
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade De Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor

PATRÍCIA MADALENA SAN GREGÓRIO GUEDES

Os efeitos nocivos da restrição alimentar na qualidade óssea e na placa de crescimento da tíbia de ratos são parcialmente revertidos pela realimentação.

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).

PATRÍCIA MADALENA SAN GREGÓRIO GUEDES

Os efeitos nocivos da restrição alimentar na qualidade óssea e na placa de crescimento da tíbia de ratos são parcialmente revertidos pela realimentação.

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

Guedes, Patrícia Madalena San Gregório.

Os efeitos nocivos da restrição alimentar na qualidade óssea e na placa de crescimento da tíbia de ratos são parcialmente revertidos pela realimentação. Ribeirão Preto, 2023.

129 f.: Il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Desnutrição. 2. Placa de crescimento. 3. Tecido ósseo. 4. 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

Patrícia Madalena San Gregório Guedes

Os efeitos nocivos da restrição alimentar na qualidade óssea e na placa de crescimento da tíbia de ratos são parcialmente revertidos pela realimentação.

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

Agradeço imensamente por me conceder a graça de concluir esta etapa importante em minha vida. Com tua orientação e amor incondicional, fui capaz de superar os desafios que encontrei ao longo do caminho e alcançar esta conquista tão significativa.

Aos meus pais, José Marcos Guedes (in memoriam)

Nair Madalena San Gregório Guedes

Aos meus exemplos de vida, que me moldaram em quem eu sou hoje, quero expressar minha profunda gratidão por todas as renúncias que fizeram no prol da minha jornada, por estarem ao meu lado em todos os momentos e por compartilharem dos meus sonhos. Agradeço por todo cuidado, carinho e amor que sempre dedicaram a mim.

Aos meus irmãos, Marcos Vinicius, Priscila Manuela, Semei Matheus e meu cunhado

Rafael

Meus melhores amigos, agradeço o apoio que me deram, o carinho, amor e amizade incomparável.

Aos meus sobrinhos Théo e José Marcos

Por serem minha maior fonte de amor, ternura e inspiração!

Ao meu noivo Alexandre Moceni

Pela compreensão, amizade e companheirismo que você me ofereceu, bem como pela sua paciência e amor que me proporcionaram tranquilidade, para junto comigo sonhar os planos do futuro.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de expressar minha gratidão ao professor **Dr. José B. Volpon** pela sua orientação essencial nesta tese e pela sua contribuição significativa para o meu crescimento pessoal, acadêmico e científico. Agradeço por toda a dedicação, empenho e sabedoria compartilhada ao longo desta jornada. Além disso, sou grata pela paciência, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim ao permitir que eu explorasse minhas próprias ideias e buscasse soluções de forma independente. Essa liberdade foi fundamental para o meu crescimento e para a construção da minha identidade acadêmica.

Ter tido a oportunidade de tê-lo como orientador foi verdadeiramente um privilégio.

À **Dra. Ariane Zamarioli**, agradeço pelos comentários precisos e inúmeras sugestões oferecidas ao longo do desenvolvimento da pesquisa e escrita do artigo.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, **Prof. Dr. Luis Vicente Garcia**, agradeço pela oportunidade concedida, especificamente pelo tempo dedicado aos alunos da pós-graduação.

À **Rita de Cássia Stela Cossalter**, secretária do Programa de Pós-graduação, expresso minha gratidão pelo suporte e orientações fornecidas, bem como pelas conversas compartilhadas.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP: **Ismar Ribeiro e Maria Teresinha de Moraes e Francisco Carlos Mazzocato**. Expresso minha profunda gratidão pelo valioso suporte oferecido e pelos momentos agradáveis compartilhados. Quero destacar, em particular, minha sincera apreciação ao técnico e amigo Chico, cuja assistência contínua e amizade enriqueceram imensamente esses anos de convívio.

Aos amigos que ganhei na pós-graduação, **Suelen Albertini, Ana Clara Oliveira, Leonardo Rigobello**, agradeço pela amizade, todo auxílio com os procedimentos deste trabalho, e claro, a ótima convivência que tivemos durante esses anos.

À minha amiga de longa data, **Iara Inácio Botega**, uma verdadeira irmã que a vida me presenteou. Ela esteve ao meu lado em todos os momentos desta jornada, compartilhando

medos, incertezas, conquistas, lágrimas e momentos de alegria. Sou imensamente grata pelo seu constante apoio, paciência e companheirismo.

À **Roberta Carminati Shimano**, agradeço pela ajuda em todas as etapas, por sempre me incentivar na realização deste trabalho, pelas conversas, conselhos e parceria. Enfim, por ter se tornado uma grande amiga.

Ao professor **Dr. Antônio Carlos Shimano**, docente do departamento, agradeço pelos ensinamentos e pela por sua valiosa contribuição na condução da análise mecânica.

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

À professora **Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), agradeço pela disponibilização do Laboratório onde realizei parte da análise histológica. Estendo meu agradecimento à especialista de laboratório **Marília** e aos dedicados técnicos **Marco Antônio, Nilza Leticia e Arlete**, cuja assistência técnica foi inestimável para o sucesso deste trabalho.

Ao professor **Dr. João Paulo Mardegan Issa** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por ceder o laboratório para conduzir parte das análises histológicas. Também expresso minha gratidão ao técnico **Dimitrius Leonardo Pitol** do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), por sua significativa contribuição com a parte técnica das análises histológicas.

Às técnicas **Viviane de Cássia Oliveira** e **Ana Paula Macedo**, por todo carinho, solicitude, generosidade e amizade.

Ao técnico **Daniel Cavallari** do centro para documentação da biodiversidade da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pelo auxílio durante a análise microtomográfica.

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

A CAPES e a FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

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

Processo nº 2020/00529-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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

*Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a
Deus, não sou o que era antes.*

(Martin Luther King)

RESUMO

RESUMO

GUEDES, P. M. S. G. **Os efeitos nocivos da restrição alimentar na qualidade óssea e na placa de crescimento da tíbia de ratos são parcialmente revertidos pela realimentação.** 2023. 129 f. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023.

Fundamento: A desnutrição é resultado da deficiência geral ou específica de nutrientes essenciais e apresenta alta prevalência no mundo. Essa condição repercute em vários sistemas orgânicos, com maior impacto nas crianças cujo efeito pode persistir ao longo da vida, mesmo após a normalização da alimentação. Uma ingestão nutricional adequada desempenha importante papel no crescimento e maximização da aquisição de massa óssea durante o desenvolvimento esquelético, o que pode reduzir a incidência de osteoporose e o risco de fraturas na vida adulta. Apesar do efeito da desnutrição sobre o desenvolvimento do indivíduo ser bem conhecido, ainda há várias lacunas a serem atendidas e controvérsias a serem esclarecidas em relação aos mecanismos envolvidos após a reintrodução alimentar.

Objetivo: O objetivo desta investigação foi avaliar o impacto da restrição alimentar e subsequente realimentação no tecido ósseo e na placa de crescimento de ratos em diferentes fases do desenvolvimento.

Material e métodos: Foram utilizados 78 ratos machos, variedade *Wistar Hannover*, com massa corporal inicial de 50-60 g, divididos em três grupos experimentais: (1) CON: ratos controle, acompanhados por 12 semanas e sem intervenção específica; (2) RA: ratos submetidos à restrição alimentar por 12 semanas e; (3) REA: ratos submetidos a seis semanas de restrição alimentar e depois, realimentados por diferentes períodos (duas, quatro e seis semanas). Os grupos foram subdivididos com base no período de observação após a restrição alimentar e a realimentação. A eutanásia ocorreu em diferentes períodos. Os animais permaneceram em gaiolas individuais durante todo o experimento. A desnutrição foi induzida a partir do desmame por meio da restrição alimentar geral em 50% em relação à ingestão dos controles no dia anterior. Ao término do período experimental, os ossos foram submetidos às análises macroscópica, microtomografia computadorizada (avaliação qualitativa e quantitativa da microestrutura óssea), densitometria óssea (DXA), microscopia óptica (caracterização dos tecidos), histomorfometria (quantificação de colágeno, volume trabecular e morfometria da cartilagem de crescimento), TRAP (marcação de osteoclastos), imunohistoquímica (OPG, RANK e RANKL), PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica e ensaio mecânico (avaliação da resistência mecânica).

Resultados: Os resultados indicaram que a restrição alimentar de 50% causou danos à estrutura e função da placa de crescimento, levando a alterações celulares nas zonas hipertrófica e proliferativa. As demais análises revelaram que a desnutrição pós-natal provocou desequilíbrio na remodelação óssea, prejudicando a qualidade óssea com deterioração da microarquitetura e redução da densidade óssea, além de comprometer a resistência mecânica. A realimentação estimulou a atividade celular da placa de crescimento, melhorou a formação óssea e inibiu a reabsorção, mas os efeitos prejudiciais não foram revertidos completamente durante o período de estudo.

Conclusões: Conclui-se que a realimentação melhorou algumas alterações nocivas na tíbia do rato observadas na placa de crescimento e no tecido ósseo, mas a reversão completa não foi alcançada.

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

ABSTRACT

ABSTRACT

GUEDES, P. M. S. G. **The deleterious effects of dietary restriction on bone quality and the tibial growth plate in rats are partially reversed by refeeding.** 2023. 129 s.[Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2023.

Background: Malnutrition is the result of a general or specific deficiency of essential nutrients and is highly prevalent worldwide. This condition adversely affects various organ systems, with a more pronounced impact on children, whose effects may persist throughout life, even after the normalization of the diet. Adequate nutritional intake plays a crucial role in growth and maximize the bone mass acquisition during skeletal development, which may reduce the incidence of osteoporosis and the risk of fractures in adulthood. The impact of malnutrition on an individual's development is well-known; however, there are still various gaps that need to be addressed, and controversies that require clarification, regarding the mechanisms involved after reintroducing a regular diet.

Aim: The aim of this investigation was to assess the impact of food restriction and subsequent refeeding on bone tissue and cartilage growth in rats at different stages of development

Material and methods: Seventy-eight male Wistar Hannover variety rats, initially weighing 60 g, were divided into three experimental groups: (1) CON: control rats, monitored for 12 weeks without any specific intervention; (2) RA: rats subjected to 12 weeks of food restriction, and (3) REA: rats subjected to six weeks of food restriction and then re-fed for various periods (two, four, and six weeks). The groups were further subdivided based on the observation period after food restriction and refeeding. Euthanasia was conducted at different time points. Throughout the experiment, the animals were kept in individual cages. Malnutrition was induced starting from weaning by imposing a general food restriction of 50% in relation to the controls' intake from the previous day. At the end of the experimental period, the bones underwent macroscopic analyses, computed microtomography (qualitative and quantitative evaluation of bone microstructure), bone densitometry (DXA), optical microscopy (tissue characterization), histomorphometry (quantification of collagen, trabecular volume, and growth cartilage morphometry), TRAP (osteoclast labeling), immunohistochemistry (OPG, RANK, and RANKL), real-time PCR to assess gene expression, and mechanical assay (evaluation of mechanical resistance).

Results: The results indicated that a 50% dietary restriction caused damage to the structure and function of the growth plate, leading to cellular changes in the hypertrophic and proliferative zones. The other analyses revealed that postnatal malnutrition caused an imbalance in bone remodeling, impairing bone quality by deteriorating the microarchitecture and reducing bone density. Additionally, it compromised the mechanical strength of the bones. Refeeding stimulated growth cartilage cell activity, improving bone and inhibiting resorption. However, the detrimental effects were not completely reversed during the study period.

Conclusions: In conclusion, refeeding improved some harmful changes caused by malnutrition in rat tibias, but complete recovery was not achieved.

Keywords: Malnutrition. Bone tissue. Growth plate. Rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representativo da distribuição dos grupos e subgrupos experimentais.	49
Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental.	51
Figura 3. Imagem ilustrativa do exame de densitometria óssea.	53
Figura 4. Imagem ilustrativa das trabéculas metafisárias na extremidade proximal da tíbia analisada pelo Micro-CT.	54
Figura 5. Imagem ilustrativa da região cortical da diáfise da tíbia analisada pelo micro-CT	55
Figura 6. Imagem ilustrativa da região ocupada pela cartilagem de crescimento analisada pelo Micro-CT.....	56
Figura 7. Fotomicrografia ilustrativa da área de seleção para análise histomorfométrica. A) Área trabecular da metáfise proximal da tíbia selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de demarcação da região de interesse analisada (tricroômico de Massom, 50x).	57
Figura 8. Fotomicrografia sob luz polarizada. A) Área de seleção da metáfise proximal das tíbias B) Demarcação da área de colágeno. As fibras colágenas são expressas em vermelho-alaranjado e verde amarelado (<i>picrosirius red</i> , 50x).	58
Figura 9. Secções histológicas da metáfise proximal da tíbia corada pelo TRAP. Os osteoclastos aparecem em vermelho indicando que a área sofre reabsorção óssea (seta verde). Aumento de 100x.	59
Figura 10. Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarcacão de OPG (A), RANK (B) e RANKL (C). As marcações positivas estão indicadas pelas setas verdes. Aumento de 400x.....	60
Figura 11. Seleção manual para determinar a área total (A) e a zona hipertrófica da cartilagem de crescimento (B), delimitadas pelo contorno amarelo (Hematoxilina e eosina, aumento de 50x e 100x).	61
Figura 12. Seleção manual para determinar a espessura da cartilagem de crescimento, medida a partir da zona de repouso, abrangendo todas as camadas até o início da zona de ossificação (Hematoxilina e eosina, aumento de 50x).	61
Figura 13. Tíbia de rato preparada para ensaio de flexão de três pontos. Os pontos de apoio distam 2,5 cm entre si e a carga foi aplicada no centro.	62
Figura 14. Curvas da evolução da massa corporal dos grupos experimentais.	68
Figura 15. Comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos.....	69
Figura 16. Efeito da restrição alimentar e realimentação nas características arquitetônicas trabecular e cortical das tíbias de ratos.	71
Figura 17. Fotomicrografia sob luz polarizada da região proximal das tíbias mostrando as fibras de colágeno expressas em tons vermelho-alaranjado e verde-amarelado (<i>picrosirius red</i> , 50x).	73

Figura 18. Porcentual da área de colágeno na região proximal da tíbia, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada em μm^2	73
Figura 19. Fotomicrografia do osso trabecular marcada em azul na região proximal da tíbia dos grupos experimentais (tricroômico de Masson, 50x).	74
Figura 20. Porcentual de osso trabecular obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2	75
Figura 21. Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas com TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato, 100x).....	76
Figura 22. Avaliação da atividade de reabsorção óssea no tecido metafisário das tíbias de ratos.	77
Figura 23. Fotomicrografia da metáfise proximal da tíbia evidenciando o padrão de imunomarcacão positiva para as proteínas osteoprotegerina (OPG), fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). Aumento de 400x.	78
Figura 24. Quantificacão da imunomarcacão das proteínas RANK, RANKL e OPG, expressas em porcentagem.	78
Figura 25. Expressão gênica do colágeno tipo 1 (Col1A1) e Osterix (SP7)	79
Figura 26. Limite da resistênci mecânica (força máxima e rigidez) da córtex óssea aos esforços de flexão.	80
Figura 27. Análise quantitativa do volume da cartilagem de crescimento.....	81
Figura 28. Fotomicrografia da cartilagem de crescimento (Hematoxilina e eosina. Aumentos de 100x e 200x).....	82
Figura 29. Gráficos representativos da área total (A), espessura (B) e área da zona hipertrófica (C) da cartilagem de crescimento.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Morfometria das tíbias (média \pm DP): massa, comprimento e perímetros (P.= perímetro). 69

Tabela 2. Avaliação da microarquitetura óssea por μ CT (médias \pm DP)..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBMR: *American Society for Bone and Mineral Research*

B.Ar: Área de osso

BS/BV: Razão da superfície óssea pelo volume ósseo

BV: Volume ósseo total

BV/TV: Volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas

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

cDNA: DNA complementar

CMO: Conteúdo mineral ósseo

Col.Ar: Área de colágeno

Col1a1: Colágeno tipo1, alfa 1a

Ct.Th: Espessura da cortical

Ct.V: Volume total do osso cortical

CON: Controle

CONCEA: Conselho nacional de controle de experimentação animal

Conn.D: Densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas

Ct: *threshold cycle*

DMO: Densidade mineral óssea

DP: Desvio padrão

DXA: Densitometria óssea com dupla emissão de raios X

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FIG: Figura

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

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

GapDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

HE: Hematoxilina-Eosina

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

μCT: Microtomografia computadorizada

mRNA: RNA mensageiro

Nº: Número

Osterix (Osx): Fator de transcrição específico do osteoblasto

OPG: Osteoprotegerina
OMS: Organização mundial de Saúde
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
RA: Restrição alimentar
RANK: Receptor do ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
REA: Realimentação
ROI: Região de interesse
SMI: índice de modelo estrutural
Tb.N: Número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido ósseo
Tb.Sp: Espaçamento entre as trabéculas ósseas
Tb.Th: Espessuras das trabéculas ósseas
TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tt.Ar: Área total
TV: Volume total
USP: Universidade de São Paulo
 μ CT: Microtomografia computadorizada
2D: Bidimensional
3D: Tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

‰: porcentagem

°: grau

°C: graus Celsius

μA: microampere

μL: microlitro

μm: micrômetro

μ²: micrômetro ao quadrado

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

g/cm²: grama por centímetro quadrado

g/cm³: grama por centímetro cúbico

kcal: quilocaloria

kV: quilovolt

mg: miligrama

mm: milímetro

mm/min: milímetro por minuto

mm²: milímetro quadrado

mm³: milímetro cúbico

n°/mm Número por milímetro

N: Newton

N/mm: Newton por milímetro

rpm: rotações por minuto

x: Vezes, repetições

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
1.1	Cenário contemporâneo da desnutrição	33
1.2	Efeitos da restrição alimentar no tecido esquelético	34
1.2.1	<i>Cartilagem de crescimento</i>	35
1.2.2	<i>Tecido ósseo</i>	37
1.2.3	<i>Remodelação óssea</i>	39
1.3	Repercussões da realimentação no tecido esquelético	40
2	HIPÓTESE	44
3	OBJETIVOS	46
3.1	Geral	46
3.2	Específicos	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	Tipo de estudo	48
4.2	Animais Experimentais	48
4.3	Grupos experimentais	48
4.4	Procedimento experimental - Dieta normal e restrição alimentar	51
4.4.1	<i>Cuidado e tratamento dos animais durante o período experimental</i>	52
4.5	Controle da massa corporal	52
4.6	Análises	52
4.6.1	<i>Análise morfológica do osso</i>	52
4.6.2	<i>Densitometria óssea (DXA)</i>	52
4.6.3	<i>Microtomografia computadorizada (μCT)</i>	53
4.6.4	<i>Histologia e histomorfometria do tecido ósseo</i>	56
4.6.5	<i>Análise Imunoistoquímica</i>	59
4.6.6	<i>Histomorfometria da cartilagem de crescimento</i>	60
4.6.7	<i>Análise mecânica</i>	62
4.6.8	<i>Análise molecular</i>	63
4.7	Análise dos resultados	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Massa Corporal	67
5.2	Análise óssea	68
5.2.1	<i>Análise Macroscópica</i>	68
5.2.2	<i>Análise densitométrica</i>	69
5.2.3	<i>Análise da microarquitetura óssea trabecular e cortical (μCT)</i>	70
5.2.4	<i>Histomorfometria</i>	72
5.2.5	<i>Imunoistoquímica óssea</i>	77
5.3	Biologia Molecular	79
5.4	Avaliação mecânica	79
5.5	Análise da cartilagem de crescimento	81
5.5.1	<i>TV - Volume da cartilagem de crescimento (μCT)</i>	81

5.5.2	<i>Microscopia óptica</i>	81
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS *	97
	ANEXO	103
	APÊNDICES.....	105
	MANUSCRITO.....	109

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O acesso à alimentação adequada e o não padecer de fome são direitos fundamentais, consagrados no artigo 25 da Declaração Universal dos Direitos Humanos. No entanto, a desnutrição persiste como um grave problema de saúde pública em escala global (1), afetando diversas populações. Atualmente, cerca de 45 milhões de crianças menores de cinco anos estão abaixo do peso ideal, enquanto outras milhões sofrem de atraso no crescimento devido à desnutrição (2,3). Além de causar extremo sofrimento humano, essa condição leva a sérias repercussões em órgãos e funções do organismo. O impacto é ainda mais significativo nas crianças, uma vez que elas estão se desenvolvendo, podendo resultar em comprometimento irreversível que se estende à idade adulta (4).

A desnutrição é uma condição em que os indivíduos carecem de nutrientes suficientes para manter normais suas funções básicas. A subnutrição, um tipo específico de desnutrição, ocorre quando há ingestão inadequada de nutrientes, resultando em deficiências de macronutrientes, micronutrientes ou calorias totais. Várias razões podem contribuir para essa condição, como a ingestão calórica insuficiente, mudanças fisiológicas relacionadas à idade, afecções gastrointestinais, problemas inflamatórios crônicos e incapacidades físicas (5,6). O Marasmo, o Kwashiorkor e o nanismo nutricional são tidos como as formas clínicas mais graves da desnutrição. Existe a forma mista, conhecido como kwashiorkor marasmático, na qual as duas formas isoladas se sobrepõem (7,8). A inanição é manifestação mais extrema da desnutrição, ocorrendo quando o organismo não recebe cronicamente a nutrição adequada. Nesse estágio, o corpo recorre ao consumo dos próprios tecidos como fonte essencial de energia para garantir a sobrevivência (9).

Ingestão excessiva ou desequilibrada de energia e/ou nutrientes podem conduzir à manifestação da desnutrição, resultando em duas categorias primárias de condições. Uma é a 'subnutrição', que abrange o atraso no crescimento (baixa estatura para a idade), emagrecimento (baixo peso para a altura), insuficiência ponderal (baixo peso para a idade) e deficiências ou insuficiências de micronutrientes (falta de vitaminas e minerais importantes). A categoria oposta é o sobrepeso, obesidade e doenças não transmissíveis relacionadas à dieta (como doenças cardíacas, derrame, diabetes e câncer) (10).

Todos os órgãos e sistemas do corpo são afetados de forma abrangente pela alimentação inadequada, e suas implicações podem variar de acordo com o tipo e a gravidade da desnutrição (4). Dentre os efeitos mais comuns estão a redução da imunidade, fraqueza

muscular, anemia, bem como o comprometimento do crescimento e desenvolvimento adequado das crianças, que pode resultar em atrasos no desenvolvimento físico e cognitivo (2,11).

A nutrição desempenha um papel formativo crucial na infância e no início da adolescência, com repercussões significativas na altura adulta, composição corporal e maturação de todos os sistemas fisiológicos. Durante essa fase, o sistema esquelético passa por adaptações estruturais dinâmicas em resposta ao crescimento do corpo. Essas mudanças se refletem principalmente no crescimento e remodelação óssea, juntamente com variações na mineralização do osso externo e na arquitetura interna trabecular. Além disso, ocorrem ajustes nas propriedades mecânicas dos ossos. Para garantir que esse processo transcorra de maneira apropriada, é fundamental manter uma alimentação equilibrada, que forneça todos os nutrientes essenciais ao organismo, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais (12–14).

Diversos fatores genéticos e ambientais podem influenciar o crescimento e a qualidade óssea. No entanto, destaca-se que a desnutrição é reconhecida como uma das principais causadoras de défices de peso e altura considerados abaixo dos padrões normais. Especificamente nos países em desenvolvimento, cerca de um terço das crianças com menos de cinco anos enfrentam atraso no crescimento linear ou estatura reduzida devido à desnutrição crônica, que é ocasionada pela escassez de alimentos e por doenças infecciosas (3).

1.1 Cenário contemporâneo da desnutrição

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número global de pessoas em situação de fome aumentou para 828 milhões (15). Aproximadamente 149 milhões de crianças com menos de cinco anos enfrentam a desnutrição crônica, caracterizada pelo crescimento insuficiente para a idade. Nos países mais impactados pela crise alimentar, mais de 30 milhões de crianças atualmente sofrem de desnutrição aguda, das quais oito milhões estão em estado de grave emaciação, a forma mais letal de desnutrição caracterizada pela perda extrema de peso. A desnutrição está frequentemente associada à pobreza, à má nutrição materna, à falta de acesso a alimentos saudáveis e água potável, bem como à ausência de saneamento básico e questões políticas. (15).

No Brasil, os índices de desnutrição infantil têm apresentado preocupante aumento nos últimos anos, configurando-se como sério problema de saúde pública, especialmente entre as crianças pertencentes a famílias de baixa renda e que vivem em condições de vulnerabilidade socioeconômica. No ano de 2022, o país testemunhou uma alarmante escalada no número de internações de bebês devido à desnutrição aguda, evidenciando-se de maneira mais acentuada nas regiões Norte e Nordeste. Além disso, a desnutrição crônica afeta aproximadamente 30% das crianças indígenas (16,17).

Em países de maior renda, a problemática da fome não está apenas vinculada à desigualdade social, mas também a fatores médicos, como a ocorrência de transtornos alimentares como a anorexia nervosa, estados depressivos, distúrbios alimentares e síndromes de má absorção (3,18). De acordo com dados recentes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), cerca de 42 milhões de pessoas nos países desenvolvidos enfrentam a subnutrição, incluindo 2,5 milhões de crianças menores de cinco anos com desnutrição aguda (2).

A pandemia COVID-19 exacerbou as disparidades e as vulnerabilidades existentes, afetando principalmente as populações mais pobres e marginalizadas em todo o mundo. Embora a desnutrição já fosse um problema global antes da pandemia, seus efeitos exacerbaram ainda mais a situação, resultando em aumento direto do número de pessoas em situação de fome (2). Além disso, a guerra, em curso na Ucrânia, contribuiu para o agravamento da situação, perturbando a cadeia de abastecimento global de alimentos.

1.2 Efeitos da restrição alimentar no tecido esquelético

Os fatores subjacentes que influenciam a relação entre desnutrição e saúde óssea, bem como suas repercussões no crescimento e qualidade óssea, já foram estudados, mas ainda permanecem em investigação. Com efeito, a maioria dos estudos se concentrou na restrição específica de nutrientes como proteínas, vitaminas e minerais essenciais (19–22). Outras pesquisas exploraram as consequências da restrição alimentar global, que envolve a redução geral na ingestão total de alimentos e seus efeitos no sistema esquelético (23–25).

Estudos mostraram que roedores sujeitos à restrição proteica apresentam redução do comprimento ósseo, reduções significativas dos componentes de osso compacto e esponjoso, diminuição do conteúdo mineral ósseo (CMO), bem como redução da massa muscular (26). Igualmente, está bem estabelecido que a carência de vitamina D reduz a densidade mineral

óssea (DMO), atividade osteoblástica, níveis de osteocalcina e IGF-1 (Insulin Growth Factor 1 ou Fator de crescimento semelhante à insulina-1), além de diminuir a resistência mecânica do osso como um todo (20,27). Outros estudos mostraram que a privação de zinco está associada a modificações na altura e morfologia da placa de crescimento, juntamente com alterações na altura e número de condrócitos nas regiões de hipertrofia e proliferação celular (22,28).

Em estudo prévio investigamos a qualidade e o crescimento ósseo em ratos jovens que foram desnutridos por meio da restrição alimentar global. Após extensa análise do tecido ósseo e da cartilagem de crescimento, diversas alterações fenotípicas foram encontradas. Na cartilagem de crescimento, constatamos alterações estruturais e funcionais das zonas hipertróficas e proliferativas com diminuição no volume, área total, área de ossificação e espessura. Além disso, verificamos que o tecido cartilaginoso apresentava menor resistência ao cisalhamento. No tecido ósseo trabecular e cortical, identificamos redução no comprimento e massa óssea, bem como menor densidade óssea. Adicionalmente, houve prejuízos na microestrutura trabecular e cortical, juntamente com redução de volume trabecular e menor deposição de colágeno. Esses resultados, forneceram evidências concretas dos efeitos negativos da desnutrição sobre a qualidade e o crescimento ósseo em ratos jovens (29).

Durante os primeiros anos de vida, ocorre um processo de crescimento esquelético caracterizado por um aumento rápido e significativo no comprimento dos ossos. Esse fenômeno envolve estruturas anatômicas conhecidas como placas de crescimento, localizadas nas extremidades dos ossos longos. A falta de nutrientes necessários para a síntese e mineralização óssea adequada pode afetar a atividade celular na placa de crescimento, comprometendo, assim, o processo de crescimento ósseo e o desenvolvimento global de crianças e adolescentes (30,31). Portanto, torna-se importante avaliar a condição óssea e compreender o processo de formação deste tecido, ao longo de todo o período de desenvolvimento esquelético, particularmente quando a privação de alimentos foi vivenciada desde os primeiros anos de vida.

1.2.1 Cartilagem de crescimento

A cartilagem de crescimento, também conhecida como placa epifisária, é uma estrutura única presente nos ossos longos e curtos das crianças, sendo a responsável pelo crescimento em comprimento do osso. Formada por tecido cartilaginoso estratificado, esta

estrutura localiza-se nas extremidades dos ossos longos, situada entre o osso subcondral e a região metafisária. A formação dessa cartilagem segue um processo chamado endocondral, no qual uma matriz cartilaginosa inicial é gradualmente substituída por tecido ósseo trabecular na região metafisária. Isso permite o contínuo crescimento e desenvolvimento dos ossos longos (32–34).

O crescimento é estimulado por diversos fatores, desencadeando uma série de eventos que propiciam o fornecimento de nutrientes e sinais necessários para regular a atividade celular nesse tecido. Esses sinais também são responsáveis pelo fechamento da placa epifisária, que ocorre quando os condrócitos esgotam seu potencial proliferativo em processo de senescência que acontece em idades diferentes, variando conforme a espécie e tipo de osso, terminando na completa substituição do tecido cartilaginoso por tecido ósseo trabecular. Em humanos saudáveis, esse evento é finalizado por volta dos 20 anos de idade (35–37).

A matriz da placa epifisária é predominantemente composta por cartilagem hialina, que possui uma matriz formada por fibrilas colágenas, proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas. Além disso, a matriz contém células especializadas conhecidas como condroblastos e condrócitos. Os condroblastos são responsáveis pela produção de novos condrócitos e localizam-se em estreita proximidade aos fibroblastos da região do pericôndrio, uma camada de tecido conjuntivo que envolve e nutre a cartilagem hialina. Os condrócitos, por sua vez, situam-se em regiões mais internas da cartilagem, e são caracterizados por formato arredondado. Eles se organizam em grupos de várias células da mesma origem e têm a função de secretar glicoproteínas, proteoglicanos e colágeno. Diferentes tipos de colágeno compõem a estrutura do disco epifisário, principalmente dos tipos II e X (32,38).

Sob a óptica microscópica, observa-se que uma secção longitudinal da placa epifisária apresenta uma organização em camadas ou zonas, formada por células que passam por diferenciação da epífise em direção à metáfise, terminando no processo de ossificação. A diferenciação e crescimento celular são desencadeados e coordenados por complexas interações de sinalização e influências hormonais, operando em sincronia com regulação temporal precisa. Essas zonas comumente são classificadas em zonas de repouso, proliferativa, hipertrófica, calcificada e ossificada. A zona de repouso, localizada mais proximalmente à epífise, atua como um reservatório celular, abrigando condrócitos pequenos (progenitores). Na zona proliferativa, os condrócitos alinham-se em colunas paralelas e dividem-se de maneira intensa. A zona seguinte é a hipertrófica; aqui, os condrócitos param de se dividir e aumentam de tamanho devido à absorção de glicogênio e lipídios. Nessa fase,

eles podem se diferenciar em osteoblastos ou passar pelo processo de apoptose. A morte dos condrócitos cria espaços vazios na matriz cartilaginosa que são preenchidos por células ósseas, marcando o início da atuação dos osteoblastos primários e osteoclastos invasores, resultando na formação da zona de cartilagem calcificada. Por fim, na zona ossificada, os vasos sanguíneos e as células osteoprogenitoras invadem completamente os espaços ou lacunas formadas, diferenciando-se em osteoblastos e depositando a matriz óssea que, depois, se calcifica, aprisionando os osteoblastos e transformando-os em osteócitos. Esse processo completo resulta na mineralização da antiga matriz cartilaginosa, transformando-a em tecido ósseo (34,35,39).

A desnutrição quando ocorre antes ou durante a fase púbere pode afetar negativamente a placa de crescimento, resultando em efeitos adversos que impactam o desenvolvimento ósseo. Devido à estrutura, localização específica e propriedades mecânicas delicadas, essas áreas são mais vulneráveis no esqueleto em desenvolvimento, sendo suscetíveis a lesões que podem causar má-formação óssea ou defeitos estruturais.

1.2.2 *Tecido ósseo*

O osso é o principal componente do esqueleto; proporciona sustentação e mobilidade por meio de um sistema de alavancas, que em conjunto com a interação sinérgica entre músculos e articulações, viabiliza os movimentos. Desempenha papel fundamental no suporte estrutural, proteção dos órgãos vitais, armazenamento e homeostase de íons minerais, como cálcio e fosfato. Ainda, o osso capta e armazena toxinas e metais pesados, minimizando, assim, seus efeitos adversos em outros tecidos, além de abrigar a medula óssea que forma as células sanguíneas (40,41).

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo, constituído por células ósseas e uma matriz extracelular mineralizada. Este tecido é altamente dinâmico, tendo a capacidade de crescer e remodelar-se de acordo com a faixa etária e as necessidades do organismo. Sua estrutura consiste em uma porção inorgânica, composta principalmente por cálcio e fosfato, que se apresentam na forma de cristais de hidroxiapatita, conferindo-lhe rigidez. Há, ainda, uma parte orgânica, formada principalmente por fibras colágenas do tipo I, e outros componentes como glicosanimoglicanos, moléculas de proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, que contribuem para a maleabilidade do osso, sendo responsáveis pela manutenção de suas propriedades elásticas (39).

A formação do osso tem início na vida embrionária e pode acontecer de duas maneiras diferentes: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. No processo de formação intramembranosa, as células mesenquimais passam por proliferação e diferenciação, dando origem a células osteoprogenitoras e fibroblastos. As células osteoprogenitoras, em sequência, transformam-se em osteoblastos que produzem espículas osteoides. Essas espículas mineralizam-se e formam uma rede contínua entrelaçada com cavidades ósseas que são preenchidas por tecido conjuntivo e hematopoiético. Esse tipo de osso imaturo é entrelaçado, mas posteriormente é reabsorvido pelos osteoclastos e, em seguida, novo tecido ósseo é depositado, dando origem a um osso maduro composto por lamelas.

Por outro lado, na ossificação endocondral, a formação de osso acontece a partir de núcleos de ossificação encontrados em um molde cartilaginoso com formato semelhante ao osso final, embora com dimensões reduzidas (32,38,41). A ossificação do molde cartilaginoso inicia-se no centro primário de ossificação. Nesse local, com a chegada da vascularização, as células mesenquimatosas próximas ao pericôndrio se diferenciam em osteoblastos, que começam a produção da matriz orgânica mineralizada. Essa produção leva à hipertrofia e apoptose dos condrócitos presentes na região central. Os espaços deixados pelos condrócitos são preenchidas por capilares sanguíneos e células mesenquimais, que se diferenciam em osteoblastos e contribuem para a formação do novo osso (32,41).

Quase que simultaneamente, no osso longo, surgem os centros secundários de ossificação nas epífises do osso em formação. Nessas regiões, a medula óssea preenche os espaços intertrabeculares, pois o osso é do tipo esponjoso. Com o crescimento radial desses centros, o tecido cartilaginoso permanece apenas como cartilagem articular e placa epifisária que é a responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos longos (32,41).

Estruturalmente, o tecido ósseo apresenta um arcabouço composto por lamelas ou trabéculas. Dependendo da organização desses elementos, o tecido ósseo pode ser classificado como esponjoso ou compacto. O tecido ósseo esponjoso, também conhecido como trabecular, é caracterizado por trabéculas mais espaçadas e multidirecionadas. É encontrado nas epífises e parte da metáfise dos ossos longos, no corpo vertebral, ossos pélvicos e alguns ossos irregulares. Por outro lado, o tecido ósseo compacto, ou cortical, é formado por lamelas justapostas e organizadas. Esse tipo de tecido prevalece nas diáfises dos ossos longos. Em torno da diáfise óssea existe uma lâmina de tecido conjuntivo – o periósteo, que possui propriedades osteogênicas capazes de auxiliar nos processos de formação e regeneração (32,40).

As células ósseas fundamentais na fisiologia dos ossos são os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Em conjunto, esses três tipos celulares desempenham papel crucial no processo de remodelação e manutenção do metabolismo ósseo.

1.2.3 Remodelação óssea

O tecido ósseo é dinâmico e passa por um processo contínuo de renovação, adaptando sua estrutura em resposta a estímulos mecânicos, reparando danos estruturais e mantendo a integridade biomecânica (42). Essa renovação tecidual é um processo complexo que envolve a atividade coordenada de células ósseas em duas fases principais: reabsorção e deposição (41).

Os osteoclastos são células volumosas, com múltiplos núcleos e ramificações extensas. São originárias do processo hematopoiético e encontram-se situadas na superfície óssea. Tem como papel primordial a reabsorção do tecido ósseo mediante a criação de um ambiente ácido, o que permite a dissociação dos cristais de hidroxiapatita para, posteriormente, propiciar a degradação total da porção orgânica através da ação de enzimas (32,41).

Os osteoblastos desempenham papel essencial na formação e preservação do tecido ósseo. Originárias de células mesenquimais, essas células são responsáveis pela síntese da matriz óssea e são metabolicamente ativas, residindo na superfície do osso. À medida que amadurecem, os osteoblastos tornam-se enclausurados na matriz mineralizada e, em seguida, passam por apoptose, ou transformam-se em osteócitos ou células de revestimento.

Os osteócitos são os principais constituintes do tecido ósseo e estão localizados nas lacunas da matriz óssea, comunicam-se entre si e com as superfícies ósseas através de projeções celulares: os canalículos. O importante papel dessas células é na manutenção da eutrofia óssea, da resposta adaptativa do osso aos estímulos mecânicos e na regulação do metabolismo ósseo (32,41).

A remodelação óssea é um processo ativo e contínuo pelo qual o tecido ósseo é constantemente renovado. Esse ciclo envolve a remoção e substituição de células ósseas antigas por células novas, garantindo a integridade e a adaptabilidade dos ossos ao longo da vida. Esse processo é influenciado por diversos estímulos que podem ser agrupados em bioquímicos, como hormônios e fatores de crescimento, e os estímulos mecânicos. Os osteócitos são células que têm a capacidade de reconhecer as cargas mecânicas aplicadas nos ossos, e isso desempenha um papel essencial na manutenção do microambiente ósseo. As

forças mecânicas são convertidas em sinais biológicos que impulsionam o processo de osteogênese (43).

As vias de regulação do remodelamento ósseo consistem em complexos mecanismos de sinalização molecular que controlam a formação e a reabsorção óssea, garantindo que os ossos sejam continuamente renovados e ajustados de acordo com as demandas fisiológicas do organismo. Uma via de sinalização de particular importância nesse contexto é o sistema RANK/RANKL/OPG que está envolvido na regulação da atividade dos osteoclastos e na remodelação óssea. O RANKL é uma molécula sinalizadora produzida pelos osteoblastos e osteócitos que se liga ao RANK presente na superfície dos osteoclastos. Essa ligação do RANKL ao RANK ativa os osteoclastos e estimula a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína produzida pelos osteoblastos que atua como inibidor da via RANK/RANKL. A OPG se liga ao RANKL e impede sua interação com o RANK nos osteoclastos, bloqueando, assim, a formação e a ativação dos osteoclastos (44,45).

Em condições normais, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é mantido pela interação desses três componentes: RANK, RANKL e OPG. No entanto, desequilíbrios nesse sistema podem levar a distúrbios ósseos, como a osteoporose, em que ocorre perda excessiva de tecido ósseo, em relação à formação, resultando em ossos frágeis e susceptíveis de fraturas.

A relação entre os quadros osteoporóticos e suas principais causas tem sido amplamente investigada, no entanto, os mecanismos subjacentes e as alterações ósseas decorrentes da desnutrição, que resulta da falta de alimentos, ainda permanecem pouco esclarecidos.

1.3 Repercussões da realimentação no tecido esquelético

Reverter as consequências causadas pela desnutrição é de extrema importância para minimizar seus efeitos tanto a curto, quanto a longo prazo. O tratamento da desnutrição requer, em geral, uma abordagem multifacetada, que visa a corrigir as deficiências nutricionais e tratar as complicações relacionadas. A realimentação desempenha um papel fundamental nesse processo.

O crescimento linear, que se refere ao aumento gradual do comprimento ao longo do tempo, é um indicador essencial do bem-estar infantil. Em populações humanas, a avaliação do crescimento é a medida mais precisa para determinar a saúde e o estado nutricional de

crianças. Condições de saúde precárias podem comprometer significativamente os padrões ideais de crescimento (46). O atraso no crescimento e a falha do crescimento linear podem resultar em atrasos no desenvolvimento infantil e estão associados a efeitos negativos na massa óssea, como densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) e qualidade óssea comprometida. Esses efeitos podem afetar o equilíbrio do *turnover* ósseo e se traduzir em osteopenia e osteoporose de início precoce, além de maior risco de fraturas ósseas (47–49).

Durante o período de crescimento, a aquisição de massa óssea é mais significativa, atingindo seu ponto máximo na puberdade. Estudos epidemiológicos revelam que um aumento de 10% no pico de massa óssea pode reduzir pela metade o risco de fraturas em adultos (50,51). Além disso, outras investigações mostram que a desnutrição intraútero e na infância está associada à redução da massa óssea na vida adulta (26). Portanto, é fundamental maximizar aquisição de massa óssea durante as duas primeiras décadas de vida, quando até 90% do pico de massa óssea é obtido (52).

Diante do exposto, intervenções dietéticas foram exploradas em diferentes modelos animais experimentais de desnutrição seguida de realimentação. Esses estudos consistem em restringir a ingestão de nutrientes específicos (53–55) ou calorias (24,25) dos animais por um tempo fixo e, posteriormente, avaliar o impacto que um período de realimentação tem sobre o crescimento, e os resultados relacionados aos ossos, comparando com animais alimentados *ad libitum*. Da mesma forma, a suplementação ou enriquecimento da dieta com nutrientes específicos foi abordada em alguns estudos (53,54).

Curiosamente, uma significativa disparidade nos resultados experimentais é observada, e ainda não está adequadamente esclarecido se ocorre a completa recuperação do déficit no crescimento e na qualidade óssea após o término do período restritivo. Dados epidemiológicos de crianças observaram recuperação parcial, mas não total da estatura após restabelecimento do suprimento alimentar. Contudo, os resultados relativos à altura final dos pacientes observados são inconsistentes (56).

A maioria dos estudos científicos conduzidos até o momento realiza o acompanhamento dos animais durante um período relativamente curto, o que impede a observação completa do desenvolvimento da maturidade esquelética. Além disso, grande parte dessas pesquisas tem se concentrado em investigar deficiências nutricionais específicas, enfocando os efeitos fenotípicos de forma isolada. No entanto, é importante considerar que a desnutrição clínica, que frequentemente afeta crianças vulneráveis em diversas regiões do

mundo, é uma condição de longa duração e caracterizada por redução geral na ingestão total de alimentos (29,57).

No presente estudo, acompanhamos os animais por curto e médios períodos, até depois de atingirem a maturidade esquelética. Replicamos a condição de desnutrição em ratos jovens, submetendo-os a uma dieta restrita em quantidade de alimento e, posteriormente, restauramos a alimentação adequada.

Embora existam estudos experimentais na literatura que investigam os efeitos sobre a qualidade óssea e o controle de crescimento ósseo em animais jovens desnutridos, seguidos de realimentação, ainda há várias lacunas a serem atendidas e controvérsias a serem esclarecidas em relação aos mecanismos envolvidos. Portanto, novas investigações são justificadas.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A hipótese desta investigação é que a desnutrição provocada em ratos imaturos tem repercussões adversas tanto no crescimento, quanto na qualidade do tecido ósseo, e que a realimentação pode reverter parcialmente ou totalmente tais efeitos deletérios.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

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

3.2 Específicos

- Avaliar a influência da restrição alimentar e ulterior realimentação na placa de crescimento proximal da tíbia de ratos em desenvolvimento.

- Avaliar a influência da restrição alimentar e ulterior realimentação nos tecidos ósseos trabecular e cortical de ratos em desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Essa investigação é um estudo experimental em modelo animal.

4.2 Animais Experimentais

Todos os procedimentos descritos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 0220/2018). Foram adotados os cuidados diários adequados, seguindo as orientações para o manejo e uso ético de animais de laboratório. Todo o estudo foi conduzido em conformidade com os princípios dos 3Rs, que consistem em reduzir, refinar e substituir o uso de animais (58). Além disso, foram seguidas as diretrizes instituídas no guia para o cuidado e uso responsável de animais de laboratório (59).

Ratos fêmeas da linhagem *Wistar Hannover*, junto com sua prole de machos, foram obtidos do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e abrigados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP durante o período de lactação. Após o desmame (21 dias), os filhotes foram separados das mães e distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais.

Durante todo o experimento, os animais ficaram alojados individualmente em gaiolas com compartimento para coletar fezes e urina. Eles tiveram acesso irrestrito à água e foram mantidos à temperatura ambiente controlada entre 20°C a 24°C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas.

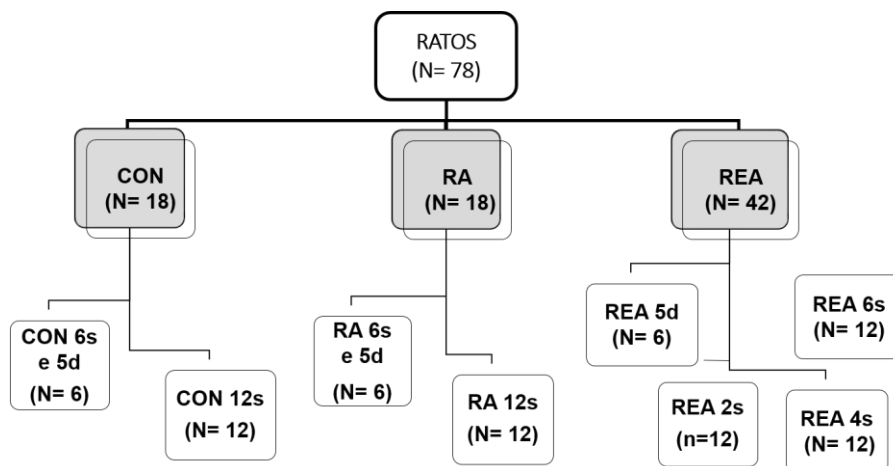
4.3 Grupos experimentais

Foi empregado no estudo o total de 78 ratos machos, com massa corporal inicial variando entre 50 e 60 gramas. Estes animais foram divididos em três grupos experimentais (1) CON: ratos controle; (2) RA: restrição alimentar e (3) REA: restrição alimentar seguida de realimentação. Este último grupo foi dividido em três subgrupos (REA 2s, REA 4s e REA 6s). Os grupos CON e RA foram divididos em dois subgrupos cada, enquanto o grupo REA foi subdividido em quatro subgrupos, totalizando oito subgrupos (Fig.1). Os subgrupos CON 6s e 5d, RA 6s e 5d, REA 6s e 5d foram incluídos na pesquisa para analisar a expressão gênica ao

longo de um período de acompanhamento de 6 semanas e cinco dias. Essa análise foi realizada cinco dias após o início das intervenções dietéticas (RA e REA). O referido período foi escolhido por ser uma fase aguda na sequência de eventos decorrentes das mudanças nutricionais. Além disso, corresponde a um estágio crucial do desenvolvimento esquelético, onde ocorrem surtos de crescimento na tíbia (12). Nessa fase, os processos de crescimento e formação óssea estão muito ativos, tornando-se um momento importante para identificar os genes envolvidos no processo de formação óssea.

Para as demais análises da estrutura óssea e da cartilagem de crescimento, foram utilizados os períodos de 2, 4 e 6 semanas. Esses intervalos foram selecionados para abranger diferentes fases do crescimento e desenvolvimento esquelético, com o objetivo de investigar se períodos mais longos de reintrodução alimentar seriam capazes de restaurar a condição normal do crescimento e a qualidade do tecido ósseo (Fig. 1).

Figura 1. Fluxograma representativo da distribuição dos grupos e subgrupos experimentais.



Fonte: Arquivo Próprio

CON – grupo controle; **RA** – grupo restrição alimentar; **REA** – grupo restrição alimentar e realimentação.

CON 6s: grupo controle seguido por 6 semanas e cinco dias de dieta normal; CON 12s: controle seguido por 12 semanas de dieta normal; RA 6s: grupo restrição alimentar seguido por 6 semanas e cinco dias; RA 12s: grupo restrição alimentar seguido por 12 semanas; REA 5 dias: grupo realimentação submetido a 6 semanas de restrição alimentar e seguido de realimentação por 5 dias; REA 2s: grupo realimentação submetido a 6 semanas de restrição alimentar, seguido de realimentação por 2 semanas; REA 4s: grupo realimentação submetido a 6 semanas de restrição alimentar, seguido de realimentação por 4 semanas; grupo realimentação submetido a 6 semanas de restrição alimentar, seguido de realimentação por 6 semanas.

Todos os grupos foram formados após o desmame que ocorreu quando os animais completaram 3 semanas de idade. O grupo restrição alimentar foi submetido à dieta restritiva após o desmame e continuou com a mesma dieta durante toda a pesquisa. Esse grupo possuiu

seu controle não desnutrido correspondente ao período de observação da restrição alimentar. O grupo realimentação também foi submetido à dieta restritiva pelo período de seis semanas, a partir do desmame. Em seguida, o grupo foi dividido em três subgrupos (REA 2s, REA 4s e REA 6s), de acordo com o tempo de introdução da realimentação que ocorreu respectivamente em duas, quatro e seis semanas (Quadro 1).

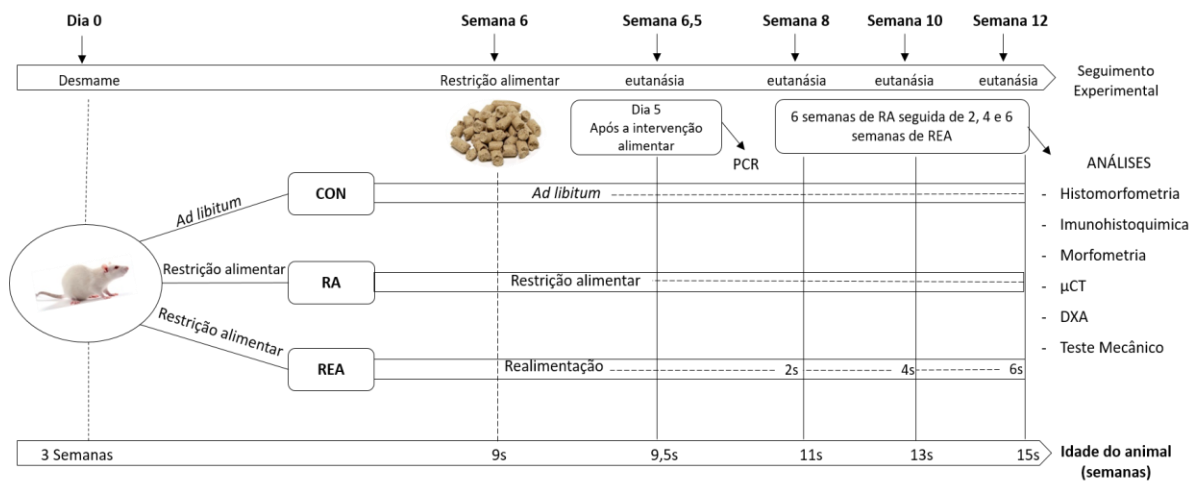
Quadro 1. Caracterização dos grupos experimentais

GRUPOS	INTERVENÇÃO	SUBGRUPOS	
CON (n= 18) Animais não desnutridos	Ratos normais, sem qualquer intervenção. Alimentação com ração padrão	CON 6s (n=6)	Seguimento por seis semanas após desmame. Eutanásia com nove semanas e cinco dias de idade.
		CON 12s (n=12)	Seguimento por 12 semanas após desmame. Eutanásia com 15 semanas de idade.
RA (n=18) Grupo com restrição alimentar	Ratos submetidos à restrição alimentar durante 12 semanas, desde o desmame	RA 6s (n=6)	Seguimento por seis semanas após desmame. Eutanásia com nove semanas e cinco dias de idade.
		RA 12s (n=12)	Seguimento por 12 semanas após desmame. Eutanásia com 15 semanas de idade.
REA (n=42) Grupo com restrição alimentar e ulterior realimentação	Ratos submetidos à restrição alimentar durante seis semanas, desde o desmame, e realimentados com a mesma ração, por diferentes períodos, conforme o subgrupo	REA 5d (n=6)	Realimentação com dieta normal durante cinco dias após a restrição alimentar. Eutanásia com nove semanas e cinco dias de idade
		REA 2s (n=12)	Realimentação com dieta normal durante duas semanas após restrição alimentar. Eutanásia com 11 semanas de idade
		REA 4s (n=12)	Realimentação com dieta normal durante quatro semanas após a restrição alimentar. Eutanásia com 13 semanas de idade
		REA 6s (n=12)	Realimentação com dieta normal durante seis semanas após a restrição alimentar. Eutanásia com 15 semanas de idade

Fonte: Arquivo Próprio

Nos subgrupos CON e RA, que foram acompanhados por 12 semanas, a eutanásia foi realizada quando os animais atingiram 15 semanas de vida. Já nos subgrupos REA 2s, 4s e 6s, o acompanhamento teve duração de 8, 10 e 12 semanas, respectivamente, e a eutanásia ocorreu nas semanas 11, 13 e 15 de vida, respectivamente, conforme indicado no esquema da figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental.



Fonte: Arquivo Próprio

4.4 Procedimento experimental - Dieta normal e restrição alimentar

Todos os grupos receberam dieta padrão (NUVILAB CR-1[®], PR, Brasil) composta por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e antioxidante.

Com relação à alimentação, no grupo Controle, sempre foi fornecida uma quantidade superior para que os animais se saciassem. A quantidade não consumida era pesada e subtraída do total fornecido, permitindo calcular a quantidade de ração consumida diariamente. No dia seguinte, do montante consumido, apenas a metade foi fornecida ao grupo sujeito à restrição alimentar. Para os animais realimentados, após período de restrição alimentar, foi fornecida a mesma quantidade de ração ofertada para o grupo controle, de acordo com sua respectiva idade.

A desnutrição foi induzida por meio da restrição alimentar em 50%, cuja comprovação foi confirmada por estudo prévio (29).

4.4.1 Cuidado e tratamento dos animais durante o período experimental

O animal foi examinado diariamente com atenção especial para as condições da atividade, reatividade, pelagem e sinais de estresse como a presença de pigmentos de porfirina na região dos olhos e focinho (59,60).

4.5 Controle da massa corporal

Três vezes por semana, foi medida a massa corporal de cada rato. A pesagem foi conduzida de forma individual, com os animais acomodados dentro de uma caixa plástica e com o uso de balança técnica (C&F Modelo P15, Ribeirão Preto, Brasil), com capacidade de até 1500 g e precisão de 5 g.

4.6 Análises

Foi aplicado cloridrato de lidocaína (5 mg/kg), por via intraperitoneal, 10 minutos antes da eutanásia, que foi realizada com quantidade excessiva do anestésico (Tiopental[®]), administrada por via intraperitoneal. Imediatamente após o óbito foi realizada a punção cardíaca para coleta de sangue (cerca de 6-8 mL), que foi centrifugado (3000 rpm) para a separação do soro, e armazenado em -80°C. Após a coleta do sangue, as tíbias foram colhidas, limpas das partes moles e estocadas em paraformaldeído 4%, álcool 70%, ou armazenadas em freezer -80°C, de acordo com a análise futura.

4.6.1 Análise morfológica do osso

Após a dissecação, as tíbias foram pesadas e obtido o comprimento ósseo pela medida da distância entre as superfícies articulares do joelho e tornozelo. Os diâmetros da região central da diáfise e metáfise proximal foram medidos com um fio cirúrgico em torno da região de interesse que, depois, teve o tamanho medido com paquímetro.

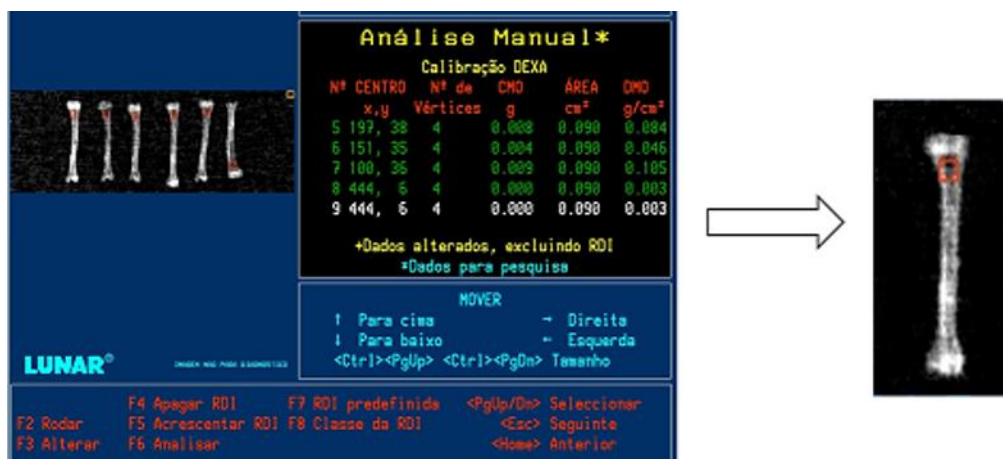
4.6.2 Densitometria óssea (DXA)

No Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, foi realizada a densitometria óssea com dupla emissão de raios X. O exame foi feito no densitômetro Lunar DPX-IQ (Lunar;

software versão 4.7 e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) e o método por absorciometria bifotônica de raio-X (DXA: Dual-energy X-ray absorptiometry). Durante o procedimento, os ossos foram colocados paralelamente um ao outro dentro de um recipiente plástico e imersos em solução alcoólica 70% na profundidade de 2,0 cm. A densidade óssea global foi analisada usando software específico projetado para a análise densitométrica de pequenas amostras (Fig. 3).

A análise concentrou-se na metáfise proximal das tíbias, utilizando áreas quadradas (ROI) de 0,09 cm² posicionadas imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento proximal como a região de interesse. A partir dessas regiões, foram avaliados os valores de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo). O coeficiente de variância foi de 4,5%.

Figura 3. Imagem ilustrativa do exame de densitometria óssea.



Fonte: Arquivo próprio.

O detalhe mostra a tíbia escaneada e a região metafisária proximal delimitada.

4.6.3 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Foi empregado um método tridimensional que possibilita a caracterização da microgeometria e densidade óssea dos tecidos. Além disso, ele permite analisar independentemente a microarquitetura trabecular e cortical (61). O procedimento de microtomografia computadorizada foi realizado no microtomógrafo GE Phoenix v|tome|x S240, pertencente ao Centro para Documentação da Biodiversidade da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, no Brasil. Utilizando o detector DXR250RT com resolução de 1000x1000 pixels, o exame foi conduzido com os seguintes parâmetros: 60Kv,

150 μ A, 1000 projeções com média de quatro exposições de 333ms, garantindo resolução de 15 μ m. Para o processamento da imagem e a obtenção das reconstruções tridimensionais, foi utilizado o software GE Phoenix datos|x2.

As análises microtomográficas foram focadas na metafíse proximal da tíbia, a fim de avaliar os tecidos trabecular e cartilagem de crescimento, bem como na região diafisária para avaliar o tecido cortical. O posicionamento ósseo foi ajustado utilizando o software Data Viewer (Bruker-microCT, versão 1.5.1.2), e, em seguida, a análise morfométrica foi conduzida por meio do software CTAn (Bruker-microCT, versão 2.2.1).

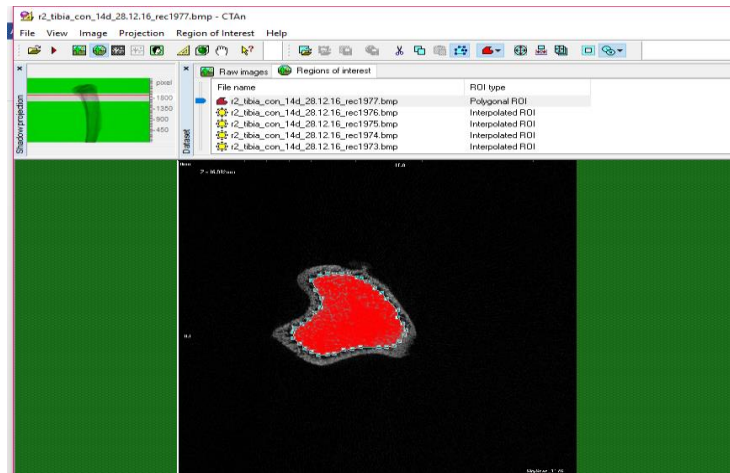
Todas as medidas morfométricas dos ossos e as terminologias adotadas seguiram as recomendações da American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) (62).

4.6.3.1 Análise da microarquitetura trabecular

A região metafisária foi manualmente selecionada com extensão de 2,0 mm, começando imediatamente após o término da cartilagem de crescimento proximal da tíbia (Fig.4). Em seguida, o osso trabecular foi separado do osso cortical por meio do software CTAn. Utilizamos esse software para determinar o melhor *threshold* a fim de excluir tecido mole e incluir apenas tecido mineralizado. O mesmo *threshold* foi aplicado em todas as amostras, mas diferentes *thresholds* foram utilizados para avaliar o osso trabecular, cortical e a cartilagem de crescimento. Para o osso trabecular, utilizamos o threshold de 255-63.

A microarquitetura trabecular da região metafisária proximal da tíbia foi caracterizada pela determinação dos seguintes parâmetros: volume ósseo total (BV), em mm^3 ; volume ocupado pelo osso trabecular, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas (BV/TV), em %; número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (Tb.N), em 1/mm; espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm; espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm; densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D), em 1/ mm^3 ; superfície óssea (BS/BV), em mm^3 ; e índice do modelo estrutural (SMI).

Figura 4. Imagem ilustrativa das trabéculas metafisárias na extremidade proximal da tíbia analisada pelo Micro-CT.

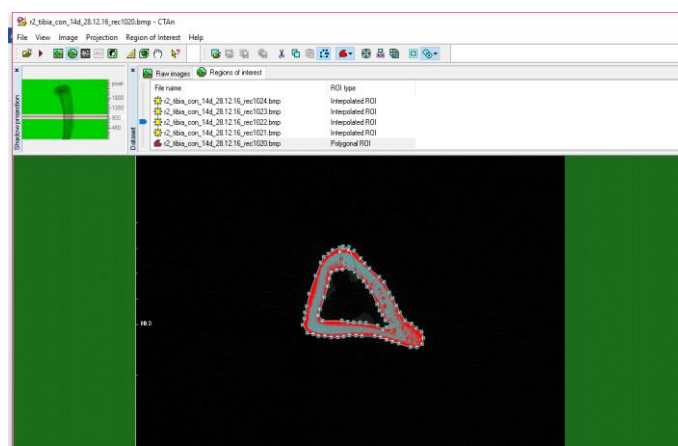


Fonte: Arquivo próprio.

4.6.3.2 Análise da microarquitetura cortical

A microarquitetura cortical foi examinada na diáfise da tíbia, 7 mm distalmente à cartilagem de crescimento proximal, em uma extensão de 1 mm (Fig. 5). Para o osso cortical, foi aplicado *threshold* de 255-75. Os parâmetros analisados foram o volume cortical (Ct.V em mm^3) e a espessura cortical (Ct.Th em mm).

Figura 5. Imagem ilustrativa da região cortical da diáfise da tíbia analisada pelo micro-CT



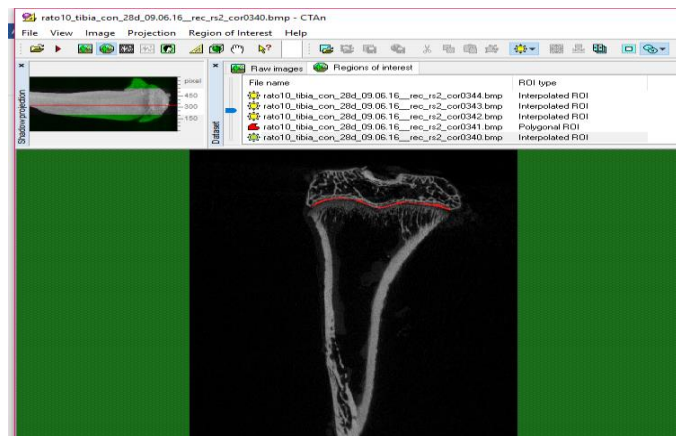
Fonte: Arquivo próprio.

4.6.3.3 Análise da cartilagem de crescimento

O processo de seleção da cartilagem de crescimento envolveu minuciosa separação manual do tecido ósseo circundante, realizada em cortes coronais abrangendo toda a sua

extensão (Fig. 6). O volume da cartilagem de crescimento foi obtido por meio do cálculo do volume total (TV) em mm³ de toda a área de interesse selecionada. O *threshold* utilizado foi de 255-60.

Figura 6. Imagem ilustrativa da região ocupada pela cartilagem de crescimento analisada pelo Micro-CT



Fonte: Arquivo próprio.

4.6.4 Histologia e histomorfometria do tecido ósseo

Foi adotada a rotina padrão para o processamento do espécime. Inicialmente, utilizou-se solução de paraformaldeído 4% para fixação, seguida pela descalcificação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%. A desidratação foi realizada utilizando concentrações crescentes de álcool, variando de 70% a 100%. Após essa etapa, o tecido foi diafanizado em xilol e, em seguida, incluído em blocos de parafina. O espécime incluído foi posicionado de forma que a face anterior da tíbia ficasse voltada para baixo. Para obtenção dos cortes histológicos, foi seguido o sentido longitudinal no plano coronal. Utilizaram-se cortes semi-seriados com espessura de 5 µm, totalizando 24 lâminas por bloco, sendo 2 cortes por lâmina. A cada 8 cortes, 10 cortes seguintes foram descartados para evitar repetições.

Para a análise seis lâminas de cada grupo foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), para avaliação da placa de crescimento e trabéculas ósseas. Cortes adjacentes foram corados com tricrômico de Masson para analisar o trabeculado ósseo e com *picrosirius red* para a avaliação da deposição de colágeno. A análise das lâminas coradas com HE foi feita de forma padronizada em toda extensão da cartilagem de crescimento proximal da tíbia. Essas secções foram examinadas sob microscópio de campo brilhante com ampliações de 50, 100 e 200x em microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) equipado com uma câmera

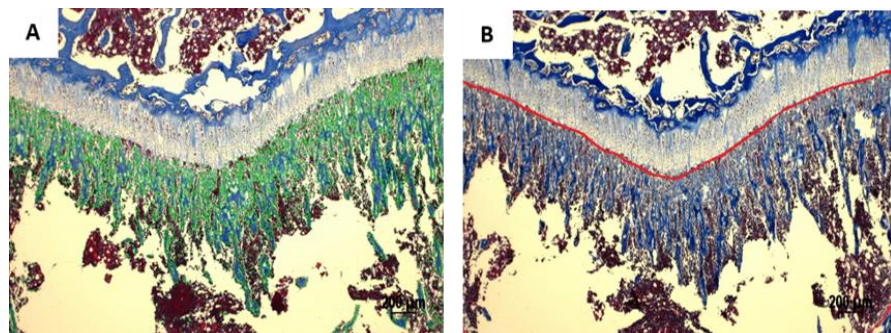
digital (Zeiss®). Já para as lâminas coradas com tricrômico de Masson e *picrosirius* red, a análise foi concentrada no tecido ósseo metafisário, imediatamente distal à placa de crescimento proximal da tíbia. A análise quantitativa foi padronizada nessa região do osso, com aumento de 50x para as lâminas coradas com tricrômico de Masson e *picrosirius* red. As imagens para avaliação do colágeno total foram adquiridas sob microscopia com luz polarizada e birrefringência no mesmo aumento de 50x.

Adicionalmente, cortes adjacentes foram corados com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para marcar a atividade osteoclástica. Essas secções foram analisadas sob microscopia de campo brilhante com ampliação de 100x, utilizando microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) e câmera digital (Zeiss®).

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

A área do osso trabecular da tíbia foi quantificada utilizando a coloração tricrômico de Masson. Foi selecionada a área de 3,5 x 2,5 mm para análise, com aumento de 50 vezes. A análise da tíbia foi realizada em imagem capturada logo abaixo da cartilagem de crescimento. Utilizando o software Axiovision®, a cor azul foi selecionada para demarcar toda a área correspondente ao osso trabecular (Fig. 7A), e as regiões que não representavam esse tipo de osso foram excluídas (Fig. 7B). A quantificação da área foi expressa como a razão da área do osso sobre a área total em porcentagem ($B.Ar/Tt.Ar -\%$) (63).

Figura 7. Fotomicrografia ilustrativa da área de seleção para análise histomorfométrica. A) Área trabecular da metáfise proximal da tíbia selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de demarcação da região de interesse analisada (tricrômico de Masson, 50x).

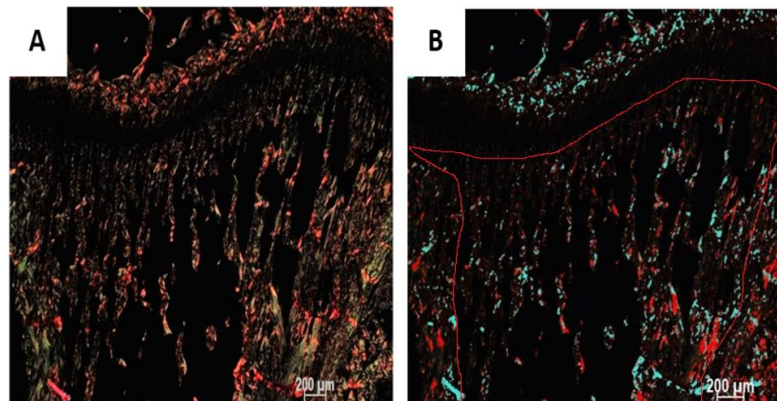


Fonte: Arquivo próprio.

4.6.4.2 Quantificação do colágeno na região da metáfise proximal da tíbia

Foi realizada a mensuração da área de colágeno presente nas lâminas coradas com *picrosirius red*. As lâminas foram analisadas utilizando luz polarizada e birrefringência, possibilitando a observação das fibras colágenas em tons de vermelho-alaranjado e verde-amarelado. A região avaliada abrangeu 3,5 x 2,5 mm, com aumento de 50 vezes, localizada imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento (Fig. 8A). A análise quantitativa das fibras de colágeno foi conduzida por meio do software Axiovision®, que captura as diferentes tonalidades de vermelho e verde utilizando luz polarizada, permitindo a quantificação da soma das áreas em μm^2 das diversas fibras. A relação entre a área de colágeno e a área total foi expressa como uma porcentagem (Col.Ar/Tt.Ar-%) (64). Depois, essa região foi avaliada para comparar a quantidade de matriz colágena presente na estrutura óssea dos animais (Fig. 8B).

Figura 8. Fotomicrografia sob luz polarizada. A) Área de seleção da metáfise proximal das tíbias B) Demarcação da área de colágeno. As fibras colágenas são expressas em vermelho-alaranjado e verde amarelado (*picrosirius red*, 50x).

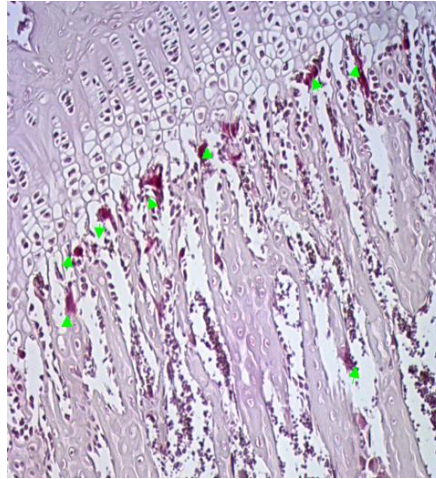


Fonte: Arquivo próprio.

4.6.4.3 Quantificação de osteoclastos

A quantificação dos osteoclastos foi obtida na coloração TRAP (Fig. 9, setas verdes). A metáfise proximal da tíbia, adjacente à placa de crescimento, foi a região de interesse avaliada. A quantificação foi realizada por meio do *software ImageJ* (NIH, versão 1.52a) e os resultados expressos em porcentagem de área.

Figura 9. Secções histológicas da metáfise proximal da tíbia corada pelo TRAP. Os osteoclastos aparecem em vermelho indicando que a área sofre reabsorção óssea (setas verdes). Aumento de 100x.



Fonte: Arquivo próprio.

4.6.5 Análise Imunoistoquímica

As amostras dos grupos experimentais presentes nas lâminas passaram por desparafinização com xilol, seguindo-se de hidratação em sequência decrescente de álcoois. Depois foram imersas em solução salina fosfatada tamponada (PBS). Em sequência, as amostras passaram pelo processo de recuperação dos epítomos antigênicos. Isso foi realizado usando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), que foi aquecida em forno micro-ondas. Foram aplicados 7 ciclos de aquecimento de 17 segundos, com intervalos de 2 minutos entre cada ciclo. Após atingir uma temperatura estável, as amostras foram submetidas a três lavagens de 3 minutos cada em solução salina tamponada (PBS). Em seguida, foi bloqueada a atividade da peroxidase endógena por 10 minutos. Novamente, as lâminas foram submetidas a três lavagens de 3 minutos cada em solução salina tamponada (PBS). Para bloquear a ligação não específica de proteínas, as amostras foram tratadas por 10 minutos com solução bloqueadora. 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, Receptor do ativador do fator nuclear kappa-B (RANK, A12997, anti-rabbit, Woburn, MA, EUA) e 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*. Em seguida, os tecidos foram lavados em PBS 4x por 3 minutos e incubadas em *horseradish peroxidase* (HRP) por 15 minutos, seguidos de 4 lavagens de PBS por 3

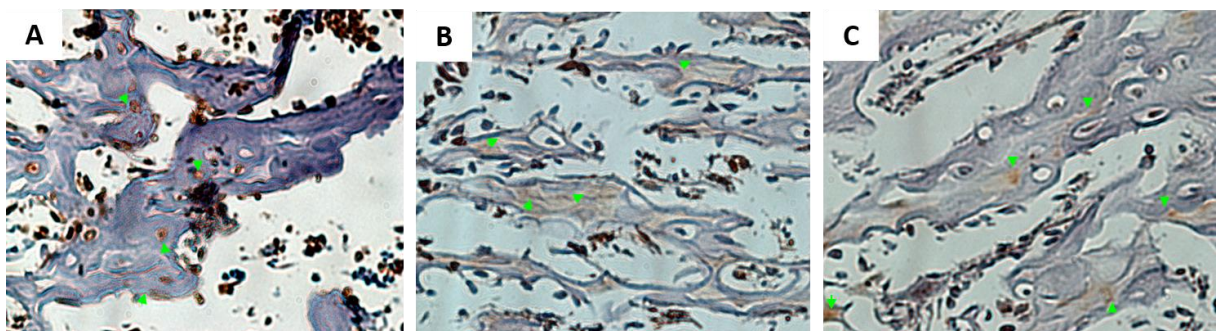
minutos cada. 3,3- Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi empregada como substrato enzimático por 5 minutos; as lâminas foram lavadas em PBS, contracoloradas com hematoxilina de Harris por 4 minutos, lavadas com água destilada, desidratadas gradualmente em álcool, e por fim, foram montadas. Como controle negativo, as amostras foram submetidas à metodologia descrita acima, suprimindo-se a utilização dos anticorpos.

4.6.5.1 Quantificação dos imunomarcadores

As áreas positivas de imunomarcação (OPG-positivas, RANK-positivas e RANKL-positivas) foram expressas na cor acastanhada. A região proximal das tíbias, imediatamente abaixo da cartilagem de crescimento proximal, foi a área de interesse avaliada. As fotomicrografias foram obtidas com amplia o de 400x, em microscópio óptico Axion Observer Z1 (Oberkochen, BW, Alemanha) acoplado a uma câmera digital.

Com o software ImageJ, foi possível isolar a tonalidade acastanha associada   marca o positiva dos anticorpos (Fig. 10) e mensurar a área de expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG. A avalia o quantitativa foi representada como a propor o da área de expressão da proteína em rela o   área total.

Figura 10. Fotomicrografia evidenciando o padrão de imunomarca o de OPG (A), RANK (B) e RANKL (C). As marca es positivas estão indicadas pelas setas verdes. Aumento de 400x.



Fonte: Arquivo próprio.

4.6.6 Histomorfometria da cartilagem de crescimento

Foram capturadas três imagens para cada se o, abrangendo as áreas central, margem direita e margem esquerda da cartilagem de crescimento, para posterior análise

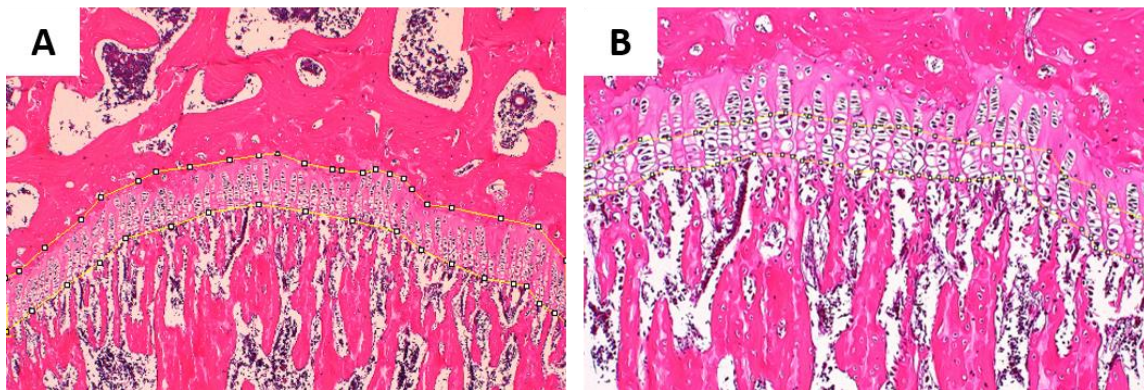
histomorfométrica. As seções foram examinadas utilizando microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) equipado com câmera digital (Zeiss®).

A avaliação quantitativa foi conduzida por meio do software ImageJ (versão 1.52a, NIH), em que os seguintes parâmetros foram medidos: (1) área total da cartilagem de crescimento em μm^2 ; (2) área da zona hipertrófica em μm^2 ; e (3) espessura total μm^2 .

4.6.6.1 Análise da área total da cartilagem de crescimento e da zona hipertrófica

Para a mensuração da área total e zona hipertrófica, o software foi calibrado para mensuração em μm . Depois, foi realizada seleção manual das áreas de interesse (Fig. 11).

Figura 11. Seleção manual para determinar a área total (A) e a zona hipertrófica da cartilagem de crescimento (B), delimitadas pelo contorno amarelo (Hematoxilina e eosina, aumento de 50x e 100x).

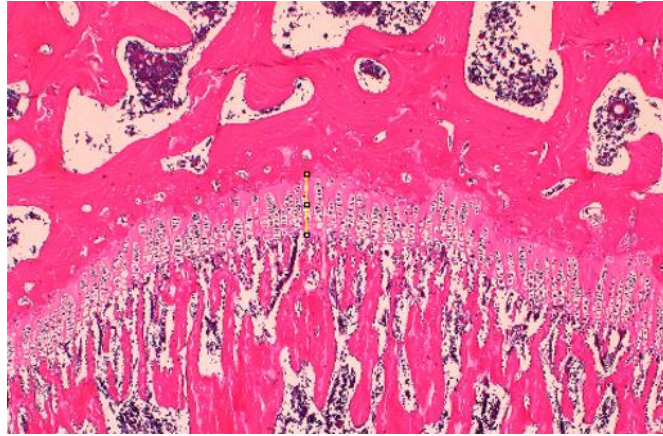


Fonte: Arquivo próprio.

4.6.6.2 Análise da espessura da cartilagem de crescimento

A mensuração da espessura da cartilagem de crescimento (μm) foi conduzida de forma manual a cada intervalo de 4 cm ao longo de sua extensão total (Fig. 12). Posteriormente, a média das medidas de espessura foi determinada e empregada para as análises comparativas.

Figura 12. Seleção manual para determinar a espessura da cartilagem de crescimento, medida a partir da zona de repouso, abrangendo todas as camadas até o início da zona de ossificação (Hematoxilina e eosina, aumento de 50x).

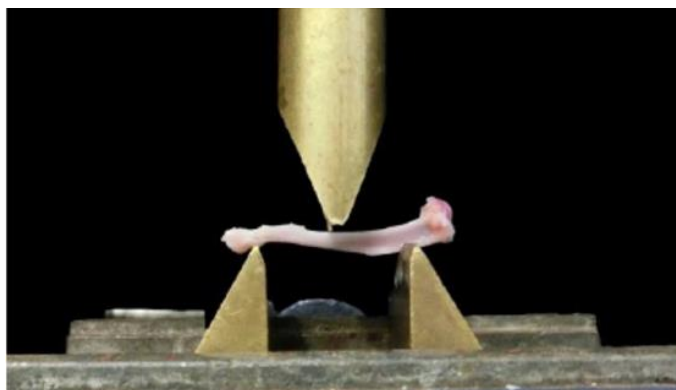


Fonte: Arquivo próprio.

4.6.7 *Análise mecânica*

Após a realização dos exames de densitometria e microtomografia, procedeu-se à execução dos testes mecânicos de flexão em três pontos, na região mediodiafisária das tíbias (Fig. 13). Previamente, as amostras foram imersas em solução salina para assegurar hidratação adequada. Os ensaios foram conduzidos na máquina universal de ensaios (EMIC® DL10.000; Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brasil), equipada com célula de carga de 500 N (EMIC® - 10000N) e velocidade de aplicação de carga de 1mm/min. A carga foi aplicada na região posterior da diáfise da tibia, apoiada por dois suportes distais, com vão livre de 25mm.

Figura 13. Tibia de rato preparada para ensaio de flexão de três pontos. Os pontos de apoio distam 2,5 cm entre si e a carga foi aplicada no centro.



Fonte: Imagem do Laboratório de Bioengenharia, FMRP-USP

4.6.8 Análise molecular

4.6.8.1 qPCR

Após a dissecação, as tíbias de cada animal, foram cortadas transversalmente na região de interesse (metáfise proximal), em ambiente estéril. Em seguida, as secções ósseas foram acondicionadas em microtubos contendo solução inativadora de RNase (RNAlater®, Sigma Aldrich®). Esses tubos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a -70°C até a etapa de processamento das amostras. Depois, as amostras foram trituradas e transferidas para microtubos contendo 500 μL de trizol (Life Technologies®, USA), sendo então novamente devolvidos ao freezer.

4.6.8.2 Extração e quantificação do RNA

Após a trituração foi adicionado clorofórmio e a amostra foi homogeneizada, repousada por 15 minutos, e centrifugada em 4°C com rotação de 12000 força centrífuga relativa (g) por minuto. A amostra, então, exibiu a separação de fases, da qual o RNA foi isolado. Depois, foram acrescentados 250 μL de isopropanol, mantida em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada em 4°C , em 12000 g por minuto. O líquido sobrenadante foi desprezado, seguido por três lavagens com álcool 75% (500 μL). As amostras foram mantidas em ar ambiente por 10 minutos para secagem. O *pellet* de RNA foi obtido e diluído em 30 μL de água ultra-pura tratada com dietil pirocarbonatolivre (DEPC).

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria de absorção (230, 260 e 280 nm) utilizando o equipamento Multiskan GO® (Thermo Scientific®, USA). Em seguida, o RNA foi tratado com DNase I, conforme as instruções do fabricante. Cada micrograma (1 μg) de RNA foi submetido a 1 unidade (U) de DNase I (Sigma®, USA), por 30 minutos a temperatura de 37°C . Para inativar a ação da DNase I, foi adicionado 1 microlitro (μL) de EDTA a uma concentração de 0,5 M. Finalmente, uma nova avaliação da quantidade de RNA foi realizada.

4.6.8.3 Integridade do RNA

Foi preparado gel de agarose a 0,8% dissolvido em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A solução foi aquecida em forno micro-ondas

para garantir a completa solubilização e, em seguida, foi cuidadosamente depositada na cuba de eletroforese horizontal. Após seco, o gel foi recoberto com tampão TAE e as amostras foram aplicadas cada uma com 2 µL da amostra em questão, juntamente com 2 µL “*loading buffer*” (azul de bromofenol e xileno cianol), além de 2 µL de uma diluição (1:500) de gel *red*. A eletroforese foi conduzida com variação gradual de potencial (80 V a 150 V) por minuto. A visualização foi realizada em aparelho transiluminador ultravioleta e o gel foi foto documentado.

4.6.8.4 Sintetização do Cdna

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total usando kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems®, USA). Para sintetizar o cDNA, 1 µg da amostra foi utilizado, adicionando 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 então submetidas a um ciclo de temperatura em termociclador, incluindo as etapas de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Após a conclusão da reação, as amostras foram devidamente armazenadas em freezer a -20°C.

4.6.8.5 Quantificação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)

Realizamos análises de PCR em tempo real para quantificar a expressão de mRNA, utilizando o kit TaqMan® e o termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No contexto do estudo da formação óssea, focamos nossa atenção nos seguintes genes: *Coll1a1* (Colagenase 1a1, ID: Rn01463848_m1) e *Osterix* (Fator de transcrição Sp7, ID: Rn02769744_s1). A expressão desses genes foi normalizada em relação ao gene endógeno GaPDH (ID: Rn01775763_g1).

4.6.8.6 Cálculo da expressão relativa do gene

A determinação da expressão do gene-alvo foi calculada utilizando o valor do *threshold cycle* (Ct). As análises dos resultados foram conduzidas empregando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, cujo resultado reflete a expressão relativa de mRNA.

4.7 Análise dos resultados

As variáveis contínuas foram descritas em termos de médias e desvios-padrão (DP). Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados, e o teste ANOVA para comparar a diferença entre os grupos. Para comparações múltiplas entre os grupos, foi aplicado o pós-teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software RStudio (RStudio, Inc, EUA) e os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism5® (GraphPad Software, Inc, São Paulo). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

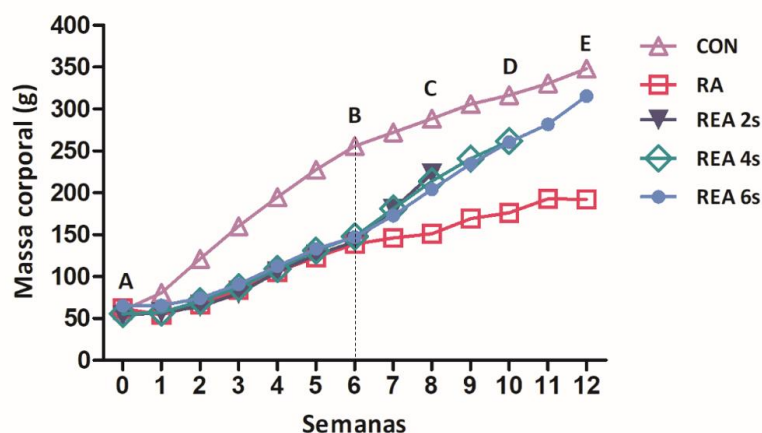
5 RESULTADOS

Durante a execução deste experimento não houve mortalidade. Os 78 ratos chegaram ao final do estudo e foram analisados. Ao longo da fase experimental, foi observada alteração na pelagem dos animais desnutridos, caracterizada por diminuição no brilho. Além disso, foram registrados distúrbios de comportamento, como agressividade e irritabilidade, especialmente durante as primeiras semanas de experimento, também nos animais desnutridos. Não foram notados grânulos de porfirina ao redor dos olhos e nariz, indicativo de importante sinal de estresse no rato.

5.1 Massa Corporal

Os valores médios semanais da massa corporal estão apresentados na figura 14. No dia zero, a massa corporal foi semelhante entre todos os grupos, indicando homogeneidade amostral ($p > 0,05$ – Fig. 14A). Durante o período de observação todos os animais ganharam massa, porém o grupo com restrição alimentar (RA) teve menor ganho em relação aos seus correspondentes etários do grupo controle e aos restrição alimentar e realimentação (REA). Esta diferença foi evidenciada logo na segunda semana do experimento e aumentou com o passar das semanas ($p < 0,05$). A realimentação mostrou melhora no ganho de massa dos animais, sendo esse efeito tempo-dependente. Ao final do experimento, a massa corporal do grupo REA 6s foi 64% maior em comparação ao grupo RA ($p < 0,0001$), e apenas 9% menor em relação ao grupo CON ($p = 0,03$). Em contraste, a massa final do grupo RA foi 45% menor em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os animais dos grupos REA e RA apresentaram curvas de ganho de massa semelhantes até o ponto intermediário do experimento, período em que ambos recebiam dieta restritiva (B). Após a sexta semana, houve aumento esperado da massa corporal nos subgrupos realimentados (REA 2, 4 e 6s), diferenciando-os dos animais mantidos em restrição alimentar. Os animais realimentados continuaram a apresentar ganho de massa corporal equivalente entre os grupos, diferenciando-se apenas na comparação de seus pontos finais (C, D, E), com acréscimo de 25% entre os grupos 2 e 4 semanas, e de 13% entre os grupos 4 e 6 semanas após a restrição alimentar ($p < 0,05$).

Figura 14. Curvas da evolução da massa corporal dos grupos experimentais.



Fonte: Arquivo Próprio

No dia zero (três semanas de idade) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (A). Os subgrupos com restrição alimentar e ulterior realimentação (REA) exibiram ganho de massa corporal semelhante até a 6ª semana (B). Nesta etapa, os animais foram realimentados *ad libitum*. REA 2s: realimentação por duas semanas e eutanásia (C); REA 4s: realimentação por quatro semanas e eutanásia (D) e REA 6s: realimentação por seis semanas e eutanásia (E). Os grupos realimentados apresentaram recuperação semelhante da massa corporal. No grupo mantido sob restrição alimentar (RA) houve redução tanto na massa corporal, quanto na velocidade de incremento

5.2 Análise óssea

5.2.1 Análise Macroscópica

Os parâmetros morfométricos da tíbia estão apresentados na Tabela 1. Todas as medidas macroscópicas foram significativamente menores no grupo RA ($p < 0,05$). Por outro lado, a realimentação levou ao aumento significativo de 30% na massa óssea ($p < 0,0001$), no comprimento ósseo em 8% ($p = 0,0001$), no perímetro da diáfise em 10% ($p = 0,01$) e no perímetro da metáfise proximal em 13% ($p = 0,003$), em comparação ao grupo com restrição alimentar permanente (RA). No entanto, todas as medidas dos ratos realimentados foram significativamente inferiores aos dos ratos CON ($p < 0,05$), e apenas o perímetro da metáfise proximal tendeu à diferença estatística ($p = 0,09$).

A comparação entre os subgrupos realimentação (REA 2, 4s e 6s) mostrou melhora tempo-dependente nas primeiras semanas da reintrodução alimentar. Os animais REA 2s apresentaram valores menores dos parâmetros analisados, que aumentaram em 4 e 6 semanas. Os subgrupos REA 4s e 6s foram estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Morfometria das tíbias (média \pm DP): massa, comprimento e perímetros (P.= perímetro)

	CON	RA	REA 2s	REA 4s	REA 6s
Massa Óssea (g)	0,65 \pm 0,06	0,44 \pm 0,04 ^a	0,40 \pm 0,06 ^{c,d}	0,55 \pm 0,05	0,57 \pm 0,05 ^{a,b}
Comprimento (mm)	39,50 \pm 0,72	35,16 \pm 0,92 ^a	33,72 \pm 0,93 ^{c,d}	37,13 \pm 0,97	37,94 \pm 1,06 ^{a,b}
P. Diáfise (mm)	10,69 \pm 0,41	8,76 \pm 0,44 ^a	8,78 \pm 0,45 ^{c,d}	9,59 \pm 0,67	9,67 \pm 0,75 ^{a,b}
P. Metáfise Proximal (mm)	18,52 \pm 0,77	15,19 \pm 1,20 ^a	16,05 \pm 0,42 ^{c,d}	17,72 \pm 0,65	17,20 \pm 0,80 ^{a',b}

Fonte: Arquivo Próprio

CON: grupo controle seguido por 12 semanas; RA: restrição alimentar seguido por 12 semanas; REA 2s: realimentação por 2 semanas após restrição alimentar; REA 4s: realimentação por 4 semanas após restrição alimentar; REA 6s: realimentação por 6 semanas após restrição alimentar. As letras indicam diferença estatisticamente significativa: ^ap<0,05 vs CON; ^bp<0,05 vs RA; ^cp<0,05 vs REA 4s; ^dp<0,05 vs REA 6s.

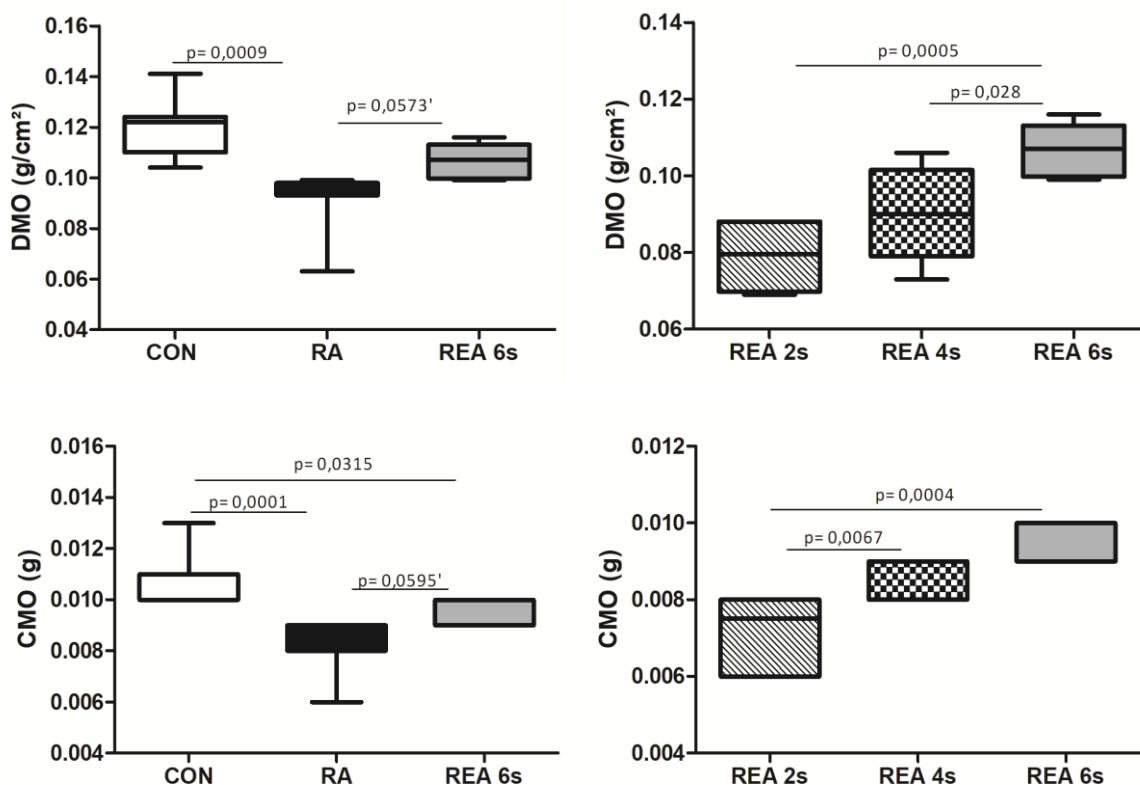
^{a'}p<0,09 vs CON. Indica tendência a diferença estatística.

5.2.2 *Análise densitométrica*

Diferenças significativas na densidade mineral óssea (DMO) e no conteúdo mineral ósseo (CMO) foram observadas entre os grupos RA e CON. O grupo RA apresentou redução significativa de 24% na DMO e de 27% no CMO em comparação com o grupo CON (p=0,0009 e p=0,0001, respectivamente). Por outro lado, o grupo REA 6s mostrou tendência à diferença significativa, com aumento de 18% na DMO da tíbia e 13% no CMO em relação aos ratos RA (p=0,057 e p=0,059, respectivamente). A comparação da DMO entre os grupos CON vs REA 6s não apresentou diferença estatística significativa (p>0,05). No entanto, o CMO do grupo realimentado foi significativamente menor em 18% (p=0,03).

Houve melhora dependente do tempo nos valores de DMO e CMO nos grupos que receberam realimentação. No grupo REA 6s, houve aumento significativo de 35% no DMO em comparação com o grupo REA 2s (p=0,0005) e aumento de 19% em comparação com o grupo REA 4s (p=0,02). O grupo REA 4s apresentou aumento de 14% no CMO em comparação com o grupo REA 2s (p=0,006). Além disso, o grupo REA 6s mostrou aumento de 22% no CMO em relação ao grupo REA 2s (p=0,0004).

Figura 15. Comparação da densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) entre os grupos.



Fonte: Arquivo Próprio

A DMO do grupo REA 6s foi completamente restaurada, mas o CMO permaneceu inferior ao grupo CON ($p < 0,05$). CON 12s: Controle seguido por 12 semanas; RA 12s: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa. Valores de $p < 0,09$ indicam tendência à diferença estatística significativa ('= $p < 0,09$).

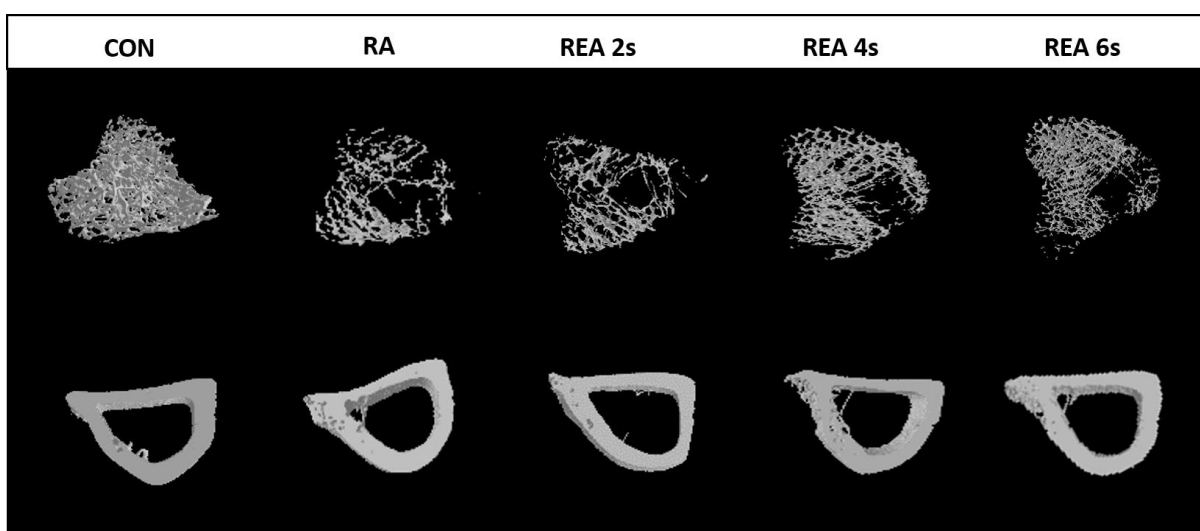
5.2.3 Análise da microarquitetura óssea trabecular e cortical (μ CT)

A restrição alimentar levou a alterações microestruturais significativas reduzindo a quantidade de volume ósseo (BV) em 76% ($p < 0,0001$), a relação entre volume ósseo e volume total (BV/TV) em 60% ($p = 0,0002$), o número trabecular (Tb.N) em 56% ($p < 0,0001$) e a espessura trabecular (Tb.Th) em 25% ($p = 0,0009$). Além de aumentar o espaçamento trabecular (Tb.Sp) em 60% ($p = 0,0012$), a superfície óssea específica em relação ao volume (BS.BV) em 36% ($p = 0,0004$) e o índice de mineralização esquelética (SMI) em 12% ($p = 0,005$), houve tendência de diminuição na densidade de conexões trabeculares (Conn.D) em 36% ($p = 0,05$), em comparação com o grupo controle. No osso cortical, a restrição alimentar resultou em redução significativa no volume cortical (Ct.V) em 37% ($p < 0,0001$) e na espessura cortical (Ct.Th) em 17% ($p = 0,01$), quando comparado ao grupo controle. A

realimentação por 6 semanas (REA 6s) reverteu os efeitos da desnutrição na arquitetura trabecular, levando ao aumento significativo no volume ósseo (BV) em 152% ($p=0,0001$), na relação entre volume ósseo e volume total (BV/TV) em 114% ($p=0,002$), no número trabecular (Tb.N) em 82% ($p=0,0003$) e na densidade de conexões trabeculares (Conn.D) em 128% ($p=0,0008$), além de reduções no espaçamento trabecular (Tb.Sp) em 35% ($p=0,002$) e no índice de modelo estrutural (SMI) em 10% ($p=0,01$). Também, houve aumento significativo no volume cortical em 43% ($p<0,0001$). A restauração do suprimento regular de alimentos melhorou significativamente a quantidade e a qualidade óssea, alcançando níveis comparáveis ao grupo controle nos parâmetros: a BV/TV, Tb.N, Conn.D, Tb.Sp, SMI e espessura cortical (Ct.Th) ($p>0,05$). No entanto, BV ($p=0,012$), Tb.Th ($p=0,002$), BS.BV ($p=0,001$) e Ct.V ($p=0,001$) não foram completamente corrigidos.

Na comparação entre os grupos realimentados o grupo REA 4s apresentou tendência à diferença estatística, com aumento de 54% em BV ($p=0,08$), além de aumento significativo de 23% em Ct.V ($p=0,01$) e 30% em Ct.Th ($p=0,0002$) em relação ao grupo REA 2s. Os demais parâmetros avaliados (BV/TV, Tb.th, Tb.N, ConnD, Tb.sp, BS/BV e SMI) não foram estatisticamente significantes. O grupo REA 6s, exibiu aumento de 32% em Ct.V ($p=0,001$) e de 30% em Ct.Th ($p=0,0005$) em relação ao grupo REA 2s. Na comparação entre os grupos REA 4s vs REA 6s nenhum dos parâmetros analisados apresentaram diferenças significativas (Tabela 2, figura 16).

Figura 16. Efeito da restrição alimentar e realimentação nas características arquitetônicas trabecular e cortical das tíbias de ratos.



Fonte: Arquivo Próprio

Imagens 3D microCT ilustrando alterações microestruturais de ambos os tecidos do grupo desnutrido, que melhora com a restauração do suprimento alimentar.

Tabela 2. Avaliação da microarquitetura óssea por μ CT (médias \pm DP).

	CON	RA	REA 2s	REA 4s	REA 6s
μCT osso trabecular					
BV (mm ³)	1,98 \pm 0,49	0,48 \pm 0,11 ^a	0,89 \pm 0,50 ^{c'}	1,37 \pm 0,30	1,21 \pm 0,39 ^{a,b}
BV/TV (%)	10,84 \pm 2,85	4,38 \pm 1,19 ^a	6,36 \pm 3,08	9,63 \pm 2,25	9,18 \pm 3,52 ^b
Tb.Th (mm)	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,003	0,06 \pm 0,01 ^{a,b}
Tb.N (1/mm)	1,70 \pm 0,25	0,74 \pm 0,20 ^a	1,13 \pm 0,49	1,47 \pm 0,27	1,35 \pm 0,18 ^b
Conn.D (1/mm ³)	41,75 \pm 12,44	26,64 \pm 9,85 ^{a'}	46,15 \pm 22,34	64,10 \pm 17,12	60,63 \pm 10,03 ^b
Tb.Sp (mm)	0,47 \pm 0,07	0,75 \pm 0,13 ^a	0,51 \pm 0,14	0,41 \pm 0,10	0,49 \pm 0,10 ^b
BS/BV (1/mm)	47,86 \pm 3,96	65,18 \pm 6,12 ^a	69,80 \pm 11,61	61,71 \pm 3,43	63,24 \pm 8,59 ^a
SMI	2,15 \pm 0,15	2,41 \pm 0,06 ^a	2,28 \pm 0,18	2,20 \pm 0,11	2,18 \pm 0,12 ^b
μCT osso cortical					
Ct.V (mm ³)	5,29 \pm 0,32	3,33 \pm 0,21 ^a	3,45 \pm 0,57 ^{c,d}	4,26 \pm 0,47	4,55 \pm 0,24 ^{a,b}
Ct.Th (mm)	0,47 \pm 0,05	0,39 \pm 0,04 ^a	0,33 \pm 0,30 ^{c,d}	0,43 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03
μCT placa					
TV (mm ³)	3,35 \pm 1,16	2,45 \pm 0,52	5,54 \pm 1,31 ^{c,d}	3,44 \pm 0,46	3,44 \pm 0,84

Fonte: Arquivo Próprio

CON: grupo controle seguido por 12 semanas; RA: restrição alimentar seguido por 12 semanas; REA 2s: realimentação por 2 semanas após restrição alimentar; REA 4s: realimentação por 4 semanas após restrição alimentar; REA 6s: realimentação por 6 semanas após restrição alimentar. As letras indicam diferença estatística significativa: ^ap<0,05 vs CON; ^bp<0,05 vs RA; ^cp<0,05 vs REA 4s; ^dp<0,05 vs REA 6s.

^{a'}p<0,09 versus CON; ^{c'}p<0,09 vs REA 4s. Indicam tendência à diferença estatística.

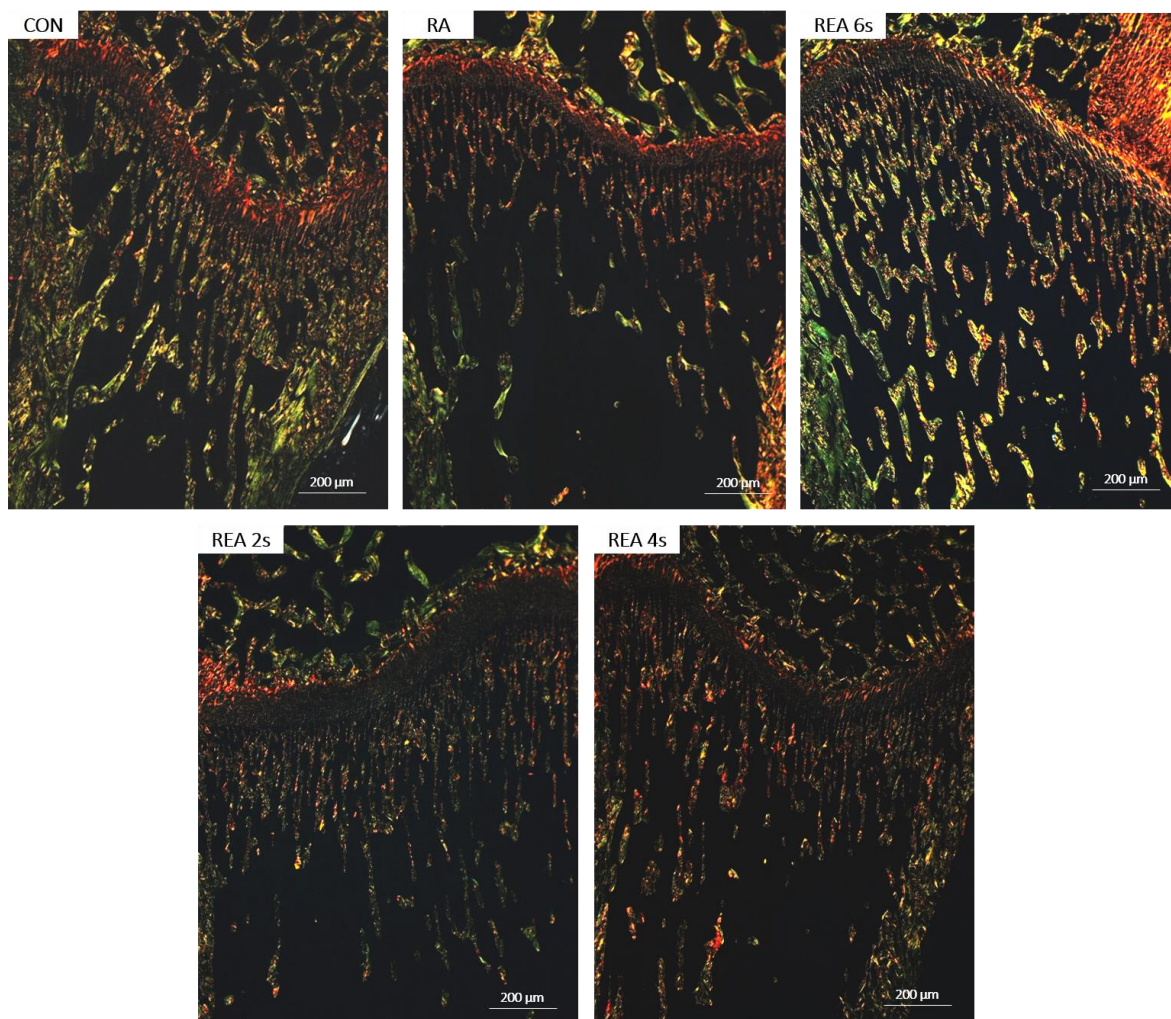
5.2.4 Histomorfometria

5.2.4.1 Fibras de colágeno na região metafisária proximal da tíbia

Na figura 17, no grupo desnutrido, foi observada redução nas fibras de colágeno e menor conexão entre elas, que melhorou nos diferentes períodos de realimentação.

A deposição total de colágeno nos ratos RA foi significativamente menor em comparação com os ratos CON (p=0,002). Em contraste, a realimentação resultou em aumento de 152% na deposição total de colágeno nos ratos REA 6s em relação aos ratos RA (p=0,007), alcançando níveis comparáveis aos ratos CON (p=0,78, Fig. 18). Entre os grupos realimentados, houve aumento significativo de 79% no grupo REA 6s em relação ao 4s (p=0,02).

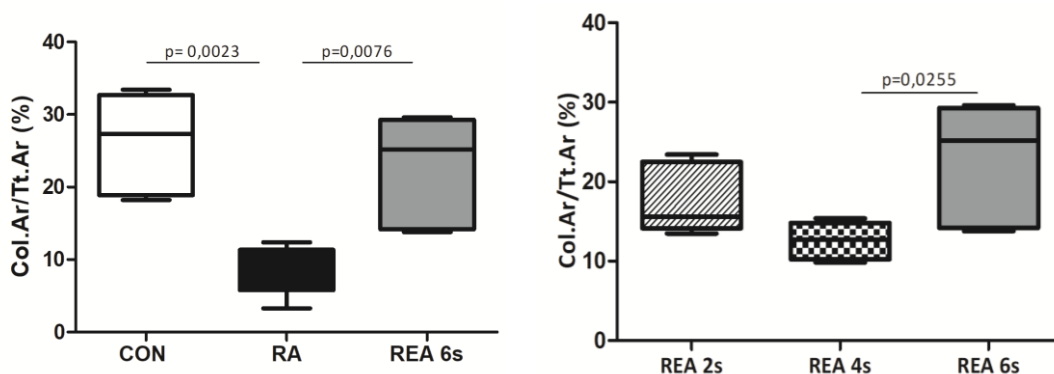
Figura 17. Fotomicrografia sob luz polarizada da região proximal das tíbias mostrando as fibras de colágeno expressas em tons vermelho-laranja e verde-amarelado (*picrosirius red*, 50x).



Fonte: Arquivo Próprio

CON: grupo controle seguido por 12 semanas; RA: restrição alimentar seguido por 12 semanas; REA 2s: realimentação por 2 semanas após restrição alimentar; REA 4s: realimentação por 4 semanas após restrição alimentar; REA 6s: realimentação por 6 semanas após restrição alimentar.

Figura 18. Porcentual da área de colágeno na região proximal da tíbia, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada em μm^2 .



Fonte: Arquivo Próprio

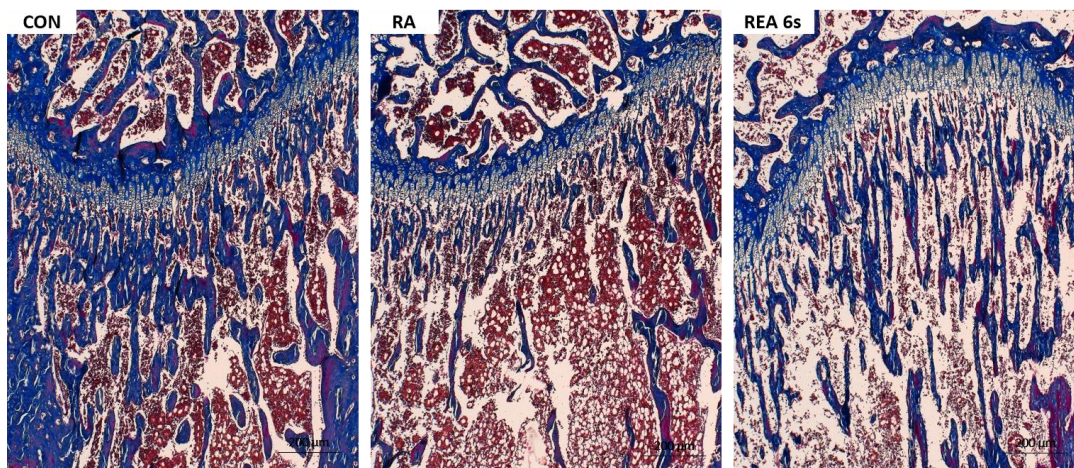
A deposição de fibras colágenas foi significativamente menor nos animais RA, e aumentou consideravelmente após a realimentação. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa.

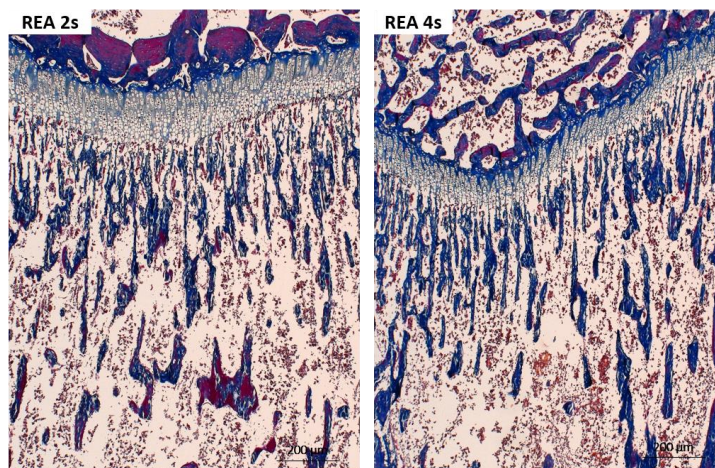
5.2.4.2 Osso trabecular na região metafisária proximal da tíbia

A Figura 19 ilustra o aspecto histológico das trabéculas ósseas na região metafisária proximal da tíbia, coradas por tricrômico de Masson. Qualitativamente, foram observadas diferentes características no trabeculado ósseo. O grupo RA, apresentou redução no volume ósseo, trabéculas ósseas mais delgadas, menor conexão entre elas, e espaçamento aumentado. Em contraste, após 2 semanas de realimentação, houve aumento no volume trabecular e as trabéculas apresentaram-se mais espessas. Esse aumento foi mais evidente após 4 e 6 semanas da reintrodução alimentar.

A área trabecular da metáfise proximal da tíbia foi significativamente menor nos ratos RA em comparação com os ratos controle ($p < 0,0001$, figura 19). No entanto, foi observado aumento significativo de 366% na área trabecular nos ratos REA 6s em comparação aos RA ($p < 0,0001$). Esse aumento restaurou totalmente seus valores em relação aos CON ($p = 0,90$). Ao comparar os subgrupos realimentados, observamos melhora tempo-dependente já nas primeiras semanas. Houve aumento de 203% entre os grupos REA 2s e 6s ($p = 0,001$) e de 201% entre os grupos REA 4s e 6s ($p = 0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos REA 2s e 4s ($p > 0,05$).

Figura 19. Fotomicrografia do osso trabecular marcada em azul na região proximal da tíbia dos grupos experimentais (tricrômico de Masson, 50x).

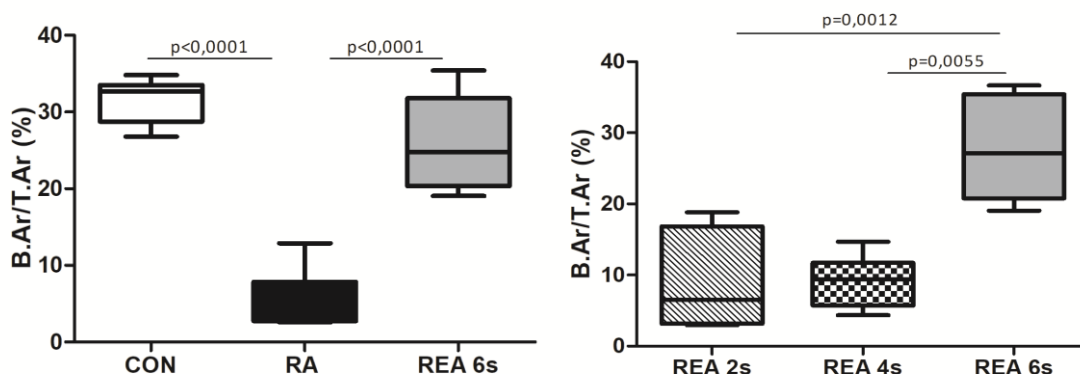




Fonte: Arquivo Próprio

CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar.

Figura 20. Porcentual de osso trabecular obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2 .



Fonte: Arquivo Próprio

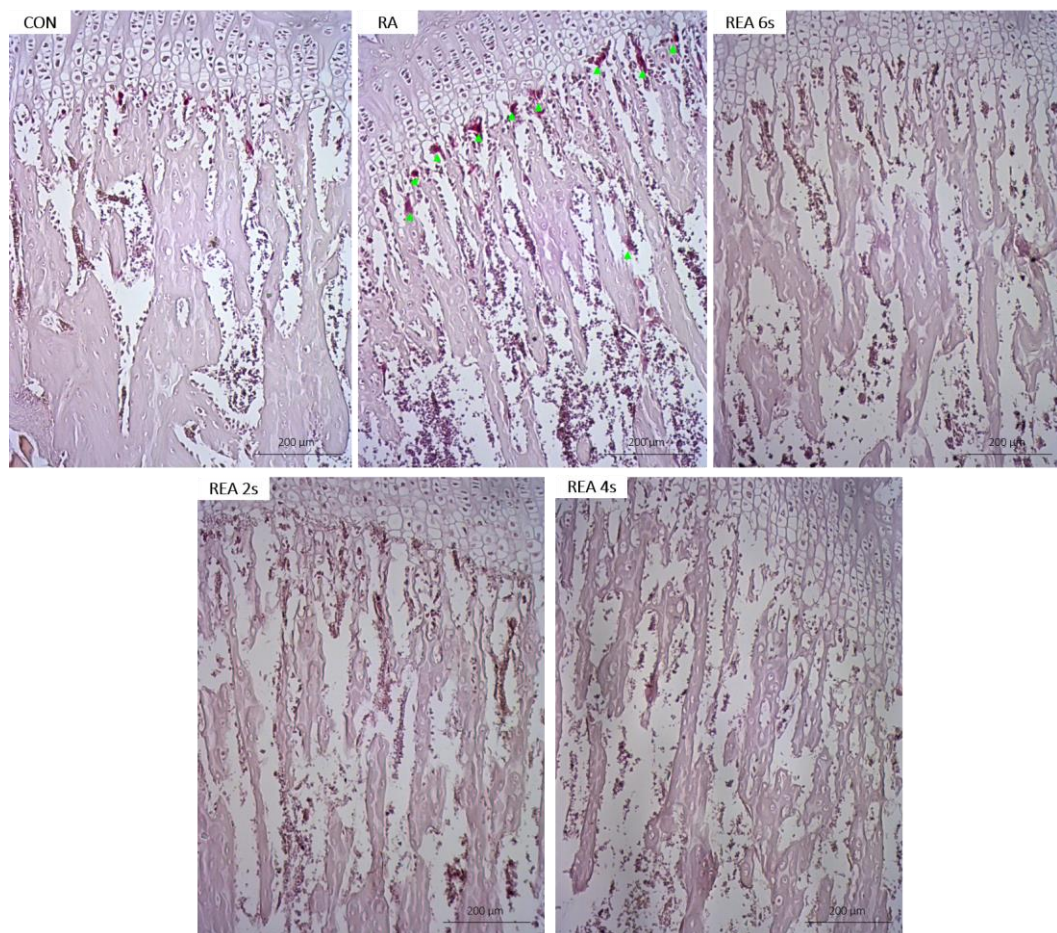
A área trabecular foi significativamente menor no grupo RA em comparação com o CON, e aumentou consideravelmente nos ratos REA 6s. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa.

5.2.4.3 Análise quantitativa da área reabsortiva e atividade osteoclástica

A figura 21 apresenta seções específicas de coloração TRAP. As estruturas avermelhadas são osteoclastos ativos que, no grupo RA, estavam em número significativamente aumentados em 133%, em comparação com os CON, ($p=0,002$). Por outro lado, no grupo REA 6s houve diminuição significativa da área de reabsorção em 65%, em

comparação com os ratos RA ($p=0,001$), com valores semelhantes aos observados nos ratos CON ($p=0,98$). Os grupos realimentados foram estatisticamente semelhantes ($p>0,05$).

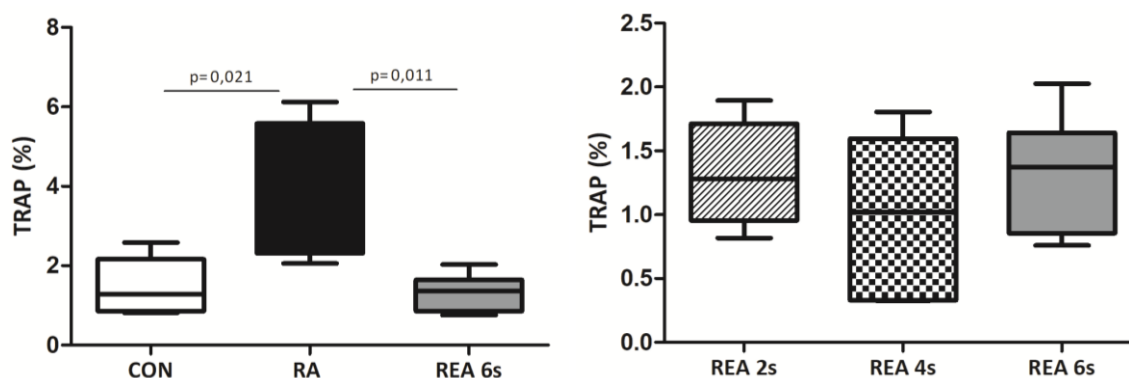
Figura 21. Cortes histológicos coronais da metáfise proximal de tíbias coradas com TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato, 100x).



Fonte: Arquivo Próprio

A área positiva para TRAP está indicada pelas setas verdes. A imagem mostra aumento da área de reabsorção no grupo RA quando comparado aos demais grupos. CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar.

Figura 22. Avaliação da atividade de reabsorção óssea no tecido metafisário das tíbias de ratos.



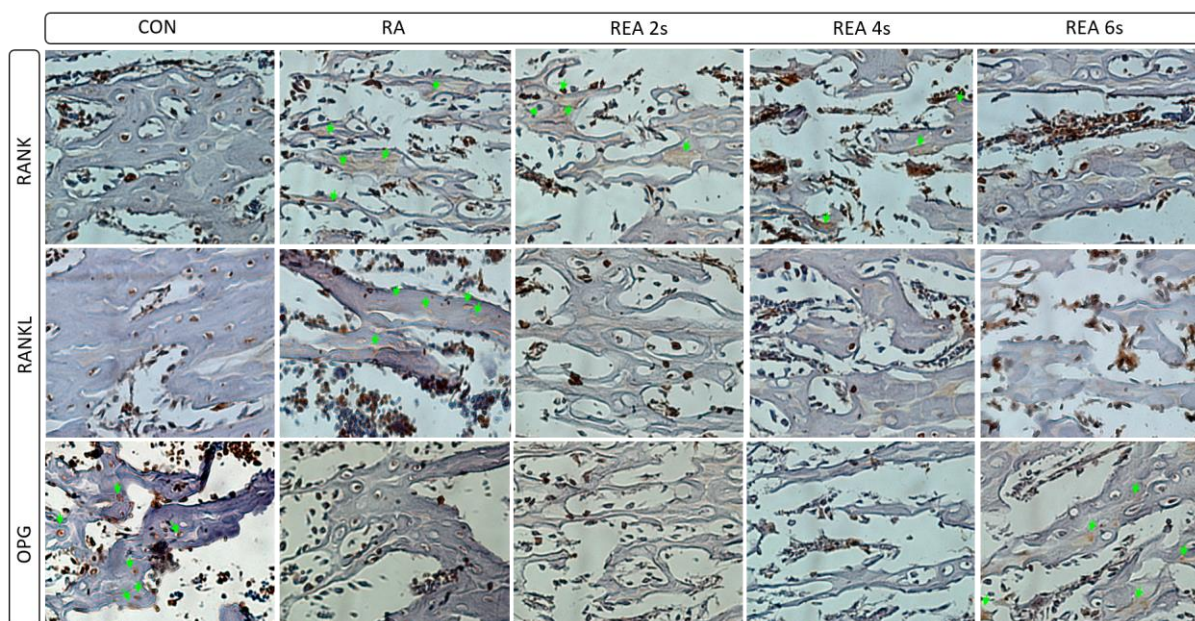
Fonte: Arquivo Próprio

Houve aumento significativo na atividade de reabsorção óssea nos grupos submetidos à RA, que foi completamente revertido com a realimentação ($p < 0,05$). Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa.

5.2.5 Imunoistoquímica óssea

A Figura 23 mostra a expressão imunoistoquímica das proteínas RANK, RANKL e OPG, confirmando a presença de remodelação óssea desequilibrada. O grupo RA apresentou aumento significativo de 137% na área positiva para RANK, em comparação com grupo CON ($7,20 \pm 1,30\%$ versus $3,04 \pm 0,74\%$, respectivamente, $p = 0,001$) e aumento de 48% na área positiva para RANKL, em comparação com os CON ($5,63 \pm 0,51\%$ versus $3,81 \pm 0,45\%$, respectivamente, $p = 0,001$). O grupo REA 6s apresentou diminuição significativa de 43% na área positiva para RANK ($p = 0,001$) diminuição de 25% na área positiva para RANK-L ($p = 0,001$) em comparação com o grupo RA. A área positiva para OPG foi 73% menor no grupo RA em comparação com o grupo CON ($2,07 \pm 0,84\%$ versus $6,55 \pm 1,77\%$, respectivamente, $p = 0,001$), com tendência à diferença significativa, sendo 88% maior no grupo REA 6s, em comparação com o grupo RA. ($p = 0,07$, Figura 4H). Entretanto, ainda foi 41% menor em comparação com os controles ($p = 0,002$). Entre os grupos realimentados, houve tendência de aumento significativo da expressão de OPG para o grupo REA 6s em comparação ao grupo 2s (65%, $p = 0,06$) e, na comparação com o grupo 4s (65%, $p = 0,07$), juntamente com redução significativa de RANK, em relação ao grupo 2s (32%, $p = 0,001$). Não houve diferença significativa na expressão de RANKL entre os grupos realimentados. As áreas de imunomarcção positiva para RANK, RANKL e OPG estão indicadas por setas verdes, ilustrando as alterações estatisticamente detectadas.

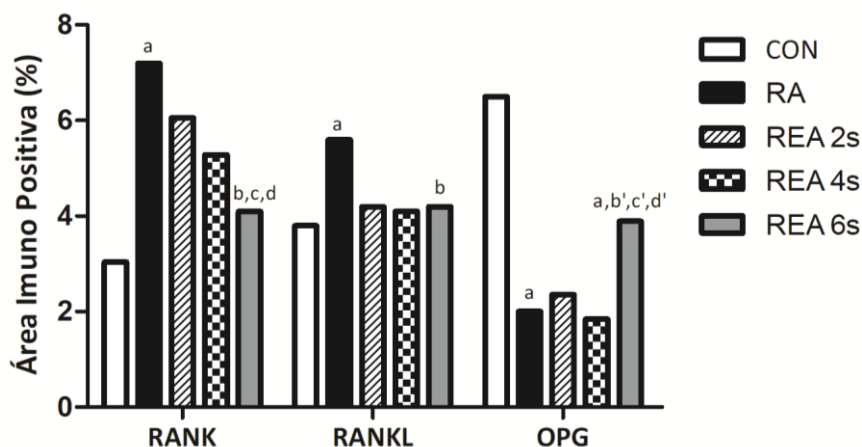
Figura 23. Fotomicrografia da metáfise proximal da tíbia evidenciando o padrão de imunomarcção positiva para as proteínas osteoprotegerina (OPG), fator nuclear kappa β (RANK) e ligante do receptor ativador fator nuclear kappa β (RANKL). Aumento de 400x.



Fonte: Arquivo Próprio

O grupo RA apresentou maior área positiva para RANK e RANKL que foram diminuídas pela realimentação, além de menor área positiva para OPG, que foram parcialmente restauradas no grupo REA 6s. As áreas de imunomarcção positivas para RANK, RANKL e OPG são indicadas por setas verdes. CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar.

Figura 24. Quantificação da imunomarcção das proteínas RANK, RANKL e OPG, expressas em porcentagem.



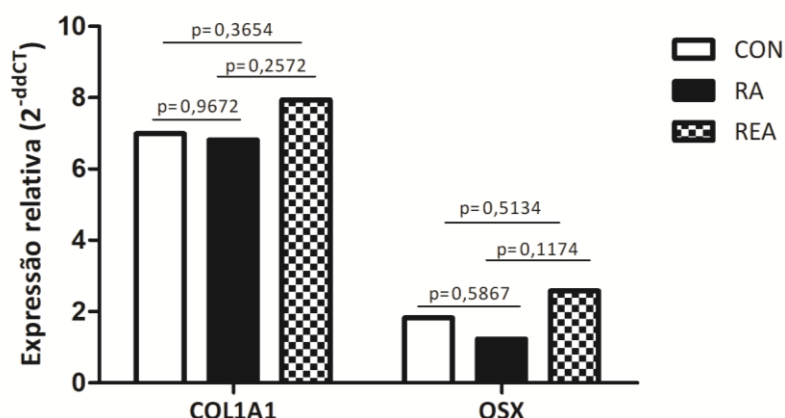
Fonte: Arquivo Próprio

^ap<0,05 vs CON; ^bp<0,05 vs RA; ^cp<0,05 vs REA 4s; ^dp<0,05 vs REA 2s. As letras indicam diferença estatística significativa (p<0,05); ^{b'}p<0,09 vs RA; ^{c'}p<0,09 versus REA 4s; ^{d'}p<0,09 versus REA 2s. Indicam tendência diferença estatística (p<0,09). CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar.

5.3 Biologia Molecular

Apesar das mudanças fenotípicas evidentes, nossos dados de PCR não indicaram diferenças na expressão gênica entre os grupos (p>0,05 - Fig. 25). No entanto, a realimentação induziu um aumento na expressão dos genes COL1A1 e Osterix, ambos genes relacionados com osteoblastos.

Figura 25. Expressão gênica do colágeno tipo 1 (Col1A1) e Osterix (SP7)



Fonte: Arquivo Próprio

Apesar de todas as alterações fenotípicas decorrentes da desnutrição, a expressão gênica de Col1A e Osx não diferiu entre os grupos (p< 0,05). CON: Controle acompanhado por seis semanas e cinco dias; RA: Restrição alimentar acompanhado por seis semanas e cinco dias; REA: Realimentação por cinco dias após seis semanas de restrição alimentar. Valores de p<0,05 indicam diferença estatística significativa.

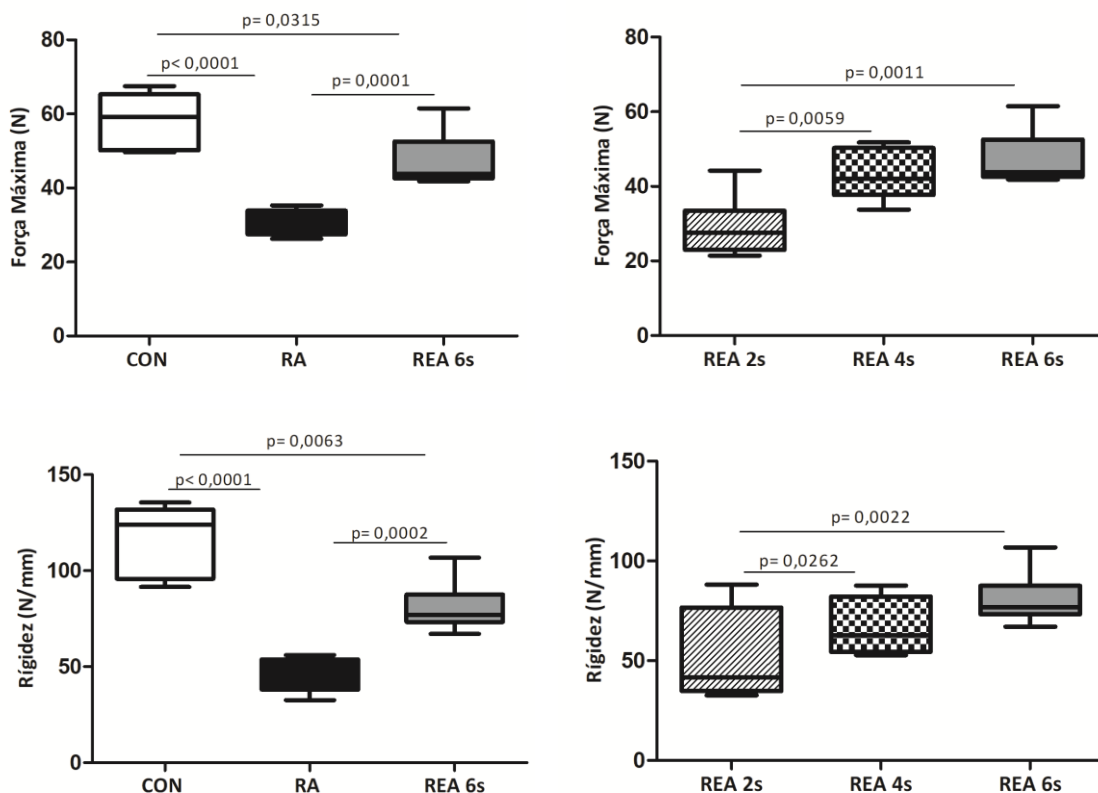
5.4 Avaliação mecânica

O teste mecânico mostrou que a realimentação efetivamente melhorou os efeitos deletérios da restrição alimentar nos parâmetros de resistência da tíbia (Fig. 26). Ratos RA exibiram ossos significativamente mais frágeis do que os CON, com força máxima diminuída em 58% (p<0,001) e rigidez em 61% (p<0,001). Por outro lado, a REA 6s aumentou significativamente a força máxima em 54% (p= 0,001) e a rigidez em 75% em comparação

com os ratos RA ($p < 0,001$). No entanto, os valores permaneceram significativamente inferiores aos dos ratos CON (força máxima $p = 0,03$; rigidez $p = 0,006$).

Entre os grupos realimentados houve melhora significativa ao longo das semanas. O grupo REA 2s apresentou menor força máxima (-33% versus REA 4s, $p = 0,005$; -38% versus REA 6s, $p = 0,001$), e rigidez reduzida em relação aos demais grupos realimentados (-33% versus REA 4s, $p = 0,02$; -45% versus REA 6s, $p = 0,002$). Os grupos REA 4s e 6s foram estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$).

Figura 26. Limite da resistência mecânica (força máxima e rigidez) do córtex ósseo aos esforços de flexão.



Fonte: Arquivo Próprio

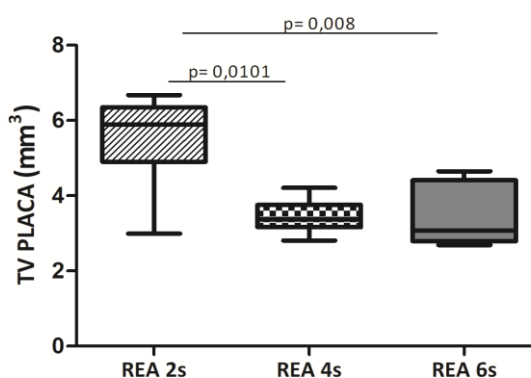
A resistência mecânica da cortical óssea da tibia foi significativamente menor no grupo RA ($p < 0,05$). A realimentação melhorou a força máxima e a rigidez, mas seus valores não foram completamente restaurados ($p < 0,05$). Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar seguido por 12 semanas; REA 2s: Realimentação seguido por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação seguido por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação seguido por seis semanas após restrição alimentar. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa.

5.5 Análise da cartilagem de crescimento

5.5.1 TV - Volume da cartilagem de crescimento (μ CT)

Não foram encontradas diferenças significativas no volume total (TV) da cartilagem de crescimento entre os grupos CON, RA e REA 6s quando avaliados por análise microtomográfica (Fig. 27). No entanto, observaram-se diferenças significativas nos grupos realimentados. O grupo REA 2s apresentou um TV significativamente maior em comparação com os demais grupos (+61% versus REA 4s, $p=0,01$; e +61% versus REA 6s, $p=0,008$). Não houve diferença significativa entre os grupos REA 4s e 6s ($p>0,05$).

Figura 27. Análise quantitativa do volume da cartilagem de crescimento.



Fonte: Arquivo próprio.

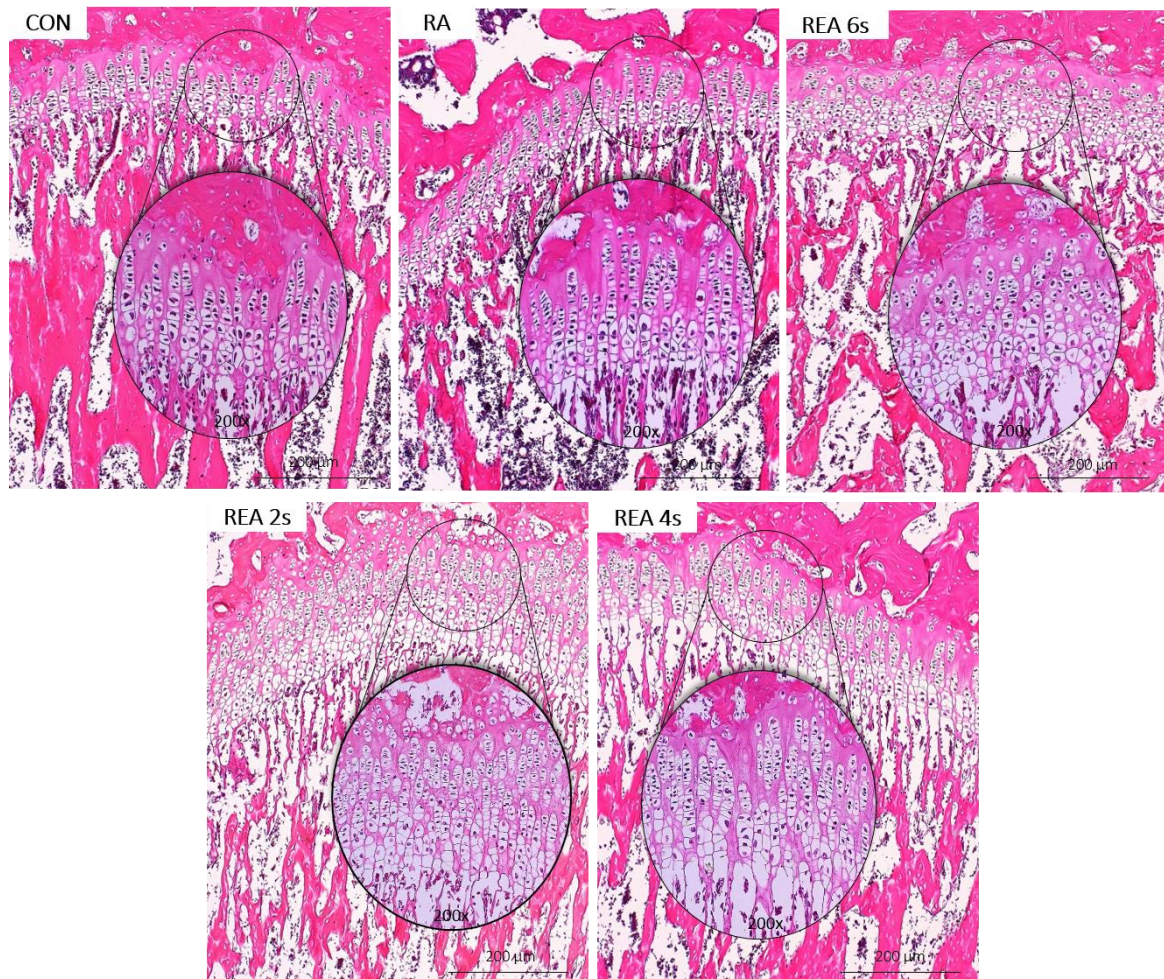
O volume da cartilagem de crescimento foi significativamente maior no grupo REA 2s. CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar. Valores de $p<0,05$ indicam diferença estatística significativa.

5.5.2 Microscopia óptica

A figura 28 apresenta imagens histológicas das cartilagens de crescimento das tíbias de ratos, que revelam importantes alterações relacionadas com os efeitos da restrição alimentar e realimentação. A RA causou discreto achatamento dos condrócitos da zona proliferativa da cartilagem; as trabéculas ósseas metafisárias eram mais delgadas e o espaçamento foi maior. Os grupos realimentados apresentaram desorganização das camadas e possível ativação precoce da apoptose celular, evidenciada pelas lacunas dos condrócitos, além da presença de grandes espaços degenerativos na zona calcificada. Por outro lado, a

reintrodução alimentar parece ter estimulado a atividade metabólica da cartilagem de crescimento ao longo das semanas, conforme indicado pelo aumento nas zonas proliferativa e hipertrófica, bem como maior espessura das trabéculas.

Figura 28. Fotomicrografia da cartilagem de crescimento (Hematoxilina e eosina. Aumentos de 100x e 200x).



Fonte: Arquivo próprio.

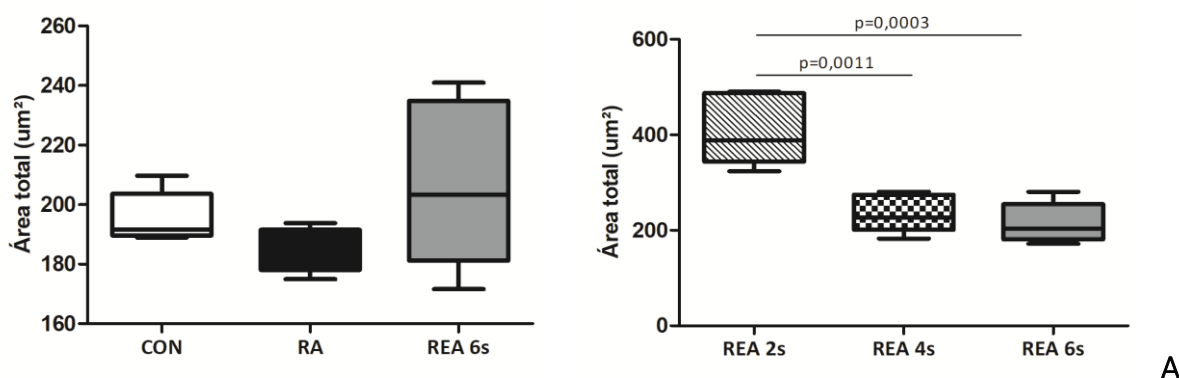
A restrição alimentar afetou a estrutura da cartilagem de crescimento, ao passo que a realimentação melhorou a estratificação celular. CON: Controle seguido por 12 semanas; RA: Restrição alimentar durante 12 semanas; REA 2s: Realimentação por duas semanas após restrição alimentar; REA 4s: Realimentação por quatro semanas após restrição alimentar; REA 6s: Realimentação por seis semanas após restrição alimentar.

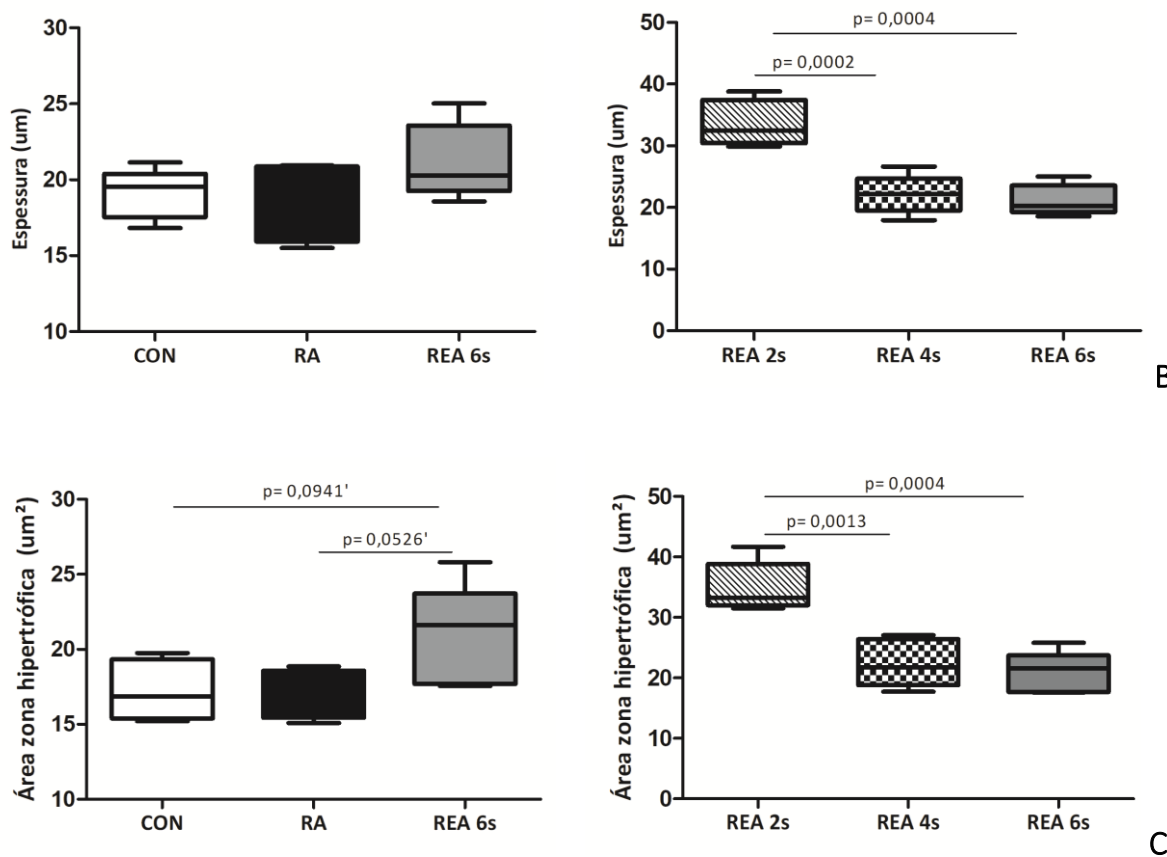
5.5.2.1 Cálculo da área total, área da zona hipertrófica e espessura da cartilagem de crescimento

A figura 29 mostra as mensurações da área total (A), espessura (B) e área da zona hipertrófica (C) das placas de crescimento. A espessura e a área total, medidas da zona de repouso até a zona de ossificação do osso metafisário, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos CON, RA e REA 6s ($p > 0,05$). Embora sem diferenças, ambos parâmetros estavam aumentados no grupo realimentado (REA 6s versus CON aumentou em 11% para espessura e em 6% para a área total; REA 6s versus RA aumentou em 16% a espessura e em 12% a área total). Além disso, a REA 6s induziu ao aumento da área da zona hipertrófica, indicando tendência à diferença estatística (REA 6s versus CON aumentou em 21%, $p = 0,09$; e REA 6s versus RA aumentou em 25%, $p = 0,05$).

Ao comparar os grupos realimentados, observou-se aumento significativo de todos os parâmetros avaliados no grupo REA 2s em relação aos grupos REA 4s e 6s (área total: 75% versus REA 4s, $p = 0,001$ e 99% versus REA 6s, $p = 0,0003$; espessura: 46% versus REA 4s, $p = 0,0002$ e 59% versus REA 6s, $p < 0,001$; zona hipertrófica: 56% versus REA 4s, $p = 0,001$ e 68% versus REA 6s, $p = 0,0004$). Os grupos REA 4s e REA 6s não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

Figura 29. Gráficos representativos da área total (A), espessura (B) e área da zona hipertrófica (C) da cartilagem de crescimento.





Fonte: Arquivo próprio.

A zona hipertrófica da cartilagem de crescimento apresentou tendência à diferença estatística. A área total, espessura e área da zona hipertrófica foi significativamente maior no grupo REA 2s. Valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística significativa; valores de $p < 0,09$ indicam tendência à diferença estatística (' = tendência).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou, por meio de diversas abordagens, os efeitos da restrição alimentar global seguida de realimentação, no tecido ósseo (trabecular e cortical) e na placa de crescimento de ratos em desenvolvimento. De modo geral, nossos resultados mostram que o nível de restrição alimentar usado (50%) afetou significativamente a massa corporal, estrutura e função da placa de crescimento, levando a efeitos adversos no crescimento ósseo. Especificamente, observamos um declínio na formação óssea, juntamente com aumento nos processos de reabsorção. Ou seja, animais desnutridos apresentaram disrupção nos processos de homeostase óssea. No entanto, quando os ratos foram realimentados, houve acentuada recuperação das principais variáveis estudadas, indicando a reversão parcial dos efeitos deletérios.

O assunto é pertinente e desperta grande interesse internacional, à luz do crescente número de indivíduos desnutridos em todo o mundo, situação que se agravou após a pandemia da Covid 19. A desnutrição sempre foi grave problema de saúde pública, cujas complicações impõem carga substancial à sociedade, tanto na realimentação, quanto no tratamento das complicações de saúde delas advindas, além de implicar em comprometimento de todas as funções e potencialidades do indivíduo. Com efeito, a desnutrição é, inicialmente, uma questão humanitária.

Nesta investigação contribuímos para aprofundar o conhecimento sobre as repercussões da desnutrição sobre o aparelho esquelético e mostrar que as sequelas podem não ser totalmente reversíveis e piores quando afetam a criança. Esse conhecimento pode ser importante para estabelecer estratégias eficazes de prevenção e tratamento.

A desnutrição abrange uma variedade de distúrbios médicos resultantes da insuficiência de energia e/ou da inadequada ingestão de nutrientes essenciais para o organismo. Quando causada por falta de alimentos e grave privação, estudos experimentais mostraram que ela desencadeia uma série de distúrbios metabólicos que levam à perda de peso, supressão da capacidade imunológica, menor capacidade de combater infecções e de reparar tecidos. Adicionalmente, ocasiona disfunção no sistema digestivo, especialmente do fígado e intestino delgado, associando uma síndrome de má-absorção secundária que diminui ainda mais o aporte de nutrientes ao organismo e estabelece grave ciclo vicioso (6,64).

Em crianças, na maioria dos casos, a desnutrição por inadequada ingestão de alimentos é condição crônica, podendo estabelecer-se ainda no período fetal, devido à desnutrição materna, levando ao nascimento de recém-nascidos de baixo peso. Esse período pré-natal

pode estender-se após o nascimento, sendo comumente associado ao atraso no crescimento e desenvolvimento ponderal (18).

Escolhemos como sujeito de nossa pesquisa o rato Wistar, pois é reconhecido como um modelo atrativo para estudos clínicos devido à sua anatomia, fisiologia e comportamento que tem bastante correspondência com seres humanos. Além disso, esse animal é amplamente utilizado em pesquisas experimentais, devido à alta resistência a condições adversas. O uso do rato Wistar apresenta várias vantagens, incluindo custo reduzido, padrão de crescimento conhecido, além da facilidade de manipulação (65,66).

Considerando que a desnutrição frequentemente afeta os indivíduos desde o seu nascimento, decidimos começar o estudo após o período de desmame dos animais, quando eles começam a receber alimentação sólida. No vigésimo segundo dia de vida (marcando o início do experimento), os ratos encontram-se em fase de crescimento linear, comparado com a infância humana. Acompanhamos os animais até depois de atingirem a idade adulta (15 semanas de vida). Esse período foi selecionado tendo como referência estudos que utilizaram avaliação alométrica do crescimento longitudinal, o qual revela surtos de crescimento da tíbia e engloba o pico de massa óssea dos animais (35,65). Essa abordagem permitiu extrapolar os dados até o estágio final da maturidade esquelética (67,68).

Nossos dados mostram que a realimentação causou modificações na cartilagem de crescimento levando ao aumento da zona hipertrófica nos animais realimentados, o que pode ter contribuído para algum crescimento ósseo adicional. No entanto, isso não compensou completamente o déficit de crescimento. Além disso, vários parâmetros que avaliamos não foram completamente restaurados, incluindo medidas morfométricas da tíbia (como massa óssea, comprimento e perímetros da metáfise proximal e região diafisária), conteúdo mineral ósseo (CMO), níveis de osteoprotegerina (OPG), parâmetros microtomográficos (incluindo volume ósseo (BV), espessura trabecular (Tb.Th), superfície óssea específica (BS.BV), espessura cortical (Ct.Th) e resistência mecânica (força máxima e rigidez)).

Em contraste, a realimentação restaurou completamente parâmetros importantes, incluindo densidade mineral óssea (DMO), medidas microtomográficas como fração de volume ósseo (BV/TV), número trabecular (Tb.N), densidade de conexão entre trabéculas (ConnD), espessura cortical (Ct.Th), índice do modelo estrutural (SMI), separação trabecular (Tb.Sp), formação óssea, síntese de colágeno, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL).

Clinicamente, crianças desnutridas apresentam não apenas atraso de crescimento, mas também DMO e CMO mais baixos devido à deficiência de mineralização óssea durante o desenvolvimento (69). Da mesma maneira, pacientes adolescentes que sofrem de anorexia nervosa, um distúrbio alimentar caracterizado pela ingestão ultra restrita de alimentos, apresentam diminuição da massa e da qualidade óssea, denotada por redução dos parâmetros densitométricos (70) e risco aumentado de fraturas ósseas (71,72). No ser humano a mineralização óssea inadequada durante o crescimento pode levar a um menor pico de massa óssea, aumentando o risco de fraturas não somente nessa faixa etária, mas também aumentando os níveis de osteoporose, o que pode ser ainda mais crítico na idade avançada (71,73,74).

Diversos modelos animais têm sido empregados para o estudo da desnutrição e na mimetização dos seus efeitos durante os primeiros estágios da vida, e dentre eles, os roedores têm sido amplamente utilizados. No entanto, a literatura científica apresenta uma variação significativa nos modelos de restrição alimentar empregados, tanto em termos de duração quanto de quantidade (64). Com relação à duração, há autores que utilizam protocolos de restrição alimentar de curta duração, enquanto outros animais permanecem sob restrição por períodos prolongados, que podem abranger vários meses. No que tange à quantidade de alimento, há estudos que utilizaram modelos percentuais de restrição, que geralmente variam de 20 a 50% da dieta controlada. (23–25,75,76). Ao passo que outros, manipulam a ração restringindo nutrientes específicos (20,22,28,53,54,77).

O modelo de estresse nutricional utilizado por nós foi um protocolo global de restrição alimentar desenvolvido em ratos machos desmamados em nosso laboratório (29,57). O objetivo foi replicar uma prática comum em países em desenvolvimento, onde as crianças frequentemente têm uma alimentação de baixa qualidade nutricional.

Experimentalmente, mudanças em parâmetros corporais, como peso e comprimento, são consideradas como critérios adequados para identificar desnutrição em modelos animais, muitas vezes dispensando a necessidade de análises laboratoriais para confirmação. No entanto, a utilização desses critérios pode variar dependendo do propósito da pesquisa, como no caso de investigações que visem a identificar deficiências específicas de nutrientes na dieta. Do ponto de vista de pacientes humanos, a OMS sugere que modificações nas medidas de massa corporal e estatura sejam adequadas para diagnosticar a desnutrição (78).

Nosso protocolo de restrição alimentar resultou em redução significativa da massa corporal e comprimento ósseo. Além disso, induziu a mudanças notáveis no microambiente ósseo, resultando em níveis aumentados de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP),

receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e ligante do RANK (RANKL), separação trabecular (Tb.Sp), índice do modelo estrutural (SMI) e superfície óssea específica (BS.BV). Por outro lado, a restrição alimentar levou a níveis reduzidos de osteoprotegerina (OPG), densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e parâmetros microtomográficos, como densidade de conexão entre trabéculas (ConnD), número trabecular (Tb.N), fração de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), volume cortical (Ct.V), espessura cortical (Ct.Th), formação óssea, deposição de colágeno e resistência mecânica. É importante notar que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na análise de expressão genética entre os grupos avaliados. Essa análise foi realizada cinco dias após as intervenções dietéticas, um período que provavelmente corresponde a uma fase aguda na sequência de eventos desencadeados pelas mudanças nutricionais. Nossa hipótese era de que a desnutrição reduziria a expressão do colágeno tipo 1 (Col1a1) e osterix (SP7) e que a realimentação aumentaria essa expressão, dada sua função bem estabelecida na formação óssea endocondral. No geral, nossos resultados mostram um desequilíbrio osteometabólico caracterizado pela redução da formação óssea e aumento da reabsorção óssea.

Nossos resultados são consistentes com os observados por outros autores. Por exemplo, Devlin et al. (2010) conduziram um estudo em camundongos, implementando uma restrição alimentar de 30% por seis e doze semanas. Os autores observaram reduções significativas na densidade mineral óssea (DMO) em todo o corpo e no conteúdo mineral ósseo (CMO), juntamente com comprometimento da microestrutura óssea (23). Da mesma forma, Pando et al. (2014) mostraram que a restrição calórica de 40%, que durou 10 dias após o desmame, afetou negativamente a placa de crescimento, prejudicando o crescimento ósseo e levando a níveis reduzidos de marcadores ósseos séricos, como a leptina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fosfatase alcalina, que são indicativos da formação óssea. Essa restrição também resultou em aumento no número de osteoclastos (24). Boyer et al. (2005) examinaram os efeitos da restrição alimentar global de 20% por 4 semanas e relataram reduções no CMO ósseo, DMO e impactos desfavoráveis nas propriedades mecânicas (25). Em estudo anterior, também observamos redução significativa na DMO, comprometimento da microarquitetura da tíbia e enfraquecimento da resistência mecânica da placa de crescimento em ratos jovens submetidos à restrição alimentar prolongada durante 70 dias (57).

Realimentamos nossos animais ao longo de três períodos distintos que abrangeram diferentes fases do crescimento e desenvolvimento esquelético. O objetivo foi avaliar as repercussões da reintrodução alimentar em diferentes estágios da maturação esquelética. Os

resultados indicaram que a recuperação do crescimento e da qualidade óssea após a desnutrição são tempo-dependentes.

Em relação às comparações entre os grupos realimentados nossa observação mais importante foi na estrutura da placa de crescimento. Animais realimentados por curto prazo apresentaram alterações significativas nos parâmetros morfométricos das placas. A menor idade associada à maior área de superfície, espessura e volume indicou uma cartilagem de crescimento mais ativa, mostrando maior potencialidade para o crescimento longitudinal (37). Acrescido a isso, os animais mais jovens apresentaram menor densidade óssea, córtices mais finos, menor volume trabecular, maior taxa de reabsorção e menor resistência óssea.

A realimentação por seis semanas apresentou efeitos estimulantes na atividade celular da placa de crescimento. Interessantemente, foram observados aumentos significativos na zona hipertrófica, juntamente com aumentos modestos na área total, espessura e volume. Além disso, foram notadas melhoras na formação óssea lamelar e na síntese de colágeno. As zonas da placa correspondem a diferentes estágios na diferenciação dos condrócitos, sendo a hipertrofia dessas células e a síntese da matriz os principais parâmetros que contribuem para o crescimento linear. Por outro lado, a ausência de significância estatística nas dimensões do disco epifisário pode ser atribuída à idade dos animais no estágio final do estudo (15 semanas), que é caracterizado pela redução na atividade metabólica devido à maturação. No entanto, é importante ressaltar que a funcionalidade da placa de crescimento foi comprometida. Evidências indiretas desse comprometimento incluem reduções no comprimento, massa e diâmetro de toda a tíbia. Esses resultados estão alinhados com outro estudo experimental que relatou aumento na altura da placa de crescimento após a realimentação (24). Nossos resultados indicam que esse aumento foi insuficiente para recuperar completamente o comprimento final do osso longo. Em concordância, observações em seres humanos mostram que embora seja encontrada alguma recuperação após a introdução de dieta normal, um dano permanente da desnutrição potencialmente se estende de maneira irreversível até a vida adulta (4).

A restrição alimentar teve um impacto profundo na resistência mecânica do osso cortical, que é influenciada principalmente pela ossificação subperiosteal (intramembranosa). Conseqüentemente, nossas avaliações indicaram comprometimentos em ambos os tipos de ossificação. Esses achados estão de acordo com pesquisas anteriores que mostraram que os ossos continuam a crescer, mesmo em condições adversas de desnutrição. No entanto, esse crescimento resulta em córtices mais finas e mais fracas, bem como na redução da massa óssea e do comprimento dos ossos (79). Investigações semelhantes realizadas em ratos jovens

não identificaram diferenças significativas na arquitetura óssea após 26 dias de realimentação (24). No entanto, vale ressaltar que este estudo não acompanhou os animais até atingirem a maturidade esquelética. Em contraste com nossos achados, Boyer et al. (2005) relataram a recuperação completa de parâmetros mecânicos após 8 semanas de realimentação (25). Nossa investigação acompanhou os animais ao longo do período de crescimento primário até estabilizarem o crescimento esquelético. A disparidade entre nossos resultados e de outros autores pode ser atribuída a variações nos ossos examinados, nas espécies de animais estudados, ou no protocolo específico utilizado para a restrição alimentar (23).

Nosso estudo, assim como outros (23,24) revelou aumento significativo na atividade osteoclástica em animais com restrição alimentar. A localização dos osteoclastos na borda metafisária da placa de crescimento sugere um aumento na reabsorção óssea. Pando et al. (2014) também encontraram número aumentado de osteoclastos em ratos com restrição alimentar, que diminuiu após a realimentação (24). Adicionalmente, há um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, com diminuição da expressão de OPG e aumento dos níveis de RANK e RANKL. A realimentação aumentou modestamente o OPG e reduziu significativamente o RANK e RANKL, indicando prevenção da reabsorção óssea.

Nos últimos anos, o papel ativo do sistema esquelético em processos regulatórios, devido à sua capacidade de armazenar e liberar elementos químicos, tem se tornado cada vez mais notório. Uma explicação plausível para a diminuição da qualidade óssea durante períodos de nutrição limitada é que a restrição alimentar desencadeia o aumento na reabsorção óssea como mecanismo compensatório para deficiências nutricionais (80). Estudos anteriores mostraram que a deficiência induzida de magnésio em ratos pode prejudicar a regulação do sistema RANK/RANKL/OPG, resultando em aumento do número de osteoclastos, níveis elevados de RANK e RANKL e redução na expressão de OPG (81).

No presente estudo não avaliamos marcadores séricos ósseos, mas realizamos a análise imunoistoquímica das proteínas RANK, RANKL e OPG, que são frequentemente usadas na avaliação de doenças ósseas e podem fornecer informações valiosas sobre a dinâmica da formação e reabsorção óssea. O sistema RANK/RANKL/OPG, um importante regulador da remodelação óssea parece ser profundamente afetado pela nutrição (45). O RANKL é liberado pelas células da linhagem osteoblástica e liga-se ao seu receptor RANK na superfície das células mieloides, estimulando sua diferenciação em osteoclastos (42). A OPG, produzida pelos osteoblastos, é um receptor chamariz para o RANKL, que bloqueia a interação RANK-RANKL por ligar-se ao RANKL, inibindo, assim, a formação de osteoclastos e, consequentemente, a reabsorção óssea (44).

Apesar dos nossos achados histomorfométricos evidenciarem menor deposição de colágeno e menor volume trabecular na metafise proximal das tíbias de ratos em dieta restrita, não encontramos nenhuma diferença relacionada à biologia molecular. Avaliamos a expressão gênica para investigar os mecanismos relacionados com as mudanças fenotípicas adversas. Nossa hipótese foi que a restrição alimentar reduziria a expressão do colágeno tipo 1 (*Colla1*) e osterix (*SP7*) e que a realimentação aumentaria a expressão desses genes, já que suas funções na formação do osso endocondral estão bem documentadas na literatura (82,83). Nossa análise foi realizada cinco dias após as intervenções alimentares (RA e REA), período escolhido na tentativa de identificar alterações causadas por se tratar de uma fase mais recente das mudanças nutricionais. Além disso, corresponde a um estágio crucial do desenvolvimento esquelético, onde ocorrem surtos de crescimento na tíbia (12). Nessa fase, os processos de crescimento e formação óssea estão mais ativos, tornando-se um momento importante para identificar os genes envolvidos no processo de formação óssea. Supusemos que, provavelmente, o período selecionado possa ter influenciado na falta de significância estatística, levando a dados inconclusivos. Ademais, outros genes poderiam ter sido estudados. Da mesma forma, paralelamente aos achados mencionados, nossas secções histológicas revelaram provável aumento do tecido adiposo da medula óssea de animais desnutridos, ao passo que nos grupos realimentados foi observado diminuição do conteúdo medular. A relação entre a desnutrição e o aumento da adiposidade medular ainda não é totalmente compreendida, e pesquisas adicionais são necessárias para esclarecer essa ligação. No entanto, é importante notar que a restrição alimentar pode levar a modificações no metabolismo energético, e alguns trabalhos ressaltam que o tecido adiposo da medula óssea tem correlação negativa com a microarquitetura óssea e o surgimento de fragilidade óssea (23,84). Essas observações podem estar associadas às alterações ósseas encontradas neste estudo, o que sugere uma provável modificação na relação entre a formação óssea e a adipogênese. Possivelmente, a adipogênese exerceria influência negativa sobre a formação óssea.

Até que ponto a qualidade óssea pode ser recuperada e restaurada após um período de inibição do crescimento permanece em debate. Mostramos, por meio de diferentes análises metodológicas, que a realimentação aumentou a atividade celular na placa tibial de crescimento e restringiu os efeitos da perda óssea induzida pela restrição alimentar de 50%. Simultaneamente, promoveu a formação óssea e reduziu a reabsorção óssea. No entanto, ainda houve déficit no comprimento do osso e a qualidade geral permaneceu comprometida.

Nosso estudo apresenta algumas limitações importantes que merecem consideração. Em primeiro lugar, concentramo-nos na análise dos efeitos da realimentação durante um período limitado de seis semanas após restrição alimentar de igual duração. Surge a pergunta, se as alterações esqueléticas patológicas persistem ao longo da vida, mesmo após extensa fase de realimentação. Pesquisas anteriores em seres humanos indicam que embora seja observada a recuperação do crescimento ("*catch up*"), após a reintrodução de uma dieta normal, os danos resultantes da desnutrição podem ter impactos irreversíveis que se estendem até a vida adulta, mesmo após a retomada do padrão alimentar adequado.

Em estudo paralelo, destacamos nossos resultados preliminares, que ainda não são conclusivos. Eles indicam a recuperação completa da massa corporal e de parâmetros morfométricos, como comprimento, perímetros e massa da tíbia, em ratos submetidos a seis semanas de restrição alimentar global seguida por período prolongado de 12 meses de realimentação. No entanto, é importante ressaltar que não examinamos ainda os aspectos microestruturais e histológicos, nem investigamos os mecanismos moleculares relacionados à qualidade óssea.

Outro ponto é que não estudamos a avaliação do perfil de expressão gênica na cartilagem de crescimento, nem avaliamos marcadores séricos ósseos e a adiposidade medular. Um enfoque mais amplo, incluindo o estudo de genes relevantes tanto no tecido ósseo, quanto no cartilaginoso, pode proporcionar uma compreensão mais abrangente desses processos. Além disso, a inclusão de análises mais detalhadas de marcadores séricos ósseos e a investigação do metabolismo energético poderiam enriquecer nossas conclusões.

Sugerimos a realização de estudos futuros que explorem a desnutrição intra-útero, bem como períodos de realimentação mais prolongados. Tais investigações podem esclarecer definitivamente a natureza reversível, ou não, das falhas no crescimento e da deterioração da qualidade óssea observadas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Foi mostrado nesta investigação que a restrição alimentar global afetou negativamente o crescimento e a qualidade dos tecidos ósseos trabecular e cortical, além de comprometer a estrutura e função da placa de crescimento. A realimentação estimulou a atividade celular na placa de crescimento e diminuiu os efeitos da perda óssea induzida pela restrição alimentar de 50%. Portanto, conclui-se que a realimentação reverteu parcialmente as alterações prejudiciais observadas nas tíbias de animais desnutridos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Monte CMG. Malnutrition: a secular challenge to child nutrition. *J pediatr.* 2000;76(3):285–97.
2. FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. [Internet]. 2022 [citado 14 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc0639en/online/cc0639en.html>
3. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet.* 2007;369(9556):145–57.
4. Perkins JM, Subramanian S V, Smith GD, Özaltin E. Adult height, nutrition, and population health. *Nutr Rev.* 2016;74(3):149–65.
5. 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.
6. Boza JJ, Nnoz DM, Vuichoud J, Jarret AR, Danièle Gaudard-de-Weck RF, Donnet A, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr.* 1999;129(7):1340–6.
7. Leite SN, Jordão Jr AA, Andrade TAM, Masson DS F MAC. Modelos experimentais de desnutrição e sua influência no trofismo cutâneo. *An Bras Dermatol.* 2011;86(4):681–8.
8. Sarni ROS, Weffort VRS, Matos ÂP de, Brasil ALD, Cardoso AL, Almeida CAN de, et al. Tratado de Pediatria. 2a ed. Sociedade Brasileira de Pediatria; 2010. capítulo 20: Nutrologia; p.1605–1781.
9. Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr.* 2007;26(4):389–99.
10. WHO. Malnutrition [Internet]. 2023 [citado 24 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/12-01-2023-urgent-action-needed-as-acute-malnutrition-threatens-the-lives-of-millions-of-vulnerable-children>
11. De Onis M, Blössner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. *Public Health Nutr.* 2011;15(1):142–8.
12. Karpouzou A, Diamantis E, Farmaki P, Savvanis S, Troupis T. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing. *J Osteoporos.* 2017;2017.
13. O’Keefe JH, Bergman N, Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, DiNicolantonio JJ, Cordain L. Nutritional strategies for skeletal and cardiovascular health: hard bones, soft arteries, rather than vice versa. *Open Hear.* 2016;3(1):1–8.
14. Even-zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O, Phillip M, et al. Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1 α RNA levels in the growth plate. *Bone.* 2008;42(3):505–15.

15. WHO. Urgent action needed as acute malnutrition threatens the lives of millions of vulnerable children [Internet]. 2023 [citado 11 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/12-01-2023-urgent-action-needed-as-acute-malnutrition-threatens-the-lives-of-millions-of-vulnerable-children>
16. UNICEF. Malnutrition. Child malnutrition is a serious problem among indigenous populations, and appears as one of the main underlying causes of death. UNICEF is working to reverse this situation. [Internet]. 2023 [citado 11 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.unicef.org/brazil/desnutricao#:~:text=No Brasil%2C cerca de 30,que as outras crianças brasileiras.>
17. Agência Fiocruz de Notícias. Hospitalização de bebês por desnutrição atinge pior nível dos últimos 13 anos [Internet]. 2022 [citado 8 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/hospitalizacao-de-bebes-por-desnutricao-atinge-pior-nivel-dos-ultimos-13-anos>
18. 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.
19. Reichling TD, German RZ. Bones , muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. *J Nutr*. 2000;130(9):2326–32.
20. 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.
21. 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.
22. Wang X, Fosmire GJ, Gay C V, Leach RM. Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J Nutr*. 2002;132(4):665–73.
23. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Min Res*. 2010;25(9):2078–88.
24. Pando R, Masarwi M, Shtaiif B, Idelevich A, Monsonogo-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.
25. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci CV, et al. Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition : a morphometric , densitometric and mechanical study. *Br J Nutr*. 2005;93(5):663–9.
26. Mehta G, Roach HI, Taylor P, Reading I, Oreffo ROC, Clarke NMP, et al. Intrauterine exposure to a maternal low protein diet reduces adult bone mass and alters growth plate morphology in rats. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(6):493–8.

-
27. 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.
 28. Rossi L, Migliaccio S, Corsi A, Marzia M, Bianco P, Teti A, et al. Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition. *J Nutr*. 2001;131(4):1142–6.
 29. Guedes P, Zamarioli A, Botega I, Assed R, Butezloff M, Souza Y, et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats. *Acta Cir Bras*. 2019;34(3):e201900301.
 30. Pando R, Even-zohar N, Shtauf B, Edry L, Shomron N, Phillip M, et al. MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues : association between miR-140 and SIRT. *J Nutr Biochem*. 2012;23:1474–81.
 31. Boersma B; Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev*. 1997;18(5):646–61.
 32. Mescher AL. Junqueira's Basic histology: text and atlas. 13 ed. McGraw-Hill education; 2013. Capítulo 8: Bone; p. 315–361.
 33. Lui JC, Jee YH, Garrison P, Iben JR, Yue S, Ad M, et al. Differential aging of growth plate cartilage underlies differences in bone length and thus helps determine skeletal proportions. *PLoS Biol*. 2018;16(7):1–22.
 34. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*. 1994;28(6):505–19.
 35. Roach HI, Mehta G, Oreffo ROC, Clarke NMP, Cooper C. Temporal Analysis of Rat Growth Plates : Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. 2003;51(3):373–83.
 36. Martin EA, Ritman EL, Turner RT. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone*. 2003;32(3):261–7.
 37. Nilsson O, Baron J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: Growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(8):370–4.
 38. Agnes D. Berendsen, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14–8.
 39. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica: texto e atlas. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. Capítulo 8: Tecido ósseo; p.132–148.
 40. Judas F, Palma P, Falacho R, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio para disciplina de ortopedia. Faculdade de Medicina de Coimbra; 2012.
 41. Florencio-silva R, Rodrigues G, Sasso-cerri E, Simões MJ, Cerri PS, Cells B. Biology of bone tissue : Structure , function , and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;1–17.
 42. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:455–98.
 43. Rosa N, Simoes R, Magalhães FD, Marques AT. From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Med Eng Phys*. 2015;37(8):719–28.
-





-
44. Yao Z, Getting SJ, Locke IC. Regulation of tnf-induced osteoclast differentiation. *Cells*. 2022;11(1):1–23.
 45. Sahin E, Orhan C, Balci TA, Erten F, Sahin K. Magnesium picolinate improves bone formation by regulation of rank/rankl/opg and bmp-2/runx2 signaling pathways in high-fat fed rats. *Nutrients*. 2021;13(10):3353.
 46. de Onis M, Branca F. Childhood stunting: A global perspective. *Matern Child Nutr*. 2016;12:12–26.
 47. Leroy JL, Frongillo EA. Perspective: What Does Stunting Really Mean? A Critical Review of the Evidence. *Adv Nutr*. 2019;10:196–204.
 48. Kueper J, Beyth S, Liebergall M, Kaplan L, Schroeder JE. Evidence for the adverse effect of starvation on bone quality: A review of the literature. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:ID 628740.
 49. Prendergast AJ, Humphrey JH. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatr Int Child Health*. 2014;34(4):250–65.
 50. Bonjour J, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci*. 2007;51:64–80.
 51. Zhu X, Zheng H. Factors influencing peak bone mass gain. *Front Med*. 2021;15(1):53–69.
 52. Bonjour J-P, Theintz G, Buchs B, Slosman D, Rizzoli R. Critical years and stages of puberty for radial bone mass apposition during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(3):555–63.
 53. Bueno-vargas P, Manzano M, Jos ML, Rueda R. Bone Mass and Improve Bone Microarchitecture during Catch-Up Growth in Rats. *Nutrients*. 2022;14(6)(1303).
 54. Bar-Maisels M, Gabet Y, Shamir R, Hiram-Bab S, Pasmanik-Chor M, Phillip M, et al. Beta palmitate improves bone length and quality during catch-up growth in young rats. *Nutrients*. 2017;9(7):764.
 55. Masarwi M, Gabet Y, Dolkart O, Brosh T, Shamir R, Phillip M, et al. Skeletal effect of casein and whey protein intake during catch-up growth in young male Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr*. 2016;116:59–69.
 56. Modan-moses D, Yaroslavsky A, Kochavi B, Toledano A, Segev S, Balawi F, et al. Linear Growth and Final Height Characteristics in Adolescent Females with Anorexia Nervosa. *PLoS One*. 2012;7(9):1–8.
 57. Botega I, Guedes P, Zamarioli A, Assed R, Issa J, Butezloff M, 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.
 58. Lewis DI. Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci*. 2019;3:675–9.
 59. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition [Internet]. 2011 [citado 17 de março de 2023]. Available at: <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>
-

-
60. 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.
 61. 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.
 62. 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.
 63. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595–610.
 64. Ingram DK, de Cabo R. Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res Rev.* 2017;39:15–28.
 65. Santiago HAR, De Pierro LR, Reis RM, Caluz AGRE, Ribeiro VB VJ. Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta cirúrgica Bras.* 2015;30(11):743–8.
 66. Filho CF, Volpon JB, Shimano AC. Ensaio de cisalhamento sobre a cartilagem de crescimento. *Acta Ortop Bras.* 1996;4(1):9–14.
 67. N F Kember. Aspects of the maturation process in growth cartilage in the rat tibia. *Clin Orthop Relat Res.* 1973;95:288–94.
 68. Hunziker E, Schenk R. Physiological mechanisms Adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol.* 1989;414:55–71.
 69. Alasagheirin MH, Clark MK. Skeletal growth, body composition, and metabolic risk among North Sudanese immigrant children. *Public Health Nurs.* 2018;35(2):91–9.
 70. Misra M, Prabhakaran R, Miller KK, Goldstein MA, Mickley D, Clauss L, et al. Weight gain and restoration of menses as predictors of bone mineral density change in adolescent girls with anorexia nervosa-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1231–7.
 71. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res Rev.* 2017;39:36–45.
 72. Faje AT, Karim L, Taylor A, Lee H, Miller KK, Mendes N, et al. Adolescent girls with anorexia nervosa have impaired cortical and trabecular microarchitecture and lower estimated bone strength at the distal radius. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1923–9.
 73. Golden NH, Abrams SA, Daniels SR, Corkins MR, De Ferranti SD, Magge SN, et al. Optimizing bone health in children and adolescents. *Pediatrics.* 2014;134(4):e1229–43.
 74. Krahenbühl T, Gonçalves EM, Costa ET, Barros Filho A de A. Fatores que influenciam a massa óssea de crianças e adolescentes saudáveis mensurada pelo ultrassom quantitativo de falanges: revisão sistemática. *Rev Paul Pediatr.* 2014;32(3):266–72.
-

-
75. 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.
 76. Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M. Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*. 2013;106:83–9.
 77. 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.
 78. WHO - World Health Organization. WHO global database on child growth and malnutrition. Geneva; 1997. p. 1–67.
 79. McCance RA, Mount L. Severe undernutrition in growing and adult animals. 5.* Metabolic rate and body temperature in the pig. *Br J Nutr*. 1960;14(1):509–18.
 80. Ferguson V, Greenberg A, Bateman T, Ayers R, Simske S. The effects of age and dietary restriction without nutritional supplementation on whole bone structural properties in C57BL/6J mice. *Biomed Sci Instrum*. 1999;35:85–91.
 81. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A. Immunolocalization of RANKL is increased and OPG decreased during dietary magnesium deficiency in the rat. *Nutr Metab*. 2005;2:1–8.
 82. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ, Wang Y, Brisson BK, Vogel LK, et al. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(6):621–31.
 83. Von der Mark K, Von der Mark H. The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage. *J Bone Jt Surg Br*. 1977;59B(4):458–64.
 84. Bredella MA, Fazeli PK, Miller KK, Misra M, Torriani M, Thomas BJ, et al. Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(6):2129–36.
 85. WHO. Malnutrition [Internet]. 2023 [citado 24 de maio de 2023]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/malnutrition#tab=tab_1
 86. Hashan MR, Das Gupta R, Day B, Al Kibria GM. Differences in prevalence and associated factors of underweight and overweight/obesity according to rural-urban residence strata among women of reproductive age in Bangladesh: Evidence from a cross-sectional national survey. *BMJ Open*. 2020;10:1–11.
 87. 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.
 88. Mazeti C, Furlan M. Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Sci Biol Sci*. 2008;30(2):197–204.
 89. 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.
 90. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone Histomorphometry : Standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595–610.
-

ANEXO

ANEXO - Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
		
<h2 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h2>		
<p>Certificamos que o Protocolo intitulado “<i>Restrição alimentar no tecido ósseo, cartilaginoso e no processo de consolidação óssea em ratos</i>”, 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 <i>filo Chordata, subfilo Vertebrata</i> (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.</p>		
<p>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.</p>		
<p>We certify that the Protocol <i>n° 220/2018</i>, entitled “<i>Dietary restriction in bone tissue, cartilage and bone healing in rats</i>”, 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 <i>phylum Chordata, subphylum Vertebrata</i> (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 male Wistar-Old rats weighing 70g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 08/01/2022.</p>		
<p>Ribeirão Preto, 25 de março de 2019</p>  <p>Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior Decano da CEUA-FMRP – USP</p>		
<small>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel. (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br</small>		

APÉNDICES

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

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

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

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

APÊNDICE C - Composição da ração utilizada na alimentação dos animais

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

MANUSCRITO

1 **Refeeding partially reverts the damage caused by food restriction to the quality of the growth plate**
2 **and bone tissue in growing rats.**

3

4 Patrícia Guedes¹, MSc; Iara Botega², MSc; Ariane Zamarioli^{3*}, PhD; Roberta Shimano⁴, PhD; Raquel
5 Segato⁵, PhD and José B. Volpon⁶

6

7 **1-** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Orthopedics and
8 Anesthesiology, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0002-0759-3713. Design of the study,
9 technical procedures, acquisition of data, analysis of data, and manuscript preparation.

10

11 **2-** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Orthopedics and
12 Anesthesiology, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0003-4826-514X. Technical procedures
13 and acquisition of data.

14

15 **3-** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Orthopedics and
16 Anesthesiology, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0002-7939-0528. Interpretation and
17 analysis of data. Manuscript review.

18

19 **4-** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Orthopedics and
20 Anesthesiology, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0002-8244-0223. Technical procedures
21 and acquisition of data.

22

23 **5-** School of Dentistry, University of São Paulo, Department of Children's Clinic, Ribeirão Preto, São
24 Paulo, Brazil. ORCID: 0000-0002-0230-1347. Acquisition of data and critical revision of manuscript.

25

26 **6-** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Orthopedics and
27 Anesthesiology, Ribeirão Preto, São Paulo Brazil. ORCID: 0000-0002-2120-0138. Design, intellectual
28 and scientific content of the study, funding the study, and critical revision and final approval of the
29 manuscript.

30

31

32

33

34

35

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72

***Corresponding Author:**

Ariane Zamarioli, PhD
Department of Orthopaedics and Anesthesiology
Ribeirao Preto Medical School
900 Av Bandeirantes
Ribeirao Preto, SP14049-900, Brazil
Office: +55 16 33153272
arianezamarioli@usp.br

Abstract

73
74
75 Malnutrition is the outcome of a general or specific deficiency of essential nutrients and remains highly
76 prevalent worldwide. This condition has negative effects on several organ systems, with a specific
77 significant impact on children. Proper nutrition is crucial for bone growth and development, reducing the
78 risks of osteoporosis and fractures later in life. The aim of this study was to evaluate the effects of food
79 restriction and subsequent refeeding on the growth plate and bone quality of rats. Fifty-four male Wistar
80 rats were randomly divided into three groups: (1) AdL, control group; (2) FRes: food restriction; and (3)
81 FRes+Ref, food restriction and subsequent refeeding. After weaning, the FRes and FRes+Ref groups
82 received only 50% of the amount of food provided to the AdL group on the previous day. In the sixth
83 week of the experiment, the FRes+Ref group was fed *ad libitum*, while the other groups continued with
84 the same restricted diet. After twelve weeks, the rats were sacrificed, and their tibias were dissected and
85 analyzed by dual-energy X-ray absorptiometry, computed microtomography, histomorphometry,
86 immunohistochemistry, Real-time PCR, and mechanical tests. Statistical analysis was performed using
87 the ANOVA test, with a significance level of less than 0.05. The results showed that food restriction
88 negatively affected the growth plate, trabecular and cortical bones. Refeeding partially reversed the
89 damage but failed to fully restore it. In conclusion, refeeding improved some harmful changes caused by
90 malnutrition in rat tibias, but complete recovery was not achieved during the study period.

91

92 **Keywords:** Malnutrition. Cancellous Bone. Cortical Bone. Growth Plate. Rats.

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110 **Introduction**

111
112 Malnutrition is a condition where individuals lack sufficient nutrients to support normal
113 functions. Undernutrition, a specific type of malnutrition, arises from an inadequate intake of nutrients,
114 resulting in deficiencies in proteins, vitamins, minerals, or overall calorie intake. This condition remains
115 highly prevalent globally, with long-lasting repercussions throughout life when occurring during the
116 growth period. Currently, around 45 million children under the age of five years are underweight, and
117 approximately 149 million suffer from stunting due to undernutrition (2,85).

118 Undernutrition can stem from various causes, encompassing insufficient calorie intake, impaired
119 food digestion, age-related physiological changes, gastrointestinal tract diseases, inflammation, and
120 physical disabilities. Environmental factors, including war, poverty, the ongoing repercussions of
121 COVID-19, and the rising living costs, exacerbate food shortages, particularly in less developed
122 countries. Conversely, in countries with higher per capita income, eating disorders such as anorexia
123 nervosa, depression, or malabsorption syndromes are the primary causes of undernutrition (15,56,76).

124 In addition to significantly impacting the social and economic development of countries
125 (3,11,86), severe and prolonged hunger can result in irreversible damage, compromising various organs
126 and systems, including the skeletal system. This is especially true when it occurs during critical growth
127 stages, such as infancy (4,73).

128 Linear growth, representing the steady progression in height over time, serves as a valuable
129 indicator of a child's well-being, as inadequate health conditions can hinder optimal growth patterns (46).
130 Delays in linear growth can also lead to setbacks in skeletal development, resulting in reduced bone
131 mineral density (BMD), diminished bone mineral content (BMC), and compromised bone quality. These
132 consequences can disrupt the balance of bone turnover, escalating the risk of early-onset osteopenia,
133 osteoporosis, and bone fractures, in both adults and in children (47–49).

134 Maximizing the acquisition bone mass during skeletal maturation holds significant importance
135 and occurs predominantly during rapid periods of growth, especially adolescence. During this critical age,
136 a 10% increase in peak bone mass has the potential to reduce the risk of fracture in adult life (50,51).
137 Researches indicate that malnutrition during fetal development and childhood is associated to lower bone
138 mass in adulthood (23). Furthermore, several factors play an essential role during this phase, including
139 genetics and conditions of pregnancy (87).

140 Dietary interventions have been investigated using diverse experimental animal models of
141 malnutrition followed by refeeding. These studies involve restricting specific nutrients (53–55) or calorie
142 intake (24) in animals for a specified duration and then assessing the impact of a refeeding period on
143 growth and bone-related outcomes, comparing them with animals fed *ad libitum*. Remarkably, it is crucial
144 to emphasize that malnutrition, in a clinical scenario, is frequently associated with limited food intake,
145 resulting in a deficiency of multiple nutrients. In this context, the undernutrition may be better understood
146 by a general model of dietary restriction.

147 In a previous study, we gathered compelling evidence showing that subjecting growing rats to a
148 50% general dietary restriction for 10 weeks had a profound impact on bone growth and quality. This
149 restriction resulted significant alterations in the structure and cellular composition of growth cartilage, as
150 well as both the cancellous and cortical bones (29).

151 In the current study, our goal is to induce a state of malnutrition in young rats by providing them
152 with a restrict amount of food, followed by adequate refeeding. Therefore, we aim to examine the effects
153 of a general adequate diet refeeding on an impaired bone and growth plate quality. Our hypothesis is that
154 refeeding could partially or totally reverse the deleterious effects of food deprivation on the long bone.

155

156 **Material and methods**

157

158 The Institutional Animal Experimentation Ethics Committee has granted approval for all
159 experimental procedures (Protocol 2020/2018). Male Wistar Hannover rats, aged 21 days with a body
160 mass ranging from 50 g to 70 g, were obtained from the Central Animal Facility of the Institution.
161 Thereafter, they received daily care following the guidelines for the care and use of laboratory animals.
162 The principles of the 3Rs (58) and the guide for the care and use of laboratory animals (59) were strictly
163 adhered throughout the study.

164 After a three-day acclimatization period, the animals (n=54) were randomly divided into three
165 experimental groups (n=18/group). The groups were as follows: 1- AdL: weight-matched control rats
166 with ad libitum access to a complete diet for rats, followed by twelve weeks. 2- FRs: rats subjected to
167 food restriction for twelve weeks. 3- FRes+Ref: rats subjected to food restriction for six weeks followed
168 by six weeks of refeeding. All groups received the same standard chow (Quimtia, PR, Brasil). The rats
169 were individually housed to monitor food consumption. Throughout the entire experimental period, the
170 animals had *ad libitum* access to water, and were kept at a controlled temperature of 22°C - 24°C, with a
171 12-hour light/dark cycle.

172

173 *Experimental model for undernutrition*

174

175 The food restriction protocol used in this study was based on a previous study conducted by our
176 group (29,57). Daily food intake of each animal was measured and correlated with weight. A 50% food
177 restriction was implemented to induce effects similar to those observed in malnourished humans, as
178 reported by Mazeti & Furlan (88). The animals were closely monitored on a daily basis for alertness,
179 activity level and coat condition. It is noteworthy that the malnourished rats exhibited more aggressive
180 behavior. Body weight was obtained three times a week.

181 After the twelve-week experimental period, rats were euthanized using an excessive dose of
182 thiopental sodium (Tiopental® Cristália, Brazil). The left tibias were immediately harvested and recorded
183 their weight, as well as measured the longitudinal length and circumference at the central region (mid-

184 diaphysis). The bones were preserved in 70% ethylic alcohol for microtomographic and densitometric
185 analyses, and mechanical tests. For histomorphometric and immunohistochemical analyses, the samples
186 were fixed in 4% paraformaldehyde.

187

188 *Bone densitometry*

189

190 Bone mineral density (BMD, in g/cm^2), bone mineral content (BMC, in g), and the area (region
191 of interest, in cm^2) were obtained using a dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) with a Lunar
192 densitometer DPX-IQ (Lunar; software version 4.7e, GE Healthcare, U. K.). The entire tibias were
193 chosen for analysis. Scanning reproducibility was obtained using the root mean square coefficient of
194 variation, which yielded a value of 4%.

195

196 *Microarchitecture of the tibia*

197

198 The bone morphology and microarchitecture (μCT) were assessed using a GE Phoenix v|tome|x
199 S240 (Phoenix-micro-CT, German) with the DXR250RT 1000x1000 pixels detector. During the exam,
200 the following parameters were selected: 60Kv, 150 μA , 1000 projections with an average of four
201 exposures of 333ms, providing a resolution of 15 μm . The GE Phoenix datos|x2 software was used for
202 image processing and three-dimensional reconstruction. The Data Viewer (Bruker-microCT, version
203 1.5.1.2) was utilized to adapt the positioning of the bone analyzed, and CTAn software (Bruker-microCT,
204 v. 2.2.1) was used to manually isolate and analyze the growth plate, trabecular and cortical bone tissues.
205 The total volume of growth cartilage was measured (TV, mm^3). The trabecular microarchitecture was
206 assessed proximal to the growth plate, for a total length of 2 mm. The evaluated parameters included bone
207 volume (BV, mm^3), bone volume fraction (BV/TV,%), trabecular number (Tb.N, 1/mm), trabecular
208 thickness (Tb.Th, mm), bone density connectivity (Conn.D , 1/ mm^3), specific bone surface (BS/BV,
209 mm^3), trabecular separation (Tb.Sp, mm), and SMI. For the tibial shaft, a 1.0 mm total length, beginning
210 7.0 mm distal to the proximal growth plate, was assessed. The microstructural parameters determined
211 were cortical volume (Ct.V, mm^3) and cortical thickness (Ct.Th, mm). The nomenclature used followed
212 the American Society for Bone and Mineral Research guidelines (89).

213

214 *Mechanical testing*

215

216 Following densitometry and μCT examinations, three-point mechanical tests were conducted at
217 the tibia mid-diaphysis. The bone was positioned on two distal supports resulting a free span of 25 mm
218 and force was applied at the center of the anterior surface. An EMIC® DL10.000 (Brazil) universal
219 testing machine equipped with a 500 N load cell (EMIC® - 10000N) applied the load at a speed of 1
220 mm/min.

221 *Microscopy*

222
223 Tibias were fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in 10% EDTA, and dehydrated in a series
224 of increasing concentrations of alcoholic solutions. Coronal sections of 5 μm in thickness were prepared
225 and stained with H&E, Masson's trichrome, TRAP, and picosirius red. The growth plate's structure was
226 characterized and quantified using H&E-stained sections, with ImageJ software® (NIH, USA) used to
227 measure thickness, total area, and hypertrophic zone area. Trabecular bone was quantified using Masson's
228 trichrome stain and the AxioImager Z2 (Zeiss, Germany). The blue color delineated the trabecular bone
229 area expressed as a proportion of the total bone area (B.Ar/Tt.Ar) visualized at 50x magnification. For
230 collagen fibers identification picosirius red staining with polarized light, and birefringence were used.
231 The, Axiovision® program quantified the ratio of collagen area to total area (Col.Ar/Tt.Ar) photographed
232 at 50x magnification (90). TRAP staining was utilized to count osteoclasts, where the red color indicated
233 areas of osteoclastic activity, expressed as a percentage of the entire area of the proximal tibial
234 metaphysis. Immunohistochemistry involved incubation of tissues with primary antibodies to OPG
235 (A2100, anti-rabbit, Woburn, MA, USA), RANK (A12997, anti-rabbit, Woburn, MA, USA), and
236 RANKL (A2550, anti-rabbit, Woburn, MA, USA). Positive immunostaining for OPG, RANK, and
237 RANKL was quantified using ImageJ software® (NIH, USA) and the ratio of protein expression area to
238 total area was calculated.

239
240 *RNA isolation and real-time PCR assessment*

241
242 This study focused on analyzing animals that were followed by six weeks and five days. Samples
243 from the proximal metaphysis were collected and immediately stored in RNase-free containers,
244 immersed in liquid nitrogen, and kept at -80°C until RNA extraction. The total RNA isolation system
245 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) was used to extract total RNA from the tibias ($n=6/\text{group}$),
246 following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using
247 a high-throughput cDNA reversion Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 1
248 μg of RNA. TaqMan® probes (Applied Biosystems) were used to quantify the expression of collagen
249 type 1 (Col1a1, assay ID: Rn01463848_m1) and osterix (Osx, assay ID: Rn02769744_s1), by quantitative
250 PCR in a StepOnePlus PCR machine (Applied Biosystems), normalized to the expression of the GAPDH
251 reference gene (Rn01775763_g1). Samples were run in duplicates, and relative expression was calculated
252 using the 2-ddCT method. The ddCt was calculated as $dCt [\text{goiFRes} - \text{refFRes}] - dCt [\text{goiAdL} - \text{refAdL}]$,
253 where goi is the gene of interest and ref is the reference gene. The ddCT was applied as a continuous
254 variable for statistical analysis. The mean for each gene of interest in the AdL group was calculated, and
255 this value was used to standardize the expression levels in the other groups. This allowed us to determine
256 how FRes and FRes+Ref influence the regulation of gene expression.

257

258 Statistical analysis

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

265

266 **Results**

267

268 *Assessment of body mass*

269

270 At baseline (day 0), all groups had similar body weight ($p > 0.05$, Figure 1A). Over the follow-up,
271 all rats experienced weight gain. However, rats subjected to food restriction showed a significantly lower
272 weight gain compared those with free access to food (AdL). A notable difference was seen in the first
273 week (32%, $p < 0.001$), which progressively increased over time, reaching 45% at the end of the sixth
274 week ($p < 0.001$, Figure 1B). The final body weight gain of the food-restricted group (FRes) was
275 significantly lower than that of the AdL rats (211% versus 480%, $p < 0.001$). In contrast, the group that
276 underwent refeeding showed a greater body weight gain compared to the rats that were malnourished
277 (385% versus 211%, $p < 0.001$). As of note, the FRes+Ref animals showed a 35% increase in body weight
278 in the eighth week of the experiment (two weeks after re-feeding) when compared to the FRs rats,
279 $p = 0.032$, Figure 1C. Furthermore, at weeks 10 and 12 after the start of the experiment (4 and 6 weeks of
280 refeeding, respectively), the FRes+Ref animals exhibited a 48% and 64% increase in body weight,
281 respectively, compared to the FRes group ($p < 0.001$, as shown in Figures 1D and 1E).

282

283 *Refeeding has been shown to be an effective method for stimulating growth plate activity, which can lead*
284 *to improvements in bone macrostructure.*

285

286 The effects of food restriction and refeeding on the morphometric parameters of the growth plate
287 and tibia are depicted in Fig 2A and summarized in Table 1, respectively. The thickness and total area of
288 the growth plate, measured from the resting zone to the ossification zone of the metaphyseal bone, did not
289 exhibit significant differences among the groups ($p > 0.05$, Fig. 2B, C). Despite the lack of statistical
290 significance, both parameters exhibited an increase in the refeed group (FRes+Ref vs AdL increased by
291 11% for thickness and by 6% for total area; FRes+Ref vs FRes increased thickness by 16% and total area
292 by 12%). Furthermore, refeeding resulted in an enlargement of the hypertrophic zone, with a trend
293 towards statistical significance (increase of 21% in FRes+Ref versus AdL, $p = 0.094$; and 25% increase

294 versus FRes, $p=0.052$) (Fig. 2D). The total volume (TV) of the growth plate, assessed through
295 microtomographic analysis, did not exhibit significant differences among the groups (Fig. 2E).

296 Table 1 presents the morphometric parameters of the tibia. All macroscopic measurements
297 displayed significant reductions in the FRes group ($p<0.05$). In contrast, refeeding resulted in substantial
298 increases in bone mass by 30% ($p<0.001$), bone length by 8% ($p=0.001$), diaphyseal perimeter by 10%
299 ($p=0.016$), and perimeter of the proximal metaphysis by 13% ($p=0.003$) compared to the FRes group.
300 However, all measurements in the re-fed rats were significantly lower than those of the AdL group
301 ($p<0.05$).

302

303 *Maladjusted bone turnover resulting from dietary restriction can be partially restored by refeeding in the*
304 *tibias*

305

306 Our TRAP staining of the sections revealed a remarkable 133% increase in resorption activity in
307 the tibias of FRes rats compared to AdL rats, as indicated by the TRAP-positive area ($p=0.02$, Fig 3B).
308 These areas were distinguished by the presence of red osteoclasts, highlighted by green pointed arrows in
309 Fig 3A. In contrast, FRes+Ref rats exhibited a significant 65% decrease in the resorption area compared
310 to FRes rats ($p=0.011$, Fig 3B), with values similar to those observed in AdL rats ($p=0.981$, Fig 3B).

311 Additionally, we detected a notable 366% increase in the trabecular area of the proximal
312 metaphysis of the tibia in FRes+Ref rats compared to FRes rats ($p<0.001$, Fig 3D), as noted in Fig 3C,
313 where the trabecular bone is stained blue by Masson staining. This increase in trabecular area fully
314 restored the values to those seen in the AdL rats ($p=0.901$, Fig 3D), which were previously reduced by
315 FRes ($p<0.001$ versus AdL, Fig 3D).

316 Similarly, total collagen deposition was significantly decreased in FRes rats compared to AdL
317 rats ($p=0.002$, Fig 3F), as depicted in Fig 3E. Refeeding in the FRes+Ref rats led to a substantial 152%
318 increase in total collagen deposition ($p=0.007$) compared to FRes rats, reaching levels comparable to
319 those observed in AdL rats ($p=0.780$, Fig 3F).

320 Our immunohistochemical analysis confirmed the presence of unbalanced bone remodeling in our
321 stained histological sections. The FRes group exhibited a significant 137% increase in the RANK-positive
322 area compared to AdL rats ($7.20\pm 1.30\%$ versus $3.04\pm 0.74\%$, respectively, $p=0.0012$). Additionally, the
323 FRes group displayed a 48% increase in the RANKL-positive area compared to AdL rats ($5.63\pm 0.51\%$
324 versus $3.81\pm 0.45\%$, respectively, $p=0.001$). Finally, the OPG-positive area in the FRes group was 73%
325 lower compared to the control group ($2.07\pm 0.84\%$ versus $6.55\pm 0.77\%$, respectively, $p=0.001$),

326 In contrast, the FRes+Ref rats demonstrated a significant 43% decrease in the RANK-positive
327 area ($p=0.001$) and a 25% reduction in the RANKL-positive area ($p=0.001$) compared to the FRes rats.
328 Moreover, the OPG-positive area in the FRes+Ref group exhibited an 88% increase in the OPG-positive
329 area compared to the FRes group ($3.89\pm 0.75\%$ versus $2.07\pm 0.84\%$, respectively, $p=0.072$) (Fig 3H). The

330 positive immunostaining areas for RANK, RANKL, and OPG are indicated by green arrows in Fig 3G,
331 illustrating the significant changes.

332
333 *Dietary restriction leads to a decrease in bone mass as measured by DXA and formation-related uCT*
334 *parameters, accompanied by an increase in microstructural parameters associated to resorption.*
335 *Refeeding partially reversed these changes.*

336
337 Significant differences were observed in bone mineral density (BMD) and bone mineral content
338 (BMC) between the FRes and AdL groups, with a decrease of 24% and 27%, respectively ($p=0.0009$ and
339 $p=0.0001$). The FRes+Ref group demonstrated a trend towards statistical significance, with an increase of
340 18% in BMD and 13% in BMC compared to the FRes group ($p=0.057$ and $p=0.059$, respectively). The
341 BMD of the refed group showed no significant difference compared to the AdL group ($p=0.19$).
342 However, the BMC of the refed group remained significantly lower at 18% ($p=0.0315$, Table 2).

343 FRes induced significant microarchitectural changes in both trabecular and cortical bone of the
344 tibias, when compared to AdL rats. Specifically, FRes resulted in a 76% decrease in bone volume (BV,
345 $p<0.0001$), a 60% decrease in BV/TV ($p=0.0002$), a 56% decrease in trabecular number (Tb.N,
346 $p<0.0001$), a 25% decrease in trabecular thickness (Tb.Th, $p=0.0009$), a 60% increase in trabecular
347 separation (Tb.Sp, $p=0.001$), a 36% increase in specific bone surface (BS.BV, $p=0.0004$), a 12% increase
348 in structural model index (SMI, $p=0.005$), and a tendency to decrease connectivity density (Conn.D) by
349 36% ($p=0.0532$). In cortical bone, FRes led to a 37% decrease in cortical volume (Ct.V, $p<0.0001$) and a
350 17% decrease in cortical thickness (Ct.Th, $p=0.018$) compared to the control group. FRes+Ref reversed
351 the effects of malnutrition on trabecular architecture, resulting in a significant increase in BV by 152%
352 ($p=0.0001$), BV/TV by 114% ($p=0.002$), Tb.N by 82% ($p=0.0003$), Conn.D by 128% ($p=0.0008$), a
353 decrease in Tb.Sp by 35% ($p=0.0029$), a decrease in SMI by 10% ($p=0.013$), and a significant increase in
354 cortical volume by 43% ($p<0.0001$), compared to FRes rats. Refeeding fully restored BV/TV, Tb.N,
355 Conn.D, Tb.Sp, SMI, and Ct.Th ($p>0.05$), which reached levels statistically similar to those seen in AdL
356 animals (Table 2, Fig 4).

357
358 *Dietary restriction reduces mechanical strength, which was partially restored by refeeding*

359
360 Our mechanical testing revealed that refeeding effectively improved the adverse effects of food
361 restriction on tibial strength (Table 3). Rats subjected to food restriction exhibited significantly weaker
362 bones compared to the AdL group, with a 58% decrease in maximal strength ($p<0.0001$) and a 61%
363 decrease in stiffness ($p<0.0001$).

364 In contrast, rats in the FRes+Ref group demonstrated a significant increase in maximum strength
365 by 54% ($p=0.0001$) and stiffness by 75% compared to the FRes rats ($p=0.0002$). However, the values of

366 the FRes+Ref group remained significantly lower than those of the AdL rats (maximum strength $p=0.031$;
367 stiffness $p=0.006$).

368

369 *Food restriction and subsequent refeeding did not change gene expression*

370

371 Although we observed significant phenotypic changes, our PCR data did not indicate any
372 differences in gene expression among the groups. However, refeeding led to an upregulation of genes
373 associated with osteoblasts, as shown in Fig 5.

374

375 **Discussion**

376

377 We investigate the impact of general food restriction (undernutrition) followed by refeeding on
378 trabecular and compact bone tissue, as well as the growth plate in growing rats. Our findings emphasize
379 the significant influence of dietary restriction on the structure and function of the growth plate, resulting
380 in adverse effects on growth and bone quality. Specifically, we observed a decline in bone formation
381 accompanied by an increase in bone resorption processes. However, upon providing the rats with
382 unrestricted access to food, a notable improvement in bone quality was observed, suggesting a partial
383 reversal of these deleterious effects.

384

385 Our data revealed that refeeding for the same duration as the food restriction resulted in an
386 enlargement of the hypertrophic zone in the refeed animals, which could have contributed to bone mass
387 acquisition. However, it did not fully compensate the growth deficit caused by the food restriction. As of
388 note, several parameters were not completely restored, including tibial morphometric measurements (such
389 as bone mass, length, and perimeters of the proximal metaphysis and central region of the diaphysis),
390 bone mineral content, osteoprotegerin levels, some microtomographic parameters (i.e. bone volume,
391 trabecular thickness, specific bone surface, cortical thickness), and mechanical strength (maximum
392 strength and stiffness). In contrast, some parameters were fully restored by refeeding (i.e. bone mineral
393 density, microtomographic measurements such as bone volume fraction, trabecular number, connection
394 density between trabeculae, cortical thickness, structural model index, trabecular separation), bone
395 formation, collagen synthesis, tartrate-resistant acid phosphatase, nuclear factor kappa-B receptor
396 activator, and nuclear factor kappa-B ligand receptor activator.

396

397 Clinically, malnourished children not only experience growth retardation but also exhibit lower
398 BMD and BMC due to inadequate bone mineralization during their development (69). Likewise,
399 adolescents with anorexia nervosa demonstrate decreased bone mass and quality, as indicated by reduced
400 densitometric parameters (70). Insufficient bone mineralization during this critical period is likely to lead
401 suboptimal peak bone mass, thereby increasing the susceptibility to fractures during childhood and
adolescence, as well as the risk of long-term bone disorders, such as osteoporosis (73,74).

402 Numerous animal models have been employed to investigate malnutrition and replicate its effects
403 during early life, with rodents being extensively used. However, the scientific literature displays
404 significant variation in the models of dietary restriction employed, both in terms of duration and quantity
405 (23–25,76,88). Some researchers have utilized diets with specific nutrient compositions
406 (20,22,28,53,54,77). In our study, we opted for a global food restriction protocol, which is more
407 accurately representative of childhood malnutrition.

408 Our dietary restriction protocol induced notable changes in the bone microenvironment, resulting
409 in upregulation of bone resorption related parameters, including increases in the levels of tartrate-resistant
410 acid phosphatase (TRAP), receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), receptor activator of
411 nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), trabecular separation (Tb.Sp), structural model index (SMI),
412 trabecular separation (Tb.Sp), and specific bone surface (BS.BV). Moreover, dietary restriction led to
413 reduced levels of osteoprotegerin (OPG), bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), and
414 microtomographic parameters such as connection density between trabeculae (ConnD), trabecular number
415 (Tb.N), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), cortical volume (Ct.V), cortical
416 thickness (Ct.Th), bone formation, collagen deposition, and mechanical strength, which are bone
417 formation related parameters. Notably, no significant differences were observed in gene expression
418 analysis among the three groups. This analysis was conducted five days after the dietary interventions, a
419 timeframe that is likely to correspond to an acute phase in the cascade of events triggered by nutritional
420 changes. We hypothesized that malnutrition would downregulate the expression of collagen type 1
421 (Col1a1) and osterix (SP7), and that refeeding would upregulate their expression, given their well-
422 established roles in endochondral bone formation (82,83). Overall, the results demonstrate an
423 osteometabolic imbalance characterized by reduced bone formation and increased bone resorption.

424 The findings of our study are consistent with those reported by other authors. For instance, Devlin
425 et al. (2010) conducted a study on mice, implementing a 30% diet restriction for six and twelve weeks.
426 Significant reductions in whole-body bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were
427 observed, accompanied by impaired bone microstructure (13). Similarly, Pando et al. (2014)
428 demonstrated that a 40% calorie restriction lasting 10 days after weaning negatively affected the growth
429 plate, impeding bone growth and leading to decreased levels of serum bone markers such as leptin,
430 insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and alkaline phosphatase, which are indicative of bone formation.
431 This restriction also resulted in an increase in the number of osteoclasts (24). Boyer et al. (2005)
432 examined the effects of a global dietary restriction of 20% for 4 weeks and reported reductions in bone
433 BMC, BMD, and unfavorable impacts on mechanical properties (25). In our previous study, we similarly
434 observed a significant reduction in BMD, compromised tibial microarchitecture, and weakened
435 mechanical strength of the growth plate in young rats subjected to prolonged food restriction for 70 days
436 (24).

437 Refeeding exhibited stimulatory effects on cellular activity within the growth plate. Notably,
438 significant increases were observed in the hypertrophic zone, along with modest increases in the total

439 plate area, thickness, and volume. Moreover, there were notable enhancements in lamellar bone formation
440 and collagen synthesis. The absence of statistical significance in growth plate dimensions can be
441 attributed to the animals' age at the final stage of the study (15 weeks), characterized by reduced
442 metabolic activity due to maturation. However, it is important to highlight that the growth plate's
443 functionality was compromised. Indirect evidence of impaired growth plate function includes reductions
444 in the length, mass, and diameter of the entire tibia. These findings align with another experimental study
445 that reported an increase in growth plate height following refeeding. However, our results indicate that
446 this increase was insufficient to fully recover the final length of the long bone (24).

447 Dietary restriction had a profound impact on the mechanical strength of cortical bone, primarily
448 influenced by subperiosteal (intramembranous) ossification. Consequently, our evaluations indicated
449 impairments in both types of ossification. These findings are consistent with previous research
450 demonstrating that bones continue to grow even under adverse conditions of malnutrition. However, this
451 growth results in thinner and weaker cortices, as well as reduced bone mass and length (79). Similar
452 investigations conducted on young rats did not identify significant differences in bone architecture after
453 26 days of refeeding (24) or mechanical parameters after 8 weeks (25). However, it is worth noting that
454 these studies did not track the animals until they reached skeletal maturity. In contrast, our study followed
455 the animals throughout the primary growth period until they achieved peak bone mass. The disparity
456 between our results and those of others can be attributed to variations in the bones examined, the species
457 of animals evaluated, or the specific protocol used for dietary restriction (23).

458 Our study, as well as others (23,24), revealed a significant increase in osteoclastic activity in food
459 restricted animals. The location of osteoclasts at the metaphyseal edge of the growth plate suggests
460 increased bone resorption. Pando et al. (2014) also demonstrated an increase in the number of
461 osteoclasts, which decreased after refeeding (24). Added to this, there is an unbalanced bone remodeling
462 process with decreased OPG expression and increased levels of RANK and RANKL. Refeeding modestly
463 increased OPG, and reduced significantly RANK and RANKL, indicating prevention of bone resorption.

464 In recent years, the active role of the skeletal system in regulatory processes, owing to its capacity
465 to store and release chemical elements, has become increasingly evident. A plausible explanation for the
466 decline in bone quality during periods of limited nutrition is that dietary restriction triggers an increase in
467 bone resorption as a compensatory mechanism for nutritional deficiencies (80). Previous studies have
468 demonstrated that induced magnesium deficiency in rats can disrupt the regulation of the
469 RANK/RANKL/OPG pathway, resulting in heightened osteoclastic activity, elevated levels of RANK
470 and RANKL, and reduced expression of OPG.

471 The extent to which bone quality can recover and be restored after a period of growth inhibition
472 remains a topic of debate. Refeeding has been shown to enhance cell activity in the tibial growth plate and
473 alleviate the effects of bone loss induced by a 50% dietary restriction. It simultaneously promotes bone
474 formation and reduces bone resorption. However, there is still a deficit in bone length, and the overall
475 quality remains compromised. Based on our findings, we conclude that refeeding partially reverses the

476 detrimental changes observed in the tibias of undernourished animals. Further investigations involving
477 longer periods of refeeding can shed light on whether growth failure and deterioration in bone quality are
478 transient or permanent phenomena.

479

480 **Acknowledgments**

481

482 We extend our gratitude to all the investigators, staff, and trainees from the Laboratory of
483 Bioengineering at the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, for their
484 invaluable assistance throughout the entire study. Additionally, our sincere thanks go to the School of
485 Philosophy, Sciences, and Letters of Ribeirão Preto and the School of Dentistry of Ribeirão Preto,
486 University of São Paulo, Brazil, for their valuable contributions to the microstructural analysis.

487

488 **Author Contributions**

489

490 PM: Studied the design, technical procedures, and data acquisition, performed data analysis, initiated the
491 manuscript, and wrote the first draft. IB: Conducted technical procedures and data acquisition. AZ:
492 Contributed to study design and methods, gave critical analysis and interpretation of the data, provided
493 guidance during manuscript preparation and final revision of the manuscript. RS: Handled technical
494 procedures and data acquisition. RS: Assisted with data acquisition and provided critical analysis of the
495 manuscript. JV: Contributed to the conception, intellectual and scientific content of the study, funded the
496 research, provided critical review, and gave final approval of the manuscript. All authors reviewed the
497 final version and approved the submission.

498 **"Statements and Declarations"**

499

500 **Conflicts of interest**

501 The authors declare no conflict of interest.

502

503 **Data archiving**

504 The datasets produced and/or analyzed during the present research are accessible to the
505 responsible author upon a reasonable request.

506 All information generated or analyzed during this study is covered in this scientific publication.

507

508 **Statement of ethics**

509 We hereby confirm that all relevant institutional and governmental guidelines pertaining to the
510 ethical treatment of animals were meticulously adhered to throughout the duration of this research

511

512 **Funding**

513 The São Paulo Research Foundation funded this study (FAPESP) - 2020/00529-5.

514 *This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível*
 515 *Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.*

516

517 **References**

518

519 1. WHO (2023) Malnutrition. https://www.who.int/health-topics/malnutrition#tab=tab_1. Accessed
 520 24 maio 2023

521 2. FAO (2022) The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and
 522 agricultural policies to make healthy diets more affordable.
 523 <https://www.fao.org/3/cc0639en/online/cc0639en.html>. Accessed 14 abr 2023

524 3. WHO (2023) Urgent action needed as acute malnutrition threatens the lives of millions of
 525 vulnerable children. [https://www.who.int/news/item/12-01-2023-urgent-action-needed-as-acute-](https://www.who.int/news/item/12-01-2023-urgent-action-needed-as-acute-malnutrition-threatens-the-lives-of-millions-of-vulnerable-children)
 526 [malnutrition-threatens-the-lives-of-millions-of-vulnerable-children](https://www.who.int/news/item/12-01-2023-urgent-action-needed-as-acute-malnutrition-threatens-the-lives-of-millions-of-vulnerable-children). Accessed 11 abr 2023

527 4. Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M (2013) Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*
 528 106:83–89. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-02266-7>

529 5. Modan-moses D, Yaroslavsky A, Kochavi B, Toledano A, Segev S, Balawi F, Mitrany E, Stein D
 530 (2012) Linear Growth and Final Height Characteristics in Adolescent Females with Anorexia
 531 Nervosa. *PLoS One* 7:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045504>

532 6. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, Carter JA, Group ICDS
 533 (2007) Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet*
 534 369:145–157. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60076-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60076-2)

535 7. Hashan MR, Das Gupta R, Day B, Al Kibria GM (2020) Differences in prevalence and associated
 536 factors of underweight and overweight/obesity according to rural-urban residence strata among
 537 women of reproductive age in Bangladesh: Evidence from a cross-sectional national survey. *BMJ*
 538 *Open* 10:1–11. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034321>

539 8. De Onis M, Blössner M, Borghi E (2011) Prevalence and trends of stunting among pre-school
 540 children, 1990–2020. *Public Health Nutr* 15:142–148.
 541 <https://doi.org/10.1017/S1368980011001315>

542 9. Perkins JM, Subramanian S V, Smith GD, Özaltın E (2016) Adult height, nutrition, and population
 543 health. *Nutr Rev* 74:149–165. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv105>

544 10. Golden NH, Abrams SA, Daniels SR, Corkins MR, De Ferranti SD, Magge SN, Schwarzenberg SJ
 545 (2014) Optimizing bone health in children and adolescents. *Pediatrics* 134:e1229–e1243.
 546 <https://doi.org/10.1542/peds.2014-2173>

547 11. de Onis M, Branca F (2016) Childhood stunting: A global perspective. *Matern Child Nutr* 12:12–
 548 26. <https://doi.org/10.1111/mcn.12231>

549 12. Leroy JL, Frongillo EA (2019) Perspective: What Does Stunting Really Mean? A Critical Review
 550 of the Evidence. *Adv Nutr* 10:196–204. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy101>.

551 13. Kueper J, Beyth S, Liebergall M, Kaplan L, Schroeder JE (2015) Evidence for the adverse effect
 552 of starvation on bone quality: A review of the literature. *Int J Endocrinol* 2015:ID 628740.
 553 <https://doi.org/10.1155/2015/628740>

554 14. Prendergast AJ, Humphrey JH (2014) The stunting syndrome in developing countries. *Paediatr Int*
 555 *Child Health* 34:250–265. <https://doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000158>

556 15. Bonjour J, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S (2007) Gene-environment interactions in the skeletal
 557 response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci* 51:64–80.
 558 <https://doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000158>

559 16. Zhu X, Zheng H (2021) Factors influencing peak bone mass gain. *Front Med* 15:53–69.
 560 <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0748-y> REVIEW

561 17. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ,
 562 Boussein ML (2010) Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in
 563 growing mice. *J Bone Min Res* 25:2078–2088. <https://doi.org/10.1002/jbmr.82>

564 18. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D (1995) Childhood growth,

- 565 physical activity, and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res* 10:940–947.
566 <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100615>
- 567 19. Bueno-vargas P, Manzano M, Jos ML, Rueda R (2022) Bone Mass and Improve Bone
568 Microarchitecture during Catch-Up Growth in Rats. *Nutrients* 14(6):
569 <https://doi.org/10.3390/nu14061303>
- 570 20. Bar-Maisels M, Gabet Y, Shamir R, Hiram-Bab S, Pasmanik-Chor M, Phillip M, Bar-Yoseph F,
571 Gat-Yablonski G (2017) Beta palmitate improves bone length and quality during catch-up growth
572 in young rats. *Nutrients* 9:764. <https://doi.org/10.3390/nu9070764>
- 573 21. Masarwi M, Gabet Y, Dolkart O, Brosh T, Shamir R, Phillip M, Gat-Yablonski G (2016) Skeletal
574 effect of casein and whey protein intake during catch-up growth in young male Sprague-Dawley
575 rats. *Br J Nutr* 116:59–69. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001781>
- 576 22. Pando R, Masarwi M, Shtauf B, Idelevich A, Monsonego-Ornan E, Shahar R, Phillip M, Gat-
577 Yablonski G (2014) Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up
578 growth. *J Endocrinol* 223:227–239. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0486>
- 579 23. Guedes P, Zamarioli A, Botega I, Assed R, Butezloff M, Souza Y, Issa J, Ximenez J, Volpon J
580 (2019) Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in
581 growing rats. *Acta Cir Bras* 34:e201900301. [http://dx.doi.org/10.1590/s0102-
582 865020190030000001](http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020190030000001)
- 583 24. Lewis DI (2019) Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top*
584 *Life Sci* 3:675–679. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>
- 585 25. (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition.
586 <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>. Accessed 17 mar 2023
- 587 26. Botega I, Guedes P, Zamarioli A, Assed R, Issa J, Butezloff M, Souza Y, Ximenez J, Volpon J
588 (2019) Bone callus formation is highly disrupted by dietary restriction in growing rats sustaining a
589 femoral fracture. *Acta Cir Bras* 34:e20190010000002. [http://dx.doi.org/10.1590/s0102-
590 865020190010000002](http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020190010000002)
- 591 27. Mazeti C, Furlan M (2008) Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição
592 alimentar desde o nascimento. *Acta Sci Biol Sci* 30:197–204.
- 593 28. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines
594 for assessment of bone microstructure in rodents using micro – computed tomography. *J Bone*
595 *Miner Res* 25:1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>
- 596 29. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR
597 (1987) Bone Histomorphometry : Standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone*
598 *Miner Res* 2:595–610. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>
- 599 30. Alasagheirin MH, Clark MK (2018) Skeletal growth, body composition, and metabolic risk among
600 North Sudanese immigrant children. *Public Health Nurs* 35:91–99.
601 <https://doi.org/10.1111/phn.12386>
- 602 31. Misra M, Prabhakaran R, Miller KK, Goldstein MA, Mickley D, Clauss L, Lockhart P, Cord J,
603 Herzog DB, Katzman DK, Klibanski A (2008) Weight gain and restoration of menses as
604 predictors of bone mineral density change in adolescent girls with anorexia nervosa-1. *J Clin*
605 *Endocrinol Metab* 93:1231–1237. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1434>
- 606 32. Krahenbühl T, Gonçalves EM, Costa ET, Barros Filho A de A (2014) Fatores que influenciam a
607 massa óssea de crianças e adolescentes saudáveis mensurada pelo ultrassom quantitativo de
608 falanges: revisão sistemática. *Rev Paul Pediatr* 32:266–272. [http://dx.doi.org.10.1590/0103-
609 0582201432319](http://dx.doi.org/10.1590/0103-0582201432319)
- 610 33. Boyer PM, Compagnucci GE, Olivera MI, Bozzini C, Roig MC, Compagnucci CV, Alippi RM
611 (2005) Bone status in an animal model of chronic sub-optimal nutrition: a morphometric ,
612 densitometric and mechanical study. *Br J Nutr* 93:663–669. <https://doi.org/10.1079/BJN20041331>
- 613 34. Rossi L, Migliaccio S, Corsi A, Marzia M, Bianco P, Teti A, Gambelli L, Cianfarani S, Paoletti F,
614 Branca F (2001) Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to
615 impaired growth plate activity and inanition. *J Nutr* 131:1142–1146.
616 <https://doi.org/10.1093/jn/131.4.1142>
- 617 35. Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I (2009) Vitamin D and bone physiology:
618 Demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*
619 18:473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2009.00446.x>

- 620 36. Wang X, Fosmire GJ, Gay C V, Leach RM (2002) Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte
 621 proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J Nutr*
 622 132:665–673. <https://doi.org/10.1093/jn/132.4.665>
- 623 37. Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA (2008) Food restriction and simulated
 624 microgravity: effects on bone and serum leptin. *J Appl Physiol* 104:1086–1093.
 625 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01209.2007>
- 626 38. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ, Wang Y, Brisson BK, Vogel LK, Hankenson KD, Adams SL
 627 (2014) Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. *Calcif*
 628 *Tissue Int* 94:621–631. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9843-x>
- 629 39. Von der Mark K, Von der Mark H (1977) The role of three genetically distinct collagen types in
 630 endochondral ossification and calcification of cartilage. *J Bone Jt Surg Br* 59B:458–464.
 631 <https://doi.org/10.1302/0301-620X.59B4.72756>
- 632 40. McCance RA, Mount L (1960) Severe undernutrition in growing and adult animals. 5.* Metabolic
 633 rate and body temperature in the pig. *Br J Nutr* 14:509–518. <https://doi.org/10.1079/BJN19600064>
- 634 41. Ferguson V, Greenberg A, Bateman T, Ayers R, Simske S (1999) The effects of age and dietary
 635 restriction without nutritional supplementation on whole bone structural properties in C57BL/6J
 636 mice. *Biomed Sci Instrum* 35:85–91.

638 Tables

639
 640 **Table 1** Morphological measurements of tibias (mean \pm SD)

641
 642 **Table 2** Assessment of bone density by DXA, and bone microarchitecture by μ CT. Values are means \pm
 643 standard deviation, n=6/group

644
 645 **Table 3** Assessment of bone strength by mechanical test. FRes significantly impaired maximal strength
 646 and tibial stiffness compared to AdL. FRes+Ref partially restored bone mass, but did not reach values
 647 comparable to AdL. Values are means \pm standard deviation, n=6/group

648
 649 **Fig. 1** Comparison of body mass variation (g) among groups. On day 0, body mass was similar in all
 650 groups (A, $p > 0.05$). Although all animals showed an increase in mass over time, those with food
 651 restriction had a smaller gain compared to the control and refeeding groups at 6 weeks (B); 8 weeks (C);
 652 10 weeks (D); and 12 weeks (E). * Indicates a significant difference ($p < 0.05$)

653
 654 **Fig. 2** Illustrates histological sections of proximal tibial growth plates (A) and morphometric parameters
 655 (B, C, D, and E) that were compared using hematoxylin and eosin staining at original 100x and 200x
 656 magnifications. AdL (control rats, left column), FRes (rats with restricted diet, middle column), and
 657 FRes+Ref (rats fed ad libitum after dietary restriction, right column). Thickness and total area did not
 658 show statistically significant differences (B, C). However, the hypertrophic zone of the FRes+Ref group,
 659 indicated by green arrows, was larger than that of the other groups, indicating a trend towards statistical
 660 significance (D). The total volume (TV) of the growth plates was also measured using computed
 661 microtomography (μ CT). No significant difference was found for TV (E). # Indicates a trend towards
 662 statistical significance ($p < 0.09$).

663
 664 **Fig. 3** The TRAP-positive area in the tibias of the FRes group was significantly larger than the AdL
 665 group, but this increase was completely restored by refeeding (A). The area of resorption in the FRes
 666 group was indicated by green arrows and magnified at 100x (B). The FRes group had a significantly
 667 reduced trabecular area compared to AdL, likely due to an increase osteoclastic activity, which was fully
 668 restored by refeeding in the FRes+Ref rats (C). This increase in trabecular area can be seen in Masson-
 669 stained sections as areas outlined in blue, magnified at 50x (D - green arrows). Similarly, the FRes group
 670 showed collagen deposition at the trabeculae than AdL, which was fully restored in the FRes+Ref group
 671 (E), as evidenced by picrosirius-stained slides, magnified at 50x (F - green arrows).

672 Immunohistochemical analysis confirmed the unbalanced bone remodeling in the FRes group, with
 673 greater RANK- and RANK-L-positive areas than AdL, which were reduced by refeeding. The FRes
 674 group exhibits lower OPG-positive area, which was partially restored in the FRes+Ref group (G). Areas
 675 of positive immunostaining for RANK, RANKL and OPG are indicated by green arrows (H). * Indicates
 676 a significant statistical difference ($p < 0.05$). # Indicates a trend towards statistical significance ($p < 0.09$)
 677

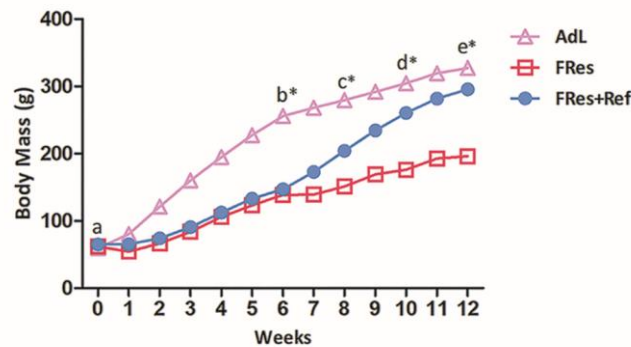
678 **Fig. 4** Improvement of Trabecular and cortical microarchitecture in rat tibiae due to refeeding. 3D
 679 microCT images illustrate the changes in both tissues in the malnourished group that were partially
 680 restored with the reintroduction of regular food supply
 681

682 **Fig. 5** Despite the significant phenotypic changes observed in malnutrition, no significant differences
 683 were detected in the gene expression of Coll1A and Osterix among the groups ($p > 0.05$)
 684

685 **Figures**

686 **Fig 1.**

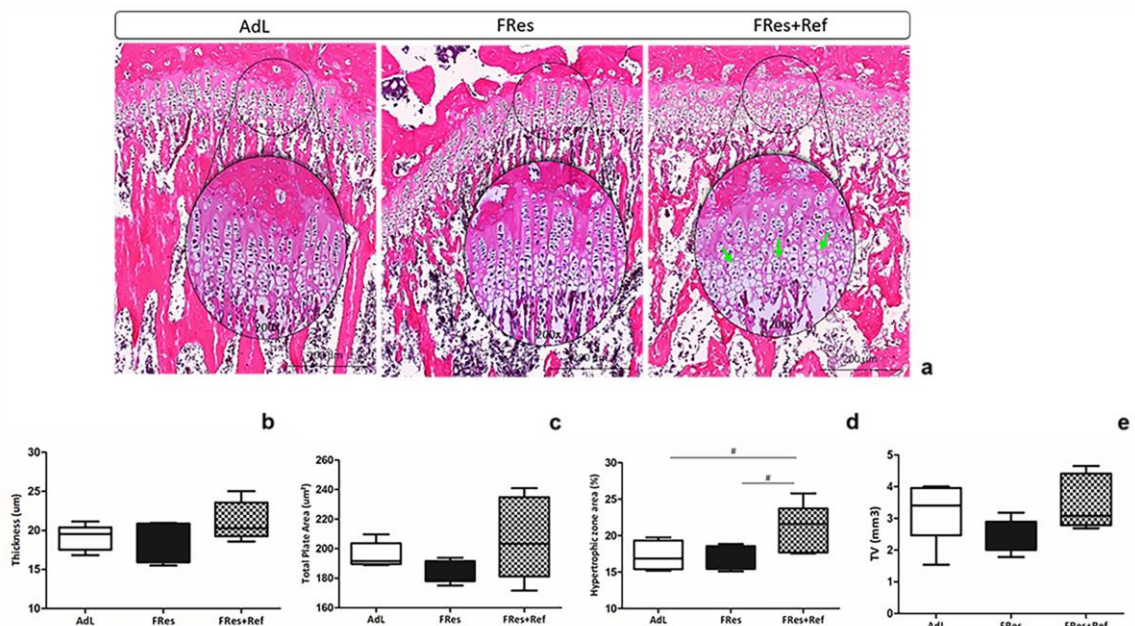
687



688

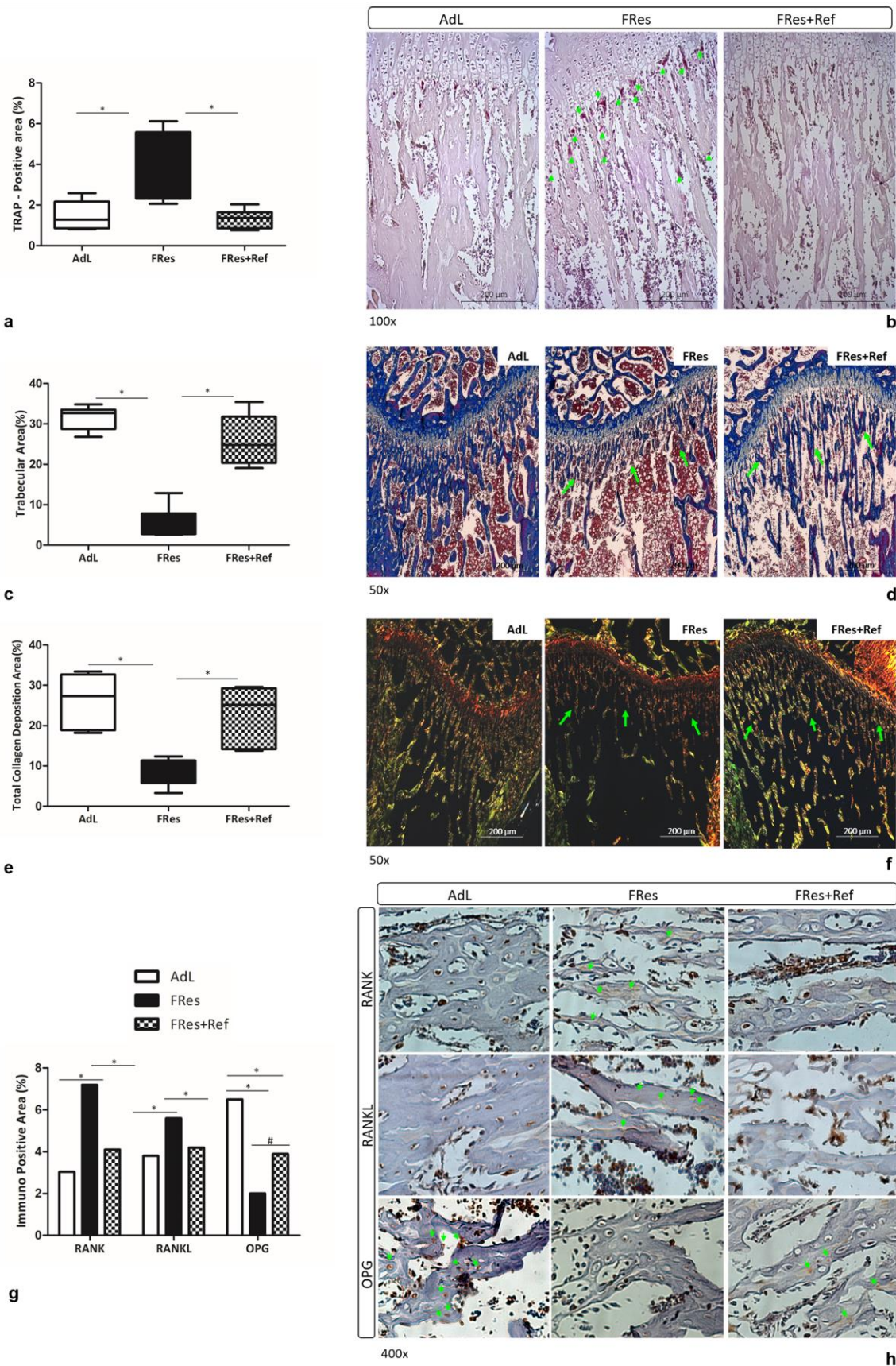
689 **Fig 2.**

690



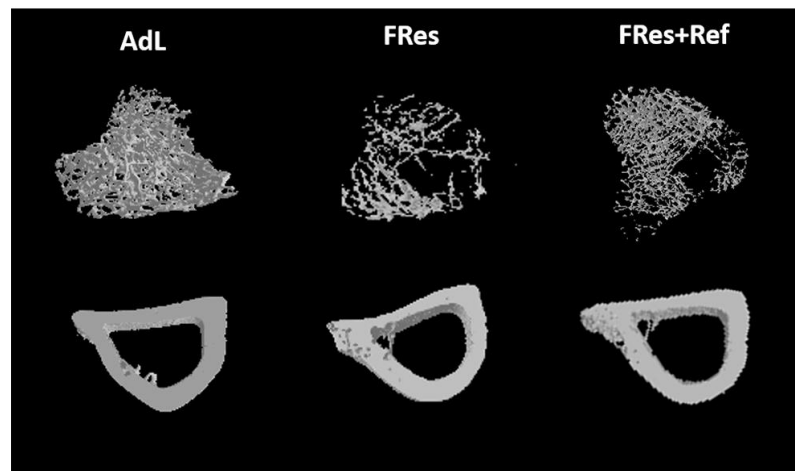
691

692 **Fig 3.**



694 **Fig 4.**

695

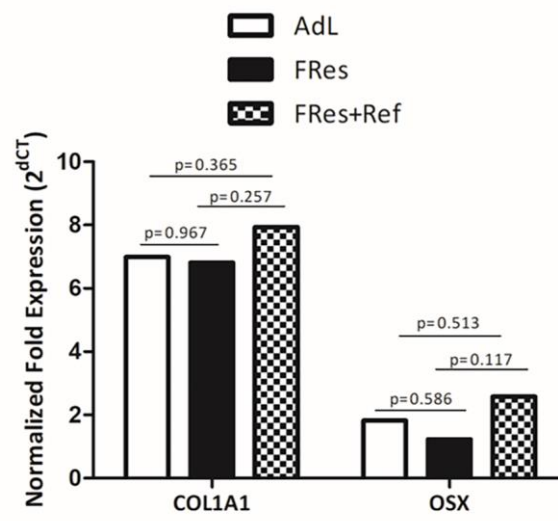


696

697

698 **Fig 5.**

699



700