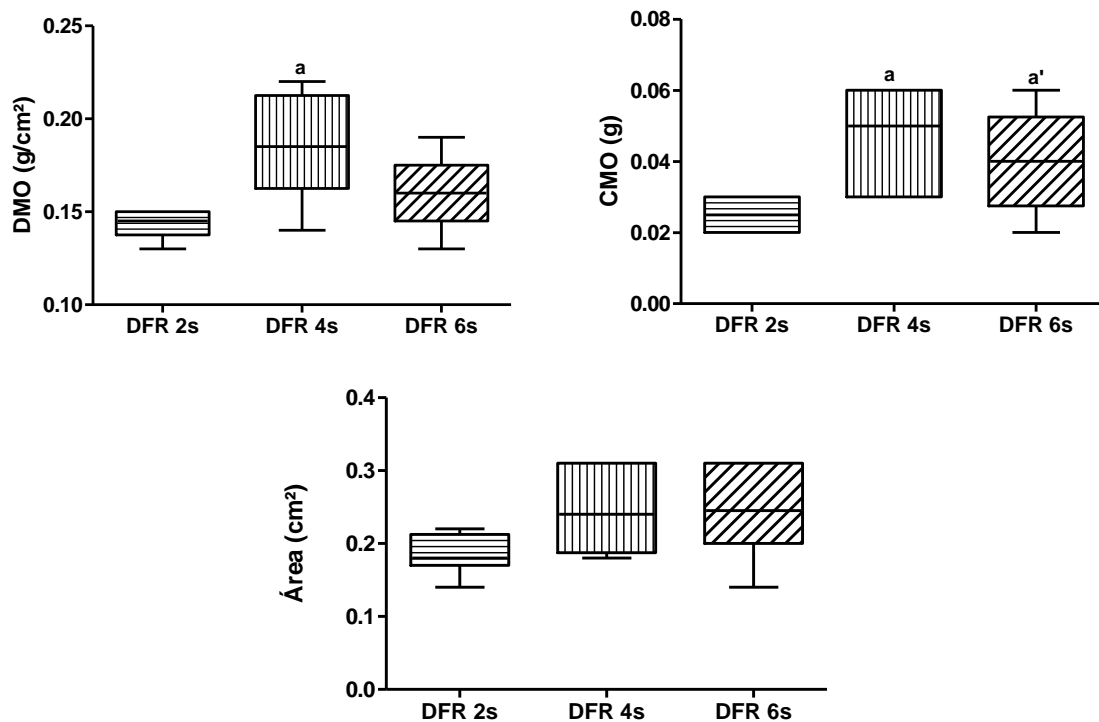
**Figura 17-** Comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo entre os grupos seis semanas pós-fratura.



A restrição alimentar reduziu tanto a densidade DMO (37 %), como o CMO (50 %) e a área do calo ósseo neoformado (31 %), quando comparado aos animais controle ( $p<0,05$ ). Neste mesmo período a realimentação aumentou a área do calo ósseo (33 %) ( $p=0,057$ ), sem diferença estatística para a DMO (+7 %) e o CMO (+33 %), quando comparados aos animais desnutridos. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística, (a=  $p<0,05$ ) vs CON 6s; e tendência à diferença estatística (b' =  $p<0,10$ ) vs DFD 6s.

Houve aumento significativo da DMO (+29%,  $p=0,009$ ) e do CMO (+67%,  $p=0,016$ ) entre os subgrupos realimentados nos períodos de 2 a 4 semanas pós-fratura. Entre 4 e 6 semanas pós-fratura, nenhum dos parâmetros densitométricos apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) (Fig.18).

**Figura 18-** Comparação da DMO, CMO e área do calo ósseo entre os grupos realimentados pós-fratura.



No período de 4 a 6 semanas pós-fratura nenhum dos parâmetros densitométricos apresentaram diferença estatística, de 2 a 4 semanas houve aumento significativo da densidade DMO (29 %) e do conteúdo CMO (67 %). A área do calo ósseo permaneceu igual em todos os subgrupos realimentados. DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística, ( $a= p<0,05$ ) vs DFR 2s; e tendência à diferença estatística ( $a'= p<0,10$ ) vs DFR 2s.

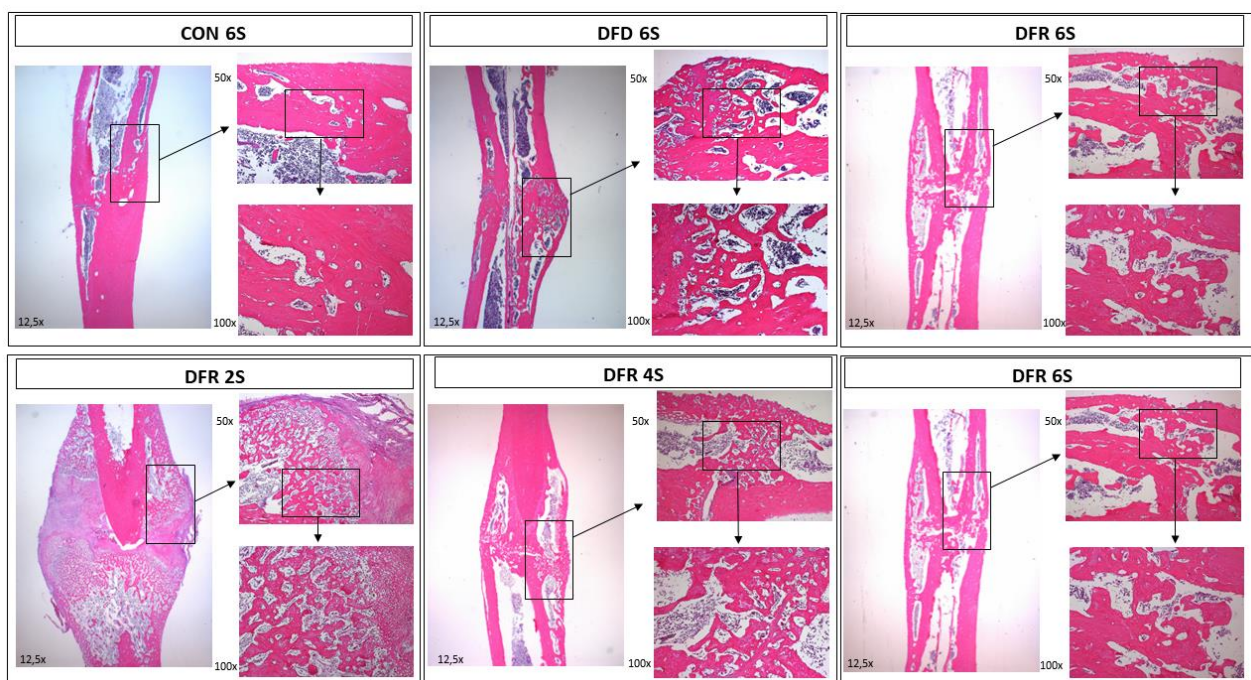
#### 5.4 Microscopia óptica

Seis semanas após a fratura os ratos do grupo controle apresentaram a região do calo com sinais de remodelação óssea cortical, com mínimo tecido ósseo neoformado. As poucas trabéculas apresentadas eram mais organizadas, espessas e compactadas. Os ratos sob restrição alimentar, no entanto, apresentaram um calo ósseo imaturo composto em grande maioria por cartilagem e tecido ósseo neoformado, com presença de trabéculas ósseas finas e dispersas, evidenciando atraso no processo de consolidação óssea. A realimentação melhorou a

consolidação, com a diminuição da quantidade de cartilagem e presença de trabéculas ósseas mais espessas e compactadas (Fig.19).

Na análise dos subgrupos realimentados por diferentes semanas pós-fratura foi possível observar a evolução característica do processo de consolidação óssea, porém com atraso nos últimos períodos avaliados. O grupo DFR 2s apresentou o calo ósseo formado predominantemente por tecido cartilaginoso (Fig.19) e abundante deposição de colágeno (Fig.20), características que correspondem a fase de calo ósseo mole que era esperada para esse período. O grupo quatro semanas pós-fratura (DFR 4s) apresentou maior quantidade de trabéculas ósseas, porém só se tornaram mais espessas, organizadas e compactadas com 6 semanas pós-fratura (DFR 6s) (Fig.19), nesta última fase já era esperado que a região do calo ósseo apresentasse maior característica de osso remodelado. Além disso, pôde ser observado nesses animais, a redução tempo dependente na deposição de colágeno (Fig.20).

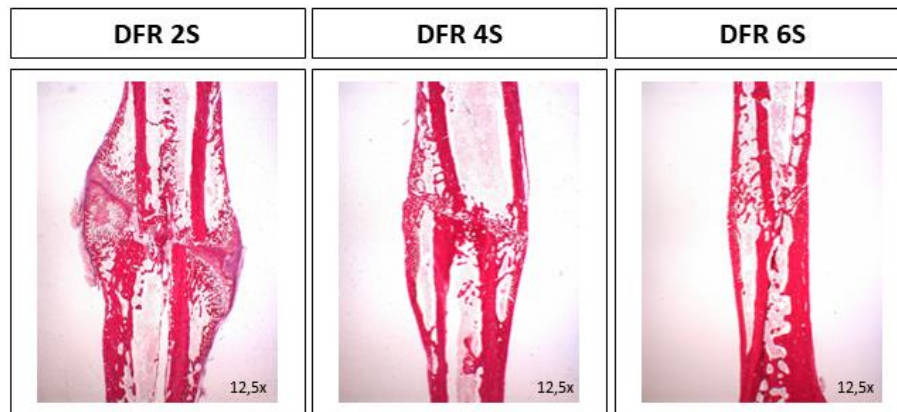
**Figura 19-** Cortes histológicos longitudinais do calo ósseo.



O grupo DFD 6s apresentou atraso na proliferação e diferenciação celular durante a reparação da fratura. Na sexta semana pós-fratura os animais controles apresentaram o calo ósseo remodelado, enquanto os ratos sob restrição apresentavam o calo ósseo composto na grande maioria por tecido cartilaginoso e trabéculas imaturas. O grupo realimentado seis semanas pós-fratura (DFR 6s) apresentou menor quantidade de cartilagem e trabéculas ósseas mais compactadas, mas o calo ósseo não estava remodelado como dos animais controle. Já entre os subgrupos realimentados (DFR 2, 4 e 6 semanas) houve evolução do processo de consolidação, porém com atraso. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. O retângulo retrata a região correspondente ao aumento de 50x e 100x (12,5x, 50x e 100x. HE).



**Figura 20-** Cortes histológicos longitudinais do calo ósseo corados com *picrosirius red*.



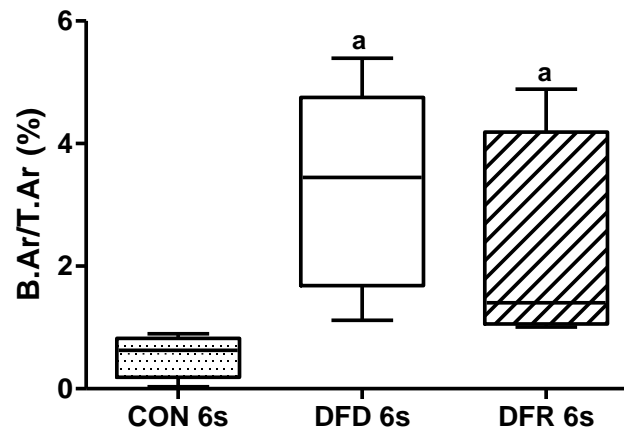
Os subgrupos realimentados mostraram redução da deposição de colágeno, que foi associada ao tempo de acompanhamento e a evolução do processo de consolidação. DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura- 12,5x.

#### 5.4.1 *Volume de osso neoformado*

O percentual de tecido neoformado foi avaliado por meio da histomorfometria (Fig. 21 e 22). No período de 6 semanas pós-fratura os animais do grupo controle apresentaram mínimo tecido ósseo neoformado, enquanto os animais do grupo DFD 6s continuavam com grande quantidade deste tecido ( $p=0,011$ ) (Fig. 23). Embora o grupo realimentado por mesmo período tenha apresentado melhora no processo de remodelação óssea, com diminuição de 27 % do tecido ósseo neoformado, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo desnutrido ( $p>0,05$ ) (Fig. 21).

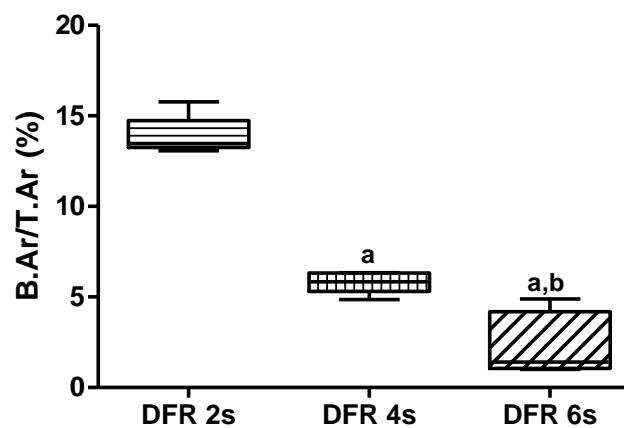
Entre os animais realimentados a quantidade de tecido ósseo neoformado foi maior no período de 2 semanas pós-fratura, com redução tempo dependente. Houve diferença estatística significativa entre REA 2s e REA 4s, REA 2s e REA 6s, REA 4s e REA 6s ( $p<0,05$ ) (Fig. 22), que também pode ser observada qualitativamente nos cortes histológicos (Fig. 23).

**Figura 21-** Porcentual de tecido ósseo neoformado obtido por meio da razão da área de osso pela área total.



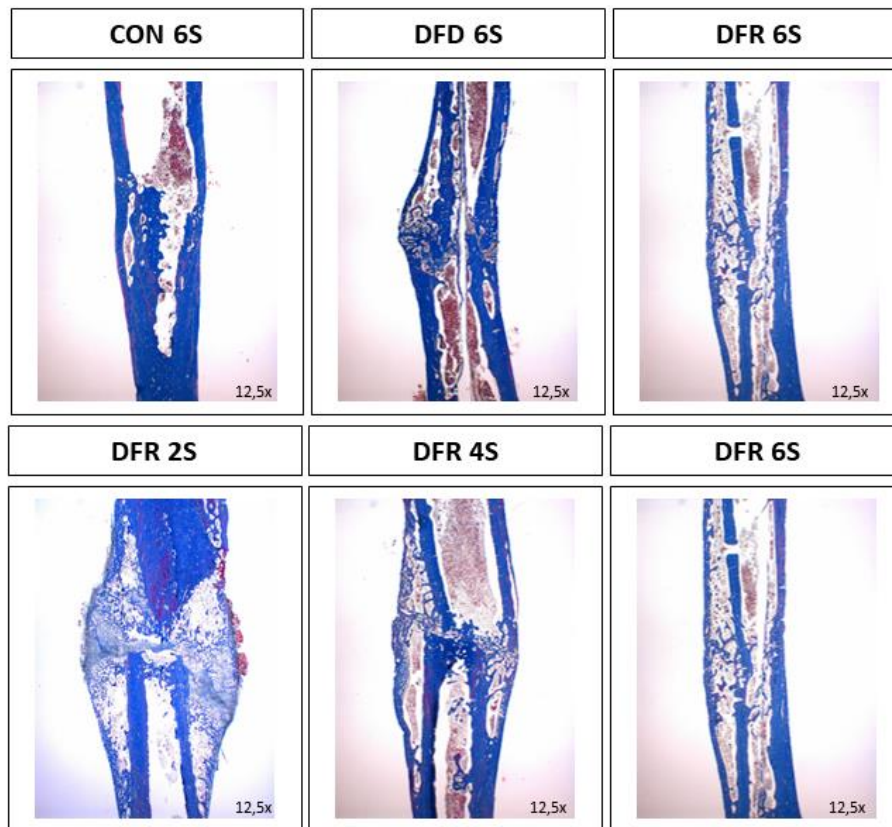
Houve diminuição de 84 % do volume de tecido neoformado no grupo controle em relação ao grupo DFD 6s, e de 78 % no grupo controle em relação ao DFR 6s. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. A letra indica diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs CON 6s.

**Figura 22-** Porcentual de tecido ósseo neoformado nos subgrupos realimentados.



Houve redução tempo dependente, relacionada com o processo de consolidação e consequente remodelação óssea. Entre DFR 2s e DFR 4s (-58 %), DFR 2s e DFR 6s (-83 %) e entre DFR 4s e DFR 6s (-59 %). DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs DFR 2s; ( $b = p < 0,05$ ) vs DFR 4s.

**Figura 23-** Fotomicrografia do tecido neoformado na região da fratura.



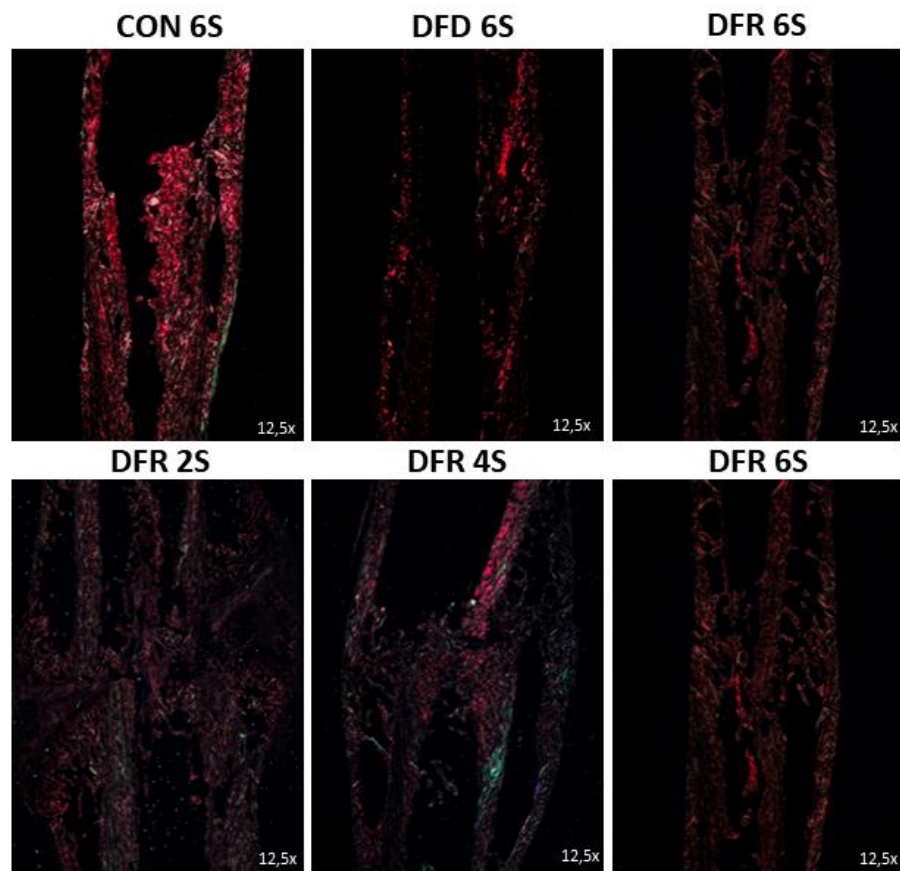
O grupo controle apresentou valor inferior do porcentual de osso neoformado em relação aos grupos DFD 6s e DFR 6s. Nos animais realimentados foi apresentada uma redução tempo dependente. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura- tricrômico de Masson, 12,5x.

#### 5.4.2 Fibras de colágeno no calo ósseo

A análise histomorfométrica para avaliação do porcentual de fibras colágenas no calo ósseo obtido pela coloração *picrosirius red* (Fig. 24) mostrou diminuição significativa de colágeno nos animais restrição alimentar 6 semanas pós-fratura em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ). A realimentação neste período aumentou as fibras colágenas em 109 % quando comparada aos animais desnutridos ( $p = 0,007$ ) (Fig. 25).

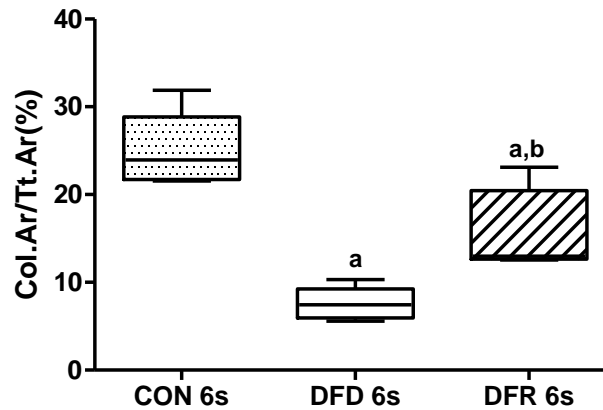
Nos subgrupos realimentados é possível observar a redução das fibras colágenas em 27% entre os animais DFR 2s e DFR 6s ( $p = 0,081$ ) (Fig. 26).

**Figura 24-** Fotomicrografia das fibras de colágeno expressas em vermelho-alaranjado e verde-amarelado sob luz polarizada, na região do calo ósseo.



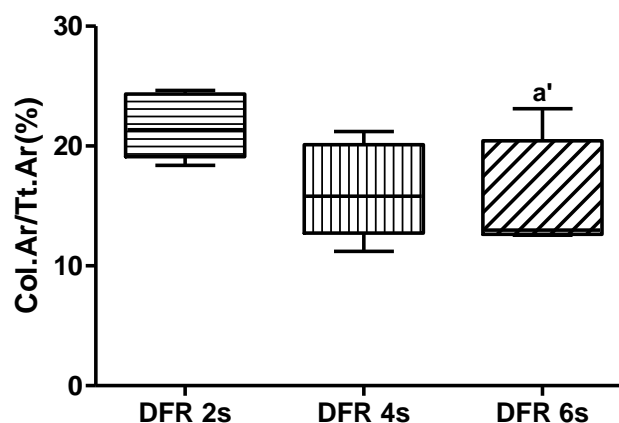
A deposição de colágeno no calo ósseo dos animais com DFD 6s foi significativamente menor que o grupo CON 6s (-70 %). O grupo realimentado neste período (DFR 6s) apresentou melhora significativa do colágeno (+109 %) quando comparado aos animais desnutridos. Nos animais realimentados (REA 2, 4 e 6s) é possível observar a redução de 27 % de colágeno entre os grupos 2 e 6 semanas pós-fratura ( $p < 0,10$ ). CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura- *picosirius red*, 12,5x.

**Figura 25-** O gráfico mostra o percentual da área de colágeno na região do calo ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total.



Houve diminuição das fibras colágenas no grupo DFD 6s de aproximadamente 70 % em relação ao controle ( $p < 0,001$ ), e de 52 % em relação ao grupo DFR 6s ( $p = 0,0007$ ). O grupo DFR 6s apresentou a redução de aproximadamente 37 % em relação ao grupo CON 6s ( $p = 0,015$ ). CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs CON 6s; ( $b = p < 0,05$ ) vs DFD 6s.

**Figura 26-** O gráfico mostra o percentual da área de colágeno na região do calo ósseo entre os animais realimentados, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total.



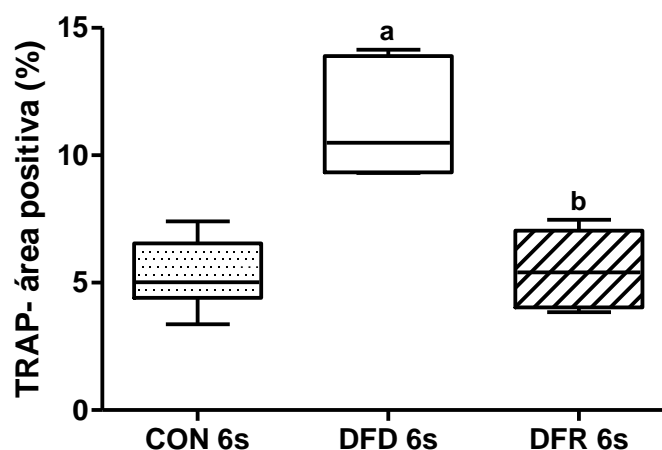
Houve tendência a diferença estatística apenas entre os grupos DFR 2s e DFR 6s, com a diminuição das fibras colágenas em 27 % ( $p = 0,081$ ). DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. A letra indica tendência à diferença estatística, ( $a' = p < 0,10$ ) vs DFR 2s.

### 5.4.3 Atividade osteoclástica no calo ósseo

A coloração fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é marcador bioquímico de reabsorção óssea e permite marcar, especificamente a atividade osteoclástica, com manchas avermelhadas nas imagens histológicas. Nossas seções de coloração TRAP revelaram um aumento significativo de 113 % na atividade de reabsorção do calo de animais do grupo DFD 6s em comparação com os controles, medido pela área TRAP-positiva ( $p < 0,001$ ) (Fig. 27), marcada por osteoclastos de cor vermelha e setas verdes pontiagudas (Fig. 28). Por outro lado, a realimentação neste período diminuiu significativamente a área de reabsorção óssea no calo em 51 % em comparação com os ratos DFD 6s ( $p < 0,001$ ), com valores comparáveis aos observados em ratos do grupo controle ( $p > 0,05$ ) (Fig. 27).

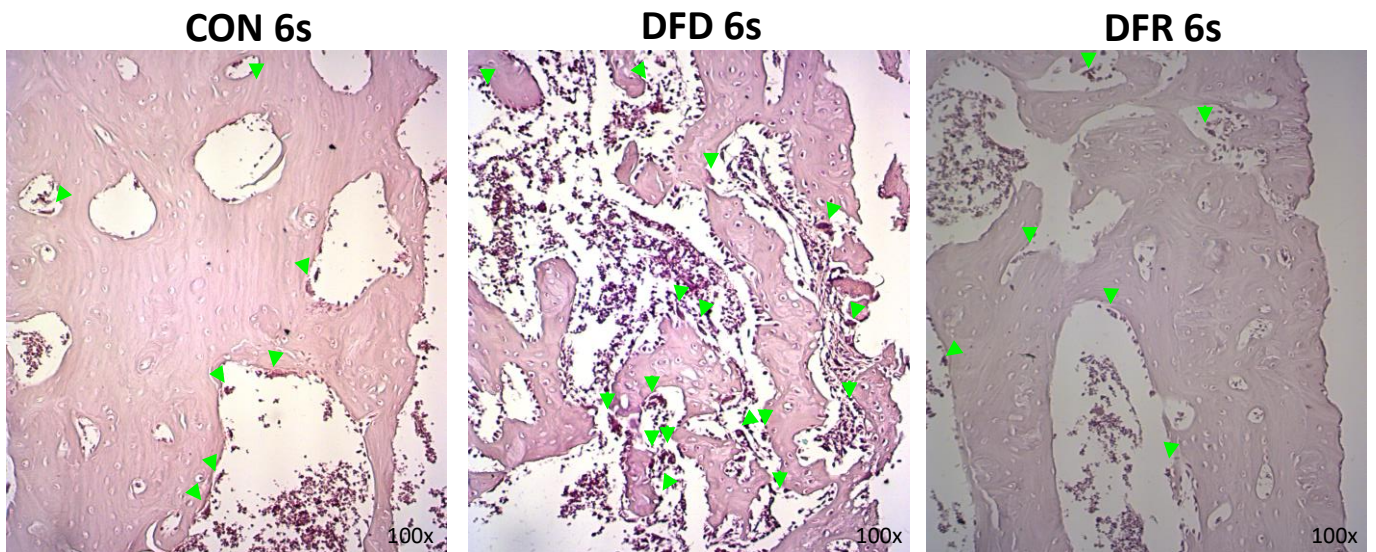
A quantificação nos subgrupos realimentação (DFR 2s, DFR 4s e DFR 6s) não identificou diferença estática significativa entre eles ( $p > 0,05$ ) (Fig. 29).

**Figura 27-** Gráfico com a quantificação da atividade osteoclástica dos grupos seguidos por 6 semanas pós-fratura, obtida por imagens histológicas coradas com TRAP.



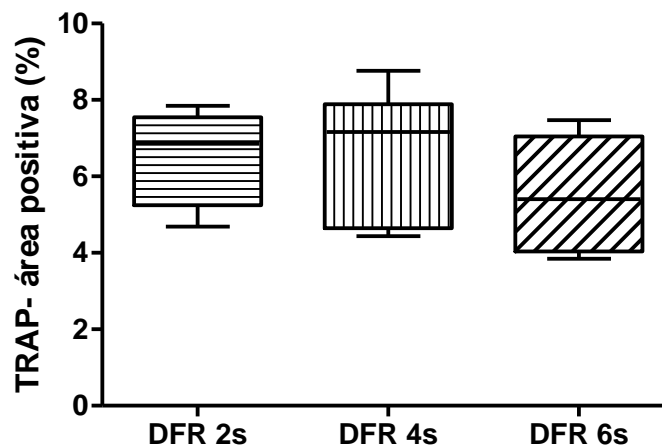
A área TRAP-positiva foi significativamente maior nos animais DFD 6s quando comparado ao grupo CON 6s e ao DFR 6s. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato. As letras indicam diferença estatística (a=  $p < 0,05$ ) vs CON 6s; (b=  $p < 0,05$ ) vs DFD 6s.

**Figura 28-** Fotomicrografia da área de reabsorção do calo ósseo seis semanas pós-fratura.



Lâminas coradas com TRAP, as setas verdes indicam os osteoclastos corados em vermelho. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato, 100x.

**Figura 29-** Gráfico com a quantificação da atividade osteoclástica dos subgrupos realimentados acompanhados por 2, 4 e 6 semanas pós-fratura, obtida por imagens histológicas coradas com TRAP.



A área TRAP-positiva foi semelhante entre os subgrupos. DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato.

## 5.5 Imunoistoquímica

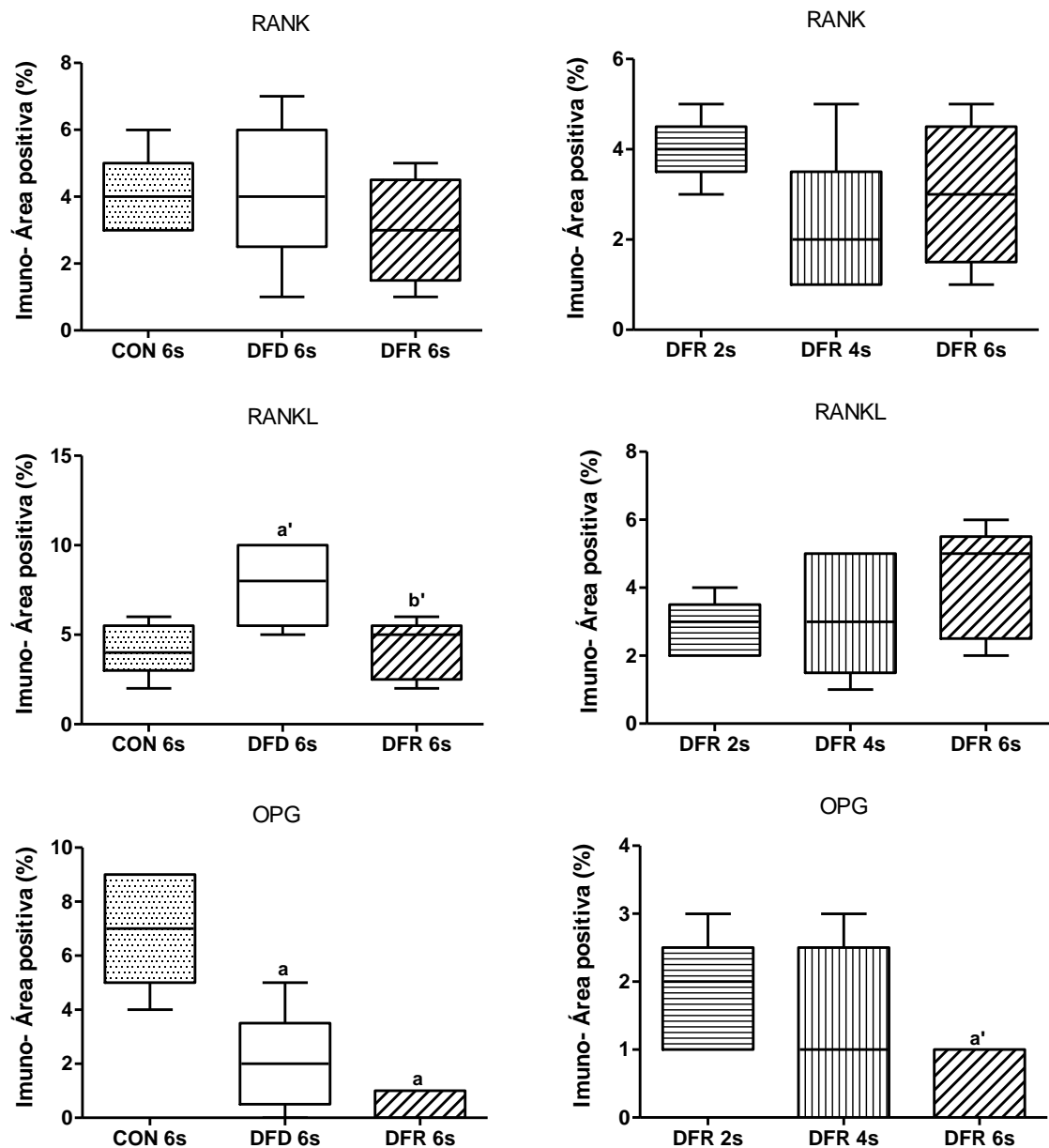
A análise imunoistoquímica confirmou a evidência de remodelação óssea desequilibrada de nossas seções histológicas coradas. O grupo DFD 6s apresentou alto padrão de imunomarcagem na área RANKL positiva, com aumento de 95 % em relação ao grupo CON 6s ( $p=0,060$ ). Embora a área RANK-positiva tenha sido semelhante entre os três grupos ( $p>0,05$ ), a área OPG-positiva foi 250 % maior no grupo CON 6s ( $p=0,001$ ) em comparação com o grupo DFD 6s (Fig.30). O grupo DFR 6s apresentou uma tendência à diferença estatística com diminuição de 46 % na área positiva para RANKL ( $p=0,055$ ), embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada nas áreas RANK-positiva e OPG-positiva em relação aos animais desnutridos. Portanto, a desnutrição aumentou a atividade de reabsorção óssea, que foram parcialmente neutralizadas pela realimentação. As áreas de imunomarcagem positiva para RANK, RANKL e OPG são indicadas por setas verdes e ilustram as alterações estatisticamente significativas detectadas seis semanas pós-fratura (Fig.31).

Entre os subgrupos realimentados foi observada a redução de aproximadamente 78 % na área OPG-positiva entre os acompanhamentos de 2 a 6 semanas pós-fratura ( $p=0,089$ ), demonstrando avanço nas fases da consolidação óssea com a evolução do tempo, porém as áreas RANK e RANKL- positivas permaneceram semelhantes entre os três períodos observacionais ( $p>0,05$ ) (Fig.30).

---

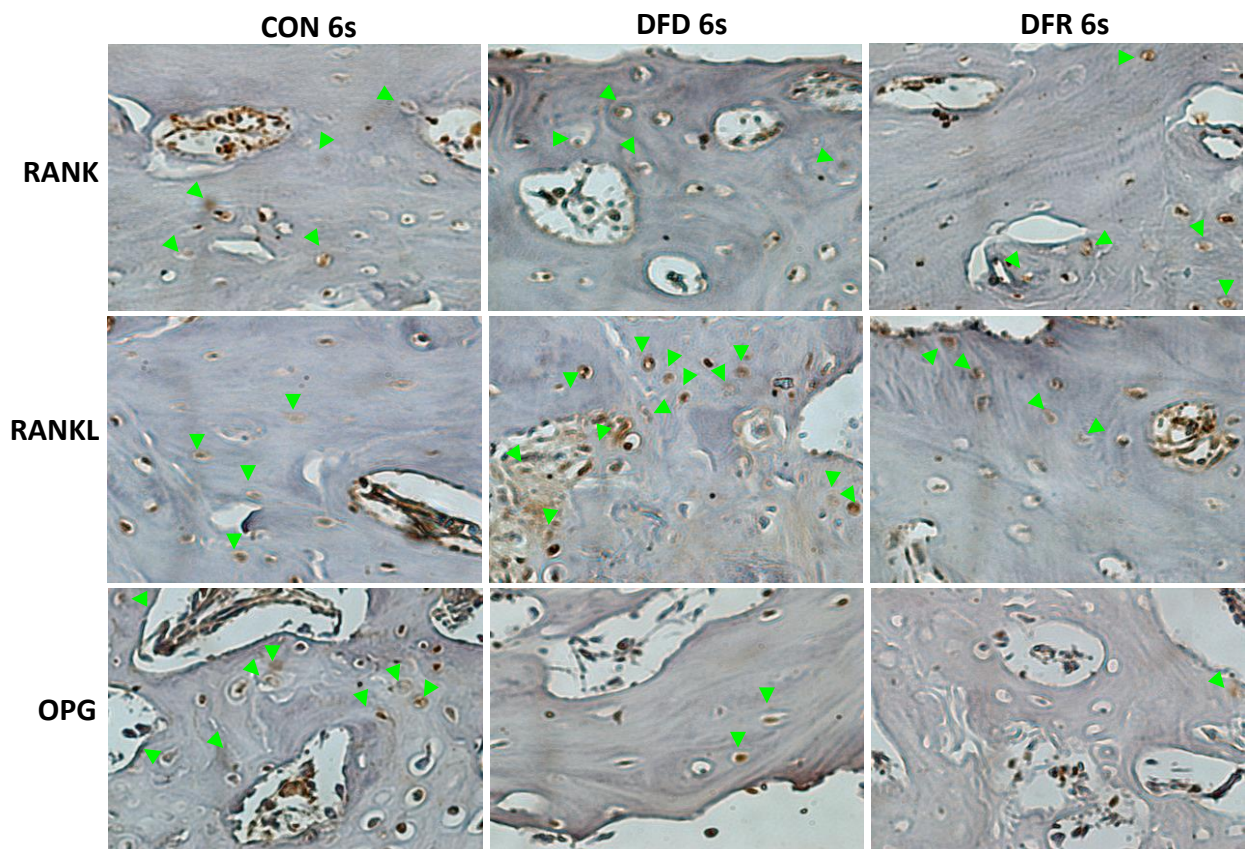


**Figura 30-** Os gráficos mostram o percentual da área de imunomarcção positiva para RANK, RANKL e OPG em todos os subgrupos avaliados.



CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs CON 6s; tendência à diferença estatística ( $a' = p < 0,10$ ) vs CON 6s ou vs DFR 2s; e tendência à diferença estatística ( $b' = p < 0,10$ ) vs DFD 6s.

**Figura 31-** A figura apresenta a área de imunomarcção positiva para RANK, RANKL e OPG, indicadas por setas verdes.



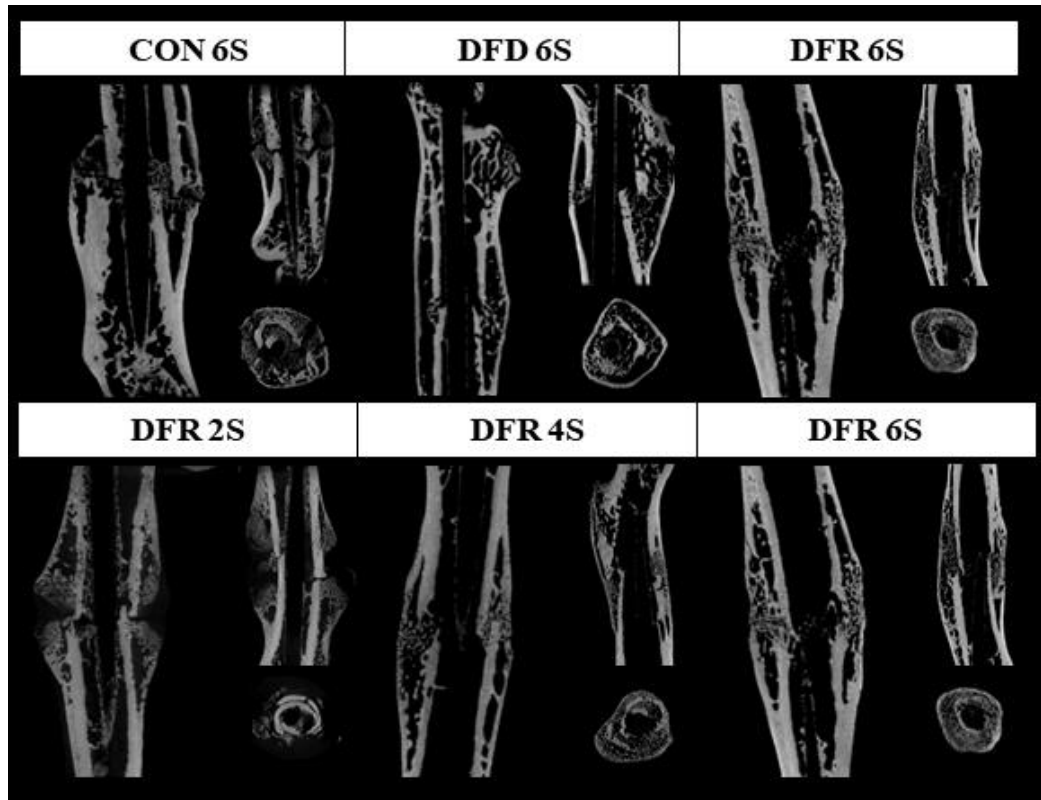
Os grupos CON 6s e DFR 6s exibiram uma área RANKL-positiva menor do que DFD 6s. Por outro lado, os ratos CON 6s apresentaram uma área positiva maior para OPG do que para os grupos DFR 6s e DFD 6s. Não houve diferença estatística significativa na área RANK-positiva entre os grupos. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa-B; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B; OPG: osteoprotegerina.

## 5.6 Microarquitetura do calo ósseo

A restrição alimentar afetou negativamente a formação do calo ósseo reduzindo seu volume (BV) em 29 % ( $p=0,019$ ), no período de seis semanas pós-fratura (Fig. 32 e 33), a razão de volume ósseo pelo volume total (BV/TV) foi reduzida em 44 % ( $p<0,001$ ), o número de trabéculas (Tb.N) em 50 % ( $p<0,001$ ), a densidade de conectividade (Conn.D) em 84 % ( $p<0,001$ ), já o espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp) teve o aumento 63 % ( $p<0,001$ ). Por outro lado, o grupo DFR 6s diminuiu Tb.Sp em 42 % ( $p<0,001$ ), o índice do modelo estrutural em 117% ( $p=0,028$ ), e aumentou BV/TV em 74 % ( $p<0,001$ ), Tb.N em 97 % ( $p<0,001$ ) e Conn.D em 541 % ( $p<0,001$ ) quando comparado aos animais desnutridos de

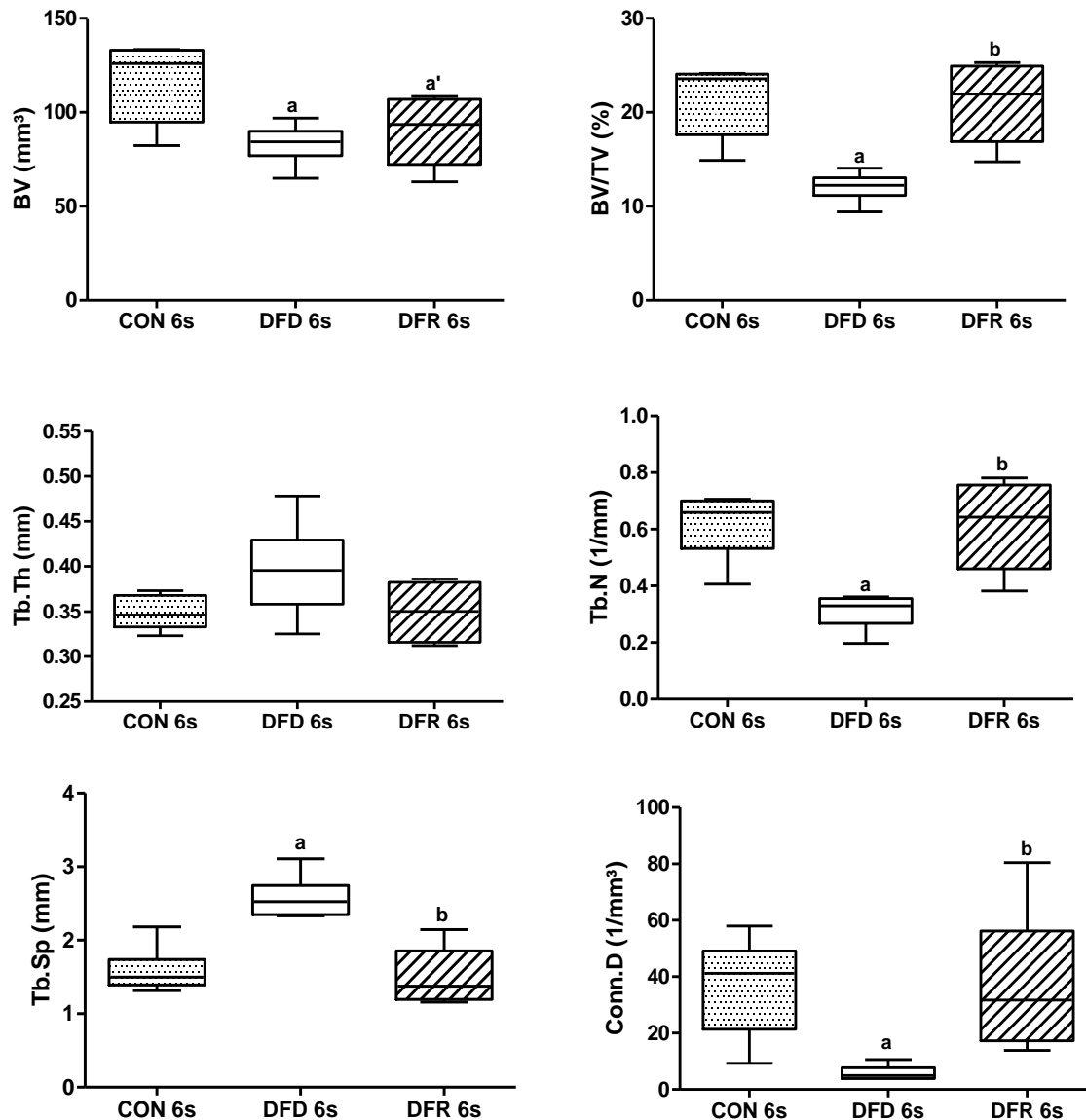
mesmo período. Além disso, os animais DFR 6s apresentaram valores semelhantes ao grupo CON 6s para vários parâmetros (BV/TV, Tb.Th , Tb.N , Tb.Sp , Conn.D e SMI), indicando que houve restauração das alterações causadas pela desnutrição (Fig. 33 e 34).

**Figura 32-** Imagens do calo ósseo obtidas pelo  $\mu$ CT.



A figura mostra a redução do volume ósseo no grupo DFD 6s quando comparado aos grupos de mesmo período. Entre os subgrupos realimentados foi observada a evolução do processo de consolidação. Planos: sagital, coronal e transversal. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura.

**Figura 33-** Análise quantitativa da microestrutura do calo ósseo obtida pela microtomografia computadorizada.



A restrição alimentar reduziu o volume do calo ósseo (em 29 %,  $p=0,019$ ), a razão de volume ósseo pelo volume total (em 44 %,  $p<0,001$ ), o número de trabéculas ósseas (em 50 %,  $p<0,001$ ) e a densidade de conectividade do calo (em 84 %,  $p<0,001$ ), por outro lado, aumentou a separação entre as trabéculas ósseas formadas no calo ósseo (em 63 %,  $p<0,001$ ). A realimentação aumentou a razão de volume ósseo pelo volume total (em 74 %,  $p<0,001$ ), o número de trabéculas (em 97 %,  $p<0,001$ ) e a densidade de conectividade (em 541 %,  $p<0,001$ ), além disso, reduziu o espaçamento entre as trabéculas formadas no calo (em 42 %,  $p<0,001$ ) quando comparado aos animais desnutridos. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística (a=  $p<0,05$ ) vs CON 6s; tendência à diferença estatística (a'=  $p<0,10$ ) vs CON 6s; (b=  $p<0,05$ ) vs DFD 6s.

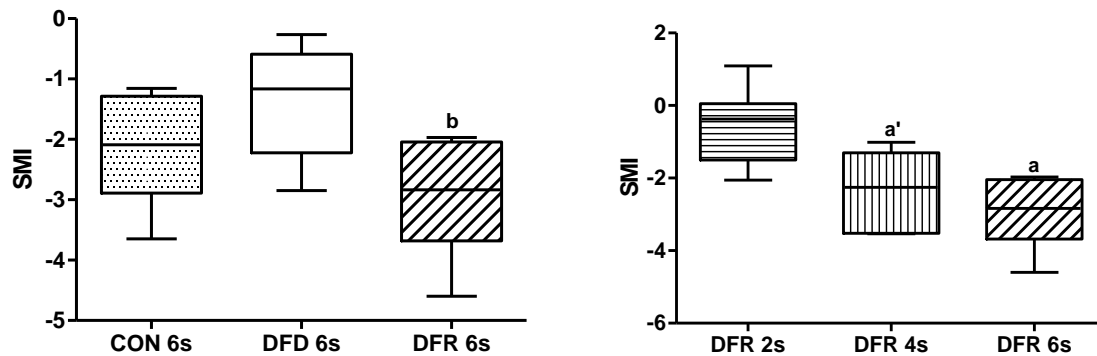
A tabela 3 apresenta os valores microtomográficos dos animais realimentados. Foi observada tendência à diferença estatística significativa entre os grupos DFR2s e DFR6s, onde os animais realimentados por maior período apresentaram aumento da razão de volume ósseo pelo volume total em 25 % ( $p=0,099$ ), já a densidade de conectividade foi reduzida em 69 % ( $p=0,041$ ) além do SMI em 310 % ( $p=0,011$ ) quando comparado aos realimentados por duas semanas pós-fratura. O índice de modelo estrutural foi maior no grupo DFR 2s, com redução de 224 % para DFR 4s ( $p=0,070$ ) e de 310 % para o grupo DFR 6s ( $p=0,011$ ) (Fig. 34).

**Tabela 3-** Análise quantitativa da microestrutura do calo ósseo obtida pela microtomografia computadorizada (média  $\pm$  DP).

	DFR 2s	DFR 4s	DFR 6s
BV (mm <sup>3</sup> )	76,12 $\pm$ 6,85	91,93 $\pm$ 15,32	90,08 $\pm$ 18,19
BV/TV (%)	16,77 $\pm$ 1,51	19,34 $\pm$ 3,22	21,04 $\pm$ 4,23 <sup>a'</sup>
Tb.Th (mm)	0,31 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,03
Tb.N (1/mm)	0,56 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,14	0,61 $\pm$ 0,17
Tb.Sp (mm)	1,61 $\pm$ 0,28	1,60 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,39
Conn.D (1/mm <sup>3</sup> )	121,10 $\pm$ 58,67	72,16 $\pm$ 59,40	37,37 $\pm$ 24,94 <sup>a</sup>
SMI	-0,72 $\pm$ 1,38	-2,33 $\pm$ 1,07 <sup>a'</sup>	-2,95 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>

A realimentação por maior período diminuiu a densidade de conectividade (em 69 %,  $p=0,041$ ), o índice de modelo estrutural (em 310 %,  $p=0,011$ ) e aumentou a razão de volume ósseo pelo volume total (em 25 %,  $p=0,099$ ) em relação ao grupo realimentado duas semanas pós-fratura. DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a= p<0,05$ ) vs DFR 2s; tendência à diferença estatística ( $a'= p<0,10$ ) vs DFR 2s.

Figura 34- Índice de modelo estrutural do calo ósseo entre os grupos.

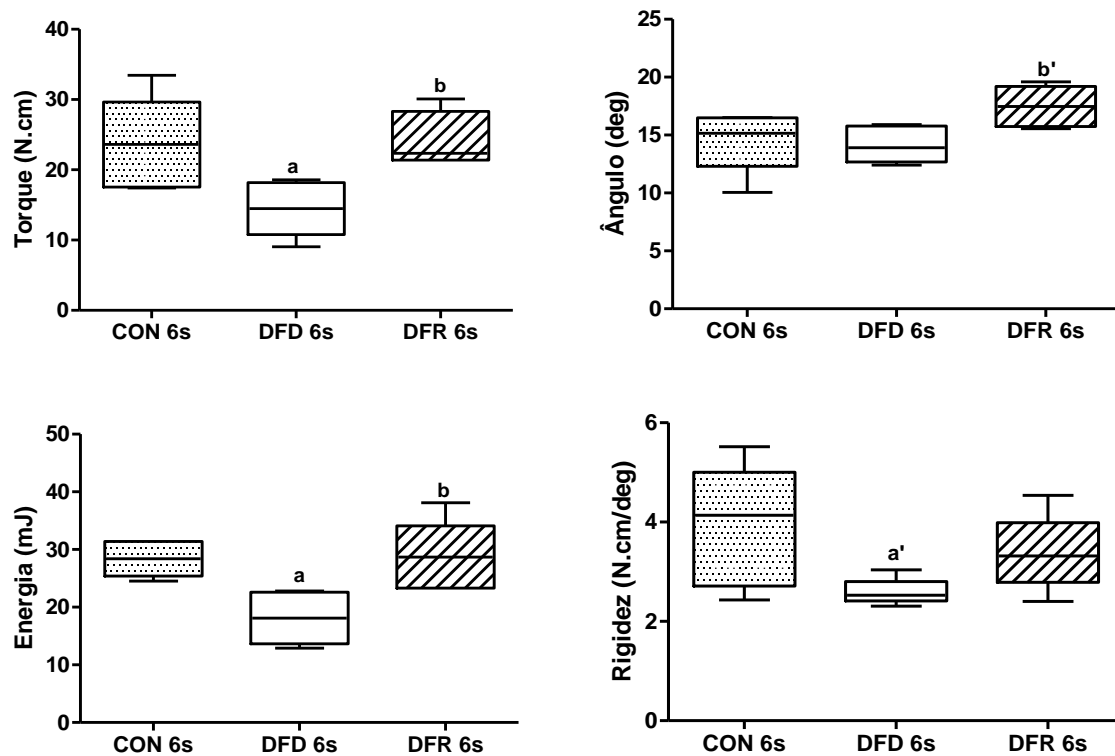


Houve aumento de 117 % nos animais DFD 6s quando comparado ao grupo DFR 6s ( $p=0,028$ ). Entre os animais realimentação o SMI foi maior no grupo DFR 2s, com redução de 224 % para DFR 4s ( $p=0,070$ ) e de 310 % para o grupo DFR 6s ( $p=0,011$ ). CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a= p<0,05$ ) vs DFD 2s; tendência à diferença estatística ( $a'= p<0,10$ ) vs DFR 2s; ( $b= p<0,05$ ) vs DFD 6s.

## 5.7 Ensaio Mecânico

Os fêmures dos animais DFR 6s apresentaram maior resistência do calo ósseo ao torque (68 %,  $p=0,012$ ), ângulo de deslocamento antes da falha (23 %,  $p=0,089$ ) e energia (58 %,  $p=0,007$ ) em comparação aos animais DFD 6s. Embora não houvesse diferenças significativas na rigidez, houve um aumento de 30 %. Além disso, vale ressaltar que neste grupo todos os parâmetros relacionados ao ensaio mecânico foram comparáveis aos do grupo controle (Fig.35).

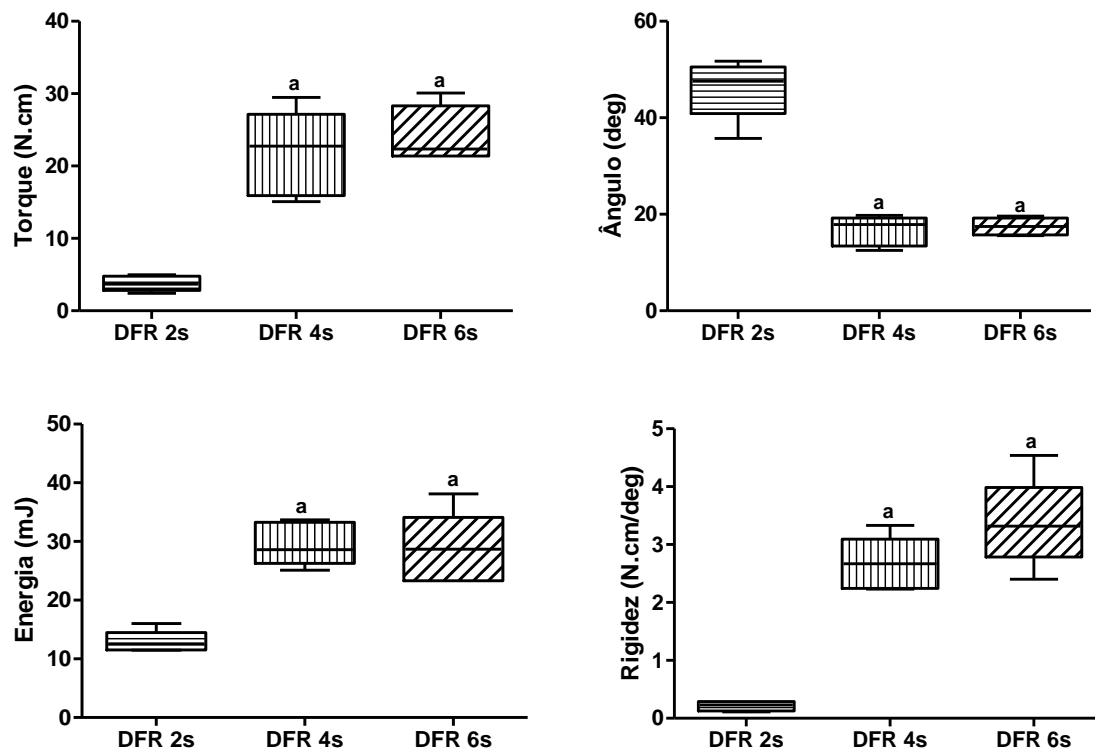
Figura 35- Parâmetros avaliados pelo ensaio mecânico de torção 6 semanas pós-fratura.



Os animais do grupo DFD 6s apresentaram diminuição de torque máximo ( $p=0,021$ ), energia ( $p=0,007$ ) e rigidez ( $p=0,068$ ), sem diferença estatística para o ângulo de torque máximo ( $p>0,05$ ) em relação ao grupo CON 6s. Por outro lado, os animais DFR 6s apresentaram aumento de torque máximo ( $p=0,012$ ), energia ( $p=0,007$ ) e ângulo de torque máximo ( $p=0,089$ ) quando comparados aos animais DFD 6s. CON 6s: controle seguido por 6 semanas após a fratura; DFD 6s (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 6 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. As letras indicam diferença estatística ( $a=p<0,05$ ) vs CON 6s; tendência à diferença estatística ( $a'=p<0,10$ ) vs CON 6s; ( $b=p<0,05$ ) vs DFD 6s; tendência à diferença estatística ( $b'=p<0,10$ ) vs DFD 6s.

Os animais realimentados apresentaram um aumento tempo dependente dos parâmetros mecânicos. Entre os grupos DFR 2s e DFR 4s, o calo ósseo dos animais com quatro semanas pós-fratura eram mais resistentes ao torque máximo (476 %,  $p<0,001$ ), energia (129 %,  $p<0,001$ ) e rigidez (1.171 %,  $p<0,001$ ). Neste período houve redução apenas do ângulo de torque máximo antes da falha (64 %,  $p<0,001$ ). O mesmo ocorreu na comparação do grupo DFR 2s e DFR 6s, onde o maior período pós-fratura apresentou aumento de torque máximo (544 %,  $p<0,001$ ), energia (122 %,  $p<0,001$ ), rigidez (1.504 %,  $p<0,001$ ), e a redução do ângulo de torque máximo antes da falha (62 %,  $p<0,001$ ). Já os grupos DFR 4s e DFR 6s apresentaram valores semelhantes para todos os parâmetros analisados, mostrando um estacionamento do aumento destes valores a partir do período relacionado a formação do calo ósseo duro (Fig.36).

Figura 36- Parâmetros avaliados pelo ensaio mecânico de torção nos subgrupos realimentados.



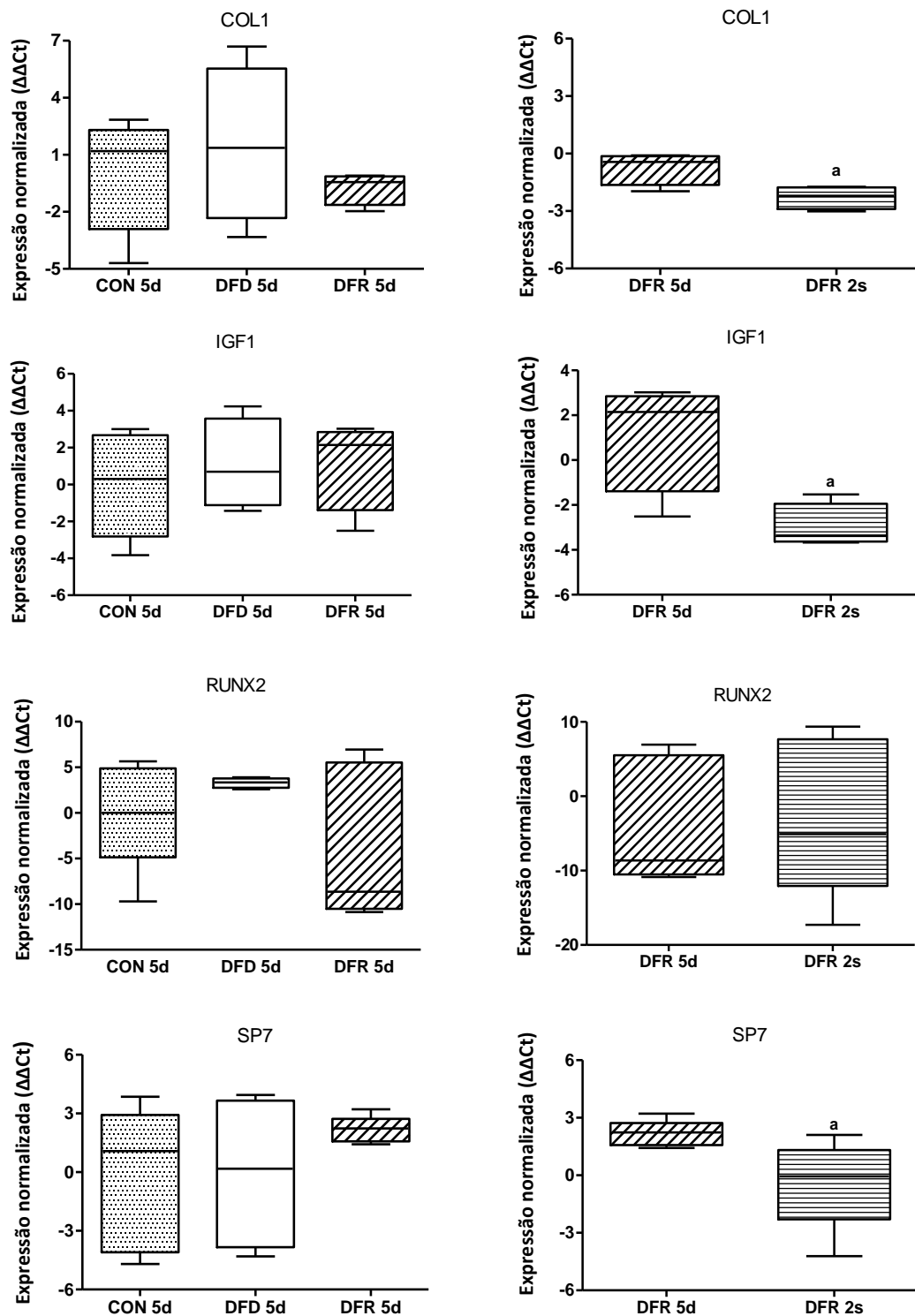
Os animais DFR 4s e DFR 6s apresentaram aumento no torque máximo, na energia e na rigidez ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo DFR 2s, com redução apenas do ângulo de torque máximo ( $p < 0,001$ ). Os valores entre os grupos DFR 4s e DFR 6s foram semelhantes para todos os parâmetros analisados. DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura; DFR 4s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 4 semanas após a fratura; DFR 6s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 6 semanas após a fratura. A letra indica diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs DFR 2s.

## 5.8 Biologia Molecular

O PCR em tempo real identificou menor expressão significativa dos genes relacionados à formação óssea *Coll* (-214%,  $p = 0,024$ ), *IGF1* (-348%,  $p = 0,021$ ) e *SP7* (-118 %,  $p = 0,045$ ), no calo ósseo do grupo DFR 2s quando comparado ao DFR 5d. Não houve diferença estatística significativa para o gene *Runx-2* neste período ( $p > 0,05$ ), como também não foi observada diferença entre todos os genes analisados nos subgrupos acompanhados por 5 dias pós-fratura (CON 5d, DFD 5d e DFR 5d) (Fig.37).



Figura 37- Expressão gênica na consolidação óssea.



Os gráficos mostram que os genes *Col1*, *IGF1* e *SP7* foram menos expressos no subgrupo DFR 2s que no subgrupo DFR 5d ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatística para o gene *Runx-2* ( $p > 0,05$ ). Todos os genes analisados entre os subgrupos 5 dias (CON, DFD e DFR) não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). CON 5d: controle seguido 5 dias após a fratura; DFD 5d (Desnutrição/ Fratura/ Desnutrição): seguido por 5 dias após a fratura; DFR 5d (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 5 dias após a fratura; DFR 2s (Desnutrição/ Fratura/ Realimentação): seguido por 2 semanas após a fratura. A letra indica diferença estatística ( $a = p < 0,05$ ) vs DFR 5d.

---

# *DISCUSSÃO*

---

## 6 DISCUSSÃO

A realimentação minimizou os efeitos da desnutrição na consolidação da fratura, conforme evidenciado pelos parâmetros microtomográficos, histológicos e de resistência mecânica. No entanto, deve-se notar que alguns parâmetros examinados permaneceram inferiores aos do grupo controle, indicando uma recuperação parcial.

Diversos trabalhos documentam a perda óssea em decorrência da desnutrição (3,7–9,21,49,50,52,58). No entanto, os efeitos específicos da desnutrição no processo de reparação de fraturas não foram bem descritos na literatura. Enquanto alguns estudos investigam o efeito das restrições de nutrientes específicos (12,13,18,19,22), nosso estudo utiliza a restrição alimentar global para simular melhor a desnutrição infantil. Dessa maneira, escolhemos realizar a restrição alimentar geral de 50 % da dieta consumida *ad libitum* pelos animais do grupo controle. Na literatura, os valores comumente usados em investigações sobre o tecido ósseo variam de 20 % a 50 %, em um intervalo de tempo de 10 dias a 18 semanas (3,7,8,49,50,58).

Nossos estudos prévios revelaram que a restrição alimentar de 50 % prejudicou a qualidade do osso trabecular, cortical e da placa de crescimento, e também atrasou a cicatrização óssea nos períodos de formação de calo ósseo mole e duro, em animais acompanhados até 13ª semana de vida (4,20). Portanto, hipotetizamos que a restrição alimentar também interferiria no processo de consolidação de fraturas em um período mais tardio, uma vez que a matéria prima e a ação coordenada de várias células e fatores de crescimento são necessários para que ocorra a remodelação óssea, além disso, acreditamos que a realimentação pós-fratura fosse capaz de reverter parcialmente ou totalmente os danos causados pela desnutrição.

Embora estudos clínicos respondam a muitas dúvidas acerca deste tópico, ainda existem limitações técnicas, financeiras e éticas para aprofundar as investigações. O modelo animal por sua vez é atraente não só por possibilitar o controle adequado, mas também por permitir uso de fatores específicos no fenômeno que se estuda. O rato Wistar foi nosso animal de preferência, pois há na literatura dados padronizados do seu desenvolvimento (59,60), bem como os protocolos de desnutrição. Além disso, em nosso laboratório o modelo de fratura nesse animal já foi utilizado em vários trabalhos (20,61–63).

Quanto ao diagnóstico de desnutrição, há um consenso de que os efeitos da dieta sobre o peso e crescimento são aceitos como elementos suficientes em um modelo animal (48), com dispensa de exames laboratoriais. Entretanto, estes podem ser usados a depender do tipo de investigação, como, por exemplo, a deficiência em um fator específico na dieta. Em nosso

---

laboratório, Fontoura Filho realizou o trabalho com deficiência proteica e dosou periodicamente a creatinina urinária, além de dosar a albumina sérica no momento do sacrifício dos animais (64). Já para os seres humanos, a OMS recomenda para o diagnóstico os dados antropométricos, como peso e altura (65).

Na sexta semana de restrição alimentar, momento em que a desnutrição já estava instalada, foi realizada a fratura óssea. O processo de cicatrização de um osso saudável é composto por quatro fases distintas e sobrepostas: inflamação, formação de calo mole, formação de calo duro e remodelação (41,66). Na fase inflamatória, um hematoma se forma entre os fragmentos ósseos e vários fatores de crescimento e citocinas surgem no local da fratura (66,67). Posteriormente, as células mesenquimais imaturas diferenciam-se em condrócitos e osteoblastos. Os condrócitos passam por diferenciação, proliferação e maturação, levando à formação de cartilagem mineralizada, conhecida como calo ósseo mole (68). Uma vez que a matriz da cartilagem é formada, ocorre a transformação da cartilagem mineralizada em osso, conhecida como formação óssea secundária ou calo ósseo duro. A fase de remodelação é então responsável pela reformulação do calo ósseo inicial, a fim de restaurar sua função e estrutura (69). Considerando a biologia da consolidação de fratura em ratos, escolhemos os períodos de análise de 2, 4 e 6 semanas pós-fratura que representam as fases de calo ósseo mole, duro e de remodelação, respectivamente.

A restrição alimentar induziu mudanças notáveis no microambiente ósseo, como níveis elevados de TRAP, RANKL, aumento da separação trabecular e um maior índice de modelo estrutural. Como resultado do processo de reparo atrasado, houve maior quantidade de osso neoformado. Por outro lado, houve diminuição na osteoprotegerina, densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo, área de calo, deposição de colágeno, parâmetros microtomográficos, de resistência mecânica à torção e medidas morfométricas.

Nossos resultados indicaram que a restrição alimentar durante o crescimento esquelético prejudicou significativamente a consolidação de fraturas ósseas, evidenciando um desequilíbrio osteometabólico, com redução na formação, aumento na reabsorção e consequente atraso na reparação, uma vez que os animais desnutridos ainda apresentavam trabéculas ósseas finas e dispersas, com maior quantidade de tecido ósseo neoformado, e os animais controles apresentavam a região da fratura com características de osso cortical remodelado, mínimo tecido ósseo neoformado e trabéculas ósseas compactadas.

A análise da expressão gênica realizada cinco dias após a fratura (fase inflamatória) não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. Isso sugere que as mudanças genótípicas podem se tornar mais aparentes nas fases posteriores do processo de consolidação. Estudos

---

anteriores conduzidos por nossa equipe mostraram menor expressão de genes relacionados à formação (*Colla e Runx-2*) em ratos desnutridos durante a fase de reparo, sugerindo atraso na consolidação óssea (20).

Em termos gerais, nossos achados indicam um desequilíbrio osteometabólico nos animais desnutridos, caracterizado por formação reduzida, reabsorção aumentada e reparo retardado do calo ósseo. Em comparação, os animais controles exibiam sinais de remodelação óssea cortical, enquanto os animais desnutridos ainda apresentavam tecido ósseo imaturo.

### **6.1 Resposta regenerativa**

A consolidação óssea requer não apenas vitamina D, cálcio e fósforo para mineralização, mas também proteínas para proliferação celular e síntese de colágeno. Além disso, durante o período de estirão do crescimento, há aumento da demanda nutricional para a formação óssea. Portanto, a otimização da oferta nutricional com o objetivo de melhorar a consolidação óssea nesse período é uma abordagem atraente por vários motivos. Trata-se de uma intervenção não invasiva, mais segura e acessível em relação aos produtos farmacológicos já desenvolvidos, que podem apresentar efeitos colaterais ou danos aos tecidos.

Publicações fornecem evidências de que a reabilitação nutricional pode atenuar ou mesmo reverter as alterações no calo ósseo (1). Em relação às dietas enriquecidas com proteínas, os benefícios parecem depender do estado nutricional inicial. Em animais não desnutridos, o enriquecimento proteico não levou à melhora nas propriedades mecânicas (13,19). No entanto, no caso de desnutrição proteica, mostrou efeitos positivos na consolidação óssea (18,22).

Por exemplo, Hughes et al. (2006) conduziram um estudo e mostraram que a restrição de proteína seguida de dieta enriquecida após fratura óssea levou ao aumento na densidade mineral óssea (DMO), mas sem melhora significativa nas propriedades mecânicas (22). Dietas enriquecidas com cálcio mostraram melhoras tanto na DMO, quanto na rigidez do calo, em estudos com camundongos (23). Da mesma forma, a suplementação de cálcio e vitamina D em ratos com dietas deficientes melhorou o processo de consolidação de fraturas avaliado por testes histológicos e mecânicos (24). No entanto, as evidências sobre os efeitos benéficos da suplementação de cálcio na progressão do processo de consolidação óssea ainda são limitadas, com a maioria dos estudos indicando apenas ganho marginal (1,23).

---

A suplementação ou enriquecimento da dieta com nutrientes específicos tem sido objeto de investigação em diversos estudos. Os aminoácidos glutamina e arginina apresentaram potencial para promover o reparo ósseo, pois desempenham papel vital na síntese de proteínas durante períodos de estresse catabólico (70). Estudos em animais mostraram que a suplementação com esses aminoácidos pode acelerar o desenvolvimento do calo ósseo, embora a influência na qualidade do calo pareça ser limitada (71).

Em termos de composição da dieta, o enriquecimento de carboidratos de digestão lenta em ossos intactos foi associado a um pico de massa óssea entre ratos em crescimento. Isso pode potencialmente contribuir para a formação óssea e diminuir o risco de fratura mais tarde na vida (21). No entanto, há escassez de estudos avaliando os efeitos diretos dos carboidratos de digestão lenta no reparo ósseo.

Fósforo, um mineral frequentemente estudado no contexto de dietas deficientes (15,16), apresentou efeitos positivos na consolidação da fratura. Verificou-se que a suplementação desse elemento químico facilita a reparação óssea, pois a fase de remodelação ocorreu de forma mais rápida, aparentemente por resultar na substituição completa da cartilagem por tecido ósseo (25). Este benefício foi observado em ratos que foram inicialmente alimentados com uma dieta pobre em fosfato, levando a resultados favoráveis (72).

Embora estudos anteriores tenham se concentrado principalmente na avaliação dos efeitos de deficiências nutricionais específicas na consolidação de fraturas, poucos examinaram o impacto da desnutrição geral comumente observada em ambientes clínicos (20). Além disso, não encontramos nenhuma pesquisa investigando especificamente os efeitos da restrição alimentar seguida de realimentação na consolidação da fratura, incluindo acompanhamento até a fase de remodelação.

Nossos resultados mostraram que subgrupos realimentados por diferentes períodos pós-fratura melhoraram no ganho de massa corporal ao longo do tempo, além disso, foi possível observar o estímulo para a recuperação das alterações histológicas, com a redução do tecido ósseo neoformado e a evolução dos estágios da consolidação. A realimentação entre os subgrupos 2, 4 e 6 semanas, evidenciou que o maior período de acompanhamento induziu ao aumento dos parâmetros microestruturais de formação óssea, como o BV/TV, e devido a melhora da remodelação óssea, reduziu o índice de modelo estrutural (SMI). Houve ganhos dos parâmetros de macroestrutura, massa óssea e de integridade mecânica, mas a densidade mineral óssea permaneceu inalterada.

A expressão gênica entre os subgrupos realimentados identificou diferença estatística significativa nos períodos 5 dias e 2 semanas pós-fratura, onde o grupo DFR 2s possuiu menor

---

expressão dos genes relacionados à formação óssea *IGF1*, *SP7* e *Colla1* quando comparado ao subgrupo DFR 5d, sem diferença estatística significativa para o gene *Runx-2*. A redução dos genes relacionados a osteoblastogênese em resposta a realimentação indica a consequente maturação do calo ósseo. Além disso, foi possível observar no subgrupo realimentado por 6 semanas pós-fratura, o estímulo significativo da formação e diferenciação do calo ósseo, a redução da reabsorção, e a restauração das alterações microestruturais e mecânica.

Com base nos resultados, os dados obtidos podem ser empregados para desenvolver estratégias nutricionais destinadas a tratar e melhorar a consolidação da fratura, mostrando que uma dieta adequada é importante para o tratamento ortopédico de uma fratura em um indivíduo desnutrido, qualquer que seja a faixa etária.

---

---

*CONCLUSÕES*

---



## 7 CONCLUSÕES

Nosso estudo forneceu evidências de que a restrição alimentar afetou negativamente a formação do calo ósseo pós-fratura, com atraso na remodelação e calo de pior qualidade.

Por outro lado, a realimentação atuou positivamente e de maneira significativa na formação e maturação do calo ósseo pós-fratura, reduzindo sua reabsorção, restaurando as alterações microestruturais e de resistência mecânica. Esses achados indicaram que a realimentação melhorou a qualidade do calo ósseo em comparação com animais desnutridos e foi capaz de reverter parcialmente os efeitos prejudiciais observados nas atividades celulares ósseas e alterações arquitetônicas.

---

---

## *REFERÊNCIAS*

---

**REFERÊNCIAS\***

1. Roberts JL, Drissi H. Advances and Promises of Nutritional Influences on Natural Bone Repair. *J Orthop Res.* 2020;38(4):695–707.
2. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, et al. Childhood growth , physical activity , and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res.* 1995;10(6):940–7.
3. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):2078–88.
4. Guedes PMSG, Zamarioli A, Botega II, da Silva RAB, Issa JPM, Butezloff MM, et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. *Acta Cir Bras.* 2019;34(3):e201900301.
5. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. [Internet]. Rome, FAO. 2022 [citado 1 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc0639en>.
6. Monte CMG. Malnutrition: a secular challenge to child nutrition. *J Pediatr.* 2000;76(3):285–97.
7. Banu J, Orhii PB, Okafor MC, Wang L, Kalu DN. Analysis of the effects of growth hormone, exercise and food restriction on cancellous bone in different bone sites in middle-aged female rats. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(8):849–64.
8. Pando R, Masarwi M, Shtaif B, Idelevich A, Monsonego-Ornan E, Shahar R, et al. Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth. *J Endocrinol.* 2014;223(3):227–39.
9. Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA. Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr.* 2012;142(6):1038–45.
10. Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, et al. Food restriction reduces cortical bone mass and serum insulin-like growth factor-1 levels and promotes uterine atrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534:165–71.
11. Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont.* 2009;18(6):473–8.
12. Guarniero R, Cinagava MY, De Santana PJ, Batista MA, De Oliveira LAA, Rodrigues CJ, et al. Influence of the protein component upon fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Ortop Bras.* 2003;11(4):206–10.
13. Pollak D, Floman Y, Simkin A, Avinezer A, Freund HR. The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat. *J Parenter Enter Nutr.* 1986;10(6):564–7.

---

\* De acordo com o Estilo Vancouver.

---

- 
14. Bourrin S, Toromanoff A, Ammann P, Bonjour JP, Rizzoli R. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8):1555–63.
  15. Wigner NA, Luderer HF, Cox MK, Sooy K, Gerstenfeld LC, Demay MB. Acute phosphate restriction leads to impaired fracture healing and resistance to BMP-2. *J Bone Miner Res.* 2010;25(4):724–33.
  16. Noguchi T, Hussein AI, Horowitz N, Carroll D, Gower AC, Demissie S, et al. Hypophosphatemia regulates molecular mechanisms of circadian rhythm. *Sci Rep.* 2018;8(1):13756.
  17. Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, et al. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone.* 2014;61:102–8.
  18. Day SM, Deheer DH. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2001;15(1):47–53.
  19. Einhorn TA, Bonnarens F, Burstein AH. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures. A biomechanical study. *J Bone Jt Surg.* 1986;68(9):1389–95.
  20. Botega II, Zamarioli A, Guedes PMSG, da Silva RAB, Issa JPM, Butezloff MM, et al. Bone callus formation is highly disrupted by dietary restriction in growing rats sustaining a femoral fracture. *Acta Cir Bras.* 2019;34(1):e20190010000002.
  21. Bueno-Vargas P, Manzano M, Pérez-Castillo ÍM, Rueda R, López-Pedrosa JM. Dietary Complex and Slow Digestive Carbohydrates Promote Bone Mass and Improve Bone Microarchitecture during Catch-Up Growth in Rats. *Nutrients.* 2022;14(6):1303.
  22. Hughes MS, Kazmier P, Burd TA, Anglen J, Kuroki K, Stoker AM, et al. Enhanced fracture and soft-tissue healing by means of anabolic dietary supplementation. *J Bone Jt Surg.* 2006;88(11):2386–94.
  23. Haffner-Luntzer M, Heilmann A, Heidler V, Liedert A, Schinke T, Amling M, et al. Hypochlorhydria-induced calcium malabsorption does not affect fracture healing but increases post-traumatic bone loss in the intact skeleton. *J Orthop Res.* 2016;34(11):1914–21.
  24. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, Scheidt AV, Busse B, Schinke T, et al. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):17205.
  25. Powers JC, Herbsman H, Hirschman A, Shaftan GW. Phosphate supplements in experimental fractures. *J Surg Res.* 1968;8(9):411–6.
  26. ACC/SCN. Nutrition throughout the life cycle. 4th Report on the world nutrition situation. Geneva; ACC/SCN. World Health Organization. 2000.
  27. WHO-World Health Organization. Malnutrition [Internet]. 2023 [citado 16 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.
  28. Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr.* 2007;26(4):389–99.
-

29. Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr.* 1999;129(7):1340–6.
  30. Dayer R, Brennan TC, Rizzoli R, Ammann P. PTH improves titanium implant fixation more than pamidronate or renutrition in osteopenic rats chronically fed a low protein diet. *Osteoporos Int.* 2010;21(6):957–67.
  31. Proos L, Gustafsson J. Is early puberty triggered by catch-up growth following undernutrition?. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(5):1791–809.
  32. Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M. Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet.* 2013;106:83–9.
  33. REDE PENSSAN. II Vigisan, Inquérito nacional sobre insegurança alimentar no contexto da pandemia da covid-19 no Brasil [Internet]. 2022 [citado 29 de abril de 2023]. Disponível em: <https://static.poder360.com.br/2022/06/seguranca-alimentar-covid-8jun-2022.pdf>.
  34. Alves SYF. Influência da resposta inflamatória sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea. [Tese de Livre-Docência]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2017.
  35. Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015;421746.
  36. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(5):813–29.
  37. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech.* 2004;71:1809–40.
  38. Merloz P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):1999–2001.
  39. Diniz SF, Amorim FPLG, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GEPM, et al. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Brazilian J Med Biol Res.* 2008;41(5):373–9.
  40. Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone.* 2009;44(2):357–363.
  41. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):2003–6.
  42. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?. *Mech Dev.* 1999;87(2):57–66.
  43. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;1(355):7–21.
-

- 
44. Foss B, Ulvestad E, Bruserud O. Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol*. 2001;67(4):267–78.
  45. Borrelli JJ, Pape C, Hak D, Hsu J, Lin S, Giannoudis P, et al. Physiological challenges of bone repair. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):708–11.
  46. Brandão CMA, Vieira JGH. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1999;43(6):401–8.
  47. Yanagihara GR. Análise tecidual e biomecânica de ossos de ratas ovariectomizadas alimentadas com ração hiperlipídica. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2017.
  48. Guarniero R, De Barros Filho TEP, Tannuri U, Rodrigues CJ, Rossi JDMBA. Study of fracture healing in protein malnutrition. *Rev Paul Med*. 1992;110(2):63–8.
  49. Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA. Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. *J Appl Physiol*. 2008;104(4):1086–93.
  50. Ahn H, Seo DH, Kim HS, Choue R. Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats. *Nutr Res*. 2014;34(8):707–13.
  51. Falcai MJ. Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
  52. Mazeti CM, Furlan MMDP. Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Sci Biol Sci*. 2008;30(2):197–204.
  53. Urabe K, Kim HJ, Sarkar G, Bronk JT, Bolander ME. Determination of the complete cDNA sequence of rat type II collagen and evaluation of distinct expression patterns of types IIA and IIB procollagen mRNAs during fracture repair in rats. *J Orthop Sci*. 2003;8(4):585–90.
  54. Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*. 2008;43(5):832–9.
  55. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595–610.
  56. Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2179–93.
  57. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468–86.
  58. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci CV., et al. Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition: a morphometric, densitometric and mechanical study. *Br J Nutr*. 2005;93(05):663–9.
-

- 
59. Santiago HAR, De Pierro LR, Reis RM, Caluz AGRE, Ribeiro VB, Volpon JB. Allometric relationships among body mass , MUZZLE-tail length , and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta Cirúrgica Bras.* 2015;30(11):743–8.
  60. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* 1998;139(2):663–70.
  61. Guimarães APFGM, Butezloff MM, Zamarioli A, Issa JPM, Volpon JB. Nandrolone decanoate appears to increase bone callus formation in young adult rats after a complete femoral fracture. *Acta Cir Bras.* 2017;32(11):924–34.
  62. Campos MS, Volpon JB, Ximenez JPB, Frantini AP, Dalloul CE, Sousa-Neto MD, et al. Vibration therapy as an effective approach to improve bone healing in diabetic rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:909317.
  63. Butezloff MM, Zamarioli A, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Volpon JB. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Acta Cir Bras.* 2015;30(11):727–35.
  64. Filho Fontoura C. Efeito da deficiência protéico-calórica sobre a resistência mecânica de ossos de ratas. Estudo do Cisalhamento sobre a placa de crescimento proximal da tíbia e da flexão sobre a diáfise femoral. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.
  65. WHO-World Health Organization. WHO global database on child growth and malnutrition. Geneva; 1997. p. 1–67.
  66. Sathyendra V, Darowish M. Basic science of bone healing. *Hand Clin.* 2013;29(4):473–81.
  67. Al-zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, Parsons JR, Bradica G, Hart CE, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor BB ( rhPDGF-BB ) and beta-tricalcium phosphate / collagen matrix enhance fracture healing in a diabetic rat model. *J Orthop Res.* 2009;27(8):1074–81.
  68. Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, Moriya H, Nimomiya Y, Einhorn TA, et al. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J Orthop Res.* 2001;19(5):935–44.
  69. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873–84.
  70. Al Balushi RM, Paratz JD, Cohen J, Banks M. Glutamine supplementation in multiple trauma of critical care. *Diet Nutr Crit Care.* 2015;203–18.
  71. Polat O, Kilicoglu SS, Erdemli E. A controlled trial of glutamine effects on bone healing. *Adv Ther.* 2007;24(1):154–60.
  72. Dzioba RB, Jackson RW. Effects of phosphate supplementation on intact and fractured femora of rats: a biomechanical study. *Can Med Assoc J.* 1977;117(10):1173–5.
-

---

*ANEXO*

---



## ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal



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



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Restrição alimentar no tecido ósseo, cartilaginoso e no processo de consolidação óssea em ratos*”, registrado com o número **220/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Batista Volpon**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de março de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 ratos WISTAR-OLD machos pesando 70g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/03/2019 a 01/08/2022.

We certify that the Protocol *n° 220/2018*, entitled “*Dietary restriction in bone tissue, cartilage and bone healing in rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/25/2019. 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 100 male Wistar-Old rats weighing 70g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 08/01/2022.

Ribeirão Preto, 25 de março de 2019

*Alceu Afonso Jordão Júnior*

**Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior**  
Decano da CEUA-FMRP – USP

---

# *APÉNDICES*

---

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

<b>Idade (semanas)</b>	<b>CON 6s</b>	<b>DFD 6s</b>	<b>DFR 2s</b>	<b>DFR 4s</b>	<b>DFR 6s</b>
<b>3</b>	60	62	54	55	65
<b>4</b>	80	55	57	57	65
<b>5</b>	121	66	64	70	74
<b>6</b>	160	84	80	87	91
<b>7</b>	195	106	106	109	112
<b>8</b>	228	123	126	131	133
<b>9</b>	256	139	142	148	147
<b>10</b>	258	139	180	181	173
<b>11</b>	271	151	223	214	204
<b>12</b>	292	169		245	235
<b>13</b>	305	176		278	261
<b>14</b>	319	193			282
<b>15</b>	348	193			315

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

<b>Semanas</b>	<b>CON</b>	<b>DFD</b>	<b>DFR</b>
<b>1<sup>a</sup></b>	29,21	14,61	14,61
<b>2<sup>a</sup></b>	41,60	20,80	20,80
<b>3<sup>a</sup></b>	46,35	23,18	23,18
<b>4<sup>a</sup></b>	51,79	25,90	25,90
<b>5<sup>a</sup></b>	56,24	28,12	28,12
<b>6<sup>a</sup></b>	56,85	28,43	28,43
<b>7<sup>a</sup></b>	41,53	20,77	54,66
<b>8<sup>a</sup></b>	58,77	29,39	57,57
<b>9<sup>a</sup></b>	59,95	29,98	58,24
<b>10<sup>a</sup></b>	54,38	27,19	50,55
<b>11<sup>a</sup></b>	59,60	29,80	45,35
<b>12<sup>a</sup></b>	51,14	25,57	49,83

APÊNDICE C- Composição da ração utilizada na alimentação dos animais.

---

<b>NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO (NUBILAB CR1®)</b>	
UMIDADE (MÁX)	120g/Kg
PROTEÍNA BRUTA (MIN)	220g/Kg
EXTRATO ETÉREO (MIN)	40g/Kg
MATERIAL MINERAL (MÁX)	90g/Kg
FIBRA BRUTA (MÁX)	70g/Kg
CÁLCIO (MIN-MÁX)	10-14g/Kg
FÓSFORO (MIN)	8.000 mg/Kg

---

---

*MANUSCRITO*

---

1 **Refeeding partially reverses impaired fracture callus in undernourished rats.**

2

3 **Running title: *Refeeding improves bone calluses in rats***

4 **Authors**

5

6 **1- Iara Inácio Botega**, M.Sc.; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo,  
7 Brazil. iarabotega@usp.br

8 **2- Patrícia M. San Gregório Guedes**, M.Sc.; School of Medicine of Ribeirao Preto -  
9 University of São Paulo, Brazil. patriciasangregorio@usp.br

10 **3- Ariane Zamarioli**, Ph.D.; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo,  
11 Brazil. ariane\_zamarioli@hotmail.com

12 **4- João Paulo Bianchi Ximenez**, Ph.D.; School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto  
13 - University of São Paulo, Brazil. joapaulo.ximenez@yahoo.com.br

14 **5- José Batista Volpon**, Ph.D.; School of Medicine of Ribeirao Preto - University of São Paulo,  
15 Brazil. hc.ortopedia@gmail.com

---



16 **Corresponding Author**

17

18 Ariane Zamarioli

19 Department of Orthopaedics and Anesthesiology

20 School of Medicine of Ribeirao Preto

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

22 Telephone: +55 16 33153272

23 E-mail: ariane\_zamarioli@hotmail.com

---

24 **Conflict of Interest**

25

26 **1- Iara Inácio Botega**, or any member of his or her immediate family, has no funding or  
27 commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing  
28 arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted  
29 article.

30 I agree and confirm this statement as true.

31

32 **2- Patrícia M. San Gregório Guedes**, or any member of his or her immediate family, has no  
33 funding or commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest,  
34 patent/licensing arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the  
35 submitted article.

36 I agree and confirm this statement as true.

37

38 **3- Ariane Zamarioli**, or any member of his or her immediate family, has no funding or  
39 commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing  
40 arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted  
41 article.

42 I agree and confirm this statement as true.

43

44 **4- João Paulo Bianchi Ximenez**, or any member of his or her immediate family, has no funding  
45 or commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest,  
46 patent/licensing arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the  
47 submitted article.

48 I agree and confirm this statement as true.

49

50 **5- José Batista Volpon**, or any member of his or her immediate family, has no funding or  
51 commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing  
52 arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted  
53 article.

54 I agree and confirm this statement as true.

---

**55 Abstract**

56 *Background:* Adequate nutritional intake plays a crucial role in maximizing skeletal  
57 acquisition, while undernutrition is a well-documented condition associated with poor bone  
58 quality. Although the effects of nutrition on fracture healing have been studied, the specific  
59 mechanisms affected by food restriction and refeeding are yet to be fully understood. Therefore,  
60 this study aims to assess the impact of food restriction and refeeding on fracture repair.  
61 Specifically, we aimed to investigate several phenotypes, including morphological assessment,  
62 density, tridimensional microstructure, histological bone cell activity, rate of newly formed  
63 bone at the callus, collagen deposition quantity, and mechanical strength. Additionally, the gene  
64 expression of Runx2, Col1a1, IGF1, and SP7 during fracture healing were assessed in a murine  
65 model of undernutrition.

*66 Questions/Purposes:*

- 67 (1) What underlying mechanism contributes to delayed fracture healing in undernourished rats?  
68 (2) What changes can be restored through refeeding?

69 *Methods:* Fifty-four male Wistar Hannover rats were randomly assigned to three groups: (1)  
70 Sham#: Control group and Fracture; (2) FRes#: Food Restriction and Fracture, (3) FRes#Ref:  
71 Food Restriction, Fracture and Refeeding. Following weaning, the FRes# and FRes#Ref groups  
72 received 50% of the food amount provided to the Shams. In the sixth week of experiment, all  
73 animals underwent a mid-right femur bone fracture, which was subsequently surgically  
74 stabilized. Following the fracture, the FRes#Ref group was refed, while the other groups  
75 maintained their pre-fracture diet. Bone calluses were analyzed on the fifth-day post-fracture  
76 by gene expression and on the sixth-week post-fracture using dual-energy X-ray  
77 absorptiometry, morphometry, histomorphometry, immunohistochemistry, computed  
78 microtomography, and torsion mechanical testing. Statistical significance was determined at a  
79 probability level of less than 0.05, and comparisons were made using the ANOVA test.

---

80           *Results:* Food restriction resulted in significant phenotypic changes in bone calluses,  
81 when compared to shams rats characterized by deterioration in microstructure (i.e., BCa.V,  
82 BCa.BV/TV, Tb.N, and Conn.D) reduced collagen deposition, bone mineral density, and  
83 mechanical strength (i.e., torque at failure, energy, and stiffness). Moreover, a higher rate of  
84 immature bone indicated a delay in the remodeling process. Refeeding stimulated bone callus  
85 collagen formation, reduced local resorption, and effectively restored the microstructural (i.e.,  
86 SMI, BCa.BV/TV, Tb.Sp, Tb.N, and Conn.D) and mechanical changes (i.e., torque at failure,  
87 energy, and angular displacement at failure) caused by food restriction. Despite these positive  
88 effects, the density of the bone callus remained lower when compared to the shams, and gene  
89 expression analysis didn't evidence any significant differences among the groups.

90           *Conclusions:* Food restriction had detrimental effects on osseous healing. However, these  
91 effects can be partially improved by refeeding. Based on these findings, new research can be  
92 developed to create targeted nutritional strategies to treat and improve fracture healing.

93           *Clinical Relevance:* Undernutrition can occur at any stage of life, and its impact on the skeleton,  
94 especially during growth period, can lead to long-term detrimental effects. Individuals with  
95 concomitant bone fractures and undernutrition require special care due to the increased  
96 likelihood of disrupted osseous healing.

---

## 97 **Introduction**

98           Bone fractures are prevalent events and often result from traumatic incidents, leading to  
99 financial, physical, and psychological challenges [34]. Fractures are often associated to traffic  
100 accidents and violence in modern society. Moreover, an increased number of fractures are  
101 attributable to pathological conditions resulting from better disease management and longer life  
102 expectancy, leading to a higher occurrence of osteoporosis in the modern population.

103           Maximizing bone mass acquisition during skeletal maturation is crucial for minimizing  
104 fracture rates in adulthood and senescence. Several factors significantly contribute to skeletal  
105 mass gain, including inherited components and environmental conditions as proper nutritional  
106 intake [11, 13]. Conversely, undernutrition has been linked to higher fracture incidence,  
107 insufficient catch-up growth, and bone mass depletion [13, 19]. While freedom from hunger is  
108 recognized as a fundamental human right, severe food insecurity continues to be a stark global  
109 reality, especially in low- and middle-income nations [16, 27].

110           Given the association between food restriction and compromised bone quality [4, 9, 13,  
111 22, 30, 36], and the crucial role of a healthy bone microenvironment in proper fracture healing,  
112 it is not surprising that undernutrition can impair bone repair and contribute to the formation of  
113 delayed and lower-quality bone callus. Numerous studies have investigated the effects of  
114 nutrient restrictions on bone health, examining the depletion of macronutrients (such as proteins  
115 or phosphate) or specific micronutrients (such as calcium or vitamin D) [6, 12, 15, 18, 23, 25,  
116 29, 32, 36, 37]. However, it is worth noting that undernutrition in clinical settings often involves  
117 limited food intake, leading to the restriction of multiple nutrients, and it may be better  
118 represented by a general food restriction model.

119           Previous investigations from our research group have provided evidence indicating that  
120 undernutrition adversely affects the integrity of trabecular and cortical bone, leading to  
121 impaired bone healing during the formation of both soft and hard callus. These previous

---

122 findings indicate that food restricted animals experienced delays in bone callus formation,  
123 which can be attributed to various factors, including delayed cell proliferation and  
124 differentiation and microstructural deterioration [5, 19].

125         Several strategies are currently employed to address bone healing disorders,  
126 encompassing pharmacological interventions, bone graft surgeries, and orthobiologics [24].  
127 Although these approaches have shown promising outcomes, they are associated with  
128 limitations such as high costs and potential side effects [34]. To investigate less invasive  
129 methods of enhancing bone cell activity, certain studies have explored specialized diets with an  
130 excess of specific nutrients. These include diets enriched with proteins, slow or fast-digesting  
131 carbohydrates, vitamin D, calcium, and phosphorus [9, 12, 15, 17, 20, 21, 32, 33]. Since our  
132 goal is to address the effects of undernutrition in clinical settings of limited food intake, we also  
133 aim to provide a refeeding by general food intake, while closely monitoring the bone union  
134 process until the remodeling phase.

135         We hypothesize that undernutrition may disrupt bone union by disturbing the balance  
136 between bone formation and resorption, as well as inhibiting cell differentiation at the fracture  
137 site. Consequently, we anticipate that refeeding could totally or partially reverse the adverse  
138 effects caused by undernutrition on healing.

---

## 139 **Methods**

140 Male Wistar Hannover rats, weighing approximately 60g and 21 days old, were used in  
141 the current study (n=54). Following a three-day acclimation period, rats were randomly  
142 assigned into three experimental groups (n=18/group). The first group, referred to as the **Sham#**  
143 (Control group and Fracture) had unrestricted access to both water and food throughout the  
144 entire experimental period. At 9 weeks of age, a complete fracture was made at the mid-  
145 diaphysis of the femur and followed for 6 weeks. The second group, referred to as **FRes#** (Food  
146 Restriction and Fracture) underwent a 6-week period of food restriction beginning at weaning  
147 (3 weeks of age). Subsequently, at 9 weeks of age, these rats experienced a femur fracture,  
148 followed by an additional 6-week period of food restriction post-fracture. The third group,  
149 designated as **FRes#Ref** (Food Restriction, Fracture, Refeeding), also underwent 6 weeks of  
150 food restriction starting from weaning. Like the FRes group, they experienced a femur fracture  
151 at 9 weeks of age, but instead of continuing food restriction, they underwent a 6-week-refeeding  
152 program (Figure 1). All groups were provided with the same standard diet and had unrestricted  
153 access to water. The rats were housed in a controlled environment with a temperature range of  
154 22°C to 24°C and maintained on a 12-hour light/dark cycle.

155 This study obtained approval from the Animal Experimentation Ethics Committee  
156 (Protocol no. 220/2018) and adhered to the principles outlined in the Guide for the Care and  
157 Use of Laboratory Animals [28].

158

### 159 **Experimental Model for Undernutrition**

160 To induce undernutrition and evaluate its impact on bone healing, we utilized a 50%  
161 food restriction protocol known to produce similar effects to those observed in undernourished  
162 humans [5, 19, 26]. The daily food intake of the control rats was measured to determine the

---

163 quantity of food provided during the restriction period to the rats in the other groups. The  
164 animals were fed a standard diet of Nuvilab CR-1® (Quintia S.A., PR, Brazil).

#### 165 Femoral fracture

166         After six weeks of initiating the food restriction protocol or sham group, the animals  
167 were anesthetized with a combination of xylazine (6mg/kg), ketamine (60mg/kg), and  
168 acepromazine (0.6mg/kg), intramuscularly administered. A closed mid-diaphyseal fracture of  
169 the femur was then created on the right limb using a guillotine apparatus [35]. Subsequently,  
170 under aseptic and antiseptic conditions, a small lateral approach was made, allowing minimal  
171 exposure to the fracture. A 1.0 mm Kirschner wire was inserted into the medullary canal of the  
172 proximal fragment, the fracture was reduced, and the wire advanced into the medullary canal  
173 of the distal fragment until reaching the condylar region. The excess wire was trimmed, and the  
174 wound was closed in layers. Immediate postoperative radiography confirmed the fracture  
175 fixation. To assess the consolidation process, radiographic follow-up was performed weekly.  
176 Post-operatively, the animals received dipyrone every 8 hours for a period of 5 days and were  
177 regularly monitored.

178

#### 179 Euthanasia

180         The rats were euthanized using an overdose dose of sodium thiopental (Thiopental®  
181 Cristália, Brazil). After dissection and macroscopic examination, the fractured femurs were  
182 preserved in 70% alcohol for subsequent analysis through densitometry, computed  
183 microtomography, and mechanical testing. For histomorphometric and immunohistochemical  
184 analysis, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde. For gene expression analysis, the  
185 specimens were immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction.

186

187

---



188 Body mass and bone morphological assessment

189           During the experiment, the rat's body mass gain was monitored by daily weighing. After  
190 euthanasia and dissection, fractured bones from each group (n=6 per group) were examined to  
191 determine their weight and measurements, including length, perimeter of callus, and the  
192 perimeter at the proximal and distal metaphysis.

193

194 Microscopy of the fracture callus

195           Transverse sections of the fracture callus were stained with hematoxylin-eosin (H&E),  
196 Masson's trichrome, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), and picrosirius red. Masson's  
197 trichrome-stained sections were examined using bright field microscopy, while picrosirius red-  
198 stained sections were analyzed under polarized light microscopy using AxioImager® Z2 (Zeiss,  
199 Germany). Quantification of data was performed using Axiovision® software (Zeiss,  
200 Germany), and images were captured using a digital camera (Zeiss®) at a magnification of 50×.  
201 The rate of newly formed bone tissue, measured by demarcating the entire blue-colored area in  
202 Masson's trichrome-stained sections, was expressed as the percentage of the total callus area  
203 (B.Ar/T.Ar, %). Picrosirius red staining was used to quantify collagen, with the collagen area  
204 expressed as a percentage of the total area (Col.Ar/Tt.Ar, %). ImageJ software, version 1.52a  
205 (Java) from NIH, was employed to analyze the TRAP-positive area as a percentage of the entire  
206 callus area in the fractured femur (%).

207           Immunohistochemistry involved incubation of tissues with primary antibodies to OPG  
208 (A2100, anti-rabbit, Woburn, MA, USA), RANK (A12997, anti-rabbit, Woburn, MA, USA),  
209 and RANKL (A2550, anti-rabbit, Woburn, MA, USA). Positive immunostaining for OPG,  
210 RANK, and RANKL was quantified using ImageJ software® (NIH, version 1.52a) and the ratio  
211 of protein expression area to total area was calculated.

212

---

## 213 Bone microstructure assessment by Microcomputed Tomography ( $\mu$ CT)

214         The bone callus microarchitecture was analyzed using a GE Phoenix v|tome|x S240  
215 microtomography ( $\mu$ CT) system from Phoenix-micro-CT, Germany. Scans were conducted  
216 with parameters set to 60 kV and 150  $\mu$ A, using 1000 projections and an average of four  
217 exposures lasting 333 milliseconds each. The resulting images were reconstructed using  
218 specific software (GE Phoenix datos|x2) and analyzed with CT scan software (CTAn version  
219 2.2.1). Several parameters were determined, including the entire bone callus volume (BCa.V,  
220  $\text{mm}^3$ ), woven bone fraction (BCa.BV/TV, %) representing callus mineralization, newly formed  
221 trabecular thickness (Tb.Th, mm), separation (Tb.Sp, mm), number (Tb.N, 1/mm), connectivity  
222 density (Conn.D, 1/ $\text{mm}^3$ ), and Structural Model Index (SMI). The resulting isotropic resolution  
223 achieved was 16  $\mu\text{m}$ . The nomenclature for  $\mu$ CT imaging in this study was adapted for bone  
224 callus using the American Society for Bone and Mineral Research guidelines [7].

225

## 226 Bone densitometry by Dual-energy X-ray Absorptiometry

227         Bone Mineral Density (BMD), Bone Mineral Content (BMC), and the region of interest  
228 (ROI) area of the entire callus were assessed using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)  
229 with a Lunar densitometer (DPX-IQ, Chalfont St. Giles, UK). The scanning reproducibility  
230 demonstrated a 4% variability.

231

## 232 Mechanical Testing

233         The whole bones (n=6 per group) were tested until failure in torsion in an Instron 55MT  
234 machine (Norwood, MA, USA) equipped with a 2.0 Nm load cell. The following parameters  
235 were obtained: torque at failure, stiffness, energy, and angular displacement at failure.

236

237

---

## 238 RNA Isolation and Real-time PCR Assessment

239 Fracture calluses (n=6 per group, 5 days post-fracture) were subjected to total RNA  
240 extraction using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, USA).  
241 Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using 1 µg of RNA and the High-  
242 Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).  
243 TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems) were employed for quantitative PCR  
244 analysis of collagen type 1, alpha 1 chain (Col1a1), runt-related transcription factor 2 (Runx2),  
245 insulin-like growth factor (IGF1), and the gene encoding transcription factor osterix (Sp7) on a  
246 StepOnePlus PCR machine (Applied Biosystems). The expression levels were normalized to  
247 the reference gene GaPDH. Duplicate samples were run, and relative expression was calculated  
248 using  $2^{-ddCT}$ , where ddCt was determined as dCt [goi FRes# – ref FRes#] – dCt [goi Sham# –  
249 ref Sham#]. The genes of interest are represented by goi, and ref denotes the reference gene.  
250 For descriptive and statistical analyses, ddCT was treated as a continuous variable. The  
251 expression levels in the Sham# group were used to normalize the other groups, indicating the  
252 regulatory effects of undernutrition and refeeding. The design and interpretation of quantitative  
253 real-time PCR results adhered to the Minimum Information for Publication of Quantitative  
254 Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [10].

255

## 256 Statistical analysis

257 All statistical analyses were conducted using RStudio software (RStudio, Inc., USA).  
258 Continuous variables were presented as mean and standard deviation (SD). The normality of  
259 the data was assessed using the Shapiro-Wilk test, and to compare data between groups, the  
260 ANOVA test was employed. For multiple comparisons between groups, Tukey's post-hoc test  
261 was utilized. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

---

## 262 **Results**

### 263 Complications and Mortality

264 Among the 67 animals included in the study, eleven died during anesthetic induction for  
265 bone fracture production, and an additional two died during anesthetic induction before  
266 radiographic follow-up for the consolidation process. This resulted in an overall mortality rate  
267 of approximately 19%, leaving a final count of 54 animals. There were no losses related to  
268 surgery complications (such as excessive comminution of fragments, K-wire loosening,  
269 infection) or undernutrition. However, it is worth noting that all animals that died belonged to  
270 the food restriction group.

271

### 272 Body Weight Assessment

273 At the beginning of the study (day 0), all groups exhibited similar body weights ( $p>0.05$ ,  
274 Figure 2A). Throughout the observation period, all rats gained weight. However, rats subjected  
275 to food restriction demonstrated lower weight gain compared to the Shams, with a noticeable  
276 difference observed in the first week (by 32%,  $p<0.001$ ) that progressively increased over time,  
277 reaching 45% by the time of fracture production ( $p<0.001$ , Figure 2B). Despite the post-fracture  
278 weight gain, the percentage difference persisted until the end of the experiment. Thus, the final  
279 body weight gain of the FRes# group was significantly lower than that of the Shams (211%  
280 versus 480%,  $p<0.001$ ).

281 In contrast, refeeding led to an increase in body weight gain compared to undernourished  
282 rats (385% versus 211%,  $p<0.001$ ). FRes#Ref animals exhibited a 35% increase in body weight  
283 in the eighth week of the experiment, two weeks after refeeding ( $p=0.032$ , Figure 2C).  
284 Furthermore, at 10 and 12 weeks after the start of the experiment (4 and 6 weeks of refeeding),  
285 the FRes#Ref animals demonstrated a 48% and 64% increase in body weight, respectively,  
286 compared to the FRes# group ( $p<0.001$ , as shown in Figure 2D and 2E).

---

287            Refeeding stimulates bone callus formation and reduces resorption

288            At six weeks post-fracture, Sham# rats showed a remodeled bone callus region (Figure  
289 3A) with an abundant collagen deposition (Figures 3B and 3C). However, rats under food  
290 restriction exhibited a bone callus composed mostly of cartilage, with spaced immature  
291 trabeculae (Figure 3A) and lower collagen deposition (Figures 3B and 3C). This suggests a  
292 delay in the union process in the FRes# groups that persisted until the bone remodeling phase.  
293 During this period, Sham animals presented minimal newly formed bone tissue (Figure 3D),  
294 with organized, thick, and compacted bone trabeculae (Figure 3E), while the FRes# group had  
295 a greater quantity of newly formed bone tissue (Figure 3D), with thin, disorganized, and  
296 dispersed bone trabeculae (Figure 3E).

297            The refeeding animals demonstrated an enhancement in the bone remodeling process,  
298 resulting in a 27% decrease in newly formed bone tissue compared to the undernourished group,  
299 but there was no statistically significant difference ( $p>0.05$ , Figure 3D). Additionally, the  
300 FRes#Ref animals exhibited thicker bone trabeculae (Figure 3A) and higher collagen deposition  
301 (Figures 3B and 3C) compared to the FRes# group.

302            TRAP staining sections demonstrated a significant 113% increase in resorption activity  
303 within the callus of FRes# animals compared to the shams ( $p<0.001$ , Figure 3F). This was  
304 visually represented by the presence of red-colored osteoclasts and highlighted by green arrows  
305 (Figure 3G). Conversely, refeeding led to a significant 51% reduction in bone resorption within  
306 the callus compared to undernourished rats ( $p<0.001$ , Figure 3F), with values comparable to  
307 those observed in the Sham# group ( $p=0.974$ , Figure 3F).

308            The undernourished group exhibited a higher immunostaining pattern in the RANKL-  
309 positive area, showing a 95% increase compared to the Sham# group ( $p=0.060$ ). While the  
310 RANK-positive area was similar across all three groups ( $p>0.05$ ), the OPG-positive area in the  
311 Sham# group was 250% higher ( $p=0.001$ , Figure 3H) compared to the FRes# group. The

---

312 FRes#Ref group demonstrated a trend towards a statistical difference, with a 46% decrease in  
313 the positive area for RANKL ( $p=0.055$ ). However, no significant differences were observed in  
314 the RANK-positive and OPG-positive areas when compared to the undernourished animals  
315 ( $p>0.05$ ). Overall, undernutrition impaired bone formation and resorption activities, which were  
316 partially mitigated by refeeding. The areas of positive immunostaining for RANK, RANKL,  
317 and OPG are indicated by green arrows, highlighting the statistically significant changes  
318 observed (Figure 3I).

319

### 320 Refeeding Restores Macro and Microstructural Changes in Bone Callus

321 Table 1 displays the morphometric data. Food restriction resulted in decreased  
322 macroscopic parameters, indicating changes in bone tissue compared to the Shams. Refed  
323 animals exhibited increased mass ( $p<0.001$ ), length ( $p<0.001$ ), proximal ( $p=0.003$ ) and distal  
324 metaphyseal circumference ( $p<0.001$ ) compared to undernourished animals. However, the  
325 diaphyseal circumference of the bone callus was similar among the groups ( $p=0.363$ ).

326 Food restriction significantly reduced several microtomographic parameters, such as  
327 BCa.V (by 29%,  $p=0.019$ ), BCa.BV/TV (by 44%,  $p<0.001$ ), Tb.N (by 50%,  $p<0.001$ ), and  
328 Conn.D (by 84%,  $p<0.001$ ), while increased Tb.Sp (by 63%,  $p<0.001$ ). In contrast, the  
329 FRes#Ref group demonstrated increases in BCa.BV/TV (by 74%,  $p<0.001$ ), Tb.N (by 97%,  
330  $p<0.001$ ), and Conn.D (by 541%,  $p<0.001$ ), along with decrease in Tb.Sp (by 42%,  $p<0.001$ )  
331 and the structural model index (by 117%,  $p=0.028$ ) compared to the FRes# group. Furthermore,  
332 the FRes#Ref animals exhibited similar values to those seen in the Shams at several parameters  
333 (BCa.BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, Conn.D, and SMI), indicating a fully restoration of the  
334 changes caused by undernutrition (Table 2).

335

336

---

337            Food Restriction Impairs Bone Mass and Mechanical Strength of Fracture Callus

338            Table 2 shows that food-restricted animals had significantly lower bone mineral density  
339 (BMD) ( $p<0.001$ ), bone mineral content (BMC) ( $p<0.001$ ), and bone callus area ( $p=0.016$ )  
340 compared to the Shams. Food restriction also negatively affected the mechanical strength of the  
341 bone callus, with reductions in torque resistance (-39%,  $p=0.021$ ), stiffness (-34%,  $p=0.068$ ),  
342 and energy (-36%,  $p=0.007$ ).

343

344            Refeeding Improves Fracture Callus Mechanical Integrity, but not Density

345            FRes#Ref animals exhibited higher bone callus resistance to torque (+68%,  $p=0.012$ ),  
346 displacement angle before failure (+23%,  $p=0.089$ ), and energy (+58%,  $p=0.007$ ) compared to  
347 FRes# animals. Stiffness showed a 30% increase, although it was not statistically significant  
348 ( $p=0.268$ ). Notably, all mechanical parameters were comparable to those of the Sham group  
349 (Table 2). Regarding densitometric analysis, the refed animals exhibited a trend towards a  
350 statistical difference in bone callus area compared to the undernourished animals ( $p=0.067$ ).  
351 However, no significant differences were observed in BMC and BMD, suggesting that bone  
352 density remained unchanged ( $p>0.05$ ).

353

354            Effect of Food Restriction and Refeeding on Gene Expression

355            There were no statistically significant differences observed between the groups in terms  
356 of gene expression five days after bone fracture ( $p>0.05$ , Figure 4).

---

**Discussion**

357  
358       Refeeding minimized the effects of undernutrition on fracture healing, as evidenced by  
359 the microtomographic, histologic and mechanical strength parameters. However, it should be  
360 noted that certain parameters remained lower than those of the sham group, indicating a partial  
361 recovery.

362       Several studies have reported bone loss due to undernutrition [1, 2, 4, 8, 9, 13, 26, 30,  
363 36]. However, the specific effects of undernutrition on the healing process of fractures have not  
364 been well-established in literature. While some studies investigated the effect of nutrient  
365 restrictions [12, 15, 18, 21, 32], our study employed a global food restriction approach to better  
366 simulate childhood undernutrition. We observed a significant delay in callus maturation among  
367 animals with inadequate nutrition in comparison to those with sufficient nutrition.

368       The food restriction protocol induced notable changes in the bone microenvironment,  
369 such as elevated levels of TRAP and RANKL, increased trabecular separation, and a higher  
370 structural model index. As a result of the delayed repair process, there was a greater amount of  
371 newly formed bone. Conversely, there were decreases in osteoprotegerin, bone mineral density,  
372 bone mineral content, callus area, collagen deposition, microtomographic parameters,  
373 mechanical torsional strength, and morphometric measurements.

374       Gene expression analysis conducted five days after the fracture (inflammatory phase)  
375 did not reveal any significant differences among the groups. This suggests that genotypic  
376 changes may become more apparent in the later stages of the consolidation process. Previous  
377 studies conducted by our team have shown lower expression of formation-related genes (Col1a  
378 and Runx2) in undernourished rats during the repair phase, indicating a delay in bone healing  
379 [5].

380       Overall, our findings indicate an osteometabolic imbalance in undernourished animals,  
381 characterized by reduced formation, increased resorption, and delayed repair. In comparison,

---



382 the sham animals exhibited signs of cortical bone remodeling, while the undernourished  
383 animals still had immature bone tissue.

384

385 Regenerative response

386 Studies in the literature have provided evidence that nutritional rehabilitation can  
387 mitigate or even reverse changes in the bone callus [34]. Regarding the protein-enriched diets,  
388 the benefits appear to depend on the initial nutritional status. In non-undernourished animals,  
389 protein enrichment did not lead to improvements in mechanical properties [15, 32]. However,  
390 in the case of protein undernutrition, it has demonstrated positive effects on bone union [12,  
391 21]. For instance, Hughes et al. (2006) conducted a study and found that protein restriction  
392 followed by an enriched diet after bone fracture led to an increase in bone mineral density  
393 (BMD) but no significant improvement in mechanical properties [21]. Calcium-enriched diets  
394 have shown improvements in both BMD and callus stiffness in certain studies with mice [20].  
395 Similarly, the supplementation of calcium and vitamin D in rats with deficient diets improved  
396 the union process as evaluated by histological and mechanical tests [17].

397 The supplementation or enrichment of the diet with specific nutrients has been the  
398 subject of investigation in various studies. Amino acids glutamine and arginine have shown  
399 potential for promoting bone repair, as they play a vital role in protein synthesis during periods  
400 of catabolic stress [3]. Animal studies demonstrated that supplementation with these amino  
401 acids can expedite bone callus development, although the influence on callus quality appears to  
402 be limited [31].

403 In terms of diet composition, an enrichment of slow-digesting carbohydrates in intact  
404 bones has been linked to a peak bone mass among growing rats. This can potentially contribute  
405 to bone formation and decrease the risk of fracture in later life [9]. However, there is a paucity  
406 of studies evaluating the direct effects of slow-digesting carbohydrates on bone repair.

---

407 Supplementation of phosphorus, a mineral that is frequently studied in the context of deficient  
408 diets [29, 37], has been found to facilitate rapid formation during the repair and remodeling  
409 phases, resulting in the complete replacement of cartilage with bone tissue [33]. This benefit  
410 has been observed in rats that were initially fed a low-phosphate diet, leading to favorable  
411 outcomes [14].

412         While previous studies have primarily focused on evaluating the effects of specific  
413 nutrient deficiencies on fracture healing, few have examined the impact of general  
414 undernutrition commonly observed in clinical settings [5] . Furthermore, we did not find any  
415 research specifically investigating the effects of a food restriction followed by refeeding on  
416 fracture union, including monitoring until the remodeling phase.

417         Our study provided evidence that refeeding significantly stimulated the formation of  
418 fracture callus, reduced its resorption, restored microstructural changes, and improved  
419 mechanical recovery. These findings indicate that global refeeding, when matched the duration  
420 of the previous restriction, successfully enhanced the quality of the bone callus compared to  
421 undernourished animals. It partially reversed the detrimental effects on bone cellular activities,  
422 architectural alterations, and mechanical integrity.

423         Based on the results, the data from our study can be utilized to develop targeted  
424 nutritional strategies aimed at treating and improving fracture consolidation.

---

**Acknowledgments**

We thank all the investigators and staff from the Laboratory of Bioengineering at the School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil, for their important assistance throughout the entire study.

**Funding**

This study was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) – Finance Code 001 and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) partially funded this study.

---

---

## References

1. Ahn H, Seo DH, Kim HS, Choue R. Calorie restriction aggravated cortical and trabecular bone architecture in ovariectomy-induced estrogen-deficient rats. *Nutr Res.* 2014;34:707-713.
  2. Al Balushi RM, Paratz JD, Cohen J, Banks M. Glutamine supplementation in multiple trauma of critical care. *Diet Nutr Crit Care.* 2015:203-218.
  3. Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA. Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. *J Appl Physiol.* 2008;104:1086-1093.
  4. Banu J, Orhii PB, Okafor MC, Wang L, Kalu DN. Analysis of the effects of growth hormone, exercise and food restriction on cancellous bone in different bone sites in middle-aged female rats. *Mech Ageing Dev.* 2001;122:849-864.
  5. Botega II, Zamarioli A, Guedes PMSG, da Silva RAB, Issa JPM, Butezloff MM, Souza YTCS, Ximenez JPB, Volpon JB. Bone callus formation is highly disrupted by dietary restriction in growing rats sustaining a femoral fracture. *Acta Cir Bras.* 2019;34:e20190010000002.
  6. Bourrin S, Toromanoff A, Ammann P, Bonjour JP, Rizzoli R. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1555-1563.
  7. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25:1468-1486.
  8. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci C V., Alippi RM. Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition: a morphometric, densitometric and mechanical study. *Br J Nutr.* 2005;93:663-669.
  9. Bueno-Vargas P, Manzano M, Pérez-Castillo Í, Rueda R, López-Pedrosa J. Dietary Complex and Slow Digestive Carbohydrates Promote Bone Mass and Improve Bone Microarchitecture during Catch-Up Growth in Rats. *Nutrients.* 2022;14:1303.
  10. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611-622.
  11. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D. Childhood growth , physical activity , and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res.* 1995;10:940-947.
  12. Day SM, Deheer DH. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2001;15:47-53.
  13. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res.* 2010;25:2078-2088.
  14. Dzioba RB, Jackson RW. Effects of phosphate supplementation on intact and fractured femora of rats: a biomechanical study. *Can Med Assoc J.* 1977;117:1173-1175.
  15. Einhorn TA, Bonnarens F, Burstein AH. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures. A biomechanical study. *J Bone Jt Surg.* 1986;68:1389-95.
  16. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable.* Rome, FAO. 2022. Available at: <https://doi.org/10.4060/cc0639en>. [Accessed 1 Aug 2023].
-

17. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, Scheidt A Vom, Busse B, Schinke T, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Sci Rep*. 2018;8:17205.
18. Guarniero R, Cinagava MY, De Santana PJ, Batista MA, De Oliveira LAA, Rodrigues CJ, Cinagava FT. Influence of the protein component upon fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Ortop Bras*. 2003;11:206-210.
19. Guedes PMSG, Zamarioli A, Botega II, da Silva RAB, Issa JPM, Butezloff MM, Sousa YTCS, Ximenez JPB, Volpon JB. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. *Acta Cir Bras*. 2019;34:e201900301.
20. Haffner-Luntzer M, Heilmann A, Heidler V, Liedert A, Schinke T, Amling M, Yorgan TA, vom Scheidt A, Ignatius A. Hypochlorhydria-induced calcium malabsorption does not affect fracture healing but increases post-traumatic bone loss in the intact skeleton. *J Orthop Res*. 2016;34:1914-1921.
21. Hughes BYMS, Icazmier P, Burd TA, Anglen J, Kuroki K, Carson WL, Cook JL. Enhanced fracture and soft-tissue healing by means of anabolic dietary supplementation. *J Bone Jt Surg*. 2006;88:2386-2394.
22. Ito E, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Soma T, Matsumoto T, Kimura A, Miyamoto K, Matsumoto H, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T. Food restriction reduces cortical bone mass and serum insulin-like growth factor-1 levels and promotes uterine atrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;534:165-171.
23. Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*. 2009;18:473-478.
24. Kostenuik P, Mirza FM. Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *J Orthop Res*. 2017;35:213-223.
25. Mao L, Tamura Y, Kawao N, Okada K, Yano M, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 2014;61:102-108.
26. Mazeti CM, Furlan MMDP. Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Sci Biol Sci*. 2008;30:197-204.
27. Monte CMG. Malnutrition: a secular challenge to child nutrition. *J Pediatr*. 2000;76:285-97.
28. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
29. Noguchi T, Hussein AI, Horowitz N, Carroll D, Gower AC, Demissie S, Gerstenfeld LC. Hypophosphatemia regulates molecular mechanisms of circadian rhythm. *Sci Rep*. 2018;8:13756.
30. Pando R, Masarwi M, Shtauf B, Idelevich A, Monsonego-Ornan E, Shahar R, Phillip M, Gat-Yablonski G. Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth. *J Endocrinol*. 2014;223:227-239.
31. Polat O, Kilicoglu SS, Erdemli E. A controlled trial of glutamine effects on bone healing. *Adv Ther*. 2007;24:154-160.
32. Pollak D, Floman Y, Simkin A, Avinezer A, Freund HR. The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat. *J Parenter Enter Nutr*. 1986;10:564-567.
33. Powers JC, Herbsman H, Hirschman A, Shaftan GW. Phosphate supplements in experimental fractures. *J Surg Res*. 1968;8:411-416.
34. Roberts JL, Drissi H. Advances and Promises of Nutritional Influences on Natural Bone Repair. *J Orthop Res*. 2020;38:695-707.

35. Santiago HAR, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB. Exposure to Secondhand Smoke Impairs Fracture Healing in Rats. *Clin Orthop Relat Res.* 2017;475:894-902. doi: 10.1007/s11999-016-5184-6.
  36. Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA. Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr.* 2012;142:1038-45.
  37. Wigner NA, Luderer HF, Cox MK, Sooy K, Gerstenfeld LC, Demay MB. Acute phosphate restriction leads to impaired fracture healing and resistance to BMP-2. *J Bone Miner Res.* 2010;25:724-733.
-

## Figure legends

**Figure 1.** Schematic representation of the study design and timeline.

**Figure 2:AE.** Comparison of body mass (g) variation among groups. **(A)**- At day 0 body mass was similar in both groups ( $p>0.05$ ). Although all animals showed an increase in mass over time, those with food restriction had a lower gain compared to shams and refeeding groups. **(B)**- 6 weeks; **(C)**- 8 weeks; **(D)**- 10 weeks; **(E)**- 12 weeks of experimental follow-up. The vertical line represents the day of the fracture.

**Figure 3:AI.** HE-stained histological images of the fracture callus in all groups, with magnification of 12.5x, 50x, and 100x. **(A)**- The FRes# group exhibited a delay in the consolidation process compared to the Sham#, with their callus mainly composed of immature cartilage and widely spaced trabeculae. Conversely, Sham# displayed a bone callus that had undergone remodeling, with dense and thick trabeculae and limited newly formed bone. While FRes#Ref partially improved the fracture consolidation process by reducing cartilaginous tissue and increasing thickness of bone trabeculae, the remodeling process remained incomplete. **(B-C)**- Further supporting evidence was found, as the fracture calluses in the Sham# and FRes#Ref rats exhibited a higher collagen deposition than the FRes# group. **(D-E)**- Moreover, a lower percentage of trabecular area was observed in the bone callus of Sham# rats, which indicated a remodeling process. **(F)**- TRAP-positive area was significantly lower in the Sham# and FRes#Ref groups than in FRes# rats. **(G)**- This can be seen in the TRAP-stained slides, where osteoclasts are marked in red and green arrows point to the areas of interest, with a magnification of 100x. **(H)**- Additionally, Sham# and FRes#Ref groups exhibited a smaller RANK-L-positive area than FRes#. On the other hand, Sham# rats displayed a larger positive area for OPG than FRes# and FRes#Ref. There was no significant difference in the RANK-

---

positive area among the groups. (I)- Positives immunostaining areas for RANK, RANKL, and OPG are pointed by green arrows.

**Figure 4.** Gene expression in bone healing 5 days post-fracture. The results of the study showed no statistical significant difference among the groups ( $p>0.05$ ).