

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar - UNESP

BRUNA GABRIELE BIFFE

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE MARCADORES
BIOQUÍMICOS DA REMODELAÇÃO ÓSSEA E SOBRE AS PROPRIEDADES
BIOMÉTRICAS, BIOFÍSICAS, DENSITOMÉTRICAS, BIOQUÍMICAS E
BIOMECÂNICAS DE FÊMURES E VÉRTEBRAS DE RATOS DE DIFERENTES
IDADES**

SÃO CARLOS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar - UNESP

BRUNA GABRIELE BIFFE

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE MARCADORES
BIOQUÍMICOS DA REMODELAÇÃO ÓSSEA E SOBRE AS PROPRIEDADES
BIOMÉTRICAS, BIOFÍSICAS, DENSITOMÉTRICAS, BIOQUÍMICAS E
BIOMECÂNICAS DE FÊMURES E VÉRTEBRAS DE RATOS DE DIFERENTES
IDADES**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B591e Biffe, Bruna Gabriele
 Efeitos da restrição alimentar sobre marcadores
 bioquímicos da remodelação óssea e sobre as
 propriedades biométricas, biofísicas,
 densitométricas, bioquímicas e biomecânicas de fêmures
 e vértebras de ratos de diferentes idades / Bruna
 Gabriele Biffe. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
 92 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
 Carlos, 2016.

 1. Desenvolvimento ósseo. 2. Envelhecimento. 3.
 Ratos. 4. Restrição alimentar. I. Título.

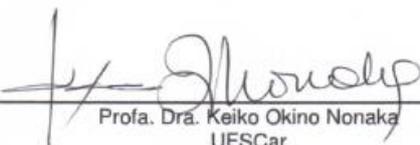


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bruna Gabrielle Biffe, realizada em 12/08/2016:



Profa. Dra. Keiko Okino Nonaka
UFSCar



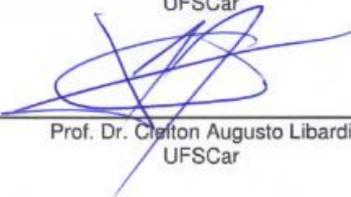
Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada
UNESP



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini
USC



Profa. Dra. Patricia Driusso
UFSCar



Prof. Dr. Clifton Augusto Libardi
UFSCar

“Porque onde estiver o teu tesouro, aí estará também o teu coração” (Mateus 6, 21)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Olair e Shirley** e a minha irmã **Laísa**, pois devo a vocês toda a minha capacidade de amar.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que, conhecendo o profundo do meu coração, colocou anjos para segurarem a minha mão quando estremei e me carregou quando faltaram forças para continuar. Toda a minha gratidão pelo imenso amor, proteção e ternura com que me tem acompanhado ao longo de minha existência. A Ele toda honra e toda glória.

Àqueles que me escutam todas as noites, intercedem por mim, sensibilizam o meu coração e cuja minha devoção e amor só aumentam: **Nossa Senhora das Graças, Nossa Senhora das Dores, Santa Teresinha, Santa Catarina e São Bento**, a minha pura gratidão.

Ao meu querido pai **Olair Biffe**, por me apoiar incondicionalmente em todas as minhas decisões. Pelo valioso exemplo de integridade que, desde sempre, revela-se como minha referência e como meu ilustre professor da vida. Todo o meu respeito, carinho e admiração em tê-lo como pai.

À minha querida mãe **Shirley Biffe**, que, antes de tudo, ensinou-me a preciosidade da comunhão com Deus. A você, que com seus joelhos sobrepostos ao chão, sua dedicação e doação, deu-me a certeza do amar sem limites. Por compreender minhas tão intensas e delicadas sensibilidades. Por viver, sofrer e comemorar comigo todos os momentos. Por me instruir a agradecer cada segundo e vivê-los com sinceridade, alegria e plenitude.

À minha querida irmã **Laísa Biffe**, pela alegria de ter uma amiga cujo laço faz-se eterno. Por me inspirar diariamente e nunca deixar de estar ao meu lado, pois em você, minha pequena, há uma enorme riqueza de todas as grandezas humanas. E, pela ternura, cumplicidade e imenso amor sem os quais não conseguiria chegar a lugar algum.

A vocês todo o meu amor!

À minha tão querida e amada tia **Cida Biffe**, pela amorosa e cuidadosa presença em todos momentos de minha vida. Tenho certeza de que a minha felicidade também faz parte da sua. Minha imensa gratidão!

Aos meus avós **Alfredo Biffe** (*in memoriam*) e **Maria Fernandes Biffe** (*in memoriam*), e ao **Padre Humberto Angeloni** (*in memoriam*), pois apesar da ausência material, cada passo da minha vida possui participação viva e marcante de vocês.

Com muito carinho, agradeço à toda minha família, que participou das minhas angústias, anseios e alegrias e compreendeu minha ausência quando foi preciso.

Ao professor Dr. **Mário Jefferson Quirino Louzada**, agradeço por ter contribuído com a minha formação durante todos esses anos, mas principalmente por ter acreditado em mim desde o início. Seus ensinamentos não se limitam a ensinamentos sobre a ciência, mas são ensinamentos a serem levados para toda a vida. Certamente, uma pessoa iluminada.

Ao professor Dr. **Antônio Augusto Ferreira de Carvalho**, pelo constante incentivo. Pelas lições de humildade, de disciplina e de amizade e por todos os preciosos ensinamentos que sempre me dedicou, na certeza de que tudo isso contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

À querida amiga **Karina Ana Silva**, pelo apoio absoluto em todos os momentos. Pelos momentos firmes e trêmulos, de preocupação e descontração, de alegria e tristeza, de risos e lágrimas, compartilhados com a certeza de uma afetuosa cumplicidade. Muito obrigada por tudo!

Ao **Victor Fabrício**, por ser um querido amigo. Obrigada por ser companheiro de laboratório, de experimentos, de conversas, de conselhos e de muitas risadas. Agradeço a amizade, o carinho, a paciência, a empatia, a generosidade, o constante bom humor e, principalmente, pelo exemplo de pessoa que é.

À **Vilma Clemi Colli**, amiga muito querida, a quem devo, além das risadas, a mão estendida, a disposição em ouvir, aconselhar e contribuir para a concretização desta e de tantas outras realizações. Muito obrigada por tudo! Os agradecimentos se estendem à Laura e ao Matheus.

Ao Bispo Emérito da diocese de São Carlos, **Dom Paulo Sérgio Machado**, por dedicar-se a me ouvir e a me conduzir. Pelo conforto e renovação da esperança que traz com suas firmes e ternas palavras e por nas dúvidas me dar a certeza. Agradeço por todas as vezes que Ele o colocou em meu caminho. Minha eterna gratidão!

Ao **Padre Daniel Cristiano Rett Nicolini**, que talvez desconheça a dimensão de minha gratidão, carinho e admiração. Agradeço por todo o cuidado e carinho com o qual me acolheu, por suas mansas palavras e valiosos gestos, pelo sorriso franco e contagiante, e por nada lhe dizer e tudo se entender. Sua imensa sabedoria, amor e inclinação a Deus transformou-me na fé. Minha profunda, eterna e terna gratidão!

Ao **Padre Jefferson Antônio Monsani**, por, com ternura, apascentar suas ovelhas. Por toda atenção, apoio e amizade dispensados. Pela sensibilidade com que toca em nossos corações quando profere suas palavras, por ser fonte de inspiração na fé e pela presença que revela, o tempo todo, o amor de Deus. Sou-lhe profundamente grata pelo carinho a mim dedicado.

Ao **Padre Marcos Antônio Ghidelli**, por, muitas vezes, mesmo sem saber, falar o que eu precisava ouvir. Agradeço toda a atenção, carinho e cordialidade. Com carinho especial, agradeço por me presentear e acreditar em meu compromisso para com Santa Inês. Sentirei uma imensa saudade das celebrações que sempre trouxeram luz e orientação para os meus dias. Muito obrigada!

Ao **Padre Luigi Fávero**, por acreditar e ser um grande incentivador da busca pelos meus sonhos. Agradeço as preciosas oportunidades, as palavras de carinho e a grande confiança que sempre me foram depositadas. Meus sinceros e afetuosos agradecimentos!

Ao **Diácono Lucas Alan Costa**, pela amizade, cumplicidade, preocupação, cuidado, disposição em ajudar e pelas palavras otimistas e de conforto, que sempre encheram os meus dias de esperança e de coragem para persistir na realização de meus ideais. Muito obrigada por todo o carinho e amizade!

Aos queridos irmãos que cantam e encantam, **Gabriel e Vitor Barreto**, exemplos de união, altruísmo, amizade, e amor e dedicação a Deus. Agradeço a atenção e a carinhosa amizade. Sinto-me agraciada por tê-los por perto.

Às queridas amigas da Paróquia São Benedito - São Carlos, **Iracema, Vera e Clélia**, que não pouparam carinho, atenção, presença e incentivo. Agradeço cada lágrima enxugada com um abraço acolhedor. Minha imensa gratidão!

Ao amigo **Ariel Viscardi**, que trouxe tantas alegrias aos meus dias. Agradeço a amizade, o carinho, a confiança e a presença divertida e companheira, em todos os momentos.

À amiga **Marina Mecca**, pela tão grande amizade. Pelas palavras de compreensão, estímulo, carinho e tranquilidade, e por vibrar junto comigo por cada etapa percorrida.

Ao amigo **Leandro Ruffoni**, por toda a amizade, simpatia e carinho, preocupação e ajuda, e pela descontraída presença nas dificuldades e alegrias. Muito obrigada!

Ao amigo **Charles Wang**, pela amizade, carinho e auxílio. Por nossas inúmeras discussões que, seguramente, foram essenciais para meu crescimento científico.

Ao **Sr. Sérgio Dias**, pela presença amiga e valiosa ajuda que me prestou, sempre torcendo por resultados positivos.

Aos amigos do **Laboratório de Neuroendocrinologia**, **Ariel Viscardi, Charles Wang, Fábio Bogni, Fábio Pastor, José Aparecido Ferreira, Karina Ana Silva, Leandro Ruffoni, Marina Mecca e Victor Fabricio**, pela amizade e companheirismo, pela troca de experiências, incentivo e ajuda na realização deste trabalho.

À querida **Cynthia Castro**, pela amizade, acolhida e gratuidade, desde o primeiro momento em São Carlos. Nunca serei capaz de retribuir toda a ajuda e carinho. Muito obrigada!

Ao amigo **Thiago Moraes**, agradeço imensamente a amizade e a confiança. Em especial, agradeço por ter sido “luz” em tantos momentos, e pela irreverência, carisma, carinho e alegria que me proporciona com sua presença. Muito obrigada!

À amiga **Taís Danilucci**, pela grande amizade construída. Por sua constante preocupação e disponibilidade em ajudar, transmitindo-me a força necessária para seguir meu caminho. Obrigada por tudo!

A amiga **Maria Fernanda Cury**, que transbordou meus dias de alegria. Imensamente grata por sua amizade e pela animada presença em minha vida!

Ao amigo **Fernando Fabrizzi**, por nossa amizade que, mesmo cheia de diferenças, nunca faltou. Agradeço o constante apoio e os tão bons momentos que me proporciona. Muito obrigada!

Aos queridos amigos **Samuel Lourenço** e **Wagner Garcez**. Não é possível lembrar de um e não pensar no outro. A presença que vocês têm em minha vida é fundamental, e sempre foi. Por nossas viagens, conversas, madrugadas de estudo e pela permanente presença, mesmo quando estão longe. Agradeço a amizade e espero tê-los sempre ao meu lado e dentro do meu coração.

Ao querido e grande amigo **Renato Macedo**, pela grandeza e suavidade de nossa amizade, pois nem a distância e nem o tempo mudam a amizade que foi construída. Muito obrigada por tudo!

Agradeço as amigas de longas datas, **Marise e Eliane Negrão, Marly Garcia, Laila Sígari, Priscila Turelo, Priscila Silvério, Talita Baldo, Mônica Antunes, Francine Jelaleti, Laysa Macedo, Nandressa Mendes, Cristiane Manaia, Aline Yamamoto, Natália Arcos, Viviane Colato e Tânia Mendes**, pois, mesmo com minhas ausências, permanecem sempre ao meu lado.

Às amigas **Fabiana Borges, Flávia Machado, Vanessa Rosana, Dayane Costa e Ludmilla Borela**, por terem participado de tantos momentos especiais da minha vida. Pelos aniversários, teatros, shows, cachoeiras, fazendas, pub's, bares, restaurantes e pelos

incansáveis e memoráveis “frios das madrugadas”. Com muito carinho, agradeço a Faby e a Flavinha, pela generosa acolhida e por nossas inesquecíveis festas, cheias de amigos e alegria, no apartamento mais animado da Sete de Setembro.

À amiga **Carolina Rúbio Vicentini**, pela incessante paciência e carinho com que suporta minhas inquietudes. Agradeço e espero, de coração, honrar sua amizade e confiança.

À amiga **Carolina Frade**, pelas palavras sábias e de conforto durante as dificuldades e, sobretudo, pela imensa amizade.

Aos queridos amigos da UNESP, **Sérgio Diniz Garcia, Wagner André Pedro e Pedro Florindo**, pela atenção e torcida e pela alegria que trazem ao meu coração todas as vezes em que nos encontramos.

À querida **Carla Komatsu**, por oferecer-me muito mais do que mereço. Agradeço as oportunidades, a compreensão, a solicitude e o carinho que, desde sempre, me oferece. Muito obrigada!

Aos **professores, orientadores e funcionários do UniSalesiano**, pelo apoio e grande torcida. Em especial, agradeço a **Solange Magnani, Cíntia Lavorato e Gabriela Miguel**, pela valiosa colaboração dada por meio de palavras de incentivo e carinho.

Aos meus queridos **alunos**, os de ontem, os de hoje e os de amanhã. Sinto-me agradecida por ter contado com a torcida e o carinho de vocês. Prometo não guardar nenhum dos meus, ainda que poucos, conhecimentos e transmiti-los com muito amor e entusiasmo a todos vocês.

A todos os meus **amigos pós-graduandos**, em especial à **Ana Carolina Martin, Grazielle Pisani e Jorge Oishi**, pelo companheirismo, ajuda e fraterna convivência.

Aos **docentes e funcionários** do Departamento de Ciências Fisiológicas, agradeço toda a atenção e contribuição dispensadas.

Ao funcionário da pós-graduação, **Alexandre Prata Vieira Chiva**, pela cordialidade e disposição em ajudar.

À **Universidade Federal de São Carlos**, por seu acolhimento e por ter sido instrumento para realização deste estudo.

Aos professores da **banca de qualificação e da defesa**, pela atenção e dedicação com que corrigiram este trabalho.

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que, em algum momento deste trajeto, caminharam comigo, pois este trabalho não é resultado de um esforço individual.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço, em especial, a minha orientadora, professora Dra. **Keico Okino Nonaka**, pela referência e exemplo a serem seguidos na vida acadêmica. Por ter aberto as portas de seu laboratório, me recebendo de braços abertos para que eu pudesse continuar minha caminhada. Meus sinceros e carinhosos agradecimentos pela condução deste estudo, pela importante contribuição para com minha formação e pelas oportunidades, ensinamentos, atenção, seriedade, segurança e confiança dispensadas a mim e à realização deste trabalho.

RESUMO

A restrição alimentar promove mecanismos adaptativos que exercem efeitos benéficos sobre doenças e longevidade. O tecido ósseo é, também, alvo dos efeitos proporcionados pela redução da ingestão da dieta. Entretanto, existem controvérsias quanto às respostas que essa intervenção pode ocasionar na quantidade e qualidade óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da restrição alimentar de 30% sobre parâmetros ósseos, de fêmures e vértebras, de ratos de diferentes idades. Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* machos, linhagem Holtzman, com 38 dias, 4 e 16 meses de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=8-10 por grupo), sendo três grupos controles (C38, C4 e C16) e três grupos restritos (R38, R4 e R16). Animais controles tiveram livre acesso à ração e água. Animais restritos foram submetidos à dieta de restrição alimentar de 30%, sendo alimentados com 70% do consumo *ad libitum* do grupo controle. O período experimental para todos os grupos foi de 6 semanas. Foram analisados marcadores bioquímicos da formação (osteocalcina) e reabsorção óssea (TRAP), e propriedades biométricas (comprimento, diâmetro maior e menor do fêmur; altura da vértebra), biofísicas (peso úmido, seco, imerso e das cinzas, volume ósseo, densidade óssea e mineral, porcentagem de água, de material mineral e orgânico), bioquímicas (conteúdo de cálcio e fósforo), densitométricas [aDMO fêmur (osso todo, epífise proximal, diáfise e epífise distal) e vértebra] e biomecânicas (carga máxima, carga máxima até fratura, deslocamento até fratura, tenacidade e rigidez femoral; carga máxima, tenacidade e rigidez vertebral), além da massa corporal e massa adiposa abdominal. O ganho de massa corporal e adiposa abdominal em animais restritos foi inferior ao dos animais que tiveram alimentação *ad libitum*. Animais restritos com 38 dias e 4 meses apresentaram redução da formação, enquanto restritos com 16 meses apresentaram redução da reabsorção óssea. A restrição alimentar induziu reduções dos parâmetros biométricos, pesos biofísicos, volume ósseo e conteúdo de cálcio e fósforo femoral em animais restritos do grupo 38 dias. Ainda, comprimento femoral e conteúdo de cálcio foram reduzidos em restritos do grupo 4 meses. A densidade areal foi reduzida em fêmures e diáfise femoral de restritos com 38 dias, e aumentada na epífise proximal femoral de restritos com 16 meses. As propriedades biomecânicas femorais não foram afetadas com a dieta de restrição alimentar em nenhum dos grupos experimentais. Em relação à análise vertebral, a altura vertebral, peso úmido, peso imerso, volume ósseo e porcentagem de água foram menores em restritos do grupo 38 dias. Ademais, a altura vertebral foi reduzida em restritos do grupo 4 meses. No entanto, densidade mineral, porcentagem de material mineral e carga máxima foram superiores em restritos do grupo 38 dias. A densidade areal, tenacidade e rigidez vertebral não se alteraram com a restrição. A dieta de restrição alimentar resultou em prejuízo do desenvolvimento ósseo femoral com marcante perda em ratos pré-púberes, inconsistentes alterações em ratos adultos jovens e potenciais benefícios em ossos de ratos idosos. Além disso, a restrição influenciou positivamente propriedades ósseas vertebrais.

Palavras-chaves: Desenvolvimento ósseo. Envelhecimento. Ratos. Restrição alimentar.

ABSTRACT

The food restriction promotes adaptive mechanisms that have beneficial effects on diseases and longevity. Also, bone is target of effects provided by the reduction of diet intake. However, there are controversies about the responses that this intervention can result on bone quantity and quality. The aim of this study was to evaluate the effect of food restriction 30% on bone parameters of femurs and vertebrae from rats of different ages. Male *Rattus norvegicus albinus* rats, Holtzman lineage, aged 38 days, 4 and 16 months of age were used. The animals were divided into six groups (n=8-10 per group), three being control groups (C38, C4 and C16) and three groups on restricted diet (R38, R4 and R16). The control animals had free access to food and water. The restricted animals were submitted to food restriction of 30% being fed with 70% of the *ad libitum* consumption of the control group. The experimental period for all groups was 6 weeks. Analysis was performed in biochemical markers of formation (osteocalcin) and bone resorption (TRAP), and in parameters biometric (length, largest and smallest diameter of the femur, vertebral height), biophysical (wet, dry and immersed weight, and of ashes, bone volume, bone and mineral density, percentage of water, mineral and organic matter), biochemical (calcium and phosphorus content), densitometric (aDMO of the femur [all bone, proximal epiphysis, diaphysis and epiphysis distal] and the vertebra), biomechanical properties (maximum load, maximum load until fracture, displacement until fracture, femoral tenacity and stiffness; spinal maximum load, tenacity and stiffness), in addition to body mass and abdominal fat mass. The body mass and fat mass gain in restricted animals was lower than that of animals which had food *ad libitum*. The food restriction in animals with 38 days and 4 months of age presented decreased bone formation, while the ones with 16 months presented decreased bone resorption. Food restriction induced reduction of the biometric parameters, biophysical weights, femoral bone volume and calcium and phosphorous content in the restricted group aged 38 days. In addition, femoral length and calcium content were reduced in the restricted group aged 4 months. The restricted diet induced reduced areal density in femurs and femoral diaphyseal of 38 days rats, and increased aDMO of femoral epiphysis proximal from 16 months rats. The femoral biomechanical properties were not affected by the food restriction diet in any of the experimental groups. As regards the vertebral analysis, vertebral height, wet weight, immersed weight, bone volume and percentage of water were lower in the restricted group aged 38 days. Moreover, vertebral height was reduced in the restricted group aged 4 months. However, mineral density, percentage of mineral matter and maximum load were higher in the restricted group aged 38 days. The areal density, vertebral tenacity and stiffness were not altered by the food restriction. The food restriction diet resulted in damage to femoral bone development with remarkable loss in prepubertal rats, inconsistent alterations in young adult rats and potential benefits to bones of elderly rats. In addition, restriction had a positive influence on vertebral bone properties.

Key Words: Bone development. Aging. Rats. Food restriction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gaiolas metabólicas para ratos utilizadas durante todo o período experimental.	41
Figura 2. Densitômetro DPX-ALPHA.	45
Figura 3. Software especial para pequenos animais usado para a análise de dados densitométricos.....	45
Figura 4. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures e de compressão em vértebras lombares de ratos	47
Figura 5. Representação esquemática da curva Carga x Deformação obtida com o teste de flexão a três pontos dos fêmures e compressão das vértebras de ratos.	47
Figura 6. Ganho de massa corporal durante o período experimental dos animais dos diferentes grupos experimentais.	51
Figura 7. Média do consumo energético semanal dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	52
Figura 8. Ganho de massa adiposa abdominal durante o período experimental dos animais dos diferentes grupos experimentais.	52
Figura 9. Parâmetros biométricos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	53
Figura 10. Parâmetros biofísicos do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	55
Figura 11. Parâmetros biofísicos da vértebra dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	58
Figura 12. Densitometria óssea femoral dos animais dos diferentes grupos experimentais.	59
Figura 13. Densitometria óssea vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
Figura 14. Densitometria óssea de diferentes regiões femorais dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	61
Figura 15. Bioquímica óssea femoral e vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62
Figura 16. Concentração plasmática de osteocalcina dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	63

Figura 17. Concentração plasmática de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	64
Figura 18. Parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	65
Figura 19. Parâmetros biomecânicos da vértebra dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de ração comercial para roedores.....	40
Tabela 2. Massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.	50
Tabela 3. Média do consumo de ração e água, e excreção de urina e fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais	51
Tabela 4. Pesos biofísicos (peso úmido, imerso, seco e das cinzas) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.	54
Tabela 5. Pesos biofísicos (peso úmido, imerso, seco e das cinzas) das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais	57

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

aDMO - Densidade mineral óssea areal

ANOVA – Análise de variância

BMU - Unidade básica multicelular

BRUs - Unidades de remodelao óssea

C38 - Controle 38 dias

C4 - Controle 4 meses

C16 - Controle 16 meses

CEEA - Comitê de tica Experimental Animal

Cl⁻ - Cloreto

cm – Centímetro

cm² - Centímetro quadrado

cm³ - Centímetro cúbico

DNA - cido desoxirribonucleico

DMO - Densidade mineral óssea

DP - Desvio Padrão

DXA - Densittrica por absorciometria de raios X de dupla energia

ELISA - Imunoensaio em sanduíche com enzima ligada

EROs - Espécies reativas de oxignio

g - Gramas

g/cm² - Grama por centímetro quadrado

GH - Hormônio do crescimento

H⁺ - Hidrognio

IGF-I - Fator de crescimento semelhante  insulina-I

IL-6 - Interleucina 6

J - Joule

Kcal - Quilocalorias

kgf - Quilograma força

kN - Quilo Newton

L5 – Quintas vértebras lombares

L6 - Sextas vértebras lombares

M-CSF - Fator de estimulação das colônias de macrófagos

MEC - Matriz extracelular

mL – Mililitro

mg - Miligramas

min - Minuto

MicroCT - Microtomografia Computadorizada

mm - Milímetros

N - Newton

n - Número de animais

ng/mL – Nanogramas por mililitro

N/mm - Newton por milímetro

O₂ - Oxigênio

O₂⁻ - Ânion superóxido

OC - Osteocalcina

OPG - Osteoprotegerina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

Pi - Peso imerso

Pm - Peso do material mineral (cinzas)

Ps - Peso seco

Pu - Peso úmido

R38 - Restritos 38 dias

R4 - Restritos 4 meses

R16 - Restrito 16 meses

OH· - Radical hidroxila

RANK – Receptor ativador do fator kappa B nuclear

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

vs - Versus

TAB - Tecido adiposo branco

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

°C - Graus Celsius

ρ - Densidade da água

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Tecido Ósseo	25
1.2 Restrição Alimentar	33
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVO	39
4 MATERIAIS E MÉTODO	40
4.1 Animais	40
4.2 Acompanhamento Experimental	41
4.3 Eutanásia	41
4.4 Parâmetros Analisados	42
4.4.1 Tecido Adiposo Abdominal	42
4.4.2 Componentes Plasmáticos	42
4.4.2.1 Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea.....	42
4.4.3 Componentes Estruturais – Ossos (Fêmur e Vértebra)	42
4.4.3.1 Biometria Óssea.....	42
4.4.3.2 Biofísica Óssea	43
4.4.3.3 Densitometria Óssea	44
4.4.3.4 Bioquímica Óssea	45
4.4.3.5 Biomecânica Óssea.....	46
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6 RESULTADOS	50
6.1 Acompanhamento Experimental	50
6.2 Biometria femoral e Vertebral	53
6.3 Biofísica femoral e Vertebral	54
6.3.1 Biofísica Femoral	54
6.3.2 Biofísica Vertebral.....	56
6.4 Densitometria Óssea Areal Total – Femoral e Vertebral	59
6.4.1 Densitometria Óssea Areal Femoral por Regiões– Epífise Proximal, Diáfise e Epífise Distal	60
6.5 Conteúdo de Cálcio e Fósforo – Femoral e vertebral	61
6.6 Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea – Osteocalcina e TRAP	62
6.7 Biomecânica Femoral e Vertebral	64
6.7.1 Biomecânica Femoral	64

6.7.2 Biomecânica Vertebral	66
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÕES.....	76
9 REFERÊNCIAS	77
ANEXO I - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido vivo, metabolicamente ativo, em equilíbrio dinâmico, e crucial para o desempenho eficiente, ao longo da vida, de importantes funções, tais como formação e manutenção do esqueleto, suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais, locomoção, alojamento da medula óssea e reserva mineral (principalmente para os minerais cálcio e fosfato) (DE BAAT et al., 2005; ROBLING, 2006). Além disso, o tecido ósseo é considerado órgão endócrino responsivo a distintas influências e sujeito à regulação tanto periférica como central (FUKUMOTO; MARTIN, 2009; GUNTUR; ROSEN, 2012).

Histologicamente, a formação do tecido ósseo ocorre a partir de uma matriz extracelular (MEC) altamente organizada e que se diferencia das demais matrizes uma vez que essa matriz é calcificada. Adicionalmente, o tecido ósseo é formado por um complexo e heterogêneo grupo de células ósseas (DE BAAT et al., 2005; DATTA, 2008).

A matriz óssea se distingue em dois tipos de componentes: a matriz orgânica e sais minerais inorgânicos. A matriz orgânica corresponde a 30% da massa óssea, exibindo em sua constituição predominância proteica, representada, principalmente, por fibras colágenas tipo I (94%) que são organizadas de forma ordenada. Outras proteínas (4%) e substâncias não colágenas (1%) também determinam a constituição orgânica da matriz (FERNANDEZ et al., 2006). Estes constituintes são determinantes da elasticidade óssea (CURREY, 1998). Sais minerais inorgânicos correspondem a 70% da massa óssea sendo constituídos basicamente por fosfato e carbonato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita (FERNANDEZ et al., 2006; DATTA, 2008) e por menores quantidades de outros minerais, como o magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a). Estes constituintes responsabilizam-se pela resistência à força de compressão e rigidez (CURREY, 1998; DOBLARÉ et al., 2004) e assumem funções metabólicas, como reservatório de íons e controle da homeostase mineral (BOIVIN; MEUNIER, 2002).

A osteocalcina (OC), um peptídeo secretado pelos osteoblastos maduros, é a forma mais abundante de substância não colágena encontrada na matriz óssea, onde sua

concentração reflete a formação óssea. A transcrição e tradução da osteocalcina são reguladas pela vitamina D e por sua afinidade com o cálcio, atuando assim na regulação homeostática das trocas ósseas de cálcio. Para tal, a osteocalcina precisa sofrer uma modificação pós-tradução tendo como cofator a vitamina K. Nesse processo ocorre a carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, formando γ -carboxiglutâmico, ação fundamental para a reação de carboxilação da osteocalcina (DÔRES et al., 2001). Somente após esse processo a osteocalcina exibirá capacidade de ligação com o cálcio que será incorporado aos cristais de hidroxiapatita. (SHEA et al., 2009).

No tecido ósseo, encontram-se quatro grupos de células: células osteoprogenitoras ou osteogênicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Células osteoprogenitoras são células troncos mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos. Estas células encontram-se na porção interna do perióstio e no endóstio e, de acordo com a dinâmica metabólica óssea, encontram-se ativas ou quiescentes. Aos osteoblastos é atribuída a atividade de formação óssea, por meio da síntese e liberação de colágeno e de outros componentes orgânicos necessários para a formação do tecido ósseo. São, os osteoblastos, os responsáveis pela mineralização óssea. Após a calcificação, quando os osteoblastos se tornam maduros, estes ficam aprisionados dentro da matriz óssea mineralizada e diferenciam-se em osteócitos, cuja principal função é a mecanotransdução - atividade realizada por seus prolongamentos citoplasmáticos que atuam como sensores celulares responsáveis pela tradução da força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos – e, desta forma, controla o crescimento e o desenvolvimento ósseo. Já os osteoclastos correspondem a células gigantes, com múltiplos núcleos, formadas a partir da fusão de células precursoras mononucleadas situadas na medula óssea e responsáveis pela reabsorção óssea (osteólise). Quando em contato com a matriz óssea, os osteoclastos desenvolvem em sua superfície borda em escova. Essa especialização de membrana celular possibilita a acidificação do local por meio da produção de prótons H^+ e ânions Cl^- , permitindo a solubilização da matriz calcificada. Além disso, os osteoclastos sintetizam e liberam outros ácidos, como fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e enzimas lisossomais como a catepsina K, liberações que garantem o processo de reabsorção óssea. Em sequência, o microambiente instituído pelos osteoclastos, libera, também, enzimas proteolíticas, como as collagenases. As collagenases atuam sobre a parte orgânica da matriz, sendo responsáveis pela degradação do colágeno (TEITELBAUM, 2000; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006b; ROBLING et al., 2006; RUBIN et al., 2006; CIVITELLI, 2008; BELLIDO, 2014; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

O osso é um tecido dinâmico submetido à constante remodelação (renovação) que combina de forma sincronizada a reabsorção (pela atividade dos osteoclastos) e formação óssea (pela atividade dos osteoblastos) para produzir uma nova unidade de matriz óssea que posteriormente será mineralizada (DE BAAT et al., 2005; ROBLING et al., 2006). Este processo cíclico e sincronizado ocorre em sítios da superfície óssea denominada unidade básica multicelular (BMU, *basic multicellular unit*), também conhecida como unidades de remodelação óssea (BRUs, *bone remodeling units*) (HAUGE, 2001; ANDERSEN, 2009).

A regulação da remodelação óssea ocorre por meio de fatores sistêmicos e locais que determinam o recrutamento de células precursoras de osteoclastos para a região da superfície óssea que será reabsorvida. Estas células precursoras se fundem e transformam-se em osteoclastos (PACIFICI, 2010). O controle desta regulação é dependente de diferentes sinalizações que promovem a liberação de hormônios, fatores de crescimento, fatores de transcrição, citocinas, entre outros que influenciam a gênese de osteoclastos por meio da regulação da sua produção (RAISZ, 1998; PHAN, 2004).

A osteoclastogênese, isto é, a diferenciação em osteoclasto, é modulada pelo fator de estimulação das colônias de macrófagos (M-CSF) e pelo RANKL (ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear) uma citocina da família TNF (Fator de necrose tumoral), produzido pelos osteoblastos. A interação de RANKL com RANK, o receptor ativador do fator kappa B nuclear [NF- κ B (RANK)], promove a diferenciação do precursor do osteoclasto em osteoclasto. Em contrapartida, a osteoprotegerina (OPG), uma glicoproteína produzida e secretada principalmente por pré-osteoblastos e osteoblastos, atua como reguladora negativa da osteoclastogênese. A OPG age como um competidor de alta afinidade com RANK e, desta forma, reduz a ligação de RANKL/RANK presente na superfície de células precursoras de osteoclastos. Com a redução da ligação entre RANKL/RANK há redução da diferenciação dos osteoclastos, contribuindo, assim, para a manutenção da massa óssea. A interação entre RANKL/RANK é a via mais conhecida da diferenciação e ativação osteoclástica. Esta ação, diretamente dependente da atividade osteoblástica, indica que os processos de reabsorção e formação são combinados (KHOSLA, 2001; THEOLEYRE, 2004; ROBLING et al., 2006; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2010, TROEN, 2013).

O equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea deve ser rigidamente controlado e mantido para assegurar o equilíbrio de minerais, as adaptações ao estresse físico e a remoção do osso antigo seguido por renovação óssea (PARFITT, 1980; DE BAAT et al.,

2005). Esta minuciosa manutenção é imprescindível para a homeostase da dinâmica óssea considerando que em cada BMU o processo de reabsorção leva em torno de 3 a 4 semanas e a formação de 3 a 4 meses (MCCAULEY; NOHUTCU, 2002). O processo é tal que em torno de 5-10% do esqueleto renova-se a cada ano, com estimada substituição de todo o esqueleto humano adulto em 10 anos (BRANDI, 2009). O equilíbrio entre os processos de remodelação óssea é, portanto, essencial para a manutenção da integridade da massa e da resistência mecânica óssea após cada ciclo de remodelação (PARFITT, 1980; DE BAAT et al., 2005), enquanto um desequilíbrio neste processo pode comprometer estes parâmetros ósseos (MEIER et al., 2005).

Morfologicamente, o osso está dividido em osso cortical, representando 85% de tecido ósseo, e osso trabecular, representando os demais 15% do tecido ósseo. O osso cortical é um tecido denso e compacto, predominante no esqueleto apendicular. Formado por anéis concêntricos que possuem no centro canais por onde passam vasos sanguíneos (Sistema Haversiano) e por canais (Canais de Volkman) que permitem a comunicação entre vasos sanguíneos com a medula óssea, o osso cortical é altamente compacto por possuir uma pequena área de superfície, baixa porosidade, associada à baixa taxa metabólica. Este tipo de osso proporciona proteção e suporte ao esqueleto, fornece resistência mecânica (a forças de torção e flexão) e pode participar de respostas metabólicas quando há prolongado ou relevante déficit mineral. De acordo com sua predominância morfológica, sua perda óssea está relacionada à fratura de ossos apendiculares, como o fêmur. O osso trabecular compreende à microarquitetura interna do tecido ósseo, marcada por inúmeras espículas (trabéculas) ósseas interconectadas e orientadas de acordo com a tensão em que o osso é submetido. Metabolicamente o osso trabecular é mais ativo que o osso cortical, por possuir alta porosidade óssea, o que lhe confere uma grande área de superfície. A relação entre a área de superfície destinada para a remodelação óssea e a acentuada atividade metabólica, justifica a intensa remodelação óssea trabecular e possibilita, quando há déficit mineral, um precoce comprometimento ósseo, como a osteoporose. De acordo com sua predominância morfológica no esqueleto axial, sua perda óssea está relacionada às fraturas vertebrais (MARTIN; BOARDMAN, 1993; EINHORN, 1996; MARX; GARG, 1998; KEAVENY et al., 2001; CLARKE, 2008).

Ossos longos, como o fêmur, exibem diferentes regiões: epífises proximal e distal (porções das extremidades ósseas), diáfise (porção central) e metáfises (região entre as epífises e diáfise). Epífises e metáfises são formadas com predominância de osso trabecular. Este tipo de tecido é encontrado na região interna destas porções, contudo,

externamente, epífises e metáfises, são envolvidas por uma fina camada de osso cortical. Já a região diafisária apresenta, em sua totalidade, osso cortical (JUDEX et al., 2004; CLARKE, 2008; RITTWEGER et al., 2009).

As superfícies ósseas são revestidas por tecido conjuntivo e por células osteoprogenitoras/osteogênicas denominadas como endóstio, na superfície interna e perióstio, na externa. O endóstio é constituído por osteoblastos provenientes da multiplicação e diferenciação de células osteoprogenitoras. É encontrado recobrimdo o canal medular, os canais de Havers, os canais de Volkmann e a cavidade do osso trabecular. Sua função é promover nutrição e remodelação óssea. O perióstio é constituído, externamente, por uma densa camada de fibras colágenas e de fibroblastos e, internamente, por células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos. Sua função é nutrir e proteger o osso, além de permitir o crescimento diametral ósseo (DOBLARÉ et al., 2004; CLARKE, 2008).

Existem dois principais processos iniciais responsáveis pelo desenvolvimento ósseo. Estes processos formam o osso durante o desenvolvimento embrionário e são denominados de ossificação intramembranosa, quando a formação é direta, e ossificação endocondral, quando a formação é indireta. A ossificação intramembranosa é responsável pela formação da maior parte do esqueleto craniofacial. Contribui para o crescimento dos ossos curtos e para o crescimento em espessura dos ossos longos. É designada como formadora direta, pois ocorre pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos, formando um centro de ossificação. Para isto, inicialmente, há proliferação, agrupamento e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas seguido pela formação de regiões conjuntivas condensadas, de origem mesenquimal, onde surgirá o futuro osso. Após a diferenciação, os osteoblastos começam a produzir matriz óssea extracelular, também chamada de matriz osteóide (matriz ainda não mineralizada), formada na sua maioria por colágeno e proteoglicanos, substâncias que apresentam capacidade de ligação com o cálcio. Por meio desta ligação, a matriz osteóide torna-se calcificada. No decorrer da calcificação há, no centro de ossificação, o desenvolvimento de uma rede de trabéculas ósseas rodeadas por perióstio que, com o contínuo crescimento trabecular, adotam a forma de placas. A formação de osso compacto ocorrerá pela compactação dessas trabéculas e a formação de sucessivas camadas ósseas periostais definirá a espessura óssea (GILBERT, 2000; FRANZ-ODENDAAL, 2011). Alternativamente, células mesenquimais podem diferenciar-se em cartilagem, que, em seguida, fornece um molde para a morfogênese óssea pelo processo de ossificação

endocondral. Nesta ossificação, ocorre a formação da maior parte do esqueleto apendicular e axial. Tal ossificação se inicia com a condensação e diferenciação celular mesenquimatosa em condrócitos. A hipertrofia celular sinaliza o passo final da diferenciação dos condrócitos, onde a matriz extracelular cartilaginosa torna-se calcificada e, parcialmente, degradada. A ossificação começa quando condrócitos hipertróficos sofrem apoptose e a cartilagem calcificada é invadida por vasos sanguíneos, células ósseas e precursores mesenquimais. A matriz cartilaginosa calcificada é então utilizada pelos osteoblastos como base para a deposição de osso mineralizado, culminando na produção de um novo osso. Este processo, após ser completado no centro de ossificação primária (localizado na diáfise), prossegue gradualmente para as extremidades, no centro de ossificação secundária (localizado um em cada epífise), e estabelece as duas placas de crescimento que separam as epífises cartilaginosas da diáfise óssea (STICKENS et al., 2004; MACKIE et al., 2011; LONG; ORNITZ, 2013). Contudo, o centro de ossificação primária promove crescimento longitudinal e no centro de ossificação secundária é observado crescimento radial. O comprimento, diafisário, de ossos longos é dado pela atividade do disco epifisário e a espessura pela aposição de tecido ósseo periostal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; CLARKE, 2008). A maturidade esquelética ocorrerá quando a expansão do centro de ossificação diafisária encontra o centro de ossificação epifisária, desaparecendo, por fim, a placa de crescimento (MACKIE et al., 2011).

A atividade óssea no esqueleto em desenvolvimento é voltada, primariamente, para o crescimento e modelação óssea (remoção do osso de um local e deposição em outro), mecanismo pelo qual o osso atinge tamanho e forma. Na maturidade esquelética, a atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação óssea (remoção e posterior substituição do osso existente por osso novo). A relação entre a taxa de formação e de reabsorção óssea determina a quantidade de massa óssea encontrada no esqueleto (RAISZ, 2005).

No decorrer do desenvolvimento, a formação óssea excede a reabsorção, permitindo aumentar a massa óssea até atingir um pico, que é a massa máxima de osso atingida no decorrer da vida. Esse processo de aquisição de massa óssea inicia-se no nascimento e se prolonga até o final da adolescência, ao término da maturação esquelética (BONJOUR et al., 1994; BRANDÃO; VIEIRA, 1999; BONJOUR et al., 2009). Nesse período, inicia-se a fase de equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea que se mantém até os 30-45 anos nas mulheres e 50-60 anos nos homens. Posteriormente,

ocorre um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea. O resultado, em longo prazo, de tal desequilíbrio é uma mudança da massa, força e estrutura óssea (MEIER et al., 2005; COMPSTON, 2011) e, por fim, se o ganho de massa óssea adquirida durante o crescimento não atingiu seu pico máximo, há maior risco de apresentar complicações osteomebólicas, como osteopenia e osteoporose, em uma fase tardia (BORGES; BRANDÃO, 2006; BONJOUR et al., 2009).

O aumento do tecido ósseo, durante a maturação do esqueleto, centra-se, essencialmente, no aumento máximo da massa óssea (pico de massa óssea). Sua relevância reflete o fato de que quanto maior a aquisição óssea durante esse período, maior será a tolerância contra a perda óssea fisiológica com o envelhecimento. Isto porque, a massa óssea, durante o envelhecimento, é determinada pelo pico da massa óssea em conjunto com a taxa de perda de massa óssea (VAANANEN, 1991). O pico de massa óssea, assim como a integridade do tecido ósseo observado ao decorrer da vida, é determinado por vários fatores incluindo raça, sexo, hereditariedade, estado hormonal, nutrição e massa corporal (BONJOUR et al., 1994; BRANDÃO; VIEIRA, 1999; BONJOUR et al., 2009). Considera-se ainda que mais de 90% da massa óssea seja adquirida durante a maturação esquelética, consolidando o acúmulo de massa óssea, durante a infância e adolescência, como um fator protetor ósseo durante o envelhecimento e um contribuinte determinante da massa e resistência óssea nesse período (BROWN; ZACHARIN, 2005; BONJOUR et al., 2009).

O envelhecimento é um processo progressivo e previsível, caracterizado pelo acúmulo de alterações a todos os níveis de organização biológica com alterações da estrutura e funcionamento de células, tecidos, órgãos e sistemas do organismo, que, por fim, culmina em declínios das funções fisiológicas (SEMBA et al., 2010).

Dentre os declínios decorrentes do processo de envelhecimento, considera-se a perda de óssea como um fenômeno universal que afeta homens e mulheres e está diretamente relacionada com a redução progressiva da massa e resistência óssea. A taxa de perda da massa óssea cortical, por década, em homens e mulheres, após os 50 anos, é de aproximadamente 3-5% no osso cortical e 6-10% no osso trabecular. Em princípio, a perda óssea pode ocorrer por diminuição da formação óssea ou como o resultado de um aumento da velocidade de reabsorção óssea associada a uma taxa de formação normal ou reduzida (O'FLAHERTY, 2000). Essa perda, dependendo da extensão, pode afetar tanto o osso trabecular como o cortical. No osso trabecular, a perda óssea pode ocorrer em resposta ao aumento da remodelação óssea ou por equilíbrio negativo na unidade básica

multicelular (BMU). Já a perda de osso cortical resulta em mudanças tanto na remodelação endocortical como intracortical. Além disso, como a espessura cortical é influenciada pela taxa de aposição periosteal, alterações estruturais também são determinadas por modificações do equilíbrio de remodelação (COMPSTON, 2011). A diminuição da massa óssea trabecular e o aumento da porosidade cortical podem ser as causas mais importantes de fragilidade óssea anos idosos (GREEN et al., 2011; CHEN et al., 2013). Por outro lado, a perda óssea pode, também, resultar de uma diminuição da carga mecânica em reflexo da redução da massa corporal, isto porque a massa corporal é altamente correlacionada com a massa e densidade mineral óssea (DMO) (BONJOUR et al., 1994). Além disso, levando em consideração a heterogeneidade do esqueleto, é provável que mudanças da arquitetura e microarquitetura óssea sejam resultados das diferenças na morfologia óssea, resultando em mudanças específicas de acordo com os sítios e com a taxa de perda óssea relacionada com a idade (COMPSTON, 2011; CHEN et al., 2013). Esses fatores conduzem a reduções em parâmetros que refletem a quantidade e qualidade óssea e ao aumento da fragilidade óssea que, associada ao aumento do risco de quedas característicos do envelhecimento, contribui para um maior índice de fraturas osteoporóticas (RAISZ, 2005; ARMAS, RECKER, 2012).

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico que resulta em falha estrutural do esqueleto marcada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e rarefação de sua microarquitetura, apresentando predisposição às fraturas mesmo em condições de baixa energia (AKESSON, 2003). Considerando a ausência de evidências de que a perda de massa óssea provoca qualquer sintoma, a osteoporose tem sido identificada como uma epidemia silenciosa e sua manifestação clínica está diretamente relacionada às fraturas. Por sua vez, as fraturas osteoporóticas estão estreitamente relacionadas com a baixa massa óssea enquanto a ausência de fraturas é dependente da aquisição máxima deste parâmetro (BONJOUR et al., 1994; BONJOUR et al., 2009).

A osteoporose pode ser classificada como primária ou secundária. A forma primária é classificada em tipo I, ou pós-menopausa e tipo II, ou senil. Já a osteoporose secundária é decorrente de processos inflamatórios, alterações endócrinas, desuso entre outros (GALI, 2001). Na osteoporose tipo I, a deficiência de estrogênio, característica da menopausa, é acompanhada por incremento do turnover ósseo com predomínio da reabsorção (TROEN, 2003). Em contraste, a osteoporose tipo II é originada através da diminuição da capacidade proliferativa de células osteoprogenitoras após o período do pico e equilíbrio da massa óssea (O'FLAHERTY, 2000).

As regiões mais susceptíveis às fraturas por osteoporose são o quadril (fêmur proximal), a coluna vertebral (vértebras) e o punho (antebraço distal). As fraturas de quadril e antebraço são consequências de traumatismos de maior ou de menor intensidade, causados, principalmente, por quedas. Já fraturas na coluna ocorrem por mínimos traumatismos (CUMMINGS; MELTON, 2002). De perfil alarmante, é projetado para o ano de 2050 aumento (240% em mulheres e 310% em homens) de fraturas de quadril em função da osteoporose, estimados em mais de seis milhões de fraturas de quadril em todo mundo (GULLBERG et al., 1997).

Fêmur, tíbia e vértebras, são os principais sítios ósseos para estudo da osteoporose. Os dois primeiros sítios ósseos apresentam predomínio de osso cortical e as vértebras, predomínio de osso trabecular (PATLAS et al., 2000). Desta forma, fêmures e vértebras foram selecionados, para serem usadas neste trabalho, levando-se em consideração sua morfologia óssea e os efeitos metabólicos que provêm desta especificação tecidual.

1.2 Restrição Alimentar

Há muito, McCay, Crowell e Maynakd (1935), demonstraram que a redução da ingestão de calorias foi responsável por quase dobrar o tempo de vida de animais experimentais e, com isso, um grande passo foi dado para o estudo onde o envelhecimento pode ser retardado. Desde então, numerosas pesquisas, com diferentes delineamentos e enfoques, vêm sendo utilizadas para compreender e elucidar os mecanismos que melhoram e prolongam a vida. Em julho de 2010, *The Journal of Nutrition*, homenageou e comemorou os 75 anos do pioneiro trabalho de McCay, Crowell e Maynakd, com a publicação “Honoring Clive McCay and 75 Years of Calorie Restriction Research” (MCDONALD; RAMSEY, 2010), e enfatizou que, sem dúvida, esse modelo de estudo contribuiu, mais do que qualquer outro, para a compreensão global dos processos biológicos do envelhecimento e da longevidade.

A restrição alimentar ou restrição calórica, como também é conhecida (MCDONALD; RAMSEY, 2010; LEE; LONGO, 2016), é uma intervenção que consiste em promover subnutrição sem causar desnutrição, através da redução de 20 a 40% da ingestão de alimentos, em comparação à alimentação típica (LEE; LONGO, 2016). Essa intervenção, importante em investigações sobre o envelhecimento, retarda o aparecimento de distúrbios relacionados à idade (TATSUMI et al., 2008; LEE; LONGO,

2016) e prolonga o tempo de vida de diferentes espécies animais (SUN et al., 2009; HOU et al., 2011; SADAGURSKI et al., 2015).

Os benefícios da restrição foram observados em diferentes estudos realizados com primatas, nos quais distintas variáveis biológicas apresentaram melhores respostas quando em comparação com o grupo controle (LANE et al., 1997; ROTH et al., 2001; INGRAM et al., 2007). Paralelamente, estudos conduzidos com ratos evidenciaram o retardo do aparecimento de diversas doenças crônicas (KRITCHEVSKY, 2001; LEE et al., 2004; FONTANA; KLEIN, 2007). Ao mesmo tempo, em humanos foi observado que a restrição induzia adaptação metabólica promovendo melhores respostas frente às doenças e aos danos oxidativos (FONTANA et al., 2004; HEILBRONN et al., 2006; HOLLOSZY; FONTANA, 2007).

O mecanismo pelo qual a restrição influencia o aparecimento mais tardio de doenças e a longevidade ainda está sendo compreendido, contudo acredita-se que não um fator isolado, mas uma combinação de fatores seja responsável pelos efeitos promovidos pela restrição (WESTERBEEK et al., 2008).

A redução da glicose e da insulina plasmáticas é uma característica marcante da restrição, isto porque a baixa ingestão de alimentos promove redução da concentração de glicose levando a uma reduzida liberação de insulina (McCARTER et al., 2007). De perfil lipogênico, a insulina quando em concentração reduzida, seria acompanhada por diminuição do depósito de tecido adiposo branco (TAB) (KERSTEN, 2001). Há algum tempo o TAB deixou de ser visto como um simples e passivo reservatório de energia e passou a ser observado como órgão endócrino responsável por diversas circunstâncias metabólicas como a liberação de moléculas biologicamente ativas, conhecidas como adipocinas, que além de atuarem sistematicamente podem também atuar em nível local. As adipocinas liberadas pelo TAB compreendem entre outras, a leptina, resistina, adiponectina, grelina e também citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-6 (interleucina 6) (MOHAMED-ALI et al., 1998). A redução do tecido adiposo, evidenciada com a restrição, pode induzir alterações da secreção dessas biomoléculas e, desta forma apresentar impacto considerável para mudanças na perspectiva de vida (COMBS et al., 2003; WU et al., 2003).

Mudanças neuroendócrinas em modelos animais de diferentes idades, relacionadas à restrição, também são descritas na literatura. Ratos submetidos à restrição exibem redução na concentração de GH (hormônio do crescimento) (MARTIN et al., 2006) e apresentam semelhanças fisiológicas com camundongos knockout desse gene

(BONKOWSKI et al., 2006). A interação entre a restrição e o eixo somatotrófico representa um importante ponto dos benefícios ocasionados pela restrição, uma vez que a menor expressão de GH proporciona redução da produção de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I) (BARTKE et al., 2001). A redução da sinalização do eixo GH/IGF-I tem sido relatada para retardar o envelhecimento e prolongar a expectativa de vida (BERGAMINI et al., 2003).

Por outro lado, os benefícios da restrição parecem, fortemente, mediados pela atenuação de danos oxidativos (ALEXEYEV et al., 2004). Estresse oxidativo é um desequilíbrio ocasionado pela produção excessiva de radicais livres e EROs (espécies reativas de oxigênio) acompanhado por uma insuficiente defesa antioxidante, apresentando danos subseqüentes (SÁNCHEZ-RODRÍGUES et al., 2007). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ (oxigênio) sofre redução com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Sob consequência desse processo, são formados intermediários reativos, tais como, o ânion superóxido (O₂^{·-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[·]) (CAVALCANTE; BRUIN, 2009). A reatividade dessas espécies apresenta grande variação, porém algumas são suficientemente reativas apresentando capacidade de promover danos em biomoléculas tais como o DNA, lipídios e proteínas (BERRA; MENCK, 2006). A restrição alimentar promove aumento da defesa antioxidante e do reparo celular, a fim de que uma superprodução de EROS, advindas no decorrer da vida, não supere os mecanismos antioxidantes, contribuindo, assim, para reprimir/retardar o envelhecimento (ALEXEYEV et al., 2004).

Ao mesmo tempo em que a restrição influencia diferentes tecidos e promove mecanismos adaptativos que exercem efeitos sobre doenças e longevidade, o osso é também alvo para os efeitos proporcionados pela redução da ingestão da dieta, ajustando sua biomecânica e fisiologia para acompanhar as mudanças estabelecidas pela restrição (LAMOTHE et al., 2003). Contudo, enquanto inúmeros estudos têm abordado categoricamente os diversos efeitos benéficos da restrição sobre a longevidade (LANE et al., 1997; KRITCHEVSKY, 2001; ROTH et al., 2001; FONTANA et al., 2004; LEE et al., 2004; HEILBRONN et al., 2006; FONTANA; KLEIN, 2007; HOLLOSZY; FONTANA, 2007; INGRAM et al., 2007), distintos estudos (BANU et al., 1999; TALBOTT et al., 2001; LAMOTHE et al., 2003; LAMBERT et al., 2005; BAEK et al., 2008; HAMRICK et al., 2008; TATSUMI et al., 2008; WESTERBEEK et al., 2008; DEVLIN et al., 2010; HAWKINS et al., 2010; HATTORI et al., 2013; HATTORI et al.,

2014; PANDO et al., 2014) têm indicado controvérsias quanto às respostas que essa intervenção pode ocasionar na quantidade e qualidade óssea.

Em estudo realizado por Devlin e colaboradores (2010), em ratos C57Bl/6J com 3 semanas de idade, submetidos à restrição 30%, durante 3 e 9 semanas, foi observado, no fêmur distal e no terço médio do fêmur, prejuízo tanto em osso trabecular como no cortical. Nesse mesmo estudo, a quinta vértebra lombar (L5) apresentou padrão de perda óssea semelhante ao encontrado no fêmur distal, entretanto a magnitude da perda foi menor.

Pando e colaboradores (2014) submeteram, por um período de 10 dias, ratos Sprague-Dawley com 24 dias a 40% de restrição, encontrando, na metáfise proximal e terço médio do úmero, redução do número de trabéculas e aumento da separação trabecular. Contudo, a restrição não afetou a DMO cortical, a área cortical e área total cortical.

Lambert e colaboradores (2005) analisaram a influência da restrição 35%, durante 5 meses de tratamento, iniciada aos 2 meses de idade em ratos Wistar sobre as propriedades geométricas, estruturais e mecânicas da tíbia e da sexta vértebra lombar (L6). Quando analisada a L6, tais propriedades não foram negativamente afetadas com a dieta de restrição. Já a análise realizada na tíbia, demonstrou mudanças da geometria, mas não em propriedades estruturais e mecânicas. Não obstante, após ajuste da massa corporal, propriedades tibiais e vertebrais de animais restritos, como carga máxima, foram maiores do que as encontradas no grupo alimentado sem restrição.

Ratos Sprague-Dawley, com 6 meses de idade, submetidos à restrição 30%, durante 6 semanas, apresentaram redução da densidade volumétrica total da metáfise proximal da tíbia semelhante ao observado em animais que tiveram os membros posteriores suspensos, simulando ambiente de microgravidade (ausência de carga). Contudo, o terço médio da tíbia e do úmero não foram afetados com a dieta de restrição (BAEK, 2008).

Tatsumi e colaboradores (2008) examinaram os efeitos da restrição 40%, ao longo da vida, iniciada aos 3 meses de idade, em camundongos C57Bl/6J e ratos F344. Os resultados indicaram um efeito bifásico sobre o osso, dependente da duração da restrição. Se realizada até 1 ano de idade, a restrição diminuiu a massa óssea. Em contraste, se realizada por mais de 2 anos, a dieta de restrição apresentou efeito protetor contra a perda óssea relacionada com a idade.

Por outro lado, Talbot e colaboradores (2001) submeteram ratas Sprague-Dawley com 20 e 48 semanas, à restrição 40% durante 9 semanas. A intervenção de restrição diminuiu drasticamente a densidade do osso femoral e resultou numa pequena redução da densidade da tíbia e do úmero. Efeitos observados em maior proporção nas ratas idosas quando em comparação às maduras. Além disso, as propriedades biomecânicas foram reduzidas em ratas idosas, mas não maduras, indicando implicações importantes da adaptação óssea de acordo com a idade em que a restrição é iniciada.

De acordo com esses estudos, ainda existem controvérsias quanto aos efeitos da restrição alimentar sobre o osso, e devem-se ressaltar as diferenças de protocolos experimentais no que diz respeito à porcentagem de restrição, idade e linhagem do animal, além do tempo de tratamento. Além disso, há a necessidade de investigar se a restrição possui efeitos específicos de acordo com sítio ósseo analisado.

2 JUSTIFICATIVA

A crescente preocupação para com a saúde, qualidade de vida, bem como para com a longevidade, tem levado a busca de diferentes meios em que estas possam ser encontradas. Dietas de restrição têm sido utilizadas com essas finalidades. Contudo, enquanto inúmeros estudos têm abordado a resposta positiva da restrição - dada à evidência de seu benefício em diferentes tecidos que concernem às adaptações sistêmicas, influenciando no retardo do aparecimento de doenças e no aumento da expectativa e da qualidade de vida - informações sobre o impacto da restrição sobre a massa óssea, realizada em diferentes idades, ainda são inconsistentes e controversas. Sobressalta-se que a busca literária apresenta lacunas que dificultam a comparação dos resultados para animais com diferentes idades, uma vez que não compartilham o mesmo delineamento experimental. Cabe realizar um estudo do tratamento da restrição em animais com diferentes idades, possibilitando, a partir das mesmas condições experimentais, comparar as respostas da restrição na massa óssea.

Considera-se que a dieta de restrição, como a que será simulada em nosso estudo, não leva a reduções extremas da alimentação e, assim, não se estenderá em prejuízo nutricional. Contudo, o osso, que será o foco de nosso estudo, possui necessidades nutricionais de acordo com seu dinâmico estado de formação e reabsorção óssea. Destaca-se aqui a importância da nutrição para o pico da massa óssea, que em conjunto com outros fatores, torna-se essencial para atingir a maturação esquelética - maturação que é refletida tanto na demanda metabólica temporal da pré-puberdade e puberdade, quanto em sua extensão com o envelhecimento, considerando a relação diretamente proporcional entre pico máximo da massa óssea e a tolerância contra a perda óssea com o envelhecimento. Além disso, por ser essencial para a manutenção da massa óssea, alterações nutricionais podem implicar em alterações do metabolismo ósseo em qualquer faixa etária, mesmo em animais com maturação óssea plena.

A influência da restrição sobre o tecido ósseo permanece confusa uma vez que os relatos da literatura são conflitantes e os mecanismos envolvidos pouco compreendidos. Desta forma, é de suma importância avaliar os efeitos da restrição alimentar sobre o tecido ósseo de ratos de diferentes idades, tendo em vista a importância da aquisição e manutenção da massa em distintas fases da vida.

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores bioquímicos da remodelação óssea e de propriedades biométricas, biofísicas, densitométricas, bioquímicas e biomecânicas dos fêmures e vértebras de ratos pré-púberes (38 dias), adultos jovens (4 meses) e idosos (16 meses), após 6 semanas de restrição alimentar a 30%.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFSCar (número 057/2012) (Anexo 1).

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* machos, linhagem Holtzman, com 38 dias, 4 e 16 meses de idade. Após um período de adaptação de sete dias, ao biotério experimental, os animais foram distribuídos em seis grupos (n=8-10 por grupo) sendo três grupos controles (C38, C4 e C16 – controles que iniciaram o experimento com 38 dias, 4 e 16 meses de idade, respectivamente) e três grupos restritos (R38, R4 e R16 – animais que iniciaram a restrição alimentar com 38 dias, 4 e 16 meses de idade, respectivamente). O período experimental para todos os grupos foi de 6 semanas. Animais controles tiveram livre acesso à ração Biotec® (Tabela 1) e água. Animais restritos foram submetidos à restrição alimentar 30%, sendo alimentados com 70% do consumo *ad libitum* do grupo controle. Este procedimento foi realizado diariamente.

Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental, em gaiolas metabólicas (Figura 1), em ambiente com temperatura controlada de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, seguindo o ciclo de claro/escuro de 10/14 horas.

TABELA 1. Composição química de ração comercial para roedores, marca Biotec®.

Composição química	Valores médios (%)
Umidade	12,0 máx.
Proteína bruta	22,0 mín.
Extrato etéreo	4,0 mín.
Minerais	10,0 máx.
Matéria fibrosa	8,0 máx.
Cálcio	1,4 máx.
Fósforo	0,8 mín.

Fonte: dados do fabricante (BIOBASE – Alimentação Animal).

FIGURA 1. Gaiolas metabólicas para ratos utilizadas durante todo o período experimental.



4.2 Acompanhamento experimental

Para acompanhamento da massa corporal, os animais foram pesados duas vezes por semana, durante todo o período experimental.

O consumo de água e ração, assim como a excreção de urina e fezes foram estimados diariamente, no mesmo horário (09h). O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre o colocado inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle da ingestão de água. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água e ração.

4.3 Eutanásia

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por meio de guilhotina, com subsequente coleta de sangue diretamente do tronco do animal. Além do sangue, foram coletados os fêmures direitos, quintas vértebras lombares (L5) e o tecido adiposo abdominal.

4.4 Parâmetros Analisados

4.4.1 Tecido Adiposo Abdominal

O tecido adiposo abdominal teve sua massa mensurada, em balança analítica (0,0001g), imediatamente após sua retirada.

4.4.2 Componentes Plasmáticos

O sangue coletado foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada (2°C). O plasma sanguíneo foi fracionado e armazenado em freezer -20°C para as determinações de osteocalcina e TRAP.

4.4.2.1 Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea

A determinação das concentrações plasmáticas de osteocalcina e TRAP, como indicadores de predisposição à formação e reabsorção de tecido ósseo, respectivamente, foi realizado por meio de técnica quantitativa e imunoenensaio em sanduíche com enzima ligada (ELISA), utilizando kits específicos para ratos da marca Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China).

4.4.3 Componentes Estruturais – Ossos (Fêmur e Vértebra)

Fêmures direitos e vértebras lombares (L5) foram removidos, dissecados, acondicionados em soro fisiológico e armazenados em freezer -20°C até o momento das análises ósseas (biométricas, biofísicas, bioquímicas, densitométricas e biomecânicas).

4.4.3.1 Biometria Óssea

As medidas biométricas foram realizadas com ajuda de um paquímetro digital (precisão de 0,05mm).

A medida do comprimento femoral teve como referencial a região distal dos côndilos femorais (face articular com a tibia) e saliência óssea proximal do trocânter maior. A espessura foi determinada na posição látero-lateral (diâmetro maior) e ântero-

posterior (diâmetro menor) da diáfise femoral, tomando como referência a base do terceiro trocânter. Nas quintas vértebras lombares (L5) foram feitas medidas da altura dos corpos vertebrais.

4.4.3.2 Biofísica Óssea

Os ossos (imersos em água destilada) foram mantidos em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida, obtiveram-se os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa à temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se o peso seco (P_s). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral - P_m), os ossos foram colocados em uma mufla a 800° C por um período de 24 horas (NORDSLETTEN et al., 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica de precisão (Chiyo®). Baseando-se no Princípio de Arquimedes, calculou-se o volume ósseo e subsequentemente a densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, obtidas pelas fórmulas (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

4.4.3.3 Densitometria Óssea

Fêmures e vértebras (L5) foram submetidos à análise densitométrica por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR (Figura 2), com software especial para pequenos animais com alta resolução (Figura 3), pertencente ao Laboratório de Biofísica – UNESP/Araçatuba. Para a avaliação densitométrica, os ossos foram submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida escaneados como um todo, capturando sua imagem (Figura 3). Posteriormente, as imagens foram manualmente contornadas para obtenção dos valores da densidade mineral óssea areal – aDMO (g/cm^2) (Figura 3). Para os fêmures, foram obtidos os valores da densidade do osso como um todo e por regiões (epífise proximal, diáfise e epífise distal). Obteve-se a densidade vertebral como um todo.

O coeficiente de variabilidade do teste densitométrico é de 2%.



FIGURA 2. Densitômetro DPX-ALPHA.



FIGURA 3. Software especial para pequenos animais usado para a análise de dados densitométricos.

4.4.3.4 Bioquímica Óssea

A partir da obtenção do material mineral dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Em seguida, por meio de ensaio colorimétrico, o conteúdo de cálcio e fósforo dos ossos foi determinado com a utilização do kit comercial específico Labtest®.

4.4.3.5 Biomecânica Óssea

Propriedades biomecânicas dos fêmures foram medidas pelo ensaio de flexão de três pontos, e propriedades biomecânicas das quintas vértebras lombares pelo ensaio de compressão, utilizando uma máquina de ensaio universal (INSTRON, modelo 4444, Canton, Massachusetts, EUA), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (Figura 4).

Para o ensaio dos fêmures, suas extremidades ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 1/3 do comprimento do fêmur, e a região central (das diáfises) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (ROBLING; TURNER, 2002). No início do ensaio, foi aplicada uma pré-carga de 5 N, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal, para acomodação do fêmur. Após o período de acomodação, aplicou-se uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min, até o momento da fratura do osso. Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica. Neste gráfico, as propriedades biomecânicas obtidas foram: carga máxima, carga máxima até fratura, deslocamento máximo até fratura, tenacidade e rigidez (Figura 5).

Para o ensaio das quintas vértebras lombares, os processos transversos, espinhosos e arcos vertebrais foram retirados, obtendo ao final o corpo vertebral. As extremidades das vértebras foram aplainadas para obtenção de superfícies planas e paralelas para o ensaio. Inicialmente, aplicou-se uma pré-carga de 10 N para acomodação do corpo de prova (SAMNEGÅRD et al., 2001). Após o período de acomodação, uma força foi aplicada no sentido crânio-caudal a uma velocidade constante de 2mm/min, até o esmagamento parcial das quintas vértebras lombares (dois terços de sua altura) (IKEDA et al., 2001). As propriedades biomecânicas obtidas foram: carga máxima, tenacidade e rigidez (Figura 5).

FIGURA 4. Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures e de compressão em vértebras lombares de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

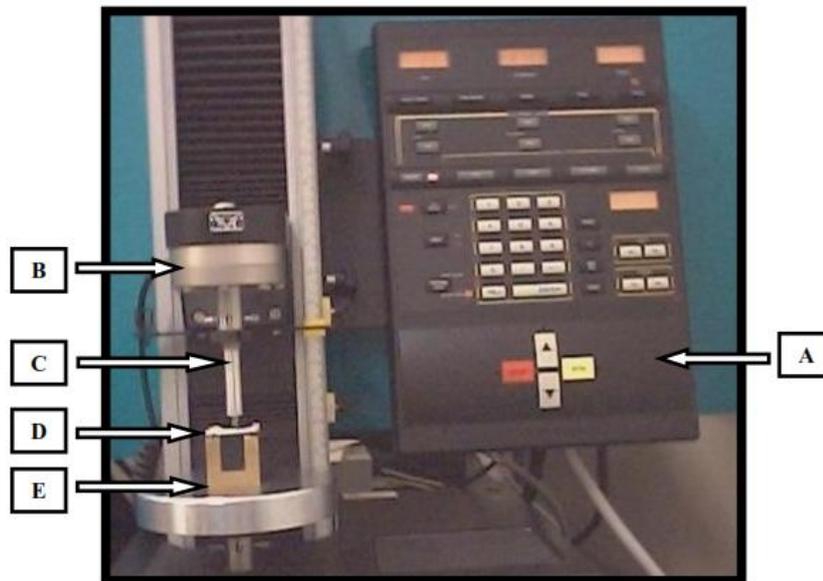
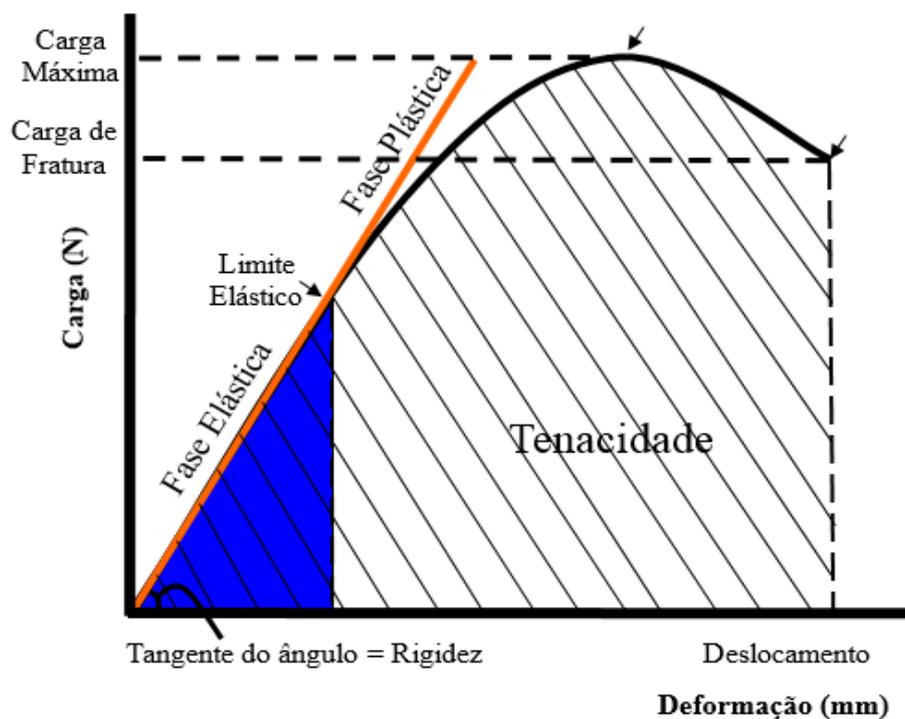


FIGURA 5. Representação esquemática da curva Carga x Deformação obtida com o teste de flexão a três pontos dos fêmures e compressão das vértebras de ratos.



Deformações (mm)

Corresponde à distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento no ponto de carga máxima e de fratura.

Carga Máxima (N)

Corresponde à maior carga suportada pela amostra (fêmur e vértebra) durante o ensaio.

Carga de Fratura (N)

Corresponde à carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur e vértebra) ao longo do ensaio.

Tenacidade (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o ponto de ruptura. Representa a energia necessária para provocar a ruptura do material, ou seja, a capacidade de uma estrutura absorver uma energia.

Rigidez (N/mm)

Determinada por meio da inclinação da reta, ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD et al., 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SigmaPlot® (versão 12.0) e expressas em média \pm desvio padrão. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA Two-way) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Acompanhamento experimental

A análise da massa corporal dos animais revelou aumento gradual da massa corporal relacionado à idade (Tabela 2). Animais dos grupos restritos exibiram diminuição significativa da massa corporal em comparação aos seus controles (Tabela 2). Esses dados são complementados com as médias dos valores do ganho de massa corporal dos diferentes grupos experimentais (Figura 6). Em associação à redução da massa corporal, a redução do consumo de ração em animais dos grupos restritos (Tabela 3), promoveu menor consumo de calorias (Figura 7), o que proporcionou redução da massa adiposa abdominal (Figura 8), observado nestes grupos de animais.

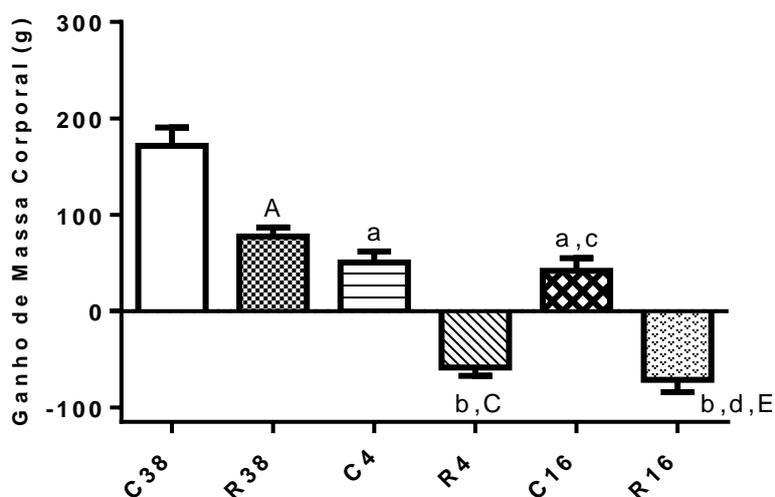
A maior massa corporal dos controles e a menor dos restritos, em consequência da restrição alimentar 30%, foram acompanhadas pelo aumento e redução da excreção média de fezes durante o período experimental para grupos controles e restritos, respectivamente (Tabela 3). A ingestão média de água assim como a excreção média de urina, não diferiram nos grupos 38 dias, 4 e 16 meses de idade (Tabela 3). Contudo, animais com 4 meses ingeriram mais água e, por consequência, excretaram mais urina em comparação com animais de 38 dias (Tabela 3). Esta diferença foi mantida em animais de 16 meses de idade (Tabela 3).

TABELA 2. Massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Massa Corporal	Grupos Experimentais					
	C38	R38	C4	R4	C16	R16
Inicial	160,60±10,11	156,80±10,16	430,66±17,48 ^a	428,50±22,35 ^b	472,92±24,13 ^{a,c}	470,30±29,51 ^{b,d}
Final	332,20±21,63	234,40±4,40 ^A	481,16±23,37 ^a	370,16±15,43 ^{b,C}	514,61±26,89 ^{a,c}	398,92±27,30 ^{b,d,E}

C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses, R16: Restrito 16 meses. Média ± DP; p<0,05: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; d vs. R4; e vs. C16. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 6. Ganho de massa corporal durante o período experimental dos animais dos diferentes grupos experimentais.



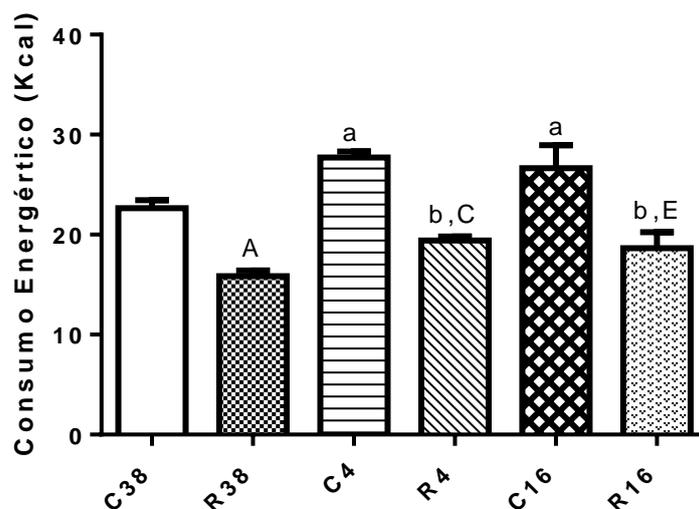
C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; e vs. C16. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

TABELA 3. Média do consumo de ração e água, e excreção de urina e fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais					
	C38	RC38	C4	R4	C16	R16
Ração (g)	22,64 \pm 0,80	15,85 \pm 0,56 ^A	27,73 \pm 0,57 ^a	19,41 \pm 0,40 ^{b,C}	26,65 \pm 2,29 ^a	18,65 \pm 1,61 ^{b,E}
Água (mL)	30,84 \pm 0,93	29,62 \pm 1,13	40,91 \pm 2,92 ^a	44,91 \pm 5,40 ^b	44,93 \pm 3,19 ^a	47,55 \pm 4,85 ^b
Urina (mL)	4,40 \pm 0,90	5,34 \pm 1,39	10,10 \pm 2,62 ^a	10,91 \pm 3,09 ^b	11,95 \pm 2,14 ^a	13,65 \pm 3,73 ^b
Fezes (g)	7,76 \pm 1,29	4,97 \pm 1,05 ^A	11,30 \pm 1,03 ^a	7,64 \pm 1,12 ^{b,C}	12,60 \pm 1,89 ^a	6,40 \pm 1,44 ^E

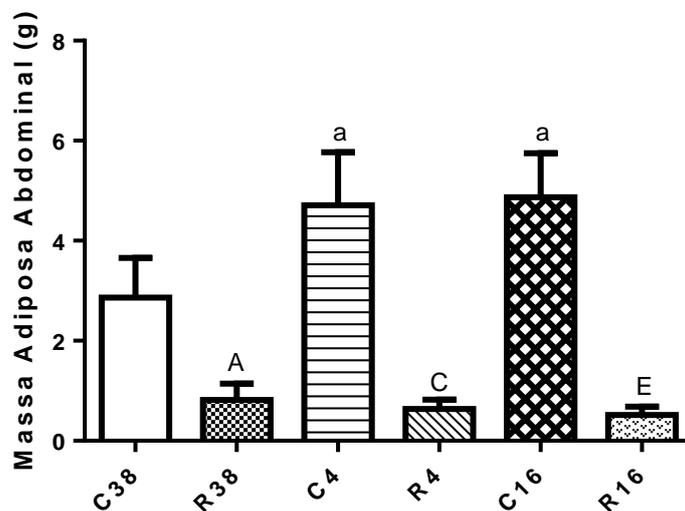
C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses, R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; e vs. C16. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 7. Média do consumo energético semanal dos animais dos diferentes grupos experimentais.



C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; e vs. C16. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 8. Ganho de massa adiposa abdominal durante o período experimental dos animais dos diferentes grupos experimentais.

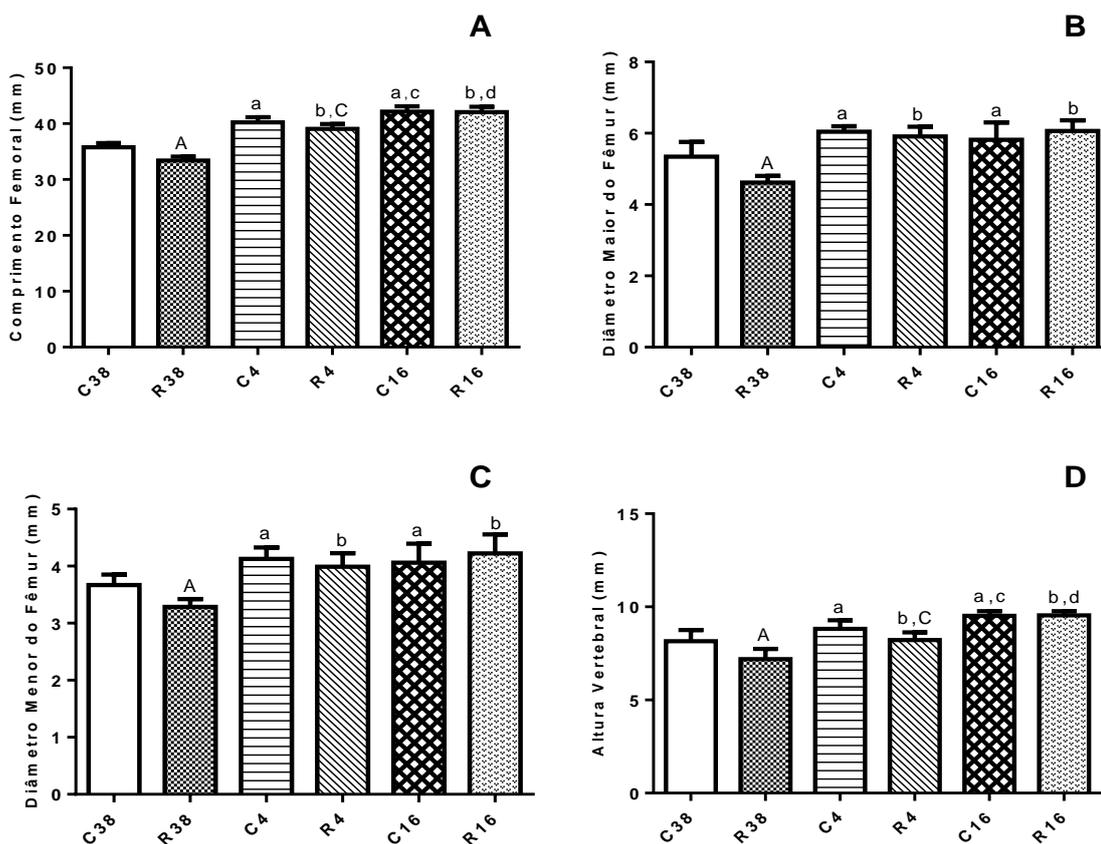


C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; e vs. C16. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.2 Biometria femoral e vertebral

Animais com restrição alimentar tiveram menor comprimento do fêmur (Figura 9A) e menor altura da vértebra (Figura 9D) em comparação aos seus controles, com ressalva para grupo de 16 meses de idade em que não foi observada diferença entre os grupos (Figuras 9A e 9D). Para as mesmas variáveis, foi observado o efeito gradual da idade, apresentando fêmures mais compridos e vértebras mais altas. O efeito da dieta reduziu a espessura (diâmetro maior e menor) do fêmur, somente no grupo 38 dias (Figuras 9B e 9C). Em relação à idade, fêmures de animais com 4 meses foram mais espessos que fêmures de animais com 38 dias, enquanto fêmures de animais com 4 e 16 meses não diferiram em suas espessuras (Figuras 9B e 9C).

FIGURA 9. Parâmetros biométricos dos ossos dos animais dos diferentes grupos experimentais.



A: Comprimento femoral; B: Diâmetro maior femoral; C: Diâmetro menor femoral; D: Altura vertebral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4; d vs. R4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.3 Biofísica femoral e vertebral

6.3.1 Biofísica femoral

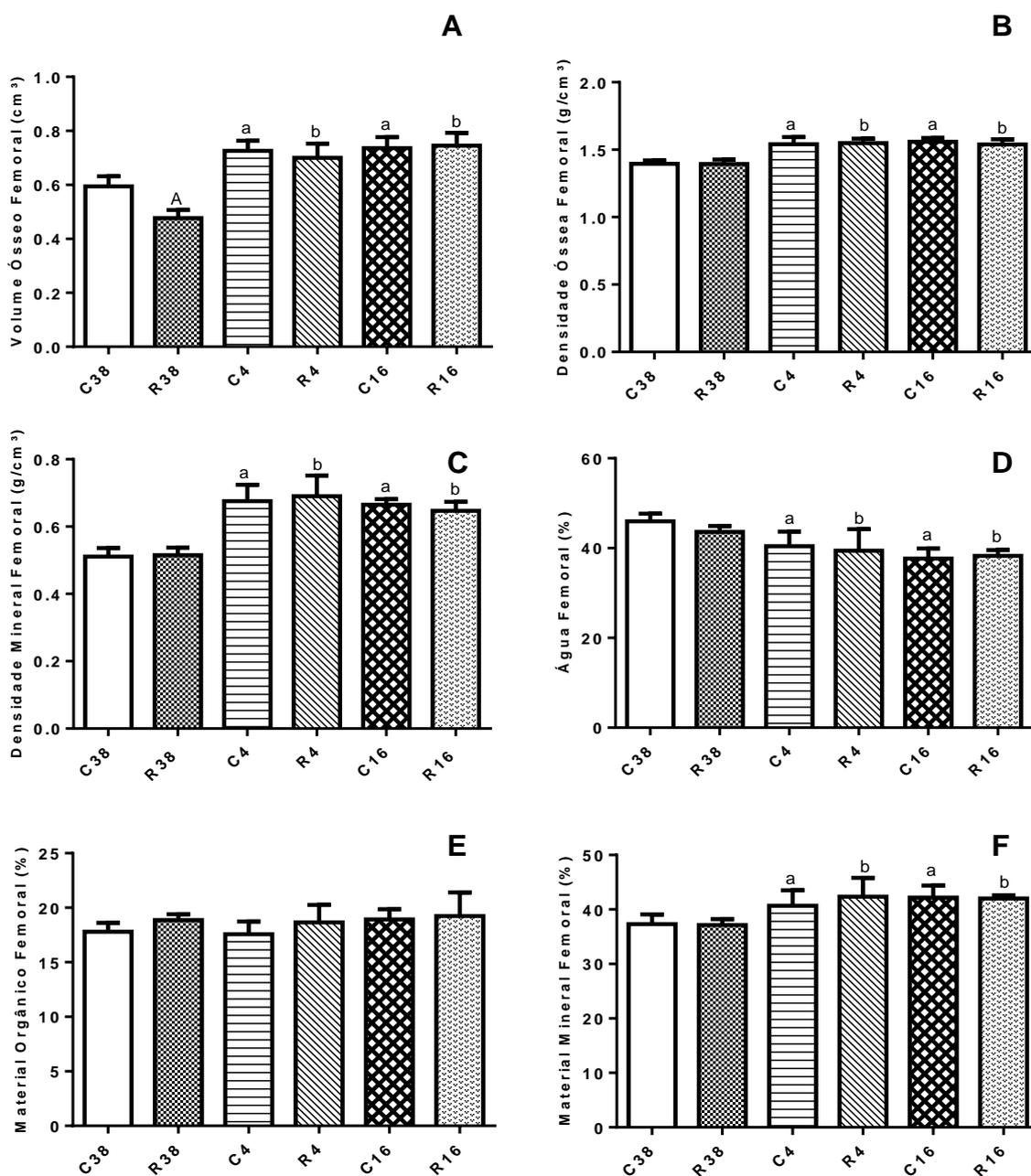
Peso úmido, imerso, seco e das cinzas (Tabela 4), diferiram no grupo 38 dias, onde os animais em restrição alimentar apresentaram menores pesos biofísicos. Nos demais grupos (4 e 16 meses) não foram encontradas diferenças (Tabela 4). Considerando a idade, o grupo de 4 meses foi, para os mesmos pesos, maior que o grupo 38 dias. Já os pesos biofísicos de animais com 16 meses de idade foram semelhantes, não observando diferença estatística (Tabela 4). O mesmo comportamento foi observado para a variável volume ósseo, onde o grupo 38 dias apresentou se menor devido à dieta, e o grupo 4 meses apresentou aumento em comparação com o grupo 38 dias pelo efeito da idade, sem alterações para o grupo com 16 meses (Figura 10A). Não foram observadas diferenças pelo efeito da dieta nos grupos 38 dias, 4 e 16 meses ao analisarmos densidade óssea (Figura 10B) e densidade mineral (Figura 10C), porcentagem de água (Figura 10D) e porcentagem de material mineral (Figura 10F). No entanto, para as mesmas variáveis, a idade influenciou o grupo com 4 meses, sendo este maior em comparação com o grupo 38 dias nas variáveis densidade óssea, densidade mineral e porcentagem de material mineral. Por outro lado, a porcentagem de água, foi menor no grupo 4 meses em comparação com o grupo 38 dias. Complementando os dados biofísicos do fêmur, não foram encontradas diferenças de porcentagem de material orgânico pelo efeito da dieta ou pelo efeito da idade (Figura 10E).

TABELA 4. Pesos biofísicos (peso úmido, imerso, seco e das cinzas) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros Femorais	Grupos Experimentais					
	C38	R38	C4	R4	C16	R16
Peso Úmido (g)	0,851±0,082	0,662±0,064 ^A	1,151±0,067 ^a	1,098±0,083 ^b	1,202±0,094 ^a	1,178±0,077 ^b
Peso Imerso (g)	0,237±0,035	0,182±0,027 ^A	0,401±0,025 ^a	0,383±0,035 ^b	0,432±0,036 ^a	0,409±0,031 ^b
Peso Seco (g)	0,469±0,028	0,373±0,019 ^A	0,682±0,051 ^a	0,690±0,079 ^b	0,730±0,061 ^a	0,720±0,055 ^b
Peso das Cinzas (g)	0,318±0,016	0,245±0,012 ^A	0,486±0,028 ^a	0,478±0,059 ^b	0,511±0,038 ^a	0,489±0,046 ^b

C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses, R16: Restrito 16 meses. Média ± DP; p<0,05: a vs. C38; b vs. R38. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 10. Parâmetros biofísicos do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.



A: Volume ósseo femoral; B: Densidade óssea femoral; C: Densidade mineral femoral; D: Porcentagem de água femoral; E: Porcentagem de material orgânico femoral; F: Porcentagem de material mineral femoral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.3.2 Biofísica vertebral

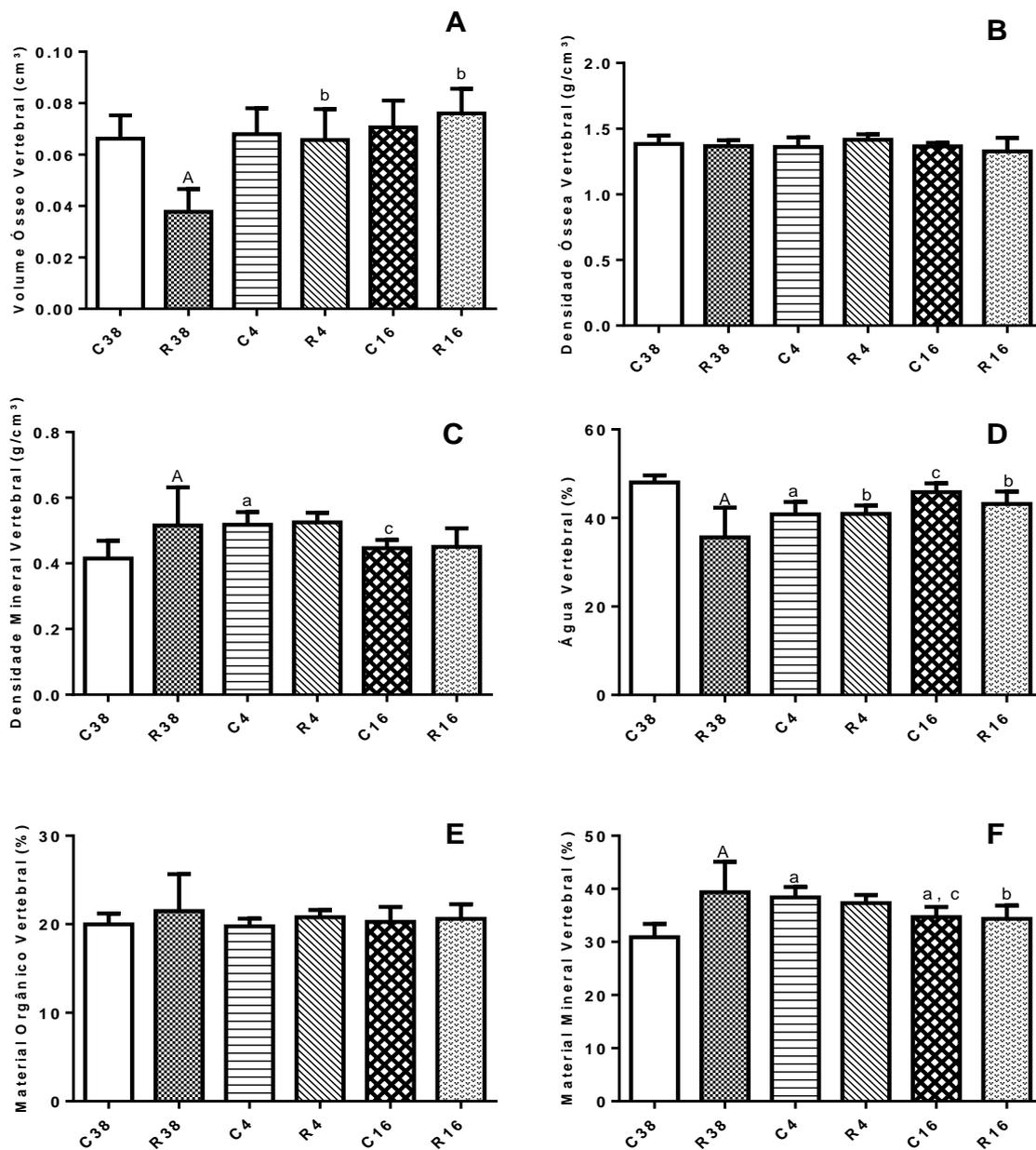
O peso úmido (Tabela 5) refletiu sobre o volume ósseo (Figura 11A) uma vez que foi observado o mesmo comportamento para estas variáveis, tanto para o efeito da dieta (redução nos animais com restrição alimentar do grupo 38 dias) quanto para o aumento pelo efeito da idade (diferença entre restrito 38 dias e restrito 4 meses). Já o peso imerso (Tabela 5) somente sofreu influência da dieta, onde foi menor em animais em restrição alimentar do grupo 38 dias, enquanto peso seco (Tabela 5) e peso das cinzas (Tabela 5) apenas sofreram influência da idade, apresentando o grupo 4 meses maiores pesos que os do grupo 38 dias. A densidade mineral diferiu no grupo 38 dias, apresentando, os animais em restrição alimentar, maior densidade (Figura 11C). Considerando a idade, o grupo controle 4 meses apresentou maior densidade mineral que o grupo controle 38 dias e controle 16 meses (Figura 11C). A porcentagem de água mostrou-se reduzida em restritos do grupo 38 dias (Figura 11D). Referente à idade, a porcentagem de água no controle 4 meses foi menor em relação ao controle 38 dias, enquanto animais em restrição alimentar com 4 meses apresentaram maior porcentagem de água que restritos com 38 dias. Por fim, controle 16 meses teve maior porcentagem de água quando comparado ao controle 4 meses (Figura 11D). A porcentagem de material mineral foi maior em restritos do grupo 38 dias quando em comparação com seu controle. Na comparação da idade, controles com 4 meses apresentaram maior porcentagem de material mineral em comparação ao grupo 38 dias. Já o grupo controle com 16 meses apresentou menores valores desta mesma variável em comparação com grupo controle com 38 dias e controle com 4 meses de idades. Por sua vez, restritos com 16 meses obtiveram menores valores da porcentagem de material mineral somente em comparação com controles do grupo 38 dias (Figura 11F). Não foram encontradas diferenças pelo efeito dieta ou idade da densidade óssea (Figura 11B) e da porcentagem de material orgânico vertebral (Figura 11E).

Tabela 5. Pesos biofísicos (peso úmido, imerso, seco e das cinzas) das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros Vertebrais	Grupos Experimentais					
	C38	R38	C4	R4	C16	R16
Peso Úmido (g)	0,091±0,010	0,062±0,010 ^A	0,093±0,012	0,086±0,011 ^b	0,092±0,015	0,099±0,011 ^b
Peso Imerso (g)	0,026±0,003	0,016±0,002 ^A	0,027±0,003	0,023±0,007	0,024±0,006	0,022±0,005
Peso Seco (g)	0,045±0,009	0,037±0,004	0,061±0,006 ^a	0,054±0,014 ^b	0,061±0,010 ^a	0,056±0,006 ^b
Peso das Cinzas (g)	0,025±0,002	0,024±0,003	0,037±0,004 ^a	0,036±0,005 ^b	0,037±0,005 ^a	0,034±0,003 ^b

C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses, R16: Restrito 16 meses. Média ± DP; p<0,05: a vs. C38; b vs. R38. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 11. Parâmetros biofísicos da vértebra dos animais dos diferentes grupos experimentais.



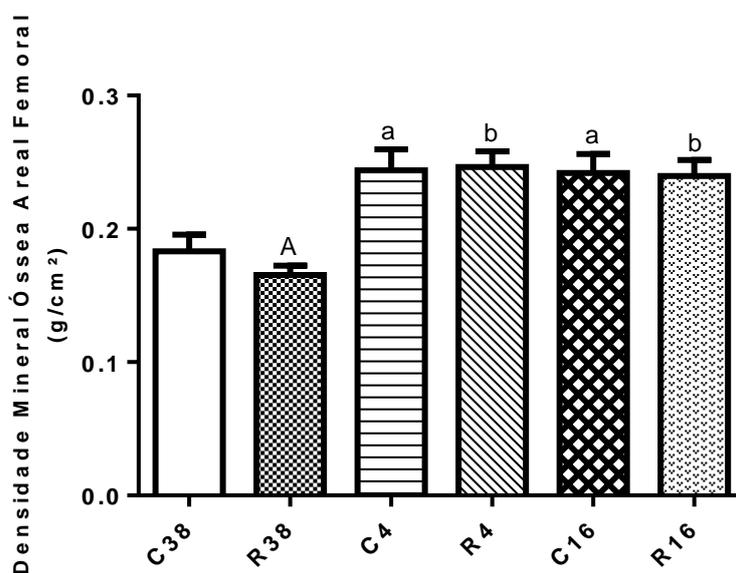
A: Volume ósseo vertebral; B: Densidade óssea vertebral; C: Densidade mineral vertebral; D: Porcentagem de água vertebral; E: Porcentagem de material orgânico vertebral; F: Porcentagem de material mineral vertebral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.4 Densitometria Óssea Areal Total – Femoral e Vertebral

A análise da densitometria óssea areal, realizada em todo o osso fêmur, denotou diferença, em relação à dieta, entre o grupo com 38 dias, apresentando o restrito menor densidade (Figura 12). Em relação à idade, maior densidade óssea foi observada em animais com 4 meses de idade (Figura 12).

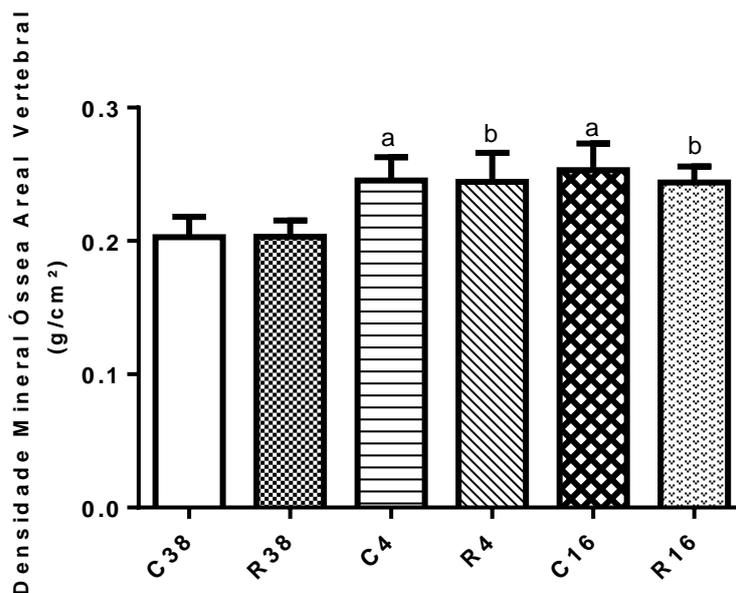
A análise da densitometria óssea areal vertebral, realizada em toda a vértebra, demonstrou apenas diferença em relação à idade, apresentando, assim como o observado na análise do fêmur, maior densidade nos animais com 4 meses de idade (Figura 13).

FIGURA 12. Densitometria óssea femoral dos animais dos diferentes grupos experimentais.



C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 13. Densitometria óssea vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.



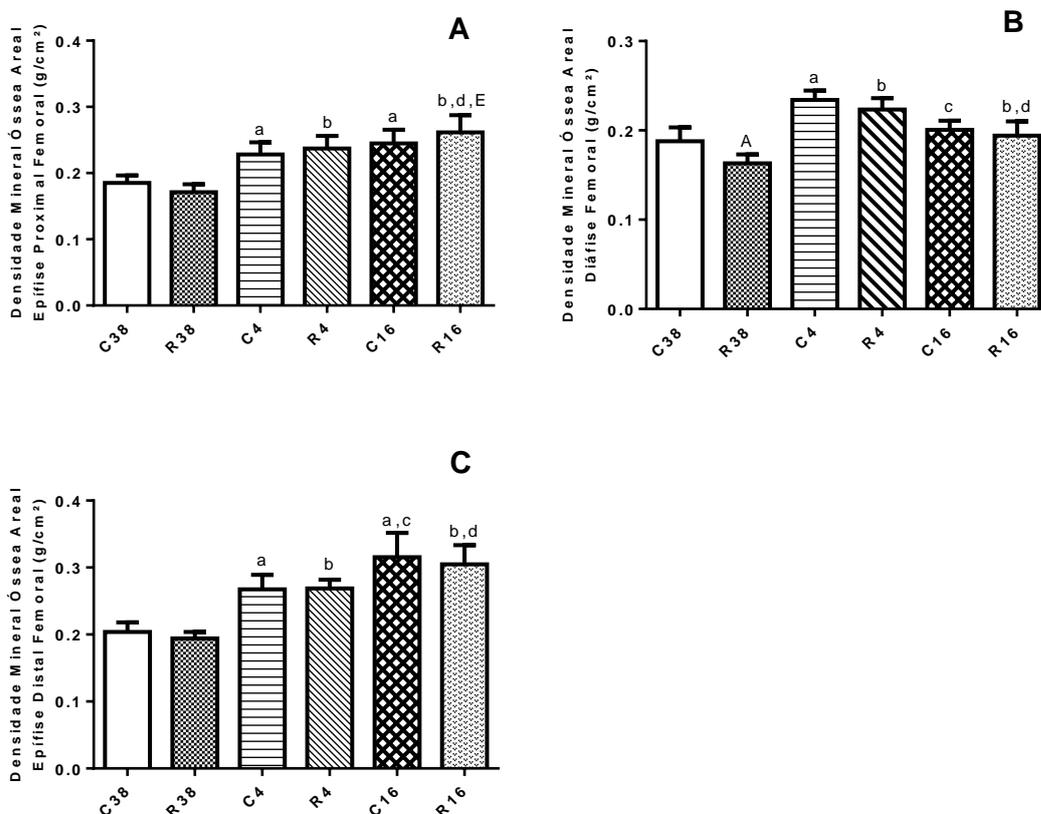
C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.4.1 Densitometria Óssea Areal Femoral por Regiões– Epífise Proximal, Diáfise e Epífise Distal

A análise realizada nas três regiões ósseas, levando-se em consideração a influência da dieta, promoveu aumento da densidade na epífise proximal de restritos com 16 meses (Figura 14A), e redução da densidade na diáfise de restritos com 38 dias (Figura 14B), quando em comparação aos seus controles, enquanto na epífise distal não foram observadas diferenças em função da dieta (Figura 14C).

Como se observou na análise densitométrica femoral, a diáfise (Figura 14B) também apresentou maior densidade óssea em animais com 4 meses, em função da idade. Além disso, animais com 16 meses apresentaram menor densidade também na região diafisária. Por outro lado, na epífise distal, foi encontrada maior densidade em animais com 16 meses de idade (Figura 14C), assim como observado na epífise proximal de restritos com 16 meses, que apresentaram maior densidade em comparação aos demais restritos com 38 dias e 4 meses de idade (Figura 14A).

FIGURA 14. Densitometria óssea de diferentes regiões femorais dos animais dos diferentes grupos experimentais.



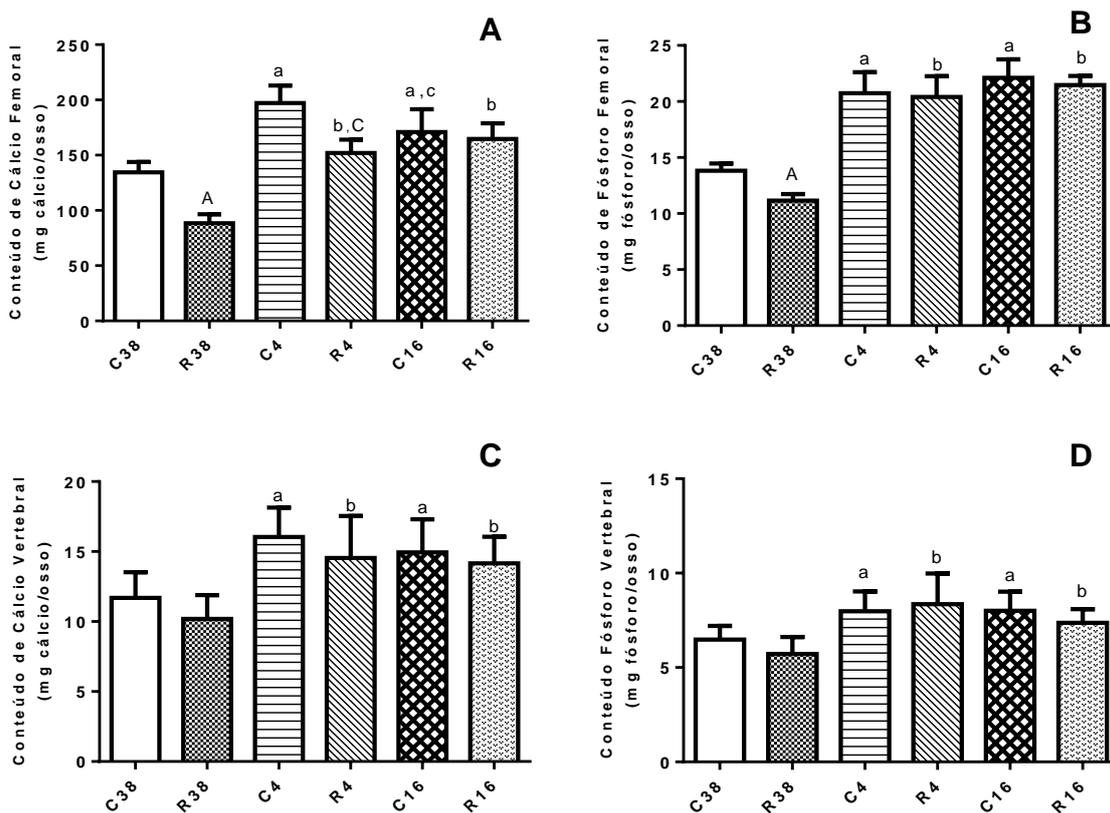
A: Densidade óssea da epífise proximal femoral; B: Densidade óssea da diáfise femoral; C: Densidade óssea da epífise distal femoral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.5 Conteúdo de cálcio e fósforo – Femoral e vertebral

O conteúdo de cálcio femoral foi diferente nos grupos 38 dias e 4 meses, apresentando, seus respectivos animais em restrição alimentar, menor conteúdo de cálcio (Figura 15A). Estas diferenças não foram observadas do conteúdo de cálcio vertebral (Figura 15C). Por outro lado, foram encontradas diferenças do conteúdo de cálcio femoral e vertebral pelo efeito da idade (Figura 15A e 15C). Ademais, o grupo controle 16 meses apresentou menor conteúdo de cálcio femoral em relação ao controle 4 meses (Figura 15A).

A dieta influenciou o conteúdo de fósforo femoral reduzindo-o em animais com restrição alimentar do grupo 38 dias (Figura 15B). Além disso, o conteúdo de fósforo foi, pelo efeito da idade, maior no grupo 4 meses em relação com o grupo 38 dias (Figura 15B), o que também pode ser observado na variável fósforo vertebral (Figura 15D).

FIGURA 15. Bioquímica óssea femoral e vertebral dos animais dos diferentes grupos experimentais.



A: Conteúdo de cálcio femoral; B: Conteúdo de fósforo femoral; C: Conteúdo de cálcio vertebral; D: Conteúdo de fósforo vertebral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$; a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.6 Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea – Osteocalcina e TRAP

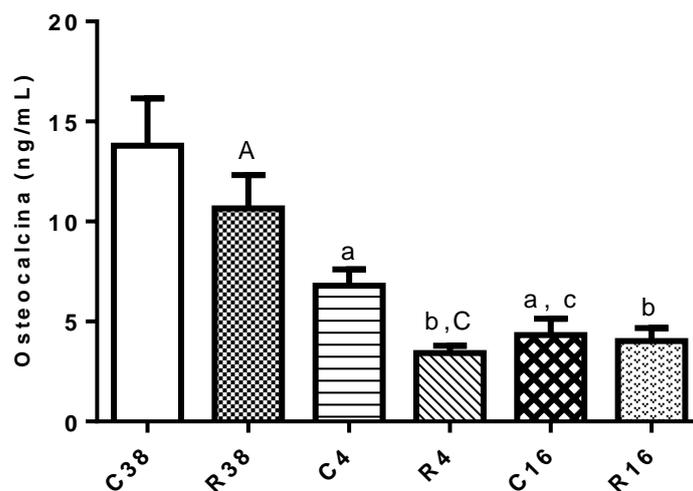
A análise dos resultados obtidos para os marcadores bioquímicos de formação (osteocalcina) e reabsorção óssea (TRAP) revelou situações distintas em função do tratamento. A intervenção alimentar de restrição, realizada em animais com 38 dias e 4 meses de idade, resultou em diminuição da concentração plasmática de osteocalcina, mas

não alterou a formação óssea de animais restritos com 16 meses de idade (Figura 16). Por outro lado, os valores obtidos nas determinações de TRAP indicaram diminuição da reabsorção óssea somente em animais restritos com 16 meses de idade (Figura 17).

Em função da idade, animais (controles e restritos) com 4 meses, apresentaram diminuição da formação óssea em comparação aos animais do grupo com 38 dias de idade (Figura 16). Já controles com 16 meses apresentaram, além da diferença para com o grupo 38 dias, menor formação em relação ao grupo controle com 4 meses, enquanto restritos com 16 meses obtiveram apenas diferença na comparação com restritos 38 dias (Figura 16).

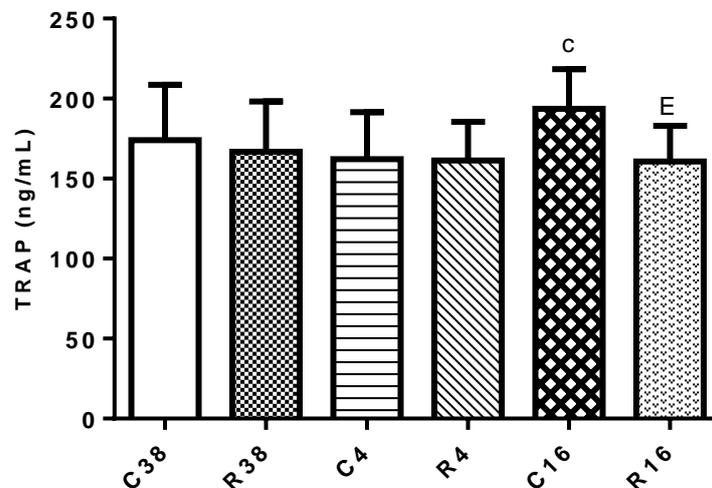
Em adição, somente animais controles com 16 meses de idade apresentaram aumento da reabsorção óssea. Este aumento foi em relação ao grupo controle com 4 meses de idade (Figura 17).

FIGURA 16. Concentração plasmática de osteocalcina dos animais dos diferentes grupos experimentais.



C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

FIGURA 17. Concentração plasmática de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) dos animais dos diferentes grupos experimentais.



C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

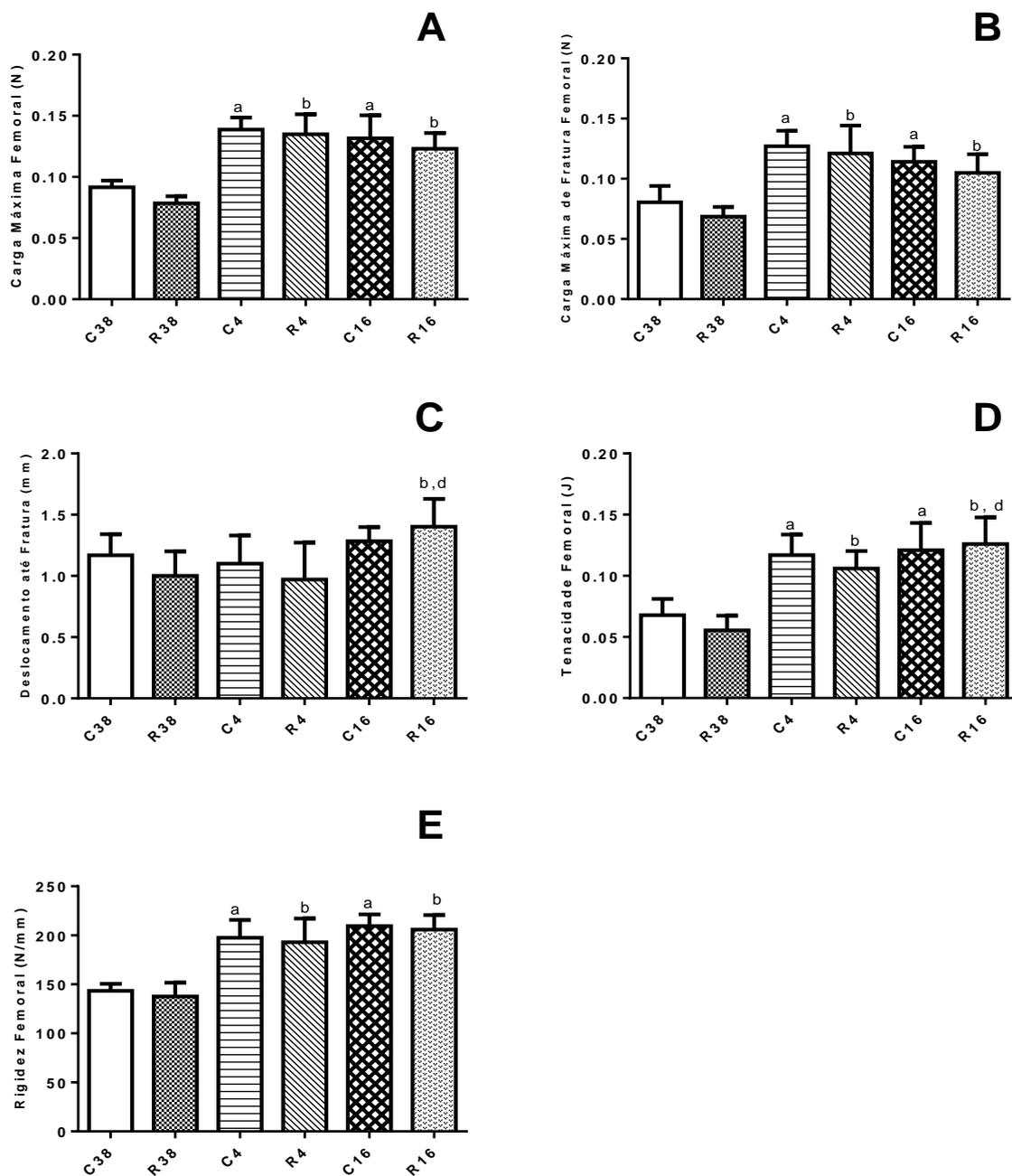
6.7 Biomecânica femoral e vertebral

6.7.1 Biomecânica femoral

Não foram observadas diferenças das propriedades biomecânicas frente à dieta de restrição (Figuras 18A, 18B, 18C, 18D e 18E).

Em consideração ao efeito da idade, o ensaio biomecânico demonstrou aumento da carga máxima em animais com 4 meses de idade em comparação com animais do grupo 38 dias (Figura 18A). Resultado semelhante foi observado para a carga máxima até o momento da fratura (Figura 18B) e rigidez (Figura 18E). Em adição, a tenacidade óssea de animais em restrição alimentar com 16 meses ainda demonstrou ser maior do que a tenacidade de restritos com 38 dias e 4 meses (Figura 18D). Animais em restrição alimentar com 16 meses tiveram maior deslocamento até a fratura em comparação com restritos 38 dias e com 4 meses (Figura 18C).

FIGURA 18. Parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais.

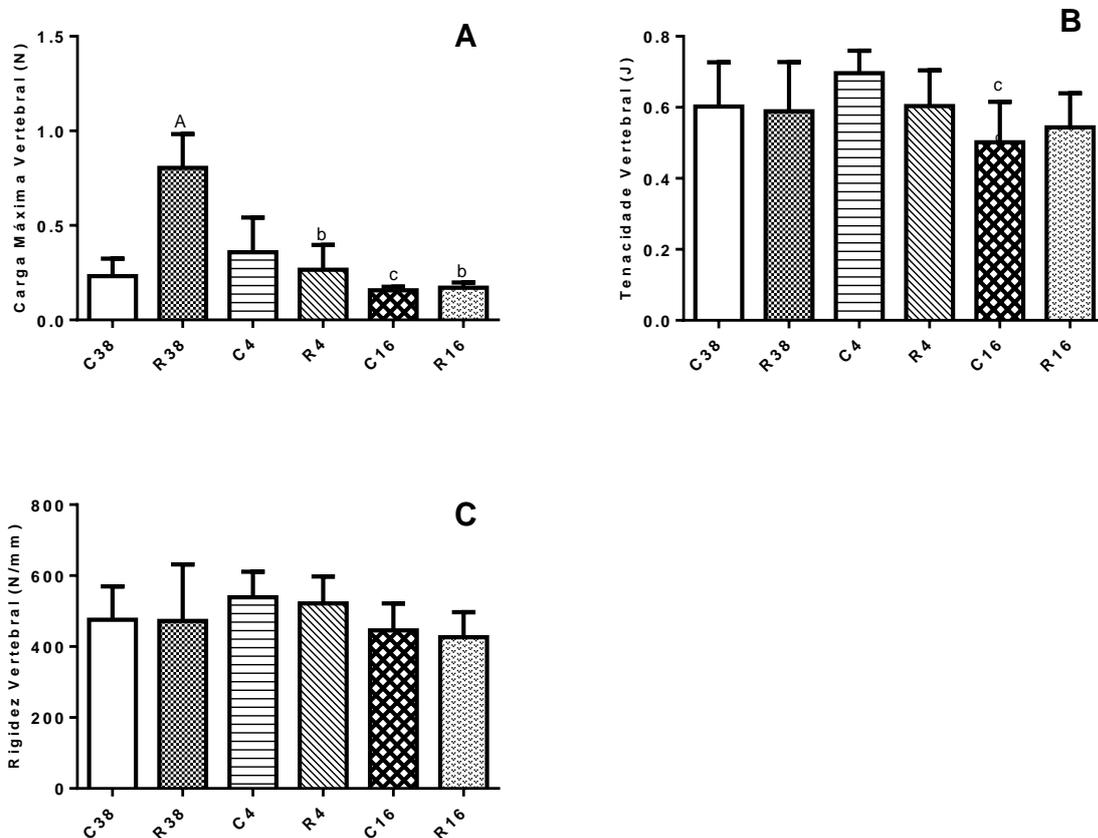


A: Carga máxima femoral; B: Carga máxima de fratura femoral; C: Deslocamento até fratura femoral; D: Tenacidade femoral. E: Rigidez femoral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; d vs. R4. Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

6.7.2 Biomecânica vertebral

Foi observado aumento da carga máxima vertebral (Figura 19A) em animais em restrição alimentar do grupo 38 dias. Esta análise demonstrou também diminuição decorrente da idade em restritos com 4 e 16 meses quando comparados com restritos 38 dias, e de controles 16 meses quando comparados com controles 4 meses de idade. Enquanto a tenacidade vertebral apresentou redução pelo efeito da idade no controle 16 meses comparado ao controle 4 meses (Figura 19B), não foram observadas diferenças da rigidez vertebral (Figura 19C).

FIGURA 19. Parâmetros biomecânicos da vértebra dos animais dos diferentes grupos experimentais.



A: Carga máxima vertebral; B: Tenacidade vertebral. C: Rigidez vertebral. C38: Controle 38 dias, R38: Restrito 38 dias; C4: Controle 4 meses, R4: Restrito 4 meses; C16: Controle 16 meses; R16: Restrito 16 meses. Média \pm DP; $p < 0,05$: a vs. C38; b vs. R38; c vs. C4. Letras maiúsculas indicam diferença na variável tratamento; Letras minúsculas indicam diferença na variável idade.

7 DISCUSSÃO

Os diferentes processos adaptativos à restrição alimentar, associados à idade, da quantidade e qualidade óssea, de acordo com a região analisada, fundamentam avaliação para melhor compreensão da relação restrição alimentar e osso. Este estudo mostrou os efeitos da restrição alimentar sobre a quantidade e qualidade óssea cortical (fêmur) e trabecular (vértebra) de animais pré-púberes (38 dias), adultos jovens (4 meses) e idosos (16 meses). A restrição alimentar promoveu alterações de parâmetros distintos que influenciaram o desenvolvimento e as propriedades ósseas de ratos pré-púberes, mas não de ratos adultos jovens ou idosos. As idades analisadas foram escolhidas para acompanhar o crescimento e o desenvolvimento ósseo observado em pré-púberes (PAJAMÄKI et al., 2003), a maturação esquelética em adultos jovens (WARREN; BEDI, 1985) e a perda óssea em ratos idosos (MARDON et al., 2008). Ressaltamos que respeitamos a mesma porcentagem de restrição, linhagem do animal e tempo de tratamento para todos os grupos. Ainda, de grande importância, foi avaliar diferentes sítios ósseos, pois efeitos distintos foram observados de acordo com a predominância de osso trabecular ou cortical.

Mesmo em animais que sofreram aumento gradativo da massa corporal, justificada pela fase exponencial do crescimento com o avanço da idade, nossos dados confirmaram que a restrição alimentar 30%, por 6 semanas, foi adequada para reduzir a massa corporal de animais em restrição. Resultado em concordância com a de outros estudos que observaram redução da massa corporal frente à dieta de restrição alimentar (BANU et al., 1999; TALBOTT et al., 2001; LAMBERT et al., 2005; BAEK et al., 2008; HAMRICK et al., 2008; TATSUMI et al., 2008; WESTERBEEK et al., 2008; DEVLIN et al., 2010; HAWKINS et al., 2010; HATTORI et al., 2013; HATTORI et al., 2014). Em associação, pôde-se constatar que a restrição alimentar promoveu, ao mesmo tempo, redução do consumo de calorias totais e da massa adiposa abdominal, influenciando, diretamente, a massa corporal dos animais restritos.

A massa corporal está intimamente correlacionada com diferentes propriedades ósseas (REID, 2002; REID, 2008), pois exerce estresse mecânico (BURR; ROBLING, 2002) que promove respostas adaptativas, levando à liberação de fatores locais e/ou sistêmicos que regulam a diferenciação de células ósseas (REID, 2002). Além de regular propriedades ósseas, é importante avaliar o impacto do consumo reduzido de alimentos e

da massa corporal, durante a aquisição do esqueleto (WESTERBEEK et al., 2008), uma condição associada à baixa massa óssea e forte preditora ao risco de fraturas e osteoporose em uma fase tardia (SEEMAN, 1994). Nossos achados confirmaram a influência negativa do baixo consumo de alimentos associado à baixa massa corporal durante o crescimento ósseo, observado em animais que iniciaram a restrição alimentar com 38 dias de idade. Estes animais apresentaram redução de parâmetros indicando comprometimento do desenvolvimento ósseo. Considerando a necessidade de energia para formação óssea, é esperado que a formação óssea seja comprometida quando a energia é restrita (TURNER; IWANIEC, 2010). Por outro lado, a redução do consumo de alimentos, foi capaz de reduzir a massa corporal, mas não influenciou expressivamente parâmetros ósseos de animais em restrição alimentar com 4 ou 16 meses de idade, indicando para estas idades, a baixa influência da redução da massa corporal sobre a massa óssea. Nossos dados apoiam o estabelecido por Turner e Iwaniec (2010), em que a massa óssea está correlacionada com a massa corporal durante o crescimento, mas não influencia o metabolismo ósseo do esqueleto maduro. De fato, foi demonstrado (HATTORI et al., 2013) que a baixa disponibilidade de energia e massa corporal tem pouco efeito sobre os tecidos ósseos em ratos machos adultos. Estas informações consolidam a importância da nutrição e do ganho de massa corporal durante o desenvolvimento para o ganho da massa óssea.

O acentuado aumento, observado com o aumento da idade, dos parâmetros biométricos (comprimento do fêmur e altura da vértebra) deste estudo, são justificados pelo crescimento ósseo constante ajustado para suportar tensões mecânicas (FROST, 1993). No entanto, a espessura femoral sofreu estabilização estrutural nos animais idosos. Em suporte a este achado, Lanyon (1987) indica que alterações adaptativas em resposta à carga ocorrem, principalmente, na pré-puberdade promovendo a maior parte das modificações estruturais. Quando o efeito da dieta foi avaliado, o comprimento do fêmur e a altura da vértebra tiveram seu crescimento comprometido em restritos pré-púberes e adultos jovens, concluindo que a restrição alimentar, nestas idades, pode alterar o crescimento longitudinal do esqueleto apendicular e axial. Segundo, Warren e Bedi (1985), o crescimento ósseo ocorre em um momento em que comprometimentos das dimensões dos ossos também podem acontecer, justificando a influência da dieta em nossos dados. Nossos achados estão em concordância com os achados de Devlin e colaboradores (2010), que indicaram que após 3 semanas de restrição a 30%, animais com 6 semanas de idade apresentaram fêmures mais curtos do que seus controles. Lamothe e

colaboradores (2003) observaram atrasos do crescimento ósseo, além de uma redução da altura da sexta vértebra lombar de animais restritos. Em extensão ao comprometimento do comprimento dos fêmures e altura das vértebras de animais pré-púberes do nosso estudo, observamos, em consequência, redução do volume ósseo que, por sua vez, é justificada pela redução do peso úmido e peso imerso observada nestes mesmos animais.

Em nosso estudo, verificamos que a densidade mineral e conteúdo mineral (porcentagem de material mineral) femoral não sofreram influência da dieta na comparação entre controles e restritos, mas, como citado anteriormente, foi observado menor volume ósseo para restritos com 38 dias. Dados suportados pelo estudo de Martin (1990), onde indica relação direta entre a densidade mineral e o conteúdo mineral e uma relação inversa entre densidade mineral e volume ósseo. Nossos resultados de volume ósseo estão de acordo com os dados obtidos por Hawkins e colaboradores (2010). Estes autores observaram, por meio de microtomografia computadorizada (microCT), baixo volume ósseo em ratas restritas a 40%. Ratos restritos (30%) também apresentaram redução do volume ósseo, constatado, por meio microCT e histomorfometria (DEVLIN et al., 2010).

Quanto à densidade óssea, realizada por meio do princípio de Arquimedes, não foram observadas diferenças pela influência da dieta em fêmures ou vértebras. Por outro lado, ao analisar a densidade óssea, por meio da técnica DXA, foi observado redução da densidade, em fêmur, mas não em vértebras, de restritos pré-púberes. Em relação à idade, fêmures de animais com 4 meses, deste estudo, apresentaram-se mais densos, por meio da Técnica de Arquimedes e DXA, em relação aos fêmures de animais mais jovens ou mais velhos, resposta atribuída à aquisição máxima de massa óssea iniciada na puberdade (BOSKEY; COLEMAN, 2010). Entretanto esta resposta só foi observada em vértebras quando utilizada a técnica de DXA. Essa divergência dos resultados, pode, em parte, ser em relação às diferenças metodológicas. A densitometria óssea realizada pelo DXA fornece uma estimativa da densidade areal apresentando uma abordagem bidimensional. Esta estimativa não expressa densidade volumétrica, isto porque não apresenta informação sobre profundidade e, desta forma ossos maiores podem superestimar a DMO, enquanto que a DMO de ossos pequenos podem ser subestimados (KATZMAN et al., 1991; KEENAN et al., 1997; MUHAMMAD et al., 2013). Por outro lado, a técnica da DXA é considerada metodologia padrão ouro para avaliação da densidade mineral óssea sendo utilizada em diferentes estudos com essa finalidade (NHI, 2001).

No presente estudo, as avaliações densitométricas realizadas em diferentes regiões (epífise proximal, diáfise e epífise distal) do fêmur, sugerem uma diferença cinética da densidade óssea de acordo com a região analisada em resposta à dieta de restrição. Nossos resultados demonstram que as densidades das epífises não foram negativamente afetadas pela dieta. Ainda, a dieta influenciou positivamente a densidade, na epífise proximal, de restritos com 16 meses, apresentando maior densidade que seu controle. Por outro lado, a densidade da diáfise femoral de animais restritos pré-púberes foi reduzida. Resultado condizente com os dados da densidade diafisária tibial observado por Hattori e colaboradores (2014) em animais restritos. Esses autores sugerem que a condição de baixa energia, observada na restrição, causa prejuízo ósseo durante a fase de crescimento. Considerando que o córtex consiste de trabéculas compactadas (TANCK et al., 2006), sugerimos que a densidade cortical reduzida, observada em nossos animais restritos pré-púberes, pode ser atribuída à uma aposição incompleta ou retardada, que resultou na redução longitudinal e diametral (observada pela biometria) e na densidade diafisária. Ainda, as diferenças observadas nos valores da aDMO, entre as regiões femorais estudadas, provavelmente sejam dependentes das diferenças no grau de mineralização e maturação óssea, subsequente à atividade metabólica para cada tipo ósseo (trabecular e compacto). A importância desses achados, reflete no fato que durante o crescimento e desenvolvimento ósseo, alterações nutricionais podem afetar a região diafisária (como observado em restritos pré-púberes), possivelmente, pela redução da aposição periosteal cortical, influenciando em sua espessura e densidade. Em adição, o aumento da densidade observado em restritos com 16 meses, sugere que a restrição nessa idade pode ser uma importante intervenção para proteção contra fraturas, considerando que a região proximal do fêmur se destaca como a região de maior suscetibilidade para incidência de fraturas osteoporóticas em função da idade (CUMMINGS; MELTON, 2002). De fato, Talbot e colaboradores (2001), constataram, a partir de análise de regressão, relação direta entre a densidade e resistência óssea, fortalecendo a ideia de que uma maior densidade implica em estratégia contra fraturas.

Conforme esperado, o percentual de água femoral diminuiu à medida que os animais se desenvolveram. O osso em desenvolvimento é caracterizado por um elevado teor de água e de material orgânico, enquanto que o tecido ósseo em envelhecimento apresenta baixas concentrações de ambas frações (BOSKEY; COLEMAN, 2010). Ainda, uma maior densidade mineral associada com maior percentual de material mineral, leva a um conseqüente menor percentual de água, como

podemos observar na avaliação das vértebras de restritos com 38 dias. Além disso, o teor de água e de material orgânico são inversamente proporcionais à concentração mineral (SMITH, 1964), como também evidenciados em nossos resultados da vértebra no grupo 38 dias. A proporção de água, material orgânico e mineral, assim como a qualidade desses elementos e o modo como estão arrançados na matriz óssea, são fundamentais para as propriedades mecânicas dos ossos (CURREY, 2003). Constatação evidenciada mediante maior porcentagem de material mineral e maior carga máxima, observada em vértebras de restritos com 38 dias. Paralelamente, indicamos que animais restritos não tiveram a qualidade óssea, em relação ao material orgânico, prejudicada uma vez que esse parâmetro foi similar ao encontrado nos controles. Estes achados se refletem sobre a rigidez, onde não foram observadas diferenças entre os grupos.

Os resultados da bioquímica óssea revelaram, em relação à idade, aumento do conteúdo de cálcio e fósforo, femoral e vertebral, para grupos adultos jovens. Esses aumentos podem ser atribuídos ao crescimento e desenvolvimento dos animais com aumento da deposição mineral decorrente da idade (COMPSTON, 2011). Em contrapartida, observamos, pela influência da dieta, reduções em fêmures, mas não em vértebras, do conteúdo de cálcio e fósforo de restritos pré-púberes e do conteúdo de cálcio de restritos adultos jovens. As diminuições dos pesos biofísicos, juntamente com a diminuição do conteúdo de cálcio e fósforo femoral, indicam uma alteração da homeostase mineral destes íons frente à dieta de restrição. Dados refletidos na análise do marcador sistêmico de formação óssea, a osteocalcina, sugerindo que animais adultos jovens e, especialmente, restritos pré-púberes, apresentaram redução da atividade osteoblástica (osteocalcina) e da mineralização óssea (no que se refere à deposição de cálcio e fósforo) em fêmures, uma vez que a osteocalcina é secretada pelos osteoblastos maduros e determina o processo de mineralização por apresentar interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita (DÔRES et al., 2001; SHEA et al., 2009). Deve-se a esses resultados uma consideração importante, tendo em vista que nessa faixa etária a osteocalcina encontra-se comumente aumentada, por haver maior necessidade de deposição óssea para o processo de mineralização durante a fase de aquisição da massa óssea (KANBUR et al., 2002). Contudo, durante o crescimento e desenvolvimento ósseo, cerca de 20% da aquisição da massa óssea é afetada pela condição nutricional (FERRARI, 2005). Desta forma, de acordo com nossos resultados, uma dieta restritiva, no decorrer do crescimento e desenvolvimento ósseo, tem potenciais implicações na quantidade e qualidade óssea (avaliada sistematicamente), podendo acarretar em prejuízo ósseo. Por

outro lado, o decréscimo da capacidade proliferativa das células osteoprogenitoras decorrentes do envelhecimento (LOPAS et al., 2014) não foi observado em animais restritos com 16 meses de idade (quando comparado com animais com 4 meses de idade), indicando que nessa faixa etária, a dieta de restrição pode contribuir para a manutenção das propriedades ósseas. Em associação a esse resultado, chamam a atenção os valores obtidos para a atividade de TRAP em animais restritos com 16 meses de idade. Nesses animais, a atividade da TRAP, como indicadora da reabsorção óssea, foi reduzida, sugerindo que, além de conservar a formação, a dieta de restrição, reduziu a reabsorção óssea em fêmures de animais idosos. Com o envelhecimento o balanço ósseo torna-se negativo, favorecendo a reabsorção em relação à formação óssea (COMPSTON, 2011). Essa combinação implica em redução de massa e força óssea que, por fim, pode resultar em osteoporose (DEMONTIERO et al., 2012). Mediante aos resultados de formação e reabsorção óssea, obtidos para animais restritos idosos, há indícios que a dinâmica da remodelação óssea foi modificada frente à dieta de restrição, evidenciando um importante papel preventivo contra a perda óssea esperada com a idade. Nossos dados corroboram com Baek e colaboradores (2008) que verificaram prejuízo da integridade do esqueleto por meio da diminuição da formação óssea (concentração de osteocalcina foi 32% mais baixa para os ratos em restrição), mas não pelo aumento da reabsorção óssea. Consistente com os achados de Baek e colaboradores (2008), Tatsumi e colaboradores (2008), observaram efeito supressor da formação óssea (redução da taxa de formação e superfície óssea, assim como da taxa de aposição mineral) um mês após o início da restrição, mas alteração da reabsorção óssea não foi observada. Em divergência, Devlin e colaboradores (2010) observaram, em animais restritos, diminuição da aquisição esquelética através da inibição de índices da formação como superfície de mineralização, taxa de formação óssea e número de osteoblastos e ativação da reabsorção óssea constatada pelo maior número de osteoclastos. Estes autores sugerem que, em associação, formação diminuída e reabsorção óssea aumentada contribuíram para reduzida aquisição óssea em animais restritos.

Importante ressaltar que os marcadores ósseos circulantes (sistêmicos), como a osteocalcina e TRAP, refletem a remodelação de todo o esqueleto, porém o estado local de determinada região óssea pode ser avaliado por técnicas direcionadas para cada região de interesse, tais como a bioquímica e biofísica óssea realizadas em nosso estudo, que permitem a avaliação direta da composição óssea. Contudo, os resultados obtidos pelos marcadores sistêmicos, foram integrativos a essas análises e permitiram, em conjunto

com todos os demais dados (biométricos, densitométricos e biomecânicos), evidenciar uma mudança da deposição de minerais (de acordo com a região), como adaptação do metabolismo ósseo em resposta à dieta de restrição.

As desordens que ocorreram durante a mineralização óssea, fato observado com redução de alguns parâmetros ósseos femorais (comprimento, pesos biofísicos, volume ósseo, densidade mineral óssea, conteúdo de cálcio e fósforo) não refletiram sobre as propriedades biomecânicas em que foi observado semelhança entre controles e restritos. Estes dados sugerem que a dieta de restrição alimentar foi suficiente para promover reduções da biometria, biofísica, densidade e bioquímica óssea, especialmente em animais com 38 dias, mas não suficiente para comprometer a qualidade óssea em relação à biomecânica. As variáveis do ensaio biomecânico fornecem informações sobre as propriedades do osso cortical (TURNER; BURR, 1993). Uma vez que este tipo de tecido ósseo apresenta uma pequena área de superfície, baixa porosidade e baixa taxa metabólica (KEAVENY et al, 2001) é esperado que respostas significantes aconteçam somente após acentuada atividade de remodelação óssea. Nossos resultados divergem dos obtidos com o teste de flexão a três pontos de Devlin e colaboradores (2010), que obtiveram redução da força máxima, rigidez e módulo de elasticidade do fêmur em animais restritos. Embora Pando e colaboradores (2014) não tenham encontrado diferenças de rigidez, na diáfise do úmero, a carga de fratura foi menor em restritos do que a evidenciada no grupo controle. As diferenças encontradas nas propriedades ósseas entre nosso estudo e estudos anteriores (DEVLIN, 2010; PANDO 2014), pode ser devido às diferenças nas espécies estudadas ou no protocolo de restrição no que diz respeito à porcentagem de restrição, idade do início de restrição e tempo de tratamento.

Um desequilíbrio entre a aposição periosteal e a reabsorção intra e endocortical, fatores chaves para o desenvolvimento da fragilidade óssea (COMPSTON, 2011), não foi identificado em animais idosos deste estudo. Consideramos isto na observação da manutenção da espessura femoral e dos valores obtidos na análise da competência biomecânica. Em referência, o maior deslocamento até a fratura, observado em fêmures de restritos com 16 meses, conjuntamente com os achados das demais propriedades ósseas, indica que a restrição alimentar poupou estes animais do esperado declínio da força e resistência óssea com o envelhecimento (CURREY, 2003). Estudos (HAMRICK et al., 2008; TATSUMI et al., 2008) atribuem à restrição atenuação e proteção contra a perda óssea relacionada à idade. Em acréscimo, podemos consolidar esta menção frente aos nossos dados de tenacidade femoral, indicando que animais em restrição alimentar

com 16 meses tiveram maior habilidade em absorver energia, ou seja, maior capacidade de resistir ao impacto mecânico em relação a restritos com 4 meses. Turner e Burr (1993) referem que mesmo que a carga máxima apresente-se menor, um osso tenaz possui maior capacidade de resistir à fratura. Referência que indica a importância de nossos achados sobre a integridade estrutural óssea de ratos idosos.

Nas avaliações das propriedades biomecânicas da vértebra, encontramos aumento da carga máxima em restritos pré-púberes em relação a seu controle. Resultado condizente com achados de Lambert e colaboradores (2005). Em adição, podemos associar o resultado da carga máxima com o observado aumento da porcentagem de material mineral e da densidade mineral para estes mesmos animais uma vez que a força óssea é influenciada por uma variedade de determinantes como as propriedades intrínsecas do tecido e o grau de mineralização, propriedades que influenciam a resistência mecânica (BOIVIN et al., 2008). Considerando que este tipo de tecido ósseo é metabolicamente mais ativo que o tecido cortical (KEAVENY et al., 2001), era esperado respostas que indicassem maior atividade de remodelação óssea, contudo, como observado por outros autores, a restrição parece proteger o osso vertebral de diferentes maneiras. Devlin e colaboradores (2010) apoiam a ideia de Hamrick (2004) que indica a conservação do osso trabecular vertebral em animais restritos como uma adaptação à fome. Posteriormente às suas investigações em 2004, Hamrick e colaboradores (2008) sugeriram que a preservação do osso trabecular vertebral pode ser um mecanismo adaptativo para armazenar mineral. Nossos dados apoiam essa ideia mediante ao observado aumento da porcentagem de material mineral e da densidade mineral encontrada na vértebra dos animais em restrição alimentar com 38 dias. Em relação à idade, nossos dados indicam redução da carga máxima vertebral, corroborando com o estudo de LaMothe e colaboradores (2003). Estes autores indicam um declínio relativo à idade em propriedades mecânicas do osso. De importância ressaltar que somente o grupo controle com 16 meses apresentou redução em relação ao grupo controle 4 meses do valor da carga máxima, fato não observado para restritos com 16 meses em comparação com restritos 4 meses. Em complemento, a tenacidade foi reduzida em controle 16 meses em relação ao controle com 4 meses de idade, contudo esse achado não foi encontrado em restritos com 16 meses de idade. A conservação do osso trabecular pode explicar a ausência de comprometimento das propriedades ósseas vertebrais de nosso estudo. Ressalva-se a importância clínica dos achados do teste biomecânico, considerando a relação entre resistência e fratura óssea (IMAI, 2015).

Por fim, embora na dieta de restrição, utilizada em nosso estudo, não tenha sido realizada adequação (suplementação) nutricional, a restrição não foi limitante sobre a restrição de minerais. Consideramos isso, ao analisarmos a biofísica óssea (densidade mineral e porcentagem de material mineral), de fêmures e vértebras, e indicarmos, independentemente da idade, ausência de influência ou efeito positivo para esses parâmetros ósseos.

8 CONCLUSÕES

Nossos dados revelaram que a restrição alimentar influenciou as propriedades ósseas dos animais de acordo com a idade e sítio analisados. Enquanto animais com 38 dias apresentaram prejuízo de diferentes propriedades ósseas femorais, relevantes parâmetros indicaram efeito positivo da restrição sobre o metabolismo vertebral. Animais com 4 meses apresentaram comprometimento de alguns parâmetros ósseos insuficientes para afetar a integridade óssea. Por outro lado, animais que sofreram restrição alimentar aos 16 meses de idade, parecem apresentar proteção óssea uma vez que a redução de importantes valores de parâmetros ósseos, esperada para esta idade, não foi observada.

9 REFERÊNCIAS

ALEXEYEV, M.F.; LEDOUX, S.P.; WILSON, G.L. Mitochondrial DNA and aging. **Clin Sci**, v. 107, n. 4, p. 355-64, 2004.

ANDERSEN, T.L.; SONDERGAARD, T.E.; SKORZYNSKA K.E., et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. **Am J Pathol**, v. 174, n.1, p. 239–247. 2009.

ÅKESSON, K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. **Bull World Health Organ**, v.81, n.9, p.657-664, 2003.

ARMAS, L.A.; RECKER, R.R. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 41, n. 3, p. 475-486, 2012.

BAEK, K.; BARLOW, A.A.; ALLEN, M.R.; BLOOMFIELD, S.A. Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. **J Appl Physiol**, v. 104, p. 1086-93, 2008.

BARTKE, A.; BROWN-BORG, H.; MATTISON, J.; KINNEY, B.; HAUCK, S.; WRIGHT, C. Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 1, p. 21–28, 2001.

BANU, M.J.; ORHII, P.B.; MEJIA, W.; MCCARTER, R.J.; MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J.S.; KALU, D.N. Analysis of the effects of growth hormone, voluntary exercise, and food restriction on diaphyseal bone in female F344 rats. **Bone**, v. 25, n. 4, p. 469-80, 1999.

BURR, D.B.; ROBLING, A.G.; TURNER, C.H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, n.5, p.781-6, 2002.

BELLIDO, T. Osteocyte-driven bone remodeling. **Calcif Tissue Int**, v. 94, n. 1, p. 25–34, 2014.

BERGAMINI, E.; CAVALLINI, G.; DONATI, A.; GORI, Z. The anti-aging effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. **Biomed Pharmacother**, v.57, n. 5-6, p.203-8, 2003.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova**, v. 29, n. 6, p.1340-1344, 2006.

BONKOWSKI, M.; ROCHA, J.; MASTERNAK, M.; AL REGALEY, K.; BARTKE, A. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, n. 20, p. 7901–05, 2006.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 2, n. 6, 538-543, 2002.

BONJOUR, J.P.; CHEVALLEY, T.; FERRARI, S.; RIZZOLI, R. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. **Salud Publica Mex**, v. 51, n. 1 Suppl, p. S5-17, 2009.

BONJOUR, J.P.; THEINTZ, G.; LAW, F.; SLOSMAN, D.; RIZZOLI, R. Peak bone mass. **Osteoporos Int**, v. 4, n. 1 Suppl, p. 7-13, 1994.

BORGES, J.L.C.; BRANDÃO, C.M.A. Low bone mass in children and adolescents. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 4, p. 775-782, 2006.

BOSKEY, A.L.; COLEMAN, R. Aging and bone. **J Dent Res**, v. 89, p. 1333–1348, 2010.

BRANDÃO, C.M.A.; VIEIRA, J.G.H. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.43, n.6, p.401-408, 1999.

BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, v. 48, Suppl 4, p. iv3-8, 2009.

BROWN, J.J.; ZACHARIN, M.R. Proposals for prevention and management of steroid-induced osteoporosis in children and adolescents. **J Paediatr Child Health**, v.41, p. 553-57, 2005.

CAVALCANTE, A.G.M.; BRUIN, P.F.C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **J Bras Pneumol**, v.35, n. 12, p.1227-1237, 2009.

CHEN, H.; ZHOU, X.; FUJITA, H.; ONOZUKA, M.; KUBO, KY. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. **Int J Endocrinol**, v.2013, p.213-2341, 2013.

CIVITELLI, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n.21, p.188-192. 2008.

CLARKE, B. Normal Bone anatomy and physiology. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.3, n. 3 Suppl, p. S131–S139, 2008.

COMBS, T.P.; BERG, A.H.; RAJALA, M.W.; KLEBANOV, S.; IYENGAR, P.; JIMENEZ-CHILLARON, J.C.; et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. **Diabetes**, v.52, n. 2, p.268-76, 2003.

COMPSTON, J. Age-related changes in bone remodelling and structure in men: histomorphometric studies. **J Osteoporos**, p. 108324, 2011.

CUMMINGS, S.R.; MELTON, L.J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. **Lancet**, v.18, n. 359(9319), p. 1761–7, 2002.

CURREY, J.D. Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. **Osteoporos Int**, v. 14, n. 5 Suppl, p. S29-36, 2003.

CURREY, J.D. **The mechanical adaptations of bones**. In: STEVENSON, J. C.; LINDSAY, R. Osteoporosis. Princeton University Press. Chapman & Hall Medical, p.1-28, 1998.

DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P.; VARANASI, S.S. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v.61, n.5, p.577-587, 2008.

DEVLIN, M.J.; CLOUTIER, A.M.; THOMAS, N.A.; PANUS, D.A.; LOTINUN, S.; PINZ, I.; BARON, R.; ROSEN, C.J.; BOUXSEIN, M.L. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 9, p. 2078-88, 2010.

DE BAAT, P.; HEIJBOER, M.P.; DE BAAT, C. Development, physiology, and cell activity of bone. **Ned Tijdschr Tandheelkd**, v. 112, n. 7, p. 258-63, 2005.

DEMONTIERO, O.; VIDAL, C.; DUQUE, G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 4, n. 2, p. 61–76, 2012.

DOBLARÉ, M.; GARCIA, J.M.; GÓMEZ, M. J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng Fracture Mechanics**, v. 71, n.13-14, p. 1809– 1840, 2004.

DÔRES, S.M.C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, A.O. Vitamina k: metabolismo e nutrição. **Rev Nutr**, v. 14, n.3, p.207-218, 2001.

EINHORN, T. A. **The bone organ system: form and function**. In: MARCUS, R., FELDMAN, D.,KELSEY, J. (Ed.). Osteoporosis. San Diego: Academic Press, 1996.

HERNÁNDEZ-GIL, I.F.-T.; ALOBERA-GRACIA, M.A.; DEL-CANTO-PINGARRÓN, M.; BLANCO-JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 1, p. E47-51, 2006a.

HERNÁNDEZ-GIL, I.F.-T.; ALOBERA-GRACIA, M.A.; DEL-CANTO-PINGARRÓN, M.; BLANCO-JEREZ, L.. Physiological bases of bone regeneration II,

The remodeling process. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 2, p. E151-215, 2006b.

FERRARI, SL. Osteoporosis: a complex disorder of aging with multiple genetic and environmental determinants. **World Rev Nutr Diet**, v. 95, p. 35–51, 2005.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G.R.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M.J.; CERRI, P.S. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **Biomed Res Int**, p. 421746, 2015.

FONTANA, L.; KLEIN, S. Aging, adiposity, and calorie restriction. **JAMA**, v. 297, n. 9, p. 986-94, 2007.

FONTANA, L.; MEYER, T.E.; KLEIN, S.; HOLLOSZY, J.O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, n. 17, p. 6659-63, 2004.

FRANZ-ODENDAAL, T.A. Induction and patterning of intramembranous bone. **Front Biosci**, n. 16, p. 2734-46, 2011.

FROST H. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. **Clin Orthop Relat Res**, n.175, p. 286-92. 1983.

FUKUMOTO, S.; MARTIN, T.J. Bone as an endocrine organ. **Trends Endocrinol. Metab**, v.20, n.5, p.230-236, 2009.

GALI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortop Bras**, v. 9, n. 2, p. 53-62, 2001.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

GREEN, J.O.; NAGARAJA, S.; DIAB, T.; VIDAKOVIC, B.; GULDBERG, R.E. Age-related changes in human trabecular bone: Relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. **J Biomech**, v. 44, n. 12, p. 2279-85, 2011.

GUNTUR, A.R.; ROSEN, C. J. Bone as an endocrine organ. **Endocrine Practice**, v.18, n. 5, p.758–762, 2012.

HAUGE, E.M.; QVESEL, D.; ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **J Bone Miner Res**, v.16, n. 9, p. 1575–1582, 2001.

HAMRICK, M.W.; DING, K.H.; PONNALA, S.; FERRARI, S.L.; ISALES, C.M. Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. **J Bone Miner Res**, v. 23, p. 870-8, 2008.

HATTORI, S.; PARK, J.H.; AGATA, U.; AKIMOTO, T.; ODA, M.; HIGANO, M.; AIKAWA, Y.; NABEKURA, Y.; YAMATO, H.; EZAWA, I.; OMI, N. Influence of food restriction combined with voluntary running on bone morphology and strength in male rats. **Calcif Tissue Int**, v. 93, n. 6, p. 540-8, 2013.

HATTORI, S.; PARK, J.H.; AGATA, U.; ODA, M.; HIGANO, M.; AIKAWA, Y.; AKIMOTO, T.; NABEKURA, Y.; YAMATO, H.; EZAWA, I.; OMI, N. Food restriction causes low bone strength and microarchitectural deterioration in exercised growing male rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 60, n. 1, p. 35-42, 2014.

HAWKINS, J.; CIFUENTES, M.; PLESHKO, N.L.; AMBIA-SOBHAN, H.; SHAPSES, A.S. Energy restriction is associated with lower bone mineral density of the tibia and femur but not obese female rats. **J Nutr**, v.40, p. 31-7, 2010.

HEILBRONN, L.K.; DEJONGE L.; FRISARD, M.I.; DELANY, J.P.; LARSON-MEYER, D.E.; ROOD, J.; NGUYEN, T.; MARTIN, C.K.; VOLAUFOVA, J.; MOST, M.M.; GREENWAY, F.L.; SMITH, S.R.; DEUTSCH, W.A.; WILLIAMSON, D.A.; RAVUSSIN, E.; PENNINGTON, CALERIE TEAM. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 295, n. 13, p. 1539-48, 2006.

HOLLOSZY, J.O.; FONTANA, L. Caloric restriction in humans. **Exp Gerontol**, v. 42, n. 8, p. 709-712, 2007.

HOU, C.; BOLT, K.; BERGMAN, A. A general life history theory for effects of caloric restriction on health maintenance. **BMC Systems Biology**, v.19, p. 55:78, 2011.

IKEDA, S., et al. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. **Bone**, v. 28, n. 6, p. 625-633, 2001.

IMAI, K. Analysis of vertebral bone strength, fracture pattern, and fracture location: a validation study using a computed tomography-based nonlinear finite element analysis. *Aging Dis.* v. 6, n.3, p.180-7, 2015.

GULLBERG, B.; JOHNNELL, O.; KANIS, J. A. World-wide projections for hip fracture. **Osteoporos Int**, v. 7, n. 5, p. 407-413, 1997.

INGRAM, D.K.; YOUNG, J.; MATTISON, J.A. Calorie restriction in nonhuman primates: assessing effects on brain and behavioral aging. **Neuroscience**, v.145, n. 4, p. 1359-64, 2007.

JUDEX, S.; GARMAN, R.; SQUIRE, M.; DONAHUE, L.-R.; RUBIN, C. Genetically based influences on the site-specific regulation of trabecular and cortical bone morphology. **J Bone Min Res**, v. 19, n. 4, p. 600–606, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KANBUR, N.; DERMAN, O.; SEN, T.A.; KINIK, E. Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty. **Int J Adolesc Med Health**, v. 14, n. 3, p. 235-44, 2002.

KATZMAN, D.K.; BACHRACH, L.K.; CARTER, D.R.; MARCUS, R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 73, n. 6, p. 1332–9, 1991.

KEAVENY, T.M.; MORGAN, E.F.; NIEBUR, G.L.; YEH, O.C. Biomechanics of trabecular bone. **Annu Rev Biomed Eng**, v.3, p.307–333, 2001.

KEENAN, M.J., et al. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 11, p. 1903-1907, 1997.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO**, v. 2, n. 4, p. 282-86, 2001.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v.142, n. 12, p. 5050-5, 2001.

KRITCHEVSKY, D. Caloric restriction and cancer. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 47, n. 1, p. 13-9, 2001.

MACKIE, E.J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **J Endocrinol**, v. 211, n. 2, p. 109-121, 2011.

LAMBERT, J.; LAMOTHE, J.M.; ZERNICKE, R.F.; AUER, R.N.; REIMER, R.A. Dietary restriction does not adversely affect bone geometry and mechanics in rapidly growing male wistar rats. **Pediatr Res**, v. 57, p. 227-31, 2005.

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

LANE, M.A.; INGRAM, D.K.; BALL, S.S.; ROTH, G.S. Dehydroepiandrosterone sulfate: a biomarker of primate aging slowed by calorie restriction. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 7, p. 2093-6, 1997.

LANYON, L.E. Functional strain in bone tissue as an objective and controlling stimulus for adaptive remodelling. **J Biomech**, v.20, p. 1083-93, 1987.

LEE, C.; LONGO, V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. **F1000Res**, v.5, F1000 Faculty Rev-117, 2016.

LEE, J.H.; JUNG, K.J.; KIM, J.W.; KIM, H.J.; YU, B.P.; CHUNG, H.Y. Suppression of apoptosis by calorie restriction in aged kidney. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 9, p. 1361-8, 2004.

LONG, F.; ORNITZ, D.M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 1, p. a008334, 2013.

LOPAS, L.A.; BELKIN, N.S.; MUTYABA, P.L.; GRAY, C.F.; HANKENSON, K.D.; AHN, J. Fractures in Geriatric Mice Show Decreased Callus Expansion and Bone Volume **Clin Orthop Relat Res**. v. 472, n. 11, p. 3523–3532, 2014.

MARDON, J.; HABAUZIT, V.; TRZECIAKIEWICZ, A.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; MERCIER, S.; TRESSOL, J.C.; HORCAJADA, M.N.; DEMIGNÉ, C.; COXAM, V. Influence of high and low protein intakes on age-related bone loss in rats submitted to adequate or restricted energy conditions. **Calcif Tissue Int**, v. 82, n. 5, p. 373-82, 2008.

MARTIN, B.; PEARSON, M.; KEBEJIAN, L.; GOLDEN, E.; KESELMAN, A.; BENDER, M.; CARLSON, O.; EGAN, J.; LADENHEIM, B.; CADET, J.L.; BECKER, K.G.; WOOD, W.; DUFFY, K.; VINAYAKUMAR, P.; MAUDSLEY, S.; MATTSON, M.P. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. **Endocrinol**, v. 148, n. 9, p. 4318-4333, 2007.

MARTIN, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **J Biomech**, v. 23, n. 10, p. 1021-1029, 1990.

MARTIN, R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. **J Biomech**, v.26, n.9, p. 1047-1054, 1993.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent**, v.7, n.4, p.267-76, 1998.

McCAY, C.M.; CROWELL, M.P.; MAYNAKD, L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. **J Nutr**, v.10, p. 163-79, 1935.

McCARTER, R.; MEJIA, W.; IKENO, Y.; MONNIER, V.; KEWITT, K.; GIBBS, M.; McMAHAN, A.; STRONG, R. Plasma glucose and the action of calorie restriction on aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 62, n. 10, p. 1059-70, 2007.

McCAULEY, L.K.; NOHUTCU, R.M. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v.73, n. 11, p. 1377-91, 2002.

McDONALD, R.B.; RAMSEY, J.J. Honoring clive McCay and 75 years of calorie restriction research. **J Nutr**, v. 140, n. 7, p. 1205-10, 2010.

MEIER, C.; LIU, P.Y.; HANDELSMAN, D.J.; SEIBEL, M.J. Endocrine regulation of bone turnover in men. **Clin Endocrinol**, v. 63, p. 603-16, 2005.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ International. **J Obesity**, v.22, n. 12, p. 1145-1158, 1998.

MUHAMMAD, S.I.; MAZNAH, I.; MAHMUD, R.B.; ESMAILE, M.F.; ZUKI, A.B.Z. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. **Clin interv aging**, v. 8, p. 1421-1431, 2013.

NIH. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **JAMA**, v. 285, p. 785–795, 2001.

NORDSLETTEN, L.; et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcif Tissue Int**, v. 55, n. 6, p. 436-442, 1994.

O'FLAHERTY, E.J. Modeling normal aging bone loss, with consideration of bone loss in osteoporosis. **Toxicol Sci**, v. 55, n. 1, p. 171-88, 2000.

PAJAMÄKI, I.; KANNUS, P.; VUOHELAINEN, T.; SIEVÄNEN, H.; TUUKKANEN, J.; JÄRVINEN, M.; JÄRVINEN, T.L.N. The bone gain induced by exercise in puberty is not preserved through a virtually life-long deconditioning: a randomized controlled experimental study in male rats. **J Bone Miner Res**, v. 18, p. 544-552, 2003.

PANDO, R.; MASARWI, M.; SHTAIF, B.; IDELEVICH, A.; MONSONEGO-ORNAN E.; SHAHAR, R.; PHILLIP, M.; GAT-YABLONSKI, G. Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth. **J Endocrinol**, v. 223, n. 3, p. 227-39, 2014.

PARFITT, A. Morphological basis of bone mineral measurements: transient and steady state effects of treatment in osteoporosis. **Miner Electrolyte Metab**, v. 4, p. 273-287, 1980.

PATLAS, N.; et al. Oophorectomy-induced osteopenia in rats in relation to age and time post-oophorectomy. **Cells Tissues Organs**, v. 166, n. 3, p. 267-274, 2000.

PHAN, T.C.A.; XU, J.; ZHENG, M.H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. **Histol Histopathol**, v. 19, n; 4, p. 1325-1344, 2004.

PÉREZ-LÓPEZ, F.R.; CHEDRAUI, P.; CUADROS-LÓPEZ, J.L. Bone mass gain during puberty and adolescence: deconstructing gender characteristics. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 5, p. 453-66, 2010.

RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. **Embryology and cellular biology of bone**. In: AVIOLI L.V.; KRANE S.M.; editors. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. 3rd. New York, NY, USA: Academic Press; 1998.

REID, I.R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v. 31, p. 547-55, 2002.

REID, I.R. Relationships between fat and bone. **Osteoporos Int**, v. 19, p. 595-606, 2008.

RITTWEGER, J.; SIMUNIC, B.; BILANCIO, G.; DE SANTO, N.G.; CIRILLO, M.; BIOLO, G.; PISOT, R.; EIKEN, O.; MEKJAVIC, I.B.; NARICI, M. Bone loss in the lower leg during 35 days of bed rest is predominantly from the cortical compartment. **Bone**, v.44, n. 4, p. 612-8, 2009.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch Biochem Biophys**, v. 503, n. 1, p. 41-53, 2010.

ROBLING, A.G.; CASTILLO, A.B.; TURNER, C.H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annu Rev Biomed Eng**, v.8, p. 455-98, 2006.

ROBLING, A. G., TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562-569, 2002.

ROTH, G.S.; LESNIKOV, V.; LESNIKOV, M.; INGRAM, D.K.; LANE, M.A. Dietary caloric restriction prevents the age-related decline in plasma melatonin levels of rhesus monkeys. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n. 7, p. 3292-5, 2001.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C.R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, p. 1-16, 2006.

SADAGURSKI, M.; LANDERYOU, T.; CADY, G.; BARTKE, A.; BERNALMIZRACHI, E.; MILLER, R.A.;. Transient early food restriction leads to hypothalamic changes in the long-lived crowded litter female mice. **Physiol Rep**, v.3, n. 4, p. e12379, 2015.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.A.; RUIZ-RAMOS, M.; CORREA-MUNOZ, E.; MENDOZA-NUNEZ, V.M. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly

Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. **BMC Musculoskelet Disord**, v.19, p. 8-124, 2007.

SEEMAN, E. Reduced bone density in women with fractures: contribution of low peak bone density and rapid bone loss. **Osteoporos Int**, v. 41, p. 15–25, 1994.

SEMBA, R.D.; NICKLETT, E.J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 65: 963-75, 2010.

SHEA, M.K.; GUNDBERG, C.M.; MEIGS, J.B.; et al. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. **Am J Clin Nutr**, v.90, p.1230–5, 2009.

SMITH, J.W. Observations on the water content of bone. **J Bone Joint Surg Br**, v.46, p. 553-62, 1964.

STICKENS, D.; BEHONICK, D.J.; ORTEGA, N.; HEYER, B.; HARTENSTEIN, B.; YU, Y.; FOSANG, A.J.; SCHORPP-KISTNER, M.; ANGEL, P.; WERB, Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice **Development**, v. 131, n. 23, p. 5883-95, 2004.

SAMNEGARD, E.; AKHTER, M.P.; RECKER, R.R. Maintenance of vertebral body bonemass and strength created by human parathyroid hormone treatment in ovariectomized rats. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 414-422, 2001.

SOGAARD, C.H., et al. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 439-449, 1997.

SUN, L.; SADIGHI AKHA, A.A.; MILLER, R.A.; HARPER, J.M. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.64, p. 711–722, 2009.

TALBOTT, S.M.; CIFUENTES, M.; DUNN, M.G.; SHAPSES, A.S. Energy Restriction Reduces Bone Density and Biomechanical Properties in Aged Female Rats. **J Nutr**, v. 131, p. 2382–2387. 2001.

E TANCK, E.; HANNINK, G.; RUIJERMAN, R.; BUMA, P.; BURGER, E.H.; HUISKES, R. Cortical bone development under the growth plate is regulated by mechanical load transfer. **J Anat**, v. 208, n.1, p.73–79, 2006.

TATSUMI, S.; ITO, M.; ASABA, Y.; TSUTUMI, K.; IKEDA, K. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. **Endocrinol**, v. 149, p. 634-41, 2008.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v.289, n.5484, p.1504-8, 2000.

THEOLEYRE, S.; WITTRANT, Y.; TAT, S.K.; FORTUN, Y.; REDINI, F.; HEYMANN, D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 15, n. 6, p. 457-75, 2004.

TROEN, B.R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Exp Gerontol**, v. 38, n. 6, p. 605-14, 2003.

TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v.14, p. 595-608, 1993.

TURNER, R.T.; IWANIEC, U.T. Moderate weight gain does not influence bone metabolism in skeletally mature female rats. **Bone**, v. 47, p. 631–635, 2010.

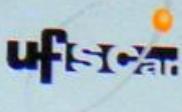
VAANANEN, H.K. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcif Tissue Int**, v. 49, p. S11-S14, 1991.

WARREN, M.A.; BEDI, K.S. The effects of a lengthy period of undernutrition on the skeletal growth of rats. **J Anat**, v. 141, p. 53-64, 1985.

WESTERBEEK, Z.W.; HEPPLER, R.T.; ZERNICKE, R.F. Effects of aging and caloric restriction on bone structure and mechanical properties. **J Gerontol**, v. 63A, p. 1131-36, 2008.

WU, X.; MOTOSHIMA, H.; MAHADEV, K.; STALKER, T.J.; SCALIA, R.; GOLDSTEIN, B.J. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1355-63, 2003.

ANEXO I - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA

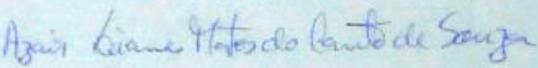
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
n° 061/2012

Protocolo n°. 057/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Efeitos da restrição calórica sobre marcadores do estresse oxidativo e o envolvimento com parâmetros estáticos e dinâmicos do metabolismo ósseo de ratos Wistar de diferentes idades.*", submetido pela pesquisadora *Bruna Gabriele Biffe*.

São Carlos, 4 de outubro de 2012.



Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza.
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais