AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL DA HEMIMANDÍBULA, ESMALTE, E DENTINA DOS DENTES INCISIVOS DE RATOS AO LONGO DAS GERAÇÕES "INBRED", DENTRO DO MODELO DE PROGRAMAÇÃO METABÓLICA PARA OBESIDADE POR REDUÇÃO DE FILHOTES.

Letícia Rosa (BIC/PROVIC/UEPG), Poliana Martinello, Nádia Fayez Omar, José Rebuglio Vellosa, José Rosa Gomes (orientador), e-mail: 1967jrgomes@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Biológicas.

Área do conhecimento conforme tabela do CNPq: Ciências Biológicas, subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq: Morfologia.

Palavras-chave: Densidade óssea, obesidade, imprint metabólico.

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública que gera alguns distúrbios no funcionamento normal do organismo assim como pode contribuir para o surgimento de outras doenças. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o conteúdo mineral da hemimandíbula, esmalte, e dentina dos dentes incisivos de ratos nas primieras gerações do modelo de programação metabólica. Após a coleta das hemimandíbulas, estas foram submetidas a alguns procedimentos como, a obtenção de fragmentos (cortes), para posterior análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV), o qual quantificou os elementos carbono (C), oxigênio (O), flúor (F), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), Potássio (K) e cálcio (Ca). A análise dos resultados demonstrou maior significância dos elementos P e Ca entre os grupos analisados. O grupo geração 1(G1) apresentou maior quantidade de P e Ca em osso e dentina que o grupo controle, assim como na análise de peso das mandíbulas a G1 apresentou maior peso que o controle. Portanto, há indícios de que o modelo de redução de ninhadas e cruzamento entre irmãos possa apresentar tendência a ter uma maior deposição de mineral em osso e dentina que animais controles.

Introdução

A obesidade é caracterizada como uma patologia de origem multifatorial, a partir dela problemas como diabetes, doenças cardiovasculares e arteriosclerose podem surgir. Diante disso a obesidade é atualmente alvo de muitas pesquisas científicas na área biomédica. Estudar os mecanismos fisiológicos e celulares da obesidade em modelos experimentais é importante para entender como a doença se desenvolve e suas consequências no equilíbrio do organismo. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o conteúdo mineral da hemimandíbula, esmalte, e dentina dos dentes incisivos de ratos utilizando duas estratégias ao mesmo tempo. Uma se refere a redução do numero de animais para 4 disponibilizando maior quantidade de alimento na fase de amamentação e a outro se refere ao cruzamento em cada geração reduzida entre machos e fêmeas da mesma geração. Nesse modelo de indução da obesidade se acredita que ocorre um acúmulo da memória celular de uma determinada característica perpetuando-se através das gerações e que em

algum momento a mesma poderá ser incorporada na genética do animal através de mecanismos epigenéticos. A proposta do projeto foi iniciar a criação e manutenção permanente de uma linhagem de ratos de laboratório sob o imprint metabólico direcionado ao fenótipo de obesidade, reduzindo o número de filhotes por ninhada. Foram analisados parâmetros fisiológicos e morfológicos ao longo das gerações. Neste projeto o objetivo foi quantificar os elementos constituintes do osso, esmalte e dentina, através de análise em Microscópio eletrônico de varredura.

Materiais e Métodos

Acasalamento e obtenção dos grupos Controle, GF, G1, G2 e G3: 10 ratos machos e 10 fêmeas não consanguíneos da linhagem Wistar, produzidos no biotério da UEPG foram mantidos sob condições de temperatura, luminosidade, alimentação e água normais. Quando atingiram a idade adulta, 250g, esses animais foram acasalados na proporção de 1 macho para 3 fêmeas. Apenas os filhotes da segunda ninhada foram selecionados para o início do experimento de programação metabólica. No terceiro dia após o nascimento, cada ninhada foi reduzida para o número de 4 animais, dois machos e duas fêmeas. Esses filhotes foram denominados de geração formadora (GF). Nos animais controles (C) 3 ninhadas foram mantidas com 8 filhotes independente do sexo. Após completarem 250 g machos e fêmeas, irmãos de cada ninhada da GF, foram acasalados para produzir a primeira geração denominada de G1. Esses animais permaneceram com a mãe até a fase de desmame, aos 21 dias, quando foram separados por sexo. Quando atingiram 90 dias machos de cada ninhada G1 foram acasalados com fêmeas G1 da mesma ninhada, ou seja, as fêmeas foram acasaladas com seus irmãos machos caracterizando os cruzamentos "inbred" gerando uma nova ninhada G2. Os filhotes foram reduzidos novamente, e acasalados ao atingir a idade adulta e assim sucessivamente até atingir a 3a geração (G3). Após reproduzirem-se, machos e fêmeas genitores de cada geração foram anestesiados com halotano e após serem sacrificados tiveram seus materiais biológicos coletados, para análises bioquímicas. Neste plano as hemimandíbulas foram o material de estudo.

Procedimentos gerais para coleta de material: quinze dias após o desmame dos filhotes, os machos e fêmeas paternos foram mortos para a coleta de diferentes órgãos incluindo as mandíbulas. Para isso, os animais foram pesados, anestesiados com halotano e sacrificados por deslocamento cervical e as hemimandibulas foram coletadas.

Processamento das mandíbulas: Após serem coletadas, as mandíbulas foram separadas em hemimandíbulas direita e esquerda de todos os grupos C, GF, G1, G2, G3 e G4 foram limpas, fixadas em formol 10% por 2 dias, lavadas em água corrente por 2 horas, e armazenadas em álcool 70% por uma semana, após isso é feita remoção de resquícios de tecido mole e são colocadas para secar em estufa à 37ºC por 3 dias.

Procedimentos para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV): para estarem aptas à análise do MEV para a obtenção da composição mineral do esmalte e dentina do dente incisivo e do osso mandibular. Para o estudo foram submetidas a análise do MEV 3 hemimandíbulas direitas do grupo controle (C), G1, G2 e G3 de macho e fêmeas. Primeiramente estas foram cortadas em sentido transversal em relação ao dente incisivo, usando um instrumento de corte de precisão Isomet 1000, o qual conta com uma lâmina de corte diamantado de 178mm. Foram realizados 4 fragmentos de 1 mm na região de molares, abrangendo

também o incisivo localizado abaixo dos molares. Dos 4 fragmentos de cada hemimandíbula apenas 1 fragmento de cada animal foi selecionado para análise do MEV. Todos os selecionados foram limpos em cuba ultrassônica (duas lavagens em água durante 480 segundos cada lavagem, seguido de enxágue) e condicionados em três tempos de ácido nítrico a 0,1% durante dez (10) segundos, intercalados em banhos de água de dez (10) segundos. Os procedimentos de condicionamento ácido foram realizados no interior de uma capela de exaustão de gases. Sequencialmente os espécimes foram submetidos a um processo de secagem em estufa durante 48 horas, com o objetivo de favorecer a deposição subsequente da camada de ouro. Depois da secagem, os corpos-de-prova foram fixados em suportes para MEV com auxílio de uma fita adesiva dupla-face de carbono e a cobertura com ouro foi realizada em aparelho de metalização a vácuo. Após a metalização o material foi submetido à análise do MEV que quantificou os elementos carbono (C), oxigênio (O), flúor (F), sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P), Potássio (K) e cálcio (Ca).

Resultados e Discussão

A Análise microscópica eletrônica de varredura proporcionou quantitativamente a porcentagem dos elementos já descritos, na região de dentina, esmalte e osso. A partir disso, obteve-se maior significância nos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P). Apesar do planejado, devido a problemas técnicos, apenas as fêmeas dos grupos controle e geração 1(G1) foram analisadas, seguem os resultados:

Na dentina do incisivo, G1 apresentou maior quantidade de Ca e P em relação ao controle sendo (14,48 ± 0,8707 e 13,02 ± 0,3478) respectivamente. Os valores para o Ca foram, 29,88 ± 0,7607 e 27,43 ± 0,1234.

No osso, G1 apresentou maior quantidade de Ca e P em relação ao controle sendo, 12,41 ± 1,421 e 12,36 ± 1,108. Os valores para o Ca foram, em G1 28,99 ± 2,208 e no controle 27,72 ± 2,068.

No esmalte do incisivo, o controle apresentou maior quantidade de Ca e P em relação à G1, sendo 14,08 ± 2,884 e 17,62 ± 0,1250. Os valores para o Ca foram, em G1 30,84 ± 5,426 e no controle 37,77 ± 0,2113.

Na análise do peso das hemimandíbulas desses grupos obteve-se o peso do controle 0,3576 ± 0,02071 e da G1 0,3894 ± 0,05122. Ou seja a G1 apresentou maior peso em relação ao controle. Em uma análise paralela à quantificação dos elementos analisados, fica evidente a relação de maior quantidade de Ca e P em dentina e osso na G1 com seu maior peso em relação ao controle que possui menor quantidade desses elementos em dentina e osso e menor peso total na hemimandíbula.

Conclusões

Devido aos resultados já mencionados, é perceptível uma relação diretamente proporcional da composição mineral de dentina e osso maior no grupo G1, principalmente nos elementos P e Ca em comparação ao controle, podendo isso ter afetado o peso das mandíbulas desse grupo que foi maior que o controle. Outro ponto importante é que os indivíduos já na primeira geração dos submetidos ao imprint metabólico apresentaram alterações importantes, indicando uma tendência à maior deposição de matéria inorgânica na matriz óssea e dentinária.

Agradecimentos

Sou imensamente grata ao meu professor orientador José Rosa Gomes e a minha co-orientadora professora Nadia Fayes Omar pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por toda a ajuda e incansáveis explicações e orientações, por sempre estarem presentes e pelos conselhos. Ao laboratório de materiais do PPG em Odontologia e ao laboratório de microscopia eletrônica do complexo multiusuários da UEPG pelas análises em EDS.

Referências

Bernardis, L.L., Patterson, B.D. 1968. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. J Endocrinol 40, 527–528.

Risnes, S.; Moinichen, C. B.; Septier, D.; Goldberg, M. 1996. Effects of accelerated eruption on the enamel of the rat lower incisor. Adv Dent Res, 10 (2):261-269.

ŠEFČÍKOVÁ Z. , BUJŇÁKOVÁ D, RAČEK L, KMEŤ V, . MOZEŠ S. 2011 Developmental Changes in Gut Microbiota and Enzyme Activity Predict Obesity Risk in Rats Arising From Reduced Nests Physiol. Res. 60: 337-346,.

Suzuki K,Simpson K A, Minnion, J S, Shillito J C, and Bloom S R. 2010 The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. Endocrine Journal, 57 (5), 359-372.

Von Diemen V, Trindade E N, Trindade M R M. Experimental model to induce obesity in rats. Acta Cirúrgica Brasileira - 21 (6) 2006 - 425.