MORFOMETRIA E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA HEMIMANDÍBULA DE RATOS AO LONGO DAS GERAÇÕES "INBRED" DENTRO DO MOLEDO DE PROGRAMAÇÃO METABÓLICA PARA OBESIDADE POR REDUÇÃO DE FILHOTES

Poliana Alexandra Martinello (BIC/Fundação Araucária), Letícia Rosa, Nádia Fayez Omar, José Rosa Gomes (Orientador), e-mail: 1967jrgomes@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural e Molecular.

Ciências Biológicas, Morfologia
Palavras-chave: imprint metabólico, obesidade, tecido ósseo, dente.

Resumo

A obesidade tem sido amplamente estudada, por conta das doenças associadas e o aumento da prevalência na população. Um dos modelos de estudo é a programação metabólica através da redução de filhotes, associada ao cruzamento entre irmãos, por no mínimo 20 gerações, e ao longo destas podem aparecer alterações morfológicas, definindo uma nova linhagem de animais. Nesta pesquisa, analisamos as hemimandibulas do grupo controle e das 3 primeiras gerações de ratos machos e fêmeas (G1, G2 e G3) quanto ao peso, medidas morfométricas - já definidas na literatura, e a densidade óssea. As hemimandibulas foram dissecadas, fixadas em formol, secas em estufa, fotografadas e radiografadas. A dentina e esmalte foram medidas após obtenção de cortes transversais das hemimandibulas. As medidas morfométricas bem com a densidade óssea foram feitas usando o programa image J. Houve um aumento significativo na altura e comprimento das hemimandíbulas e diminuição progressiva na espessura da dentina, em fêmeas e em machos, do grupo G3 quando comparado com os outros grupos. Pode-se concluir que ocorreram alterações morfométricas nas gerações até o momento avaliadas.

Introdução

A obesidade se tornou uma grande questão de saúde mundial, e de acordo com a OMS, em 2014 mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, e desses, 600 milhões eram obesos. A obesidade é caracteriza por acúmulo de tecido adiposo resultante do desequilíbrio energético prolongado, decorrente da ingestão de energia além do seu gasto e fatores hereditários. Ela está ligada a alterações endócrinas e metabólicas, a maior propensão a doenças – cardiopatias, diabetes e doenças neurodegenerativas, além de poder gerar alterações na massa óssea.

O tecido ósseo, um dos mais rígidos, é formado externamente por tecido ósseo compacto (cortical óssea), e internamente por um tecido ósseo esponjoso. A obesidade pode reduzir a espessura da cortical, e gerar alterações morfométricas no tecido ósseo, devido ao alto teor de gordura interferir na absorção do cálcio. Vale ressaltar que no sexo feminino, os hormônios produzidos no folículo ovariano, reduzem a reabsorção óssea, diminuindo o processo de remodelação. Logo, a estrutura óssea, tem menor chance de remodelação frente a condição de obesidade.

Induzir obesidade através da dieta hipercalórica é a forma mais simples que se aproxima desta condição. A desvantagem desse modelo é o uso apenas para cada período do estudo. Outra forma, é o da programação metabólica por redução

do número de ratos. O aumento da disponibilidade de alimento nas fases iniciais do desenvolvimento pode, ao longo do tempo, mudar as características metabólicas, induzindo um processo de obesidade na vida adulta, podendo ser incorporada no DNA e transmitida para a prole. Assim, o cruzamento entre irmãos de ninhadas reduzidas pode potencializar as características herdadas entre as gerações, gerando uma linhagem de animais com alterações metabólicas. A obtenção de animais obesos, por essas duas estratégias, necessita cerca de 20 gerações, e também o monitoramento das características metabólicas, genéticas e anatômicas, para avaliar a sua eficiência. Alguns marcadores de alterações estão relacionados com a anatomia óssea e, consequentemente, alterações na morfologia da hemimandíblula podem ser detectadas. Através medidas morfométricas descritas na literatura, esse projeto avaliou, nas primeiras 3 gerações entre irmãos, a hemimandibula e a estrutura dentaria do incisivo de ratos além da densidade óssea por radiografias.

Materiais e Métodos

O projeto faz parte do “Estabelecimento no biotério da UEPG de linhagem permanente de ratos (machos e fêmeas) fenotipicamente definidos como obesos a partir da estratégia fisiológica de *imprint* metabólico para uso dos pesquisadores internos e também para comercialização" Projeto CEUA-003/2015

Colônia formadora das gerações reduzidas: 6 fêmeas não consanguíneas Wistar, foram mantidas em condições de temperatura, luminosidade, alimentação e água normais. Quando atingiram a idade adulta, 250g, esses animais foram acasalados (1 macho para 3 fêmeas). No 3º dia após o nascimento, cada ninhada foi reduzida para 4 animais, 2 machos e 2 fêmeas. Esses filhotes foram denominados de geração formadora, e permaneceram com a mãe até o desmame, e então separados. Quando atingiram 90 dias, irmãos de cada ninhada foram acasalados dando origem a primeira geração – G1. Os filhotes da G1 foram novamente reduzidos e acasalados ao atingir a idade adulta e, assim sucessivamente até atingir a 3ª geração. Após se reproduzirem machos e fêmeas genitores de cada geração foram anestesiados com isofluorano e sacrificados, sendo coletado para esse estudo as hemimandíbulas. Não foram analisados os tecidos dos animais da geração formadora, pois eram o resultado do cruzamento de animais não consanguíneos.

Animais controles: 6 fêmeas foram acasaladas nas mesmas condições descritas para colônia formadora. As ninhadas foram reduzidas para 16 filhotes (8 fêmeas e 8 machos) e permaneceram com as mães até o desmame quando foram separados. Ao atingirem 90 dias foram sacrificados e as hemimandibulas coletadas. Para todos os animais, foi disponibilizado 800 gramas de ração e água por caixa a vontade.

Medidas morfométricas das hemimandibulas: as hemimandibulas coletadas foram limpas e colocadas em formaldeído 4% por 72, lavadas em água corrente e secas em estufa a 32ºC. Após isso, foram pesadas, fotografadas e pontos morfométricos, previamente estabelecidos por Brin, Michaeli e Steigman (1990) e Guerreiro (2009), foram medidos para cada hemimandíbula, no programa ImageJ.

Medida da densidade mineral das hemimandibulas: A densidade mineral óssea foi medida em pixel, no programa ImageJ, a partir de radiografias da hemimandíbula

esquerda (exposição 0,10s; 60kVp; 10 mA). Um penetrômetro de alumínio (1mm de espessura) foi utilizado como controle.

Medidas morfométricas do esmalte dentina: Após seca, as hemimandíbulas direita de 3 animais foram divididas na região do 1º molar, com um disco de corte diamantado com diâmetro de 7" (178mm) no Isomet 1000. Os cortes foram lixados, limpos e fotografados, para a análise da região do incisivo (STEIGMAN et al., 1989)

Análise estatística: todos os dados obtidos foram submetidos a análise de significância ($p<0.05$) pelo método ANOVA com pós teste Tukey.

Resultados e Discussão

Peso dos animais: quanto ao peso do rato, os machos aumentaram de peso, com exceção do grupo G3, que teve peso menor, porém maior que o controle. As fêmeas também aumentaram seu peso entre as gerações.

Peso da hemimandíbula: o peso das hemimandíbulas dos ratos machos dos grupos G1 e G2 aumentaram comparado ao controle, mas os ratos grupo G3 tiveram uma redução no peso de suas hemimandíbulas comparado ao controle, G1 e G2.

Dessa forma, observou-se que a redução do número de ratos por ninhada e o cruzamento entre irmãos alterou o peso da hemimandíbulas dos ratos, aumentando conforme as gerações, com exceção da geração G3 que teve o peso reduzido. Essa redução na G3 pode ser explicada em função de uma possível flutuação no desenvolvimento que pode ocorrer ao longo de cada geração.

Medidas morfométricas das hemimandíbulas: as medidas que tiveram diferença entre os grupos são apresentadas na figura 1.

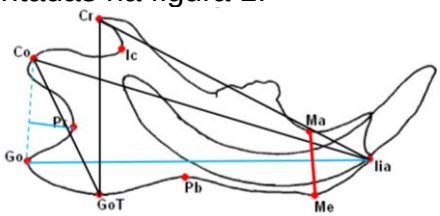


Figura 1. Medidas que apresentaram diferença entre os grupos. Em preto, aumento em ambos; em azul aumento apenas em machos; e em vermelho redução apenas em machos.

A partir dessas medidas, pode-se observar aumento significativo na morfometria das hemimandíbulas em comprimento e altura nas gerações comparada ao controle. Essas medidas são mais evidentes nos machos, por conta da diferença hormonal entre os sexos. Os hormônios sexuais femininos estão envolvidos no processo de formação e remodelação óssea, e variações energéticas durante a gestação e amamentação podem gerar alterações entre as gerações de fêmeas

Densidade mineral das hemimandibulas: utilizando o programa ImageJ, através da medida de pixels de tons de cinza, se observou que a densidade mineral óssea nos machos dos grupos G2 diminuiu em relação G1 e ao controle. Nas fêmeas, o grupo G2 apresentou maior densidade comparada a G1 e ao controle.

Medidas de esmalte e dentina: o esmalte de machos e fêmeas não apresentaram diferença entre as gerações. O comprimento mesiolateral do incisivo aumentou nas

fêmeas, em G1 comparado ao controle, porém G3 e G2 diminuiram em relação a G1. No comprimento labiolingual, nas fêmeas, houve aumento de G1 e G2 comparado ao controle, porém houve uma redução de G2 quando comparada a G1, e de G3 quando compara a G1. Quanto à largura da dentina, em machos, o grupo G3 teve redução comparado ao controle, a G1 e a G2. Nas fêmeas, houve diminuição da largura de G3 e de G2 em relação a G1.

Além disso, alguns parâmetros reduziram em uma geração e aumentaram na próxima e vice-versa, pois ao longo de cada geração acreditamos que exista uma modulação da expressão dos diferentes genes relacionados com a formação da matriz óssea, refletindo nas relações fenotípicas observadas ao longo das gerações.

Conclusões

A partir dos resultados, pode-se concluir que nas estratégias utilizadas (redução de ratos por ninhada e cruzamento entre irmãos), geraram alterações na morfometria da hemimandibula, mais evidente em machos, nas gerações analisadas, com aumento da altura e comprimento da hemimandibula e redução da espessura da dentina e aumento da densidade óssea maior em fêmeas. Porém, é necessário analisar mais gerações dentro desse modelo.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa concedida para execução do projeto. Ao professor José Rosa Gomes e a professora Nádia Fayez Omar, pela ajuda e aprendizado. Ao laboratório de Radiologia do Departamento de Odontologia e ao laboratório de equipamentos multiusuário do PPG em Odontologia.

Referências

BRIN, I.; MICHAELI, Y.; STEIGMAN, S. Long-term Effects of Orthodontic Forces on the Morphology of the Rat-incisor Socket and its Location in the Mandible. **Journal Of Dental Research,** [s.l.], v. 69, n. 12, p.1834-1838, dez. 1990.

GUERREIRO, F S. **Efeitos da consistência da dieta sobre o crescimento mandibular em ratos:** análise histomorfométrica. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ortodontia, Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STEIGMAN, S. et al. A Three-dimensional Evaluation of the Effects of Functional Occlusal Forces on the Morphology of Dental and Periodontal Tissues of the Rat Incisor. **Journal Of Dental Research,** [s.l.], v. 68, n. 8, p.1269-1274, ago. 1989.

SUZUKI, Keisuke et al. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **Endocrine Journal.** p. 359-372. apr. 2010.

VON DIEMEN, Vinicius; TRINDADE, Eduardo Neubarth; TRINDADE, Manoel Roberto Maciel. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira,** S.l, v. 21, n. 6, p.425-429, dez./dez. 2006.

WHO. **Obesity and overweight.** 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 08 de agosto de 2017.