

FABIANA MARIA DE VASCONCELOS GOUVEIA

**ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO OSSO LONGO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO**

RECIFE

2006

FABIANA MARIA DE VASCONCELOS GOUVEIA

**ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO OSSO LONGO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Patologia da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do
grau de Mestre em Patologia.

Mestranda: Fabiana Maria de Vasconcelos Gouveia

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a. Sílvia Regina Arruda de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

RECIFE

2006

Gouveia, Fabiana Maria de Vasconcelos

Aspectos histomorfométricos do osso longo de animais submetidos à desnutrição / Fabiana Maria de Vasconcelos Gouveia. – Recife: O Autor, 2006.

xiii, 46 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Desnutrição – Tecido ósseo. 2. Dieta Básica Regional (DBR) . I. Título.

591.133.11
612.398

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2007-93



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: FABIANA MARIA DE VASCONCELOS GOUVEIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: . "ASPECTO HISTOMORFOMETRICO DO OSSO LONGO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO.

ORIENTADOR: Silvia Regina Arruda de Moraes

TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TITULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 29 de março de 2006

BANCA EXAMINADORA:

Profª Liriane Baratella Evencio

Profª. Elizabeth da Silveira Neves

Profª. Elizabete Nascimento

“Enfim de tudo ficam três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza que é preciso continuar e a certeza que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”

FERNANDO SABINO

DEDICATÓRIA

Ao meu maior e eterno amor, minha Nina, Maria Julia.

“ ...nem o perfume de todas as rosas é igual a doce presença do teu amor, o amor estava aqui mas eu nunca saberia o que um dia se revelou quando te vi...”

Beto Guedes (Quando te vi)

Aos meus pais e minhas irmãs, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda minha vida.

Ao meu marido Tibério, pela paciência, apoio e principalmente pelo seu grande amor.

À professora Sílvia Moraes, que ultrapassou a sua função de orientadora, com seu carinho, amizade, bom humor, paciência, compreensão, dedicação e pelos seus preciosos ensinamentos, sem tudo isto seria impossível realizar este trabalho.

Ao professor Raul Manhães de Castro, pela sua valiosa contribuição.

À Isabella Rodrigues, uma luz neste caminho, pela sua preciosa ajuda, amizade, e dedicação.

À Ana Cristina, por sua amizade e sua grande contribuição neste trabalho.

Aos colegas de mestrado que apesar do pouco convívio, deixam saudades.

Ao professor Eulálio Cabral Filho, pelas preciosas orientações na análise estatística.

À minha amiga Andréa, por estar sempre ao meu lado.

À minha amiga e “orientadora”, Karla Mônica sua presença sempre traz muita paz.

A Joaquim Sérgio, meu amigo por sua compreensão e incentivo.

À Graça Paiva pela sua ajuda e incentivo.

Às minhas queridas amigas Betânia, Luciana, Andréa e Cristiane, pelos nossos grandes momentos de descontração.

Aos meus alunos de Fisioterapia, por entenderem minhas ausências neste período.

À Silvânia Paz pela confecção das minhas lâminas, pela paciência e pelos ensinamentos.

À equipe de pesquisa da Profa. Sílvia Moraes pela grande ajuda que todos sempre me deram.

Ao meu amigo e mestre José Carlos Filho pela compreensão e apoio.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	8
Geral.....	9
Específicos.....	9
METODOLOGIA.....	10
Animais.....	11
Modelo Experimental.....	11
Obtenção do Peso Corpórea dos Animais.....	13
Sacrifício e Coleta do Material.....	14
Verificação do Peso e da Densidade do Fêmur.....	15
Verificação do Comprimento do Fêmur.....	16
Obtenção do Ângulo entre o Cólo e a Diáfise do Fêmur.....	17
Processamento Histológico das Amostras Ósseas.....	17
Análise Morfométrica do Tecido.....	18
Análise Estatística.....	19
RESULTADOS.....	20
Peso Corpóreo dos Animais.....	21
ANÁLISES MACROSCÓPICAS.....	22
Comprimento do Fêmur.....	22
Peso do Fêmur.....	23
Densidade do Fêmur.....	24

Ângulo Colo-diafisário do Fêmur.....	25
ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS.....	26
Número de Osteócitos.....	26
Área das Lacunas Ósseas.....	27
Fotomicrografia da Cortical do Fêmur.....	27
DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	36
PERSPECTIVAS.....	38
REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

DBR	Dieta Básica Regional
GN	Grupo Nutrido
GD	Grupo Desnutrido
IGF-I	Fator de Crescimento semelhante a Insulina-I
BMU	Unidade Multicelular Básica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma ilustrando os grupos experimentais	12
Figura 2 – Balança digital utilizada para aferição do peso dos animais.....	13
Figura 3 – Anestesia do animal.....	14
Figura 4 – Coleta e dissecação do fêmur direito dos ratos.....	15
Figura 5 – Balança de pesagem hidrostática para aferição da densidade do fêmur	15
Figura 6 – Paquímetro utilizado para mensuração do comprimento do fêmur direito	16
Figura 7 – Aferição do ângulo cólo-diafisário do fêmur direito.....	17
Figura 8 – Micrótopo da marca Leica.....	18
Figura 9 – Efeito da manipulação nutricional sobre o peso corpóreo (g) de ratos com 30 dias de vida.....	21
Figura 10 – Efeito da manipulação nutricional sobre o comprimento do fêmur (mm) de ratos com 30 dias de vida.....	22
Figura 11 – Efeito da manipulação nutricional sobre o peso do fêmur (g) de ratos com 30 dias de vida.....	23
Figura 12 – Efeito da manipulação nutricional sobre a densidade do fêmur (g/cm ³) de ratos com 30 dias de vida	24
Figura 13 – Efeito da manipulação nutricional sobre o ângulo colo-diafisário do fêmur (°) de ratos com 30 dias de vida.....	25
Figura 14 – Efeito da manipulação nutricional sobre o número de osteócitos de ratos com 30 dias de vida.....	26

Figura 15 – Efeito da manipulação nutricional sobre a área das lacunas ósseas (μm^2) de ratos com 30 dias de vida..... 27

Figura 16 – Fotomicrografias da cortical do fêmur de ratos do grupo nutrido (A) e desnutrido (B) 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta padrão LABINA..... 12

Tabela 2 – Composição centesimal da Dieta Básica Regional 13

RESUMO

Analizamos o efeito da desnutrição com a Dieta Básica Regional (DBR) durante o período neonatal sobre a formação do tecido ósseo compacto do osso longo de ratos. Utilizamos 30 ratos machos *Wistar* com idades de 30 dias, divididos em grupo Nutrido (GN) constituído por filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta normoprotéica (“LABINA” – 23% de proteína) e o grupo Desnutrido (GD), constituído por filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta hipoprotéica (DBR – 8% de proteína; TEODÓSIO et al., 1990) e mantidos com a mesma dieta até os 30 dias de vida. Aos 30º dia de vida todos os animais foram pesados em balança digital, anestesiados e realizada a eutanásia dos mesmos. Os fêmures foram desarticulados, dissecados, pesados em balança digital, mensurados em toda a sua extensão com o auxílio de um paquímetro e obtida a densidade através da aferição em balança hidrostática. Foi aferido também o ângulo colo-diafisário com o auxílio de um transferidor. Secções longitudinais da diáfise do fêmur (4µm) foram obtidas e coradas com Hematoxilina-Eosina. O número de osteócitos foi estimado através da contagem, em microscópio óptico com aumento de 400X, em 16 campos microscópicos aleatórios por animal. O área das lacunas ósseas foi estimada a partir captura e análise de 10 campos aleatórios por animal, com os *softwares* Power VCRII e Scion Image for Windows (Beta 4.0.2) respectivamente. A análise do peso corporal (g) (GN= 105 ± 5,11; GD = 23* ± 0,85), peso do fêmur (g) (GN= 0,342 ± 0,015; GD = 0,092* ± 0,005), do comprimento femoral (mm) (GN= 23,17 ± 0,27; GD = 15,37* ± 0,27), da densidade do fêmur (g/cm³) (GN= 1,22 ± 0,02; GD = 1,11* ± 0,03), do ângulo colo-diafisário (°) (GN= 136,73 ± 6,86; GD = 132,00* ± 3,61), do número de osteócitos (GN= 72,64 ± 11,01; GD = 14,78* ± 7,41) e da área das lacunas ósseas (µm²) (GN= 130,06 ± 15,27; GD = 87,04* ± 9,33) demonstrou redução desses parâmetros nos animais desnutridos (*p<0.05; teste t Student e Mann-Whitney). A desnutrição imposta pela Dieta Básica Regional afetou os processos de desenvolvimento e crescimento ósseo do animal, e sugere que a intensidade dessas desordens estaria relacionada com a qualidade e a quantidade protéica da dieta, com a duração da deficiência protéica e com a idade do animal em que a dieta foi implementada.

Palavras-chave: fêmur, dieta básica regional, desnutrição, formação óssea.

ABSTRACT

The effect of malnutrition was analyzed with the Regional Basic Diet (RBD) during neonatal period in the formation of compact bone tissue of long bone of mice. 30 mice *Wistar* at 30 days age were used, mice were divided into two groups, Nourished group (NG) formed by young breastfed by female that received normoproteic diet (“LABINA” – 23% of protein) and Malnourished group (MG), formed by young breastfed by female that received hypoproteic diet (RBD – 8% of protein; TEODÓSIO et al., 1990) and kept with the same diet up to 30 days of life. At 30th day of life all animals were weighed on a digital scale, anaesthetized and it was realized the euthanasia of them. The femurs were disarticulated, dissected, weighed on a digital scale, measured with a pachymeter and the density was measured with a hydrostatic scale. The collo-dyaphisial angle was measured with a protractor. Longitudinal sections of femur dyaphysis (4 μ m) were stained with Hematoxylin-Eosin. The number of osteocytes was estimated by the counting of 16 aleatory microscopic fields with the use of a optical microscope with 400X of magnifying. The area of bone lacuna was estimated by the analysis of 10 aleatory fields, with *softwares* Power VCRII and Scion Image for Windows (Beta 4.0.2) respectively. The analysis of corporal weight (g) (NG= 105 \pm 5,11; MG = 23* \pm 0,85), femur weight (g) (NG= 0,342 \pm 0,015; MG = 0,092* \pm 0,005), femur length (mm) (NG= 23,17 \pm 0,27; MG = 15,37* \pm 0,27), femur density (g/cm³) (NG= 1,22 \pm 0,02; MG = 1,11* \pm 0,03), collo-dyaphisial angle (°) (NG= 136,73 \pm 6,86; MG = 132,00* \pm 3,61), number of osteocytes (NG= 72,64 \pm 11,01; MG = 14,78* \pm 7,41) and the area of bone lacuna (μ m²) (NG= 130,06 \pm 15,27; MG = 87,04* \pm 9,33) showed a decrease of these parameters in malnourished animals (*p<0.05; test t of Student and Mann-Whitney). The malnutrition imposed by the Regional Basic Diet affected the bone development and growth processes of animal and suggests that the intensity of these disorders would be related to the proteic quality and quantity of diet, to the duration of proteic deficiency and the age of animal subjected to the diet.

Key Words: femur, regional basic diet, malnutrition, bone formation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do tecido ósseo pode ser resumido em dois estágios. O primeiro está representado pela formação do esboço do esqueleto de tecido conjuntivo indiferenciado, quando a forma básica dos ossos é pré-formada. Em seres humanos esse estágio se completa no final do desenvolvimento embrionário. No segundo estágio, o esboço conjuntivo sofre gradual ossificação e crescimento, levando a um intenso aumento em tamanho, mas com poucas mudanças na morfologia do osso. Esta fase estende-se do último estágio de vida fetal até a adolescência (ERLEBACHER *et al*, 1995). No desenvolvimento dos ossos longos o esboço conjuntivo consiste de tecido cartilaginoso e a ossificação se inicia na região média, onde um colar ósseo é formado. Em seguida ocorre uma invasão vascular no centro cartilaginoso e uma substituição desse tecido por tecido ósseo trabecular mineralizado. Este centro primário de ossificação expande-se rapidamente em direção às duas extremidades do osso e, posteriormente, o osso trabecular da região média é reabsorvido para dar origem ao canal medular (SALLE *et al*, 2002).

Nos ossos longos, os sítios de crescimento estão localizados em três locais: na epífise, representado pela cartilagem de crescimento, na metáfise com tecido trabecular circundado por osso cortical e na diáfise, onde encontramos apenas osso cortical (SALLE *et al.*, 2002).

A matriz óssea consiste de dois componentes fundamentais distintos: um orgânico e outro inorgânico; tornando-se um material composto e resistente com colágeno e fosfato de cálcio mineral como elementos estruturais (HAM, 1983; BURGER; KLEIN- NULEND, 1999). Além disso, o tecido ósseo está constituído por quatro tipos celulares: as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Estas células, em conjunto, têm a função de produzir, manter, adaptar ou reparar, quando necessário, a matriz óssea mineralizada (WESTBROEK *et al.*, 2001).

Derivadas do mesênquima embrionário, as células osteoprogenitoras possuem potencialidade de diferenciação em osteoblastos (GARTNER; HIATT, 2001). Estes por sua

vez, sintetizam a matriz orgânica do osso e uma parte dessas células torna-se aprisionada na matriz neo-formada do osso transformando-se em osteócitos (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; GARTNER; HIATT, 2001; KNOTHE-TATE; JOSEÉ, 2004).

No osso maduro, os osteócitos e seus processos estão contidos no interior de espaços denominados de lacunas e canais chamados de canaliculos, respectivamente (ARDEN; BURGER; NIJWEIDE, 1994), formando, entre si, junções comunicantes (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; GARTNER; HIATT, 2001; PARFITT, 2002). Os osteócitos são células sensoriomecânicas (WESTBROEK *et al.*, 2001) que transformam estímulos mecânicos resultantes da força gravitacional e muscular sobre o esqueleto, em sinais bioquímicos. Estes sinais são importantes para a ativação dos osteoblastos e dos osteoclastos, no processo de adaptação da massa e estrutura ósseas (PARFITT, 2002; BURGER; KLEIN-NULEND, 1999). O desaparecimento dos osteócitos pode ser em decorrência do envelhecimento, degeneração ou necrose, apoptose e/ou fagocitose pelos osteoclastos (TOMKINSON *et al.*, 1997).

Os osteoclastos são células altamente diferenciadas que realizam a reabsorção óssea (BURGER; KLEIN-NULEND, 1999; TANAKA *et al.*, 2003). São derivadas de células precursoras da linhagem monócito-macrófago sendo encontradas ocupando depressões rasas chamadas lacunas de Howship (GARTNER; HIATT, 2001). Os osteoclastos são atraídos por células em apoptose (BRONCKERS *et al.*, 2000).

Os processos de deposição e reabsorção ósseas acontecem de forma harmoniosa durante o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo caracterizando-se por dois processos distintos: modelagem e remodelação (RAISZ, 1999; GENESER, 2004). Na espécie humana o processo de modelagem é observado até a idade de vinte a vinte e cinco anos, quando o indivíduo atinge o pico de massa óssea. Esta fase se caracteriza pela intensa formação óssea, e as atividades das células osteoblástica e osteoclástica são independentes

(GENESER, 2004). A remodelação inicia-se na primeira infância e se estende até os trinta a quarenta anos de idade (GENESER, 2004). No processo de remodelação os osteoblastos e os osteoclastos trabalham de forma unificada constituindo uma Unidade Multicelular Básica (BMU) com o objetivo de substituir o tecido ósseo envelhecido, reorganizar a estrutura trabecular do tecido ósseo e assegurar a manutenção da homeostase do cálcio (GENESER, 2004). Em ratos a maturidade esquelética ainda não está totalmente definida (BLAND, 2002), entretanto, Harlan (2005) demonstrou que há uma redução na velocidade de crescimento ósseo em ratos por volta dos sete a oito meses (HARLAN, 2006). Desta forma, pode-se dizer que os ratos alcançam sua maturidade esquelética aos 210 dias de vida (EDITORIAL OPINION, 2005).

Diversos estudos em seres humanos (ROOSO; HORMAZABAL; WINICK, 1970; GRANTHAN-McGREGOR; SCHOFIELD; POWELL, 1987; BENEFICE; FOUERE; MALINA, 1999) e em animais de laboratório (RESNICK *et al.*, 1979; MORGANE *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1995) demonstraram que a deficiência nutricional, particularmente durante a gestação e a lactação, causa alterações estruturais e funcionais em vários sistemas orgânico. Sendo assim, a desnutrição é um dos principais fatores não genéticos que podem afetar o desenvolvimento orgânico (MORGANE *et al.*, 1993). No tecido ósseo, essas influências nas primeiras fases do desenvolvimento podem atuar sobre as células progenitoras ou sobre as células recém-formadas (MC.CONNEL, 1990).

É observado que algumas alterações na composição óssea acompanham dietas protéico-calóricas deficitárias, afetando assim a maturidade do osso (HIMES, 1978). As alterações nutricionais como no caso da redução protéico-calórica afetam não somente o crescimento e desenvolvimento em recém-nascidos, mas também retardo no aparecimento de centros de ossificação (EL-MARAGHI; PLATT; STEWART, 1965; SHARDER; ZEMAN, 1973 apud HIMES, 1978). Além disso, o acúmulo de massa óssea não é uniforme ao longo de

todo osso, como por exemplo, no fêmur é notado um menor acúmulo de massa óssea ao longo da diáfise femoral (BONJOUR; CAVERZASIO, 1991).

A deficiência protéica pode também exercer um efeito negativo no balanço de cálcio e no aumento do tecido ósseo (BONJOUR; RIZZOLI, 1996; ORWOOLL, 1992). Estudos em humanos e com experimentação animal demonstraram que a baixa ingestão protéica influencia o acúmulo de massa óssea e a conservação de sua integridade com o avanço da idade; enfatizando que a desnutrição prejudica severamente o desenvolvimento ósseo. O inadequado suprimento protéico apresenta-se, portanto, como fator central na patogênese do retardo de crescimento esquelético e redução de massa óssea observada em crianças desnutridas (BONJOUR *et al.*, 2001).

No sistema nervoso, os fenômenos de diferenciação e migração neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização, que ocorrem com grande velocidade, acontecem em um momento denominado período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso (SMART; DOBBING, 1971), sendo um dos períodos mais sensíveis às agressões (WINICK, 1972; MORGANE *et al.*, 1993) e com conseqüente possibilidade de repercussões permanentes decorrentes de injúrias durante esse período. No rato, esse período inicia-se quase inteiramente no período pós-natal, correspondendo à fase de aleitamento nos primeiros 21 dias de vida (MORGANE *et al.*, 1978; 1993).

Em se tratando de manipulação nutricional no período do desenvolvimento, a Dieta Básica Regional (DBR) mostra-se como um modelo dietético adequado para produzir um estudo experimental de desnutrição (TEODÓSIO *et al.*, 1990). Foi demonstrado que a DBR é uma dieta desbalanceada e deficiente em certos nutrientes principalmente proteínas (7,8%), determinando assim uma dieta hipoprotéica.

Estudos experimentais utilizando uma dieta hipoprotéica, como é o caso da DBR, demonstraram influência severa na curva ponderal de animais submetidos a esta dieta quando

comparados com animais nutridos e que esta diferença se acentua com a idade sem que fossem detectadas diferenças entre os sexos (TEÓDOSIO *et al.*, 1990).

Algumas alterações histoquímicas e na estrutura interna do osso estão associadas à má nutrição protéico-calórica, tais como a diminuição relativa do conteúdo gorduroso e o aumento do percentual de água (HIMES, 1978). Estudos com humanos demonstraram diminuição no peso esquelético e do osso isolado em crianças com desnutrição, quando comparadas a crianças com nutrição adequada de mesma idade (DICKERSON, JOHN, 1969). Com a depleção nutricional protéico-calórica o crescimento ósseo endocondral é prejudicado, acarretando alterações histológicas relacionadas à redução da cartilagem epifisária. A dimensão desta redução da cartilagem epifisária está na dependência do grau e duração da desnutrição (SILBERBERG; SILBERBERG, 1940; LISSUER, 1951; BRAVETTA *et al.*, 1959; SCHNEIDER; ADAR, 1964; apud HIMES, 1978). Além disso, alterações no crescimento ósseo aposicional na superfície periostal, também são associadas às dietas hipoprotéicas e hipocalóricas (HIMES, 1978).

Análises histológicas em ossos longos de animais com carências protéico-calóricas demonstraram redução considerável do número de osteoblastos e aumento do número de osteoclastos na superfície endosteal (SILBERBERG; SILBERBERG, 1940; PRATT; MC.CANCE, 1960; JHA, 1973 apud HIMES, 1978).

Estudos ainda sugerem que dietas hipoprotéica e hipocalórica podem afetar ossos distintos diferentemente, sugerindo que eles reagem variavelmente quando submetidos ao estresse nutricional, provavelmente por apresentarem períodos críticos de crescimento diferenciados (NAKAMOTO; MILLER, 1977).

Diante das inúmeras alterações causadas pela desnutrição no desenvolvimento corporal, permanece atual o interesse sobre a previsibilidade destas alterações e ainda sobre

até que ponto seria possível reverter os efeitos deletérios da desnutrição sobre os eventos de crescimento e desenvolvimento.

Sendo assim, estudos experimentais que demonstrem as conseqüências de agressões, como a desnutrição com a dieta básica regional sobre o tecido ósseo, certamente fornecerão embasamento para estratégias de prevenção e combate de suas seqüelas, possibilitando uma melhor compreensão da influência dos fatores nutricionais sobre variáveis morfofisiológicas.

OBJETIVOS

GERAL

Analisar o efeito da desnutrição protéica, promovida pela dieta básica regional durante o período neonatal, sobre a formação do tecido ósseo cortical do fêmur de ratos.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento corpóreo dos animais no período neonatal por meio da aferição do peso corpóreo.
- Avaliar o crescimento do fêmur durante os 30 primeiros dias de vida, por meio da aferição do peso, do comprimento, da densidade e do ângulo colo-diafisário do fêmur dos animais.
- Avaliar os efeitos da agressão nutricional na estrutura do tecido ósseo cortical por meio da aferição do número de osteócitos e da área das lacunas ósseas do osso cortical do fêmur.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados 30 ratos albinos da linhagem *Wistar*, machos, com idade de 30 dias, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, num ciclo claro/escuro de 12:12 horas (claro das 6 às 18 horas e escuro das 18 às 6 horas), em gaiolas coletivas (de, no máximo, 6 animais/gaiola) e com livre acesso à água filtrada.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE), ofício nº 43/05 e encontra-se de acordo com as normas vigentes.

Modelo Experimental

Segundo a manipulação nutricional os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Nutrido – N (n=15) constituído por filhotes amamentados por nutrizas que receberam uma dieta normoprotéica (“LABINA” – 23% de proteína) e Grupo Desnutrido – D (n=15) composto por filhotes amamentados por nutrizas que receberam a Dieta Básica Regional (DBR) com 8% de proteína (TEODÓSIO *et al.*, 1990) (Tabela 1), (Figura 1). Foi realizado o desmame dos animais no 21º dia de vida, no entanto os dois grupos continuaram a receber as respectivas dietas até a idade de 30 dias quando foram sacrificados.

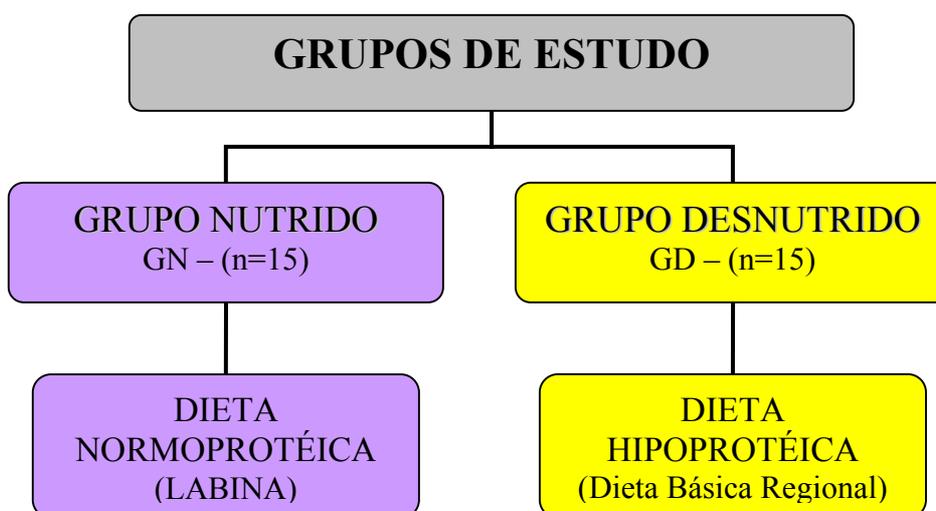


Figura 1: Organograma ilustrando os grupos experimentais segundo a manipulação nutricional e as suas respectivas dietas.

Tabela 1: Composição da dieta padrão “LABINA” (Purina do Brasil), utilizada na alimentação dos animais do grupo nutrido.

ENRIQUECIMENTO (KG DE RAÇÃO) (*)	
Vitamina A	20000UI
Vitamina D ₃	6000 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B ₁₂	10 µg
Vitamina B ₂	8 mg
Pantotenato de Cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0.1 mg
Ácido Fólico	0.5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

NÍVEIS DE GARANTIA (*)	
Umidade (máx.)	13%
Proteína (mín.)	23%
Extrato Etéreo (mín.)	2.5%
Matéria Fibrosa (máx.)	9.0%
Matéria Mineral (máx.)	8.0%
Cálcio (máx.)	1.8%
Fósforo (mín.)	0.0%

Composição Básica (*): Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz cru, Carboneto de Cálcio, Fostato Bicálcico, Sal, Pré-mix.

(*) Segundo Purina do Brasil

Tabela 2: Composição centesimal da Dieta Básica Regional (TEODÓSIO *et al*, 1990)

INGREDIENTES	g %	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DBR					
		Proteínas	Carboidratos	Gordura	Cinzas	Fibras	kcal
Feijão	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Carne seca e salgada	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,50
Gordura da carne seca e salgada	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata doce	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
TOTAL	100,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

Obtenção do Peso Corpóreo dos Animais

O peso corpóreo foi aferido no dia do sacrifício, utilizando-se balança digital (FILIZOLA, modelo MS-3, com capacidade para 3 Kg e sensibilidade de 0,5g), (Figura 2).



Figura 2: Balança digital utilizada para aferição do peso dos animais.

Eutanásia e Coleta do Material

No 30^o dia de vida os animais dos GN e GD foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Ketalar®) (0,25 ml/100g) e com xilazina (Rompum ® – Bayer) (0,05 ml/100g) (Figura 3). A seguir foi feita uma incisão na região abdominal inferior direita até o joelho. O peritônio foi rebatido, assim como órgãos e músculos desta região, e a articulação coxo-femoral evidenciada e os músculos e tendões da região anterior da coxa divulsionados. Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral e removidos os músculos e tendões posteriores. O fêmur foi desarticulado proximal e distalmente com e, em seguida, dissecado completamente para remoção de tecidos moles (Figuras 4A, B e C). Em seguida a remoção do fêmur direito, foi feito um pico na veia cava inferior para eutanásia do animal.



Figura 3: Procedimento da anestesia do animal.

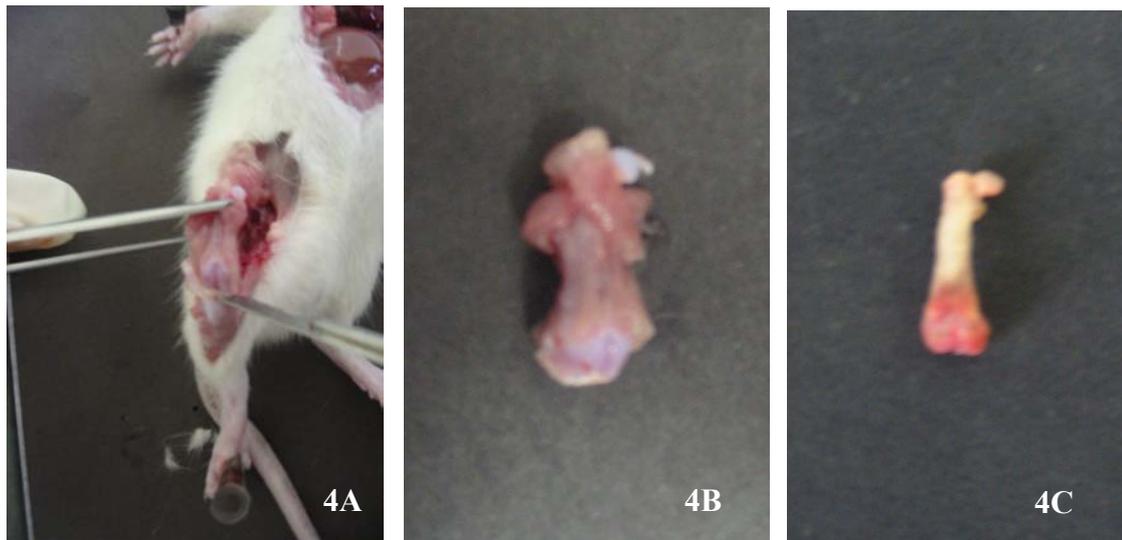


Figura 4: Coleta e dissecação do fêmur direito dos ratos. **4A** – Desarticulações proximal e distal do fêmur; **4B** – Fêmur isolado após desarticulação; **4C** – Fêmur dissecado pronto para as mensurações.

Verificação do Peso e da Densidade do Fêmur

Depois de dissecados, os fêmures foram pesados em balança digital (precisão: 0,1 mg, capacidade máxima 210g) (A& D Co., Japão). A densidade foi aferida com o auxílio de uma balança de pesagem hidrostática (sensibilidade para densidade 0,001g; capacidade máxima de 500g e capacidade mínima de 0,02g) (Marte^R), (Figura 5).



Figura 5: Balança de pesagem hidrostática para aferição da densidade do fêmur.

Verificação do Comprimento do Fêmur

Para a mensuração do comprimento do fêmur, o osso foi posicionado sobre uma superfície lisa com sua face ventral voltada para cima com o auxílio de um paquímetro (marca Western, 0,02mm). A mensuração foi realizada em todo o comprimento do osso desde a cabeça do fêmur até a superfície articular dos côndilos femorais (Figura 6).

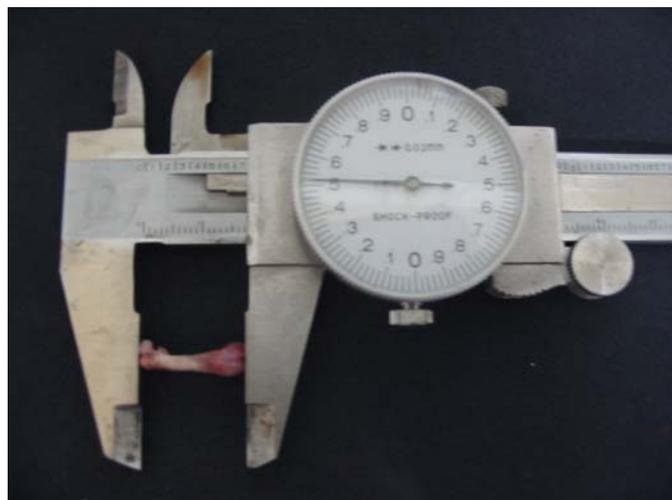


Figura 6: Paquímetro utilizado para mensuração do comprimento do fêmur direito.

Obtenção do Ângulo entre o Colo e a Diáfise do Fêmur

Com o fêmur sobre uma folha de papel apoiada em superfície lisa e face ventral voltada para cima, foram traçadas duas linhas: uma paralela à diáfise do fêmur e outra projetada a partir do centro da cabeça do fêmur. Foram feitos prolongamentos dessas linhas e o ângulo formado foi medido com o auxílio de um transferidor (MAHAISAVARIYA *et al.*, 2002), (Figura 7A e B).

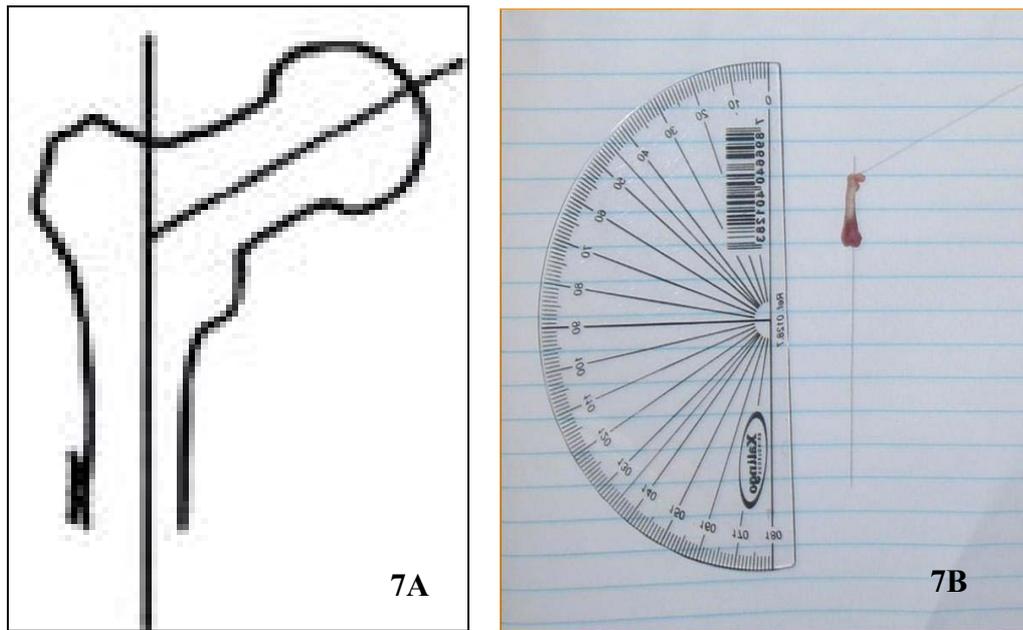


Figura 7: Aferição do ângulo cólo-diafisário do fêmur direito. **7A** – Desenho esquemático da extremidade proximal do fêmur ilustrando a aferição do ângulo colo-diafisário femoral (Fonte: www.scielo.cl). **7B** – Transferidor utilizado para mensuração do ângulo colo-diafisário com o auxílio de um transferidor.

Processamento Histológico das Amostras Ósseas

Os fêmures (06 animais para cada grupo experimental) foram fixados em formol tamponado (10ml de formol a 37% e 27ml de tampão fosfato 0,1 M - pH = 7,0) em volume 50 vezes superior ao da amostra e armazenado em recipientes de vidro. A seguir, foram descalcificados em uma solução de ácido clorídrico a 8% e ácido fórmico a 8% e monitorado até a sua descalcificação completa que variou de acordo com os grupos: grupo nutrido 24 horas e grupo desnutrido 4 horas. Após a descalcificação, os fêmures foram seccionados transversalmente ao nível do terço médio de suas diáfises. A seguir, foram processados pela técnica histológica convencional para inclusão em parafina na seguinte seqüência: desidratação em uma série crescente de álcool (70% a 100%, por 20 minutos cada); diafanização com xilol (1 banho de 20 minutos cada); embebição (1 banho de 30 minutos cada) e inclusão em parafina.

Cortes histológicos longitudinais (coronais) de 4 μ m foram obtidos com auxílio de um micrótomo (marca Leica), (Figura 8), corados pela hematoxilina e eosina (HE) e montados em Entellan (Merckel).



Figura 8: Micrótomo da marca Leica.

Análise Morfométrica do Tecido

Foram confeccionadas 3 preparações de cada animal. O número de osteócitos foi estimado através da contagem em 16 campos microscópicos obtidos aleatoriamente com auxílio de microscópio óptico (Leica) com aumento de 400X.

Para a mensuração da área das lacunas ósseas foram capturadas imagens de 10 campos microscópicos da superfície cortical do osso com o microscópio (OLYMPUS BX50), acoplado a uma microcâmera SAMSUNG (Modelo SHC 410 NAD HL), conectado a um computador (PENTIUM II DE 2000Mhz) contendo placa de captura de imagens e software para morfometria (Power VCR II). Com o programa Scion Image for Windows, Beta 4.0.2, foi realizada à análise morfométrica da área das lacunas ósseas.

Análise Estatística

Os valores foram apresentados como $X \pm DP$. Para a comparação entre os dois grupos, foram empregados os teste t de Student e Mann-Whitney admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos.

RESULTADOS

Peso Corpóreo dos Animais

O peso corpóreo (g) dos animais do GD ($23,0 \pm 0,85$) foi menor ($p < 0,001$) que o do GN ($105,0 \pm 5,11$), (Figura 9).

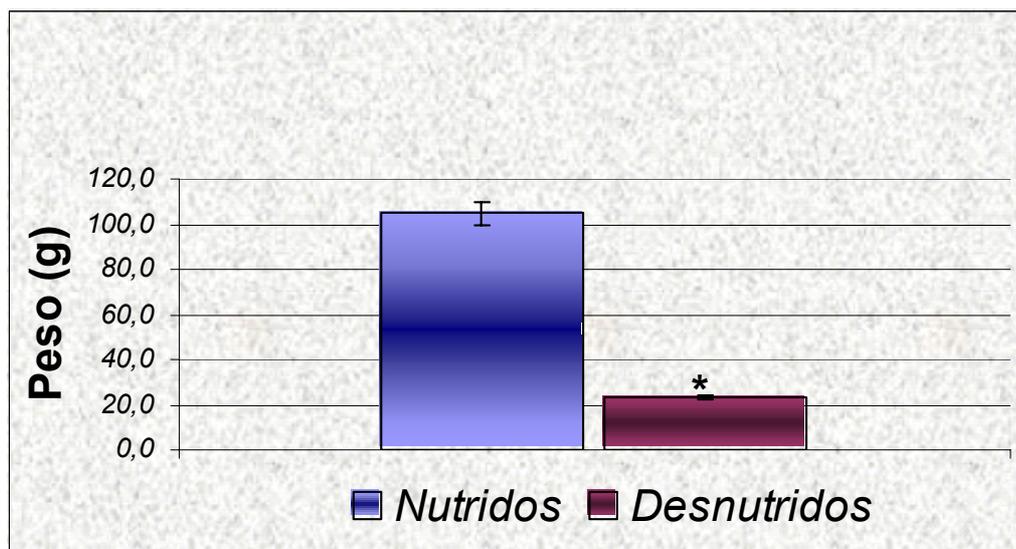


Figura 9: Efeito da manipulação nutricional sobre o peso corpóreo (g) de ratos com 30 dias de vida (teste t de Student). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $105,0 \pm 5,11$); (*GD= $23,0 \pm 0,85$). * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos.

ANÁLISES MACROSCÓPICAS

Comprimento do Fêmur

O comprimento (mm) do fêmur dos animais do GD ($15,37 \pm 0,27$) foi menor ($p < 0,001$) que o do GN ($23,17 \pm 0,27$), (Figura 10).

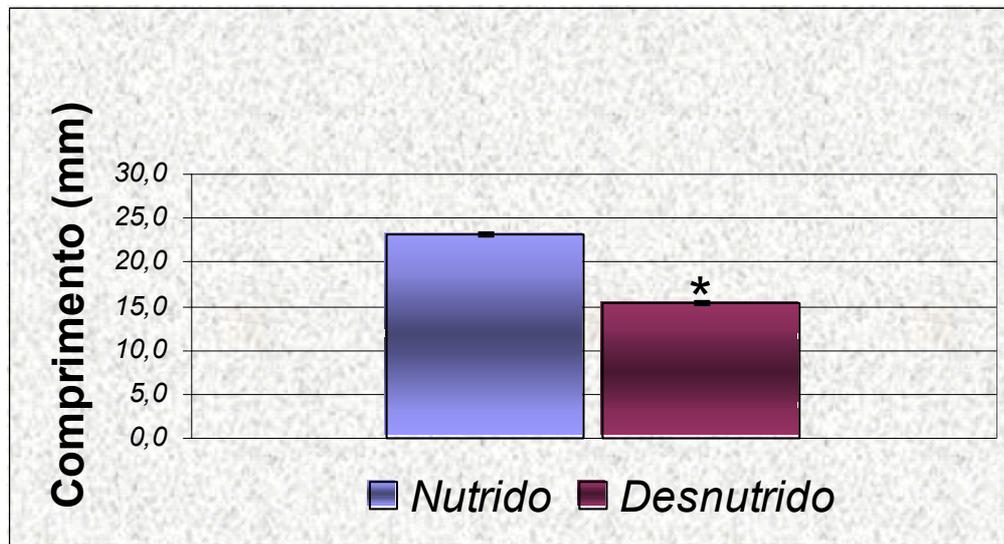


Figura 10: Efeito da manipulação nutricional sobre o comprimento do fêmur (mm) de ratos com 30 dias de vida (teste t de Student). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $23,17 \pm 0,27$); (*GD= $15,37 \pm 0,27$). * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos.

Peso do Fêmur

O peso do fêmur(g) dos animais do GD ($0,092 \pm 0,005$) foi menor ($p < 0,001$) que o do GN ($0,342 \pm 0,015$), (Figura 11).

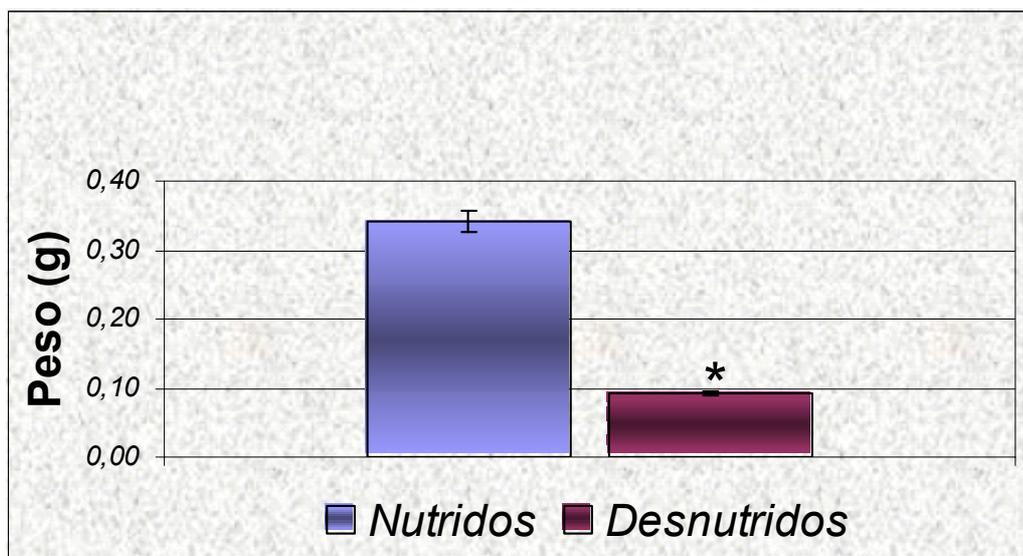


Figura 11: Efeito da manipulação nutricional sobre o peso do fêmur (g) de ratos com 30 dias de vida (teste t de Student). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $0,342 \pm 0,015$); (*GD= $0,092 \pm 0,001$). * Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.

Densidade do Fêmur

A densidade do fêmur dos animais do GD ($1,11 \pm 0,03$) foi menor ($p < 0,001$) que o do GN ($1,22 \pm 0,02$), (Figura 12).

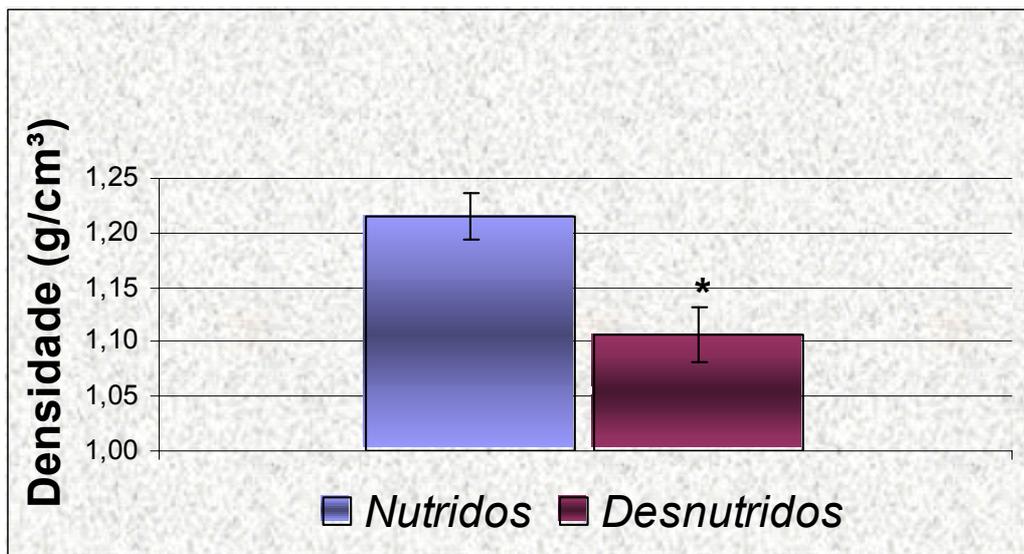


Figura 12: Efeito da manipulação nutricional sobre a densidade do fêmur (g/cm^3) de ratos com 30 dias de vida (teste Mann-Whitney). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $1,22 \pm 0,02$); (*GD= $1,11 \pm 0,03$). * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos.

Ângulo Colo-diafisário do Fêmur

O ângulo colo-diafisário do fêmur dos animais do GD ($132,00 \pm 3,61$) foi menor ($p < 0,04$) que do GN ($136,73 \pm 6,86$), (Figura 13).

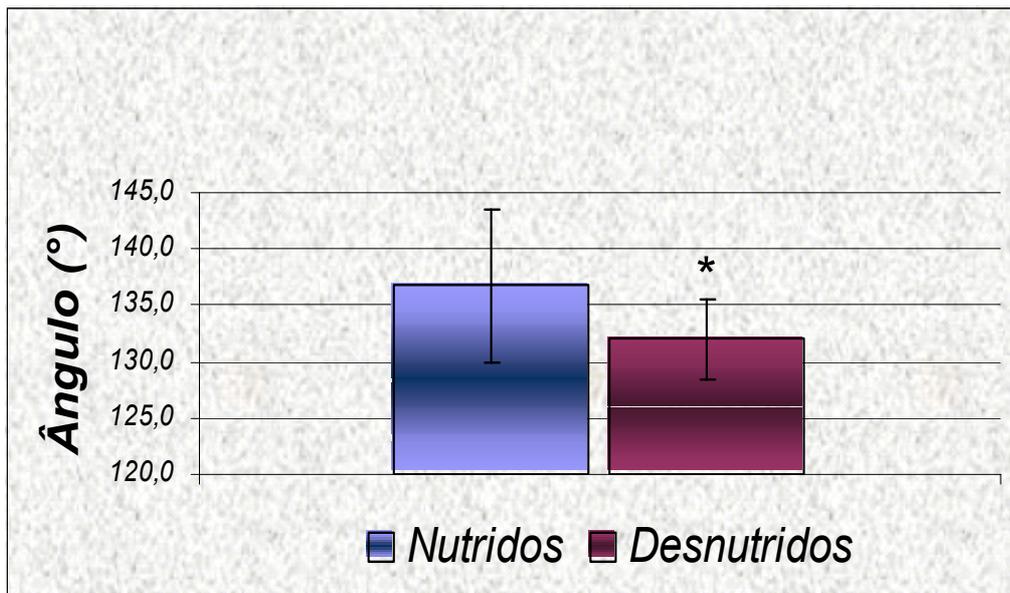


Figura 13: Efeito da manipulação nutricional sobre o ângulo colo-diafisário do fêmur (°) de ratos com 30 dias de vida (teste Mann-Whitney). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $136,73 \pm 6,86$); (*GD= $132,00 \pm 3,61$). * Indica diferença ($p < 0,04$) entre os grupos.

ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS**Número de Osteócitos**

O número de osteócitos na cortical do fêmur dos animais do GD ($14,78 \pm 7,41$) foi menor ($p < 0,001$) que do GN ($72,64 \pm 11,01$), (Figura 14).

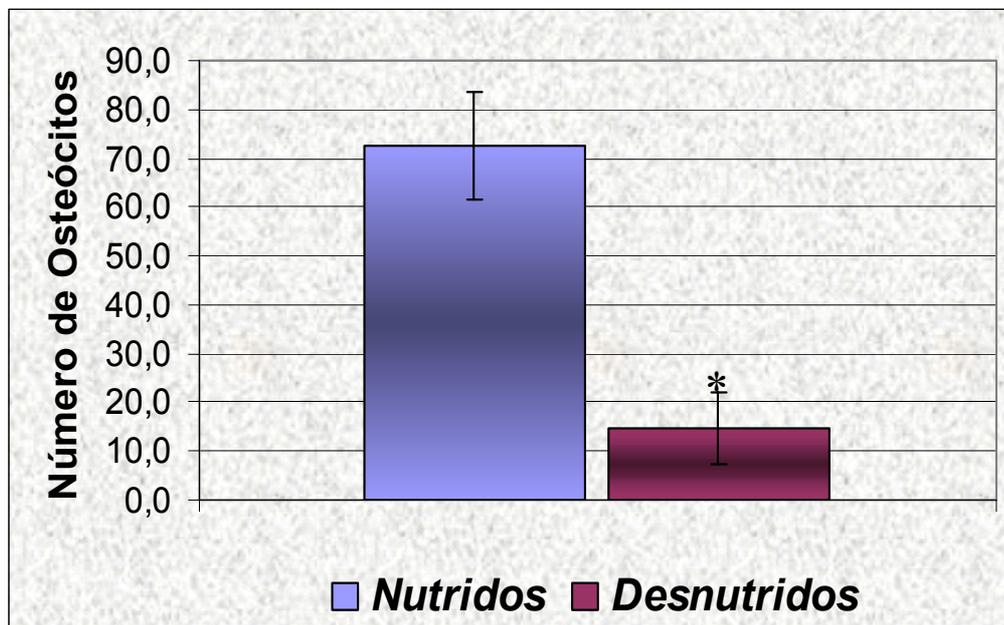


Figura 14: Efeito da manipulação nutricional sobre o número de osteócitos de ratos com 30 dias de vida (teste t de Student). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= 72,64 \pm 11,01); (*GD= 14,78 \pm 7,41). * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos.

Área das Lacunas Ósseas

A área das lacunas ósseas da cortical do fêmur dos animais do GD ($87,04 \pm 9,33$) foi menor ($p < 0,001$) que do GN ($130,06 \pm 15,27$), (Figuras 15 e 16A e B).

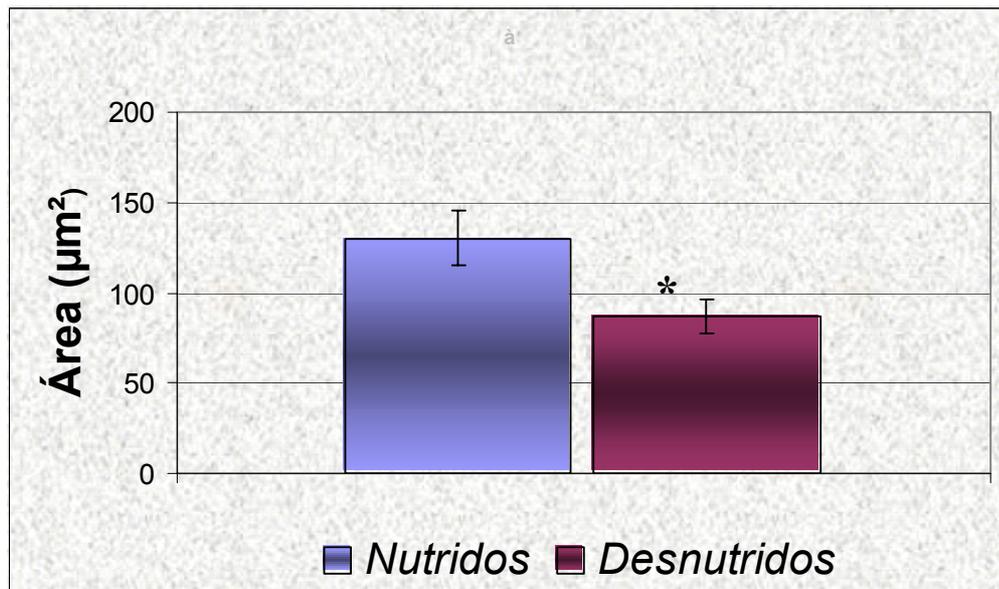


Figura 15: Efeito da manipulação nutricional sobre a área das lacunas ósseas (μm^2) de ratos com 30 dias de vida (teste t de Student). Os dados estão representados em valores médios \pm DP: (GN= $130,06 \pm 15,27$); (*GD= $87,04 \pm 9,33$). * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos.

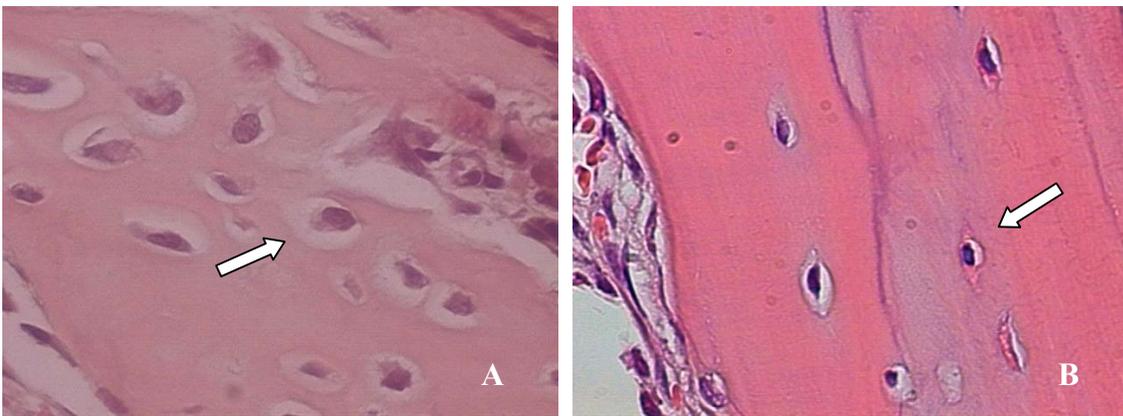


Figura 16: Fotomicrografias da cortical do fêmur de ratos do grupo nutrido (A) e desnutrido (B). As Setas indicam os osteócitos no interior da lacuna óssea (Hematoxilina-Eosina, $\pm 400X$).

DISCUSSÃO

São bem conhecidos os efeitos da desnutrição sobre a evolução ponderal e o crescimento somático (FRANK, 1986; ROOSO; HORMAZABAL; WINICK, 1970; BENEFICE; FOUERE; MALINA, 1999; MORGANE *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1995).

Em nosso estudo, utilizando um modelo de desnutrição com uma dieta multicarenal (DBR) no período de aleitamento, observamos uma redução do peso corporal, do comprimento, do peso e da densidade do fêmur e do ângulo colo-diafisário, reforçando mais ainda a hipótese que a desnutrição promovida no período neonatal, leva a um déficit no desenvolvimento somático do animal e que a severidade desse quadro não depende apenas do valor protéico da dieta ministrada, mas está relacionada a outras variáveis tais como a fase da vida em que foi imposta e o grau do insulto (PLATT; STEWART, 1962).

Alguns autores descreveram redução do peso corporal induzida pela desnutrição protéica a partir do quarto dia de vida pós-natal (SOBOTKA; COOK; BRODIE, 1974; JOHNSON *et al.*, 1991). No estudo de Barros (1999), entretanto, a redução do peso corpóreo foi observada ainda mais precocemente, já no segundo dia de vida pós-natal. Da mesma forma, Golstein; Bond (1979) observaram em seus experimentos que filhotes de ratos com privação protéica no período de aleitamento pesaram significante menos do que aqueles sem privação protéica, e o déficit de peso corporal deles persistiu ate 42 dias mesmo com a retomada de uma nutrição adequada após o desmame.

No nosso estudo o modelo de desnutrição experimental foi induzido no momento de depleção das reservas maternas; comum ao final do período gestacional e agravado pelo elevado gasto nutricional durante o parto (MORGANE *et al.*, 1978; QUEK; TRAYHURN, 1990). Desta forma a manipulação nutricional com a DBR, pode ter causado influência na qualidade do leite materno, sendo esta hipótese apoiada pelo trabalho de Sturman *et al.* (1986) que observaram redução nas quantidades relativas das proteínas do leite em ratas lactantes desnutridas. Além disso, pode ser mais agravado pela diminuição da quantidade de leite

ofertado em decorrência da diminuição do tamanho das glândulas mamárias das ratas (MARÍN *et al.*, 1995).

O período pós-natal é visto como um período de stress fisiológico para o neonato, no qual uma serie de adaptações térmicas e alimentares estão ocorrendo, levando a um alto gasto energético (BOXWELL; AYSON; RAMENOFSKY, 1995). Sendo assim, considerando que neste período a taxa de aumento de peso do neonato é elevada, a ingestão inadequada em qualidade e quantidade de alimento poderá influenciar na redução do peso corporal (RESNICK *et al.*, 1979).

O efeito da desnutrição protéica é também dependente do período de vida em que a mesma é aplicada (ALIPPI *et al.*, 2002), podendo ocorrer em qualquer fase de vida do organismo, isto é, na gestação, no aleitamento ou após o período de crescimento. O efeito específico em cada período poderá ou não ser similar e/ou reversível (LEBENTHAL; ROSSI, 1983).

Muitas alterações no tecido ósseo durante as fases de desenvolvimento e crescimento do esqueleto têm sido relacionadas às deficiências protéicas e calóricas. Se, ao contrário, o período de desnutrição ocorre relativamente atrasado em relação ao período de crescimento, o osso pode ser pouco afetado pelo insulto nutricional (HIMES, 1978).

Evidências apontam, também, que os ossos do esqueleto sejam afetados diferentemente frente ao insulto nutricional. Em um estudo que avaliou o efeito da desnutrição em mandíbulas e tíbias de ratos (NAKAMOTO; MILLER, 1976), observou que as primeiras são afetadas em um período mais precoce do que a tíbia, demonstrando haver diferenças nos períodos críticos de crescimento de acordo com o tipo de osso.

Em nossos experimentos com fêmur de ratos submetidos à dieta básica regional no período neonatal, observamos um déficit no comprimento longitudinal do osso nos trinta

primeiros de vida do animal, dado que confirma a susceptibilidade do osso longo à agressão nutricional imposta neste período.

A supressão do crescimento longitudinal de ossos longos de animais causada pela desnutrição com dietas livres de proteínas durante o período de amamentação, foram descritas por diversos estudos, e ocorre provavelmente mais como resultado de uma diminuição quantitativa de osso formado, do que devido a uma alteração no conteúdo mineral (LEE, 1976; NAKAMOTO; MILLER, 1977; HIMES, 1978; GLICK; ROWE, 1981).

A redução do comprimento de ossos longos em decorrência de uma deficiência protéica tem sido freqüentemente atribuída a uma diminuição da formação óssea (PLATT; STEWART, 1962; NAKAMOTO; MILLER, 1978). Estudos de Glick; Rowe (1981) demonstraram que a desnutrição protéica leva a características histológicas com padrões anormais de formação óssea endocondral, com a zona de cartilagem calcificada apresentando uma redução na invasão vascular com diminuição no número de osteoblastos (HIMES, 1978).

Diminuição nos níveis do Fator de Crescimento como Insulina I (IGF-I) tem sido observada em estados de desnutrição (BONJOUR *et al.*, 2001). O IGF-I é essencial para o crescimento ósseo longitudinal, atuando através da estimulação da proliferação e diferenciação de condrócitos na placa epifisária, desempenhando um papel chave na formação do osso trabecular e cortical (MULLENDER *et al.*, 2005).

Ao analisarmos o peso dos fêmures do grupo desnutrido encontramos uma redução significativa ao compararmos com o peso dos fêmures do grupo nutrido. Nossos achados corroboram com o trabalho de Himes (1978) que observou diminuição no ganho de peso do osso em animais submetidos a dietas deficitárias em proteínas.

A diminuição do peso ósseo pode estar associada tanto à desnutrição na fase intra-uterina como à desnutrição materna pós-parto (HIMES, 1978). Embora o peso ósseo seja

severamente afetado tanto por dietas hipoprotéica como por dietas hipocalóricas, o osso parece preservar sua rigidez mesmo em menor grau do que no osso normal (HIMES, 1978).

Diferenças na susceptibilidade ao insulto nutricional no que diz respeito ao peso ósseo com relação aos diferentes tipos de ossos também são observadas. Na tíbia, a redução do peso do osso, em vinte dias foi de um terço do peso do osso do animal controle, enquanto que na mandíbula esta redução foi de aproximadamente metade do peso do osso do animal controle (NAKAMOTO; MILLER, 1976).

Neste estudo também observamos redução na densidade óssea dos fêmures de animais do grupo desnutrido em relação ao grupo nutrido confirmando os achados de Himes (1978), que também constatou redução na densidade óssea de animais submetidos à dieta hipoprotéica quando comparada com a de animais com dietas normoprotéicas.

A densidade óssea reflete quantidade de massa óssea. A diminuição da densidade óssea do fêmur como apresentada no nosso experimento com a DBR, irá influenciar a resistência óssea, tendo essa hipótese apoio nos estudos de Hengsberger *et al* (2005) que demonstraram que as alterações nas propriedades intrínseca do osso contribuem para o aumento da fragilidade óssea, e os de Bonjour *et al.* (2001) que afirma que a densidade, a massa e a arquitetura óssea são determinantes na aquisição de resistência do osso, podendo servir como indicador da qualidade mecânica do osso (ALIPPI *et al.*, 2002) ou como fator preditivo do risco de fraturas, relacionado à idade do indivíduo (MOURÃO; VASCONCELOS, 2001).

O ajuste entre o acetábulo do quadril e a cabeça femoral é fortemente influenciado pelo ângulo entre o colo e a diáfise do fêmur. Mudanças neste ângulo podem ser observadas, inclusive, durante o desenvolvimento esquelético normal (ISAAC *et al.*, 1997). Estudos de Barros (1999) com ratos desnutridos com a DBR observou alterações no padrão de desenvolvimento motor; essas alterações sugerem influências na modelação óssea. No nosso

estudo, observamos uma redução do ângulo colo-diafisário do fêmur nos animais desnutridos, sugerindo ter havido alterações na estrutura do osso que influenciaram o crescimento do mesmo, entretanto, são escassos os dados sobre as relações deste ângulo com a biomecânica do membro.

Os osteócitos são as células mais abundantes no osso maduro e tem um papel importante na mecanotradução (KNOTHE-TATE; JOSEÉ, 2004; BONEWALD, 2002; MULLENDER *et al.*, 2005), e estão ativamente envolvidos na manutenção da massa óssea (KNOTHE-TATE; JOSEÉ, 2004). Estudos de Bonewald (2002) sugerem que os osteócitos são células inteligentes que direcionam a formação óssea.

Neste estudo, observamos uma redução significativa no número de osteócitos no fêmur de ratos submetidos à desnutrição com a DBR, quando comparados com o número de osteócitos do fêmur de ratos dos animais controle de mesma idade. Este dado sugere que esta redução no número de osteócitos possa ter influenciado a formação óssea como foi demonstrado pela diminuição do comprimento, do peso, da densidade e do ângulo colo-diafisário do fêmur. De acordo com Bonjour *et al.* (2001), uma suficiente ingestão protéica é fundamental para a manutenção da homeostasia do osso. Com base nestes dados podemos supor que a redução no número de osteócitos encontrada no nosso estudo acarretou distúrbios na manutenção do equilíbrio do tecido ósseo.

Tanto estudos experimentais quanto estudos em seres humanos com quadro de osteoporose (SHIJING *et al.*, 2005; BURGER; KLEIN-NULEND, 1999) demonstraram que a deficiência osteocitária pode contribuir para a fragilidade óssea.

A ligação entre atividade osteocitária e osteoblástica tem sido sugerida como sendo o mecanismo regulador da formação óssea (VASHISHTH *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que o número de osteócitos no osso reflete o número de osteoblastos embebidos na matriz óssea. A redução no número de osteócitos em ossos de animais desnutridos pode, portanto, ser

indicador de diminuição no número de osteoblastos disponíveis na matriz, sugerindo que o recrutamento defeituoso na maturação de pré-osteoblastos em osteoblastos é fator que contribui para a diminuição da formação óssea (MULLENDER *et al.*, 2005).

Atividade de formação óssea foi evidente em 45% da superfície endosteal em estudos com tíbias de animais com deficiência protéica, em comparação com 74% daquelas superfícies endosteal de animais controle (GLICK; ROWE, 1981). Uma queda na taxa de crescimento ósseo aposicional também foi relatado por Lee; Myers (1979). Com base nessas informações podemos sugerir que estas alterações do crescimento ósseo aposicional, na superfície endosteal e periosteal influenciam na diferenciação celular reduzindo o número de osteoblastos e o número de osteócito na matriz óssea.

Na atualidade são raros os estudos que analisam a relação entre a área da lacuna osteocitária e o insulto nutricional. Pesquisas nesta área analisam mais as relações entre densidade lacunar e ossos osteoporóticos, como também a relação entre densidade lacunar e microtraumas. Mori *et al.*, (1997) observaram no osso trabecular humano, que um aumento nos microtraumas coincide com uma diminuição da densidade lacunar osteocitária, sugerindo que exista uma relação entre causa e efeito entre densidade lacunar osteocitária e microtraumas (VASHISHTH *et al.*, 2000). Estudos da diáfise femoral em seres humanos também demonstraram que a densidade lacunar osteocitária pode diminuir com a idade (MORI *et al.*, 1997).

A nossa análise no que se refere à lacuna osteocitária foi realizada em relação aos efeitos da agressão nutricional, onde nós observamos uma redução significativa na área lacunar no osso cortical do fêmur dos animais desnutridos quando comparadas com fêmur dos animais controle. Nossos achados divergem daqueles de Glick; Rowe (1981), que demonstraram distribuição e área lacunar osteocitária similar no tecido ósseo de tíbia de animais com deficiência protéica quando comparados com os animais controle em estudos

com microradiografia, em animais desnutridos a partir dos 29 dias de vida. Estas divergências podem estar relacionadas à diferença de metodologia e a idade do animal em que agressão nutricional foi imposta nos dois estudos. Esta hipótese está apoiada em estudos que demonstraram que se a desnutrição ocorre após o período crítico de crescimento, o osso pode ser menos afetado pelo insulto nutricional (HIMES, 1978), o que justifica nossos achados obtidos através de um modelo de desnutrição imposta durante o período de aleitamento dos animais que corresponde ao período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso (MORGANE *et al*, 1978, 1993).

Uma redução na área da lacuna osteocitária relacionado com uma redução na atividade celular foi vista por Mullender *et al.* (1996) em estudos com pacientes osteoporóticos. Esta redução estaria, segundo os autores, relacionada com uma atividade de formação óssea reduzida e/ou redução na duração de vida do osteoblasto.

Apesar do nosso estudo não analisar ossos osteoporóticos, nós observamos que a área lacunar também apresentou uma redução frente a agressão nutricional, levando-nos a supor que esta alteração no tamanho da lacuna também possa ser consequência da influencia do déficit protéico na redução da atividade celular.

A incorporação osteoblástica na matriz óssea e sua subsequente diferenciação em osteócitos envolvem mecanismos, causas e consequências desta conversão, que ainda não foram bem elucidados (JORDAN; LOVERIDGE, 2003).

Diversos fatores estão envolvidos na regulação do crescimento ósseo, entretanto, a adequada nutrição protéica tem se destacado como elemento decisivo no crescimento e na maturação esquelética em animais como foi demonstrado através dos resultados obtidos no presente estudo.

CONCLUSÃO

- Os efeitos deletérios da desnutrição protéica com a dieta básica regional (DBR), aplicada no período neonatal, sobre o crescimento corpóreo.

- A supressão protéica promovida pela administração da DBR promove também retardo no crescimento ósseo aposicional, como foi demonstrado pela redução do comprimento longitudinal, do peso, da densidade e da aferição do ângulo colo-diafisário do fêmur.

- A desnutrição a que foram submetidos os animais nesta fase de vida promove alterações na estrutura do osso cortical com redução do número de osteócitos e na área da lacuna osteocitária.

PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da recuperação nutricional no crescimento do osso longo de animais que foram desnutridos no período neonatal.
- Observar a resistência do tecido ósseo, através de estresse mecânico, no osso longo de animais submetidos à desnutrição no período neonatal.

REFERÊNCIAS

ALIPPI, R. M. *et al.* Effect of protein-energy malnutrition in early life the dimensions and quality of the adult rat mandible. **Archives of Oral Biology**, v.47, p.47-53, 2002.

ARDEN, E. M.; BURGER, E. H.; NIJWEIDE, P. J. Function of osteocytes in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.55, p.287-299, 1994.

BARROS, K.M.T. Efeitos da desnutrição neonatal e/ou do tratamento com agonista 5-HT 1a sobre o desenvolvimento sensório-motor e atividade exploratória em ratos. 1999.107F. Dissertação (Mestrado em Bases Experimentais)-Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1999.

BENEFICE, E.; FOUERE, T; MALINA, RM. Early nutritional history and motor performance of Senegalese children, 4-6 years of age. **Ann. Hum. Biol.** v.26, n.5, p.443-55, 1999.

BLAND, S. Steriod Hormone Receptor expression in bone. **Clin. Sci.** v.98, p. 217-240, 2002.

BONEWALD, L. F. Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. **J Musculoskel. Neuron . Interact.**, v.2, n.3, p.239-241, 2002.

BONJOUR, J. P; RIZZOLI, R. Bone acquisition in adolescence.**Osteoporosis.** p.465-476, 1996.

BONJOUR, J. P.; CAVERZASIO, J. IGF-I, a key controlling elements in phosphate homeostasis during growth. In. E.M. Spencer (ed), *Modern Concepts of Insuline –Like Growth Factors*, p.193-198-Elsevier Science 1991.

BONJOUR J-P. *et al.* Protein intake and bone growth. **Can. J. Appl.Phisiol.** v.26(Suppl), p.S153-S166, 2001.

BOXWELL, J.; AYSON, P.; RAMENOFSKY, M. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. **Physiology and Behavior.** v.57, n.3, p.469-475, 1995.

BRONCKERS, A. L. J. J. *et al.* Phagocytosis of dying chondrocytesby osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labeling. **Cell Tissue Res.**, New York, v.301, p.267 272, 2000.

BURGER E. H; KLEIN-NULEND J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. **Faseb J.**, Bethesda, v.13 (Suppl), p.S101-S112, 1999.

CHEN, J. *et al.* Effect of prenatal malnutrition on release of monoamines from hippocampal slices. **Life Sciences**. v.57, n.16, p.1467-1475, 1995.

DICKERSON, W. T.; JOHN, P. M. V. The effect protein-calorie malnutrition on the composition of the human femur. **J. Nutr.** v. 23, p.917, 1969.

EDITORIAL OPINION. Comparing rats's to human's age. How old is my rat in people years? **Nutrition**. v..21, p.775-777, 2005.

ERLEBACHER, A. *et al.* Toward a molecular understanding of skeletal development. **Cell**.v.8, p.371-378, 1995.

FRANK, S. Metabolic adaptation in protein-energy malnutrition. **J. Am. Coll. Nutr.** v. 5, p. 371-81, 1986.

GARTNER L. P.; HIATT J. L. **Tratado de histologia**. 2.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S. A., 2001.

GENESER, F. **Histologia com Bases Biomoleculares** 3 edição Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ, p.212-230, 2004.

GLICK P. L.; ROWE D. J. Effects of Chronic Protein Deficiency on Skeletal Development of Young Rats. **Calcified Tissue International**, v.33, p.223-231, 1981.

GOLSTEIN, R.S.; BOND, J.T. The effect of maternal protein deprivation on renal development and function in neonatal rats. **J.Nutr.** v.109, p.949-957, 1979.

GRANTHAN-McGREGOR, S.; SCHOFIELD, W.; POWELL, C. Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-years follow up. **Pediatric**.v.79, n.2, p.274-254, 1987.

HAM, A. W. **Histologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1983.

HARLAN, I. Sprague-Dawley growth chart. Disponível em: <<http://www.Harlan.com/strain%20detail/rats/sd.html>>. Acesso em março 2006.

HENGESBERGER, S. *et al.* Intrinsic bone tissue properties in adult rat vertebrae: modulation by dietary protein. **Bone**. v.36, p.134-141, 2005.

HIMES, J. H. Bone Growth and Development in Protein-Caloric Malnutrition. **Rev. Nutr. Diet**, v.28, p.143-187, 1978.

ISAAC, B. *et al.* Prediction of the femoral neck-shaft angle from the length of the femoral neck. **Clinical Anatomy**. v.10, p.318-323, 1997.

JOHNSON, J. D. *et al.* Growth retardation during the suckling period in expanded litters of rats: observations of growth patterns and protein turnover. **Growth, Development and Aging**.v.55, p.263-273, 1991.

JORDAN, G. R.; LOVERIDGE, N. The ratio of osteocytic incorporation to bone matrix formation in femoral neck cancellous bone: An enhanced osteoblast work rate in the vicinity of hip osteoarthritis. **Calcif.Tissue Int**. v.72, p.190-196, 2003.

KNOTHE-TATE, M. L.; JOSÉE, R. A. The Osteocytes. **The International Journal of Biochem.&Cell Biology**. v.36, p.1-8, 2004.

LEBENTHAL, E.; ROSSI, T. Animals models for malnutrition during growth and development. **Nutr. Res**. v.3, p.625-628, 1983.

LEE, M. Skeletal growth and bone size of rats during protein-energy malnutrition and during rehabilitation. **Nutr. Rep. Int**. v.13, p.527-533, 1976.

LEE,M.; MYERS,GS. The effect of protein malnutrition on apositional bone growth in rat. **Experientia** v.35, p.824-845, 1979.

MAHAISAVARIYA, B. *et al.* Morphological study of the proximal fêmur: a new method of geometrical assesment using 3-dimensional reverse engineering. **Med. Eng &Phy.**, v.24, p.617-622, 2002.

MARÍN, M. C. *et al.* Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid meabolism. **Journal of Nutrition**.v.125, p.1017-1024, 1995.

McCONNEL, S. The specification of neural identity in the mammalian cerebral cortex. **Experientia**. v.46, p.922-929, 1990.

MORGANE, P. J. *et al.* The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v.2, p.137-230, 1978.

MORGANE, P. J. *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v.17, p.91-128, 1993.

MORI, S. *et al.* Trabecular bone volume and microdamage accumulation in femoral heads of women with and without femoral neck fractures. **Bone** v.21, p.521-526, 1997.

MOURÃO, A. L.; VASCONCELOS, H. A. Geometria do fêmur proximal em ossos brasileiros. **Acta. Fisiatría** v.8, n.3, p.113-19, 2001.

MULLENDER, M. G. *et al.* Osteocyte density changes in aging and Osteoporosis. **Bone** v.18, n.2, p.109-113, 1996.

MULLENDER, M. G. *et al.* Differences in osteocyte density and bone histomorphometry between men and woman and between healthy and osteoporotic subjects. **Calcif. Tissue Int.** v.77, p.291-296, 2005.

NAKAMOTO, T.; MILLER, S. A. Effect of protein-energy on the growth of mandible and long bone in newborn male and female rats. **J.Nutr.** v.107, p.983-989, 1976.

NAKAMOTO, T.; MILLER, S. A. Effect of protein–energy malnutrition on the growth of mandible and long bone in newborn male and female rats. **J. Nutr.** v.107, p.983-989, 1977.

NAKAMOTO, T.; MILLER, S. A. Physical and Biochemical Changes of the Mandible and Long Bone in Protein-Energy Malnutrition Newborn Rats. **J. Nutr.** v.109, p.1477-1482, 1978.

ORWOOLL, E. S. The effects of dietary protein insufficiency and excess on skeletal health. **Bone**. v.13, p.343-350, 1992.

PARFITT A. M. Targetd and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicelular unit origination and progression. **Bone**, New York, v.30, p 5-7, 2002.

PLATT, B. S.; STEWART, J. C. Tranverse trabeculae and osteoporosis in bone experimental protein-calorie deficiency. **J.Nutr.** v.16, n.4, p.483-493, 1962.

QUEK, V. S.; TRAYHURN, P. Calorimetric study of the energetics of pregnancy in golden hamsters. **Am. J. Physiol.** v.259, p.807-812, 1990.

RAISZ, L. G. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. **Clinical Chemistry.** v.45, n.8(B), p.1353-1358, 1999.

RESNICK, O. *et al.* Development protein malnutrition influences on the central nervous system of the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v.3, p.233-246, 1979.

ROOSO, P.; HORMAZABÁL, J.; WINICK, M. Changes in brain weight cholesterol phospholipids and DNA content in marasmatic children. **American Journal of Clinical Nutrition.** v.23, n.10, p.1275-1279, 1970.

SALLE, B. L. *et al.* Human fetal bone development histomorphometric evaluation of the proximal femoral metaphysis. **Bone** v.30, n.6, p.823-828, 2002.

SHIJING, Q. *et al.* The morfological association between microcracks and osteocyte lacune in human cortical bone. **Bone** v.37, p.10-15, 2005.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developoing brain. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research.** v.28, n.1, 1971.

SOBOTKA, T. J.; COOK, M. P.; BRODIE, R. E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. **Brain Resarch.** v.65, p.443-457, 1974.

STURMAN, J. A. *et al.* Maternal protein malnutrition in the rat: effect on protein and two enzymes in the milk. **Nutrition Research.** v.6, p.437-442, 1986.

TANAKA, S. *et al.* Signal transduction pathway regulation osteoclast differentiation and fuction. **J. Bone Miner. Metab.** , [S.I.], p.123-133, 2003.

TEODÓSIO, N. R. *et al.* A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.** v.45, n.4, p.533-545, 1990.

TOMKINSON, A. *et al.* The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 82, n.9, p.3128-3135, 1997.

VASHISHTH, D. *et al.* Decline in Osteocyte Lacunar Density in Human Cortical Bone is Associated with Accumulation of Microcracks with age. **Bone** v.26, n. 4, p.375-380, 2000.

WESTBROEK, I. *et al.* Expression of serotonin receptors in bone. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.276, n.31, Issue 3, p.28961-28968, 2001.

WINICK, M.(ed.). Current Concepts in Nutrition: Nutrition and Brain Development. **John Wiley & Sons** New York. v.1, 1972.