

Análise densitométrica de fêmures direitos de ratos submetidos à obesidade e à restrição calórica

Densitometric analysis of right femurs of rats with obesity and caloric restriction

Angélica BelortiTrabalon¹
Fernanda Ike de Almas²
Carolina Rubio Vicentini³

Resumo

O osso vivo é um tecido que sofre continuamente modelação e remodelação por influência de forças estáticas e dinâmicas como a obesidade, caracterizada pelo índice de massa corpórea igual ou superior a 30kg/m², e a restrição calórica, sendo uma intervenção que promove a redução da ingestão calórica, sem causar desnutrição. O objetivo deste trabalho foi analisar a Densidade Mineral Óssea de fêmures direitos de ratos submetidos à obesidade corporal e à restrição calórica. Foram utilizados 30 ratos Wistar, distribuídos em três grupos: controle (GC), sacarose (GS) e restrição calórica (GR), contendo 10 animais por grupo. A análise densitométrica foi admitida utilizando-se o DXA- ALPHA LUNAR. Já a massa corporal foi admitida através de uma balança de precisão. Após a análise estatística, foi verificada uma diferença significativa quando os GC e GR são comparados ao GS, em relação à densidade mineral óssea - DMO (g/cm²). Quando comparados GC e GR, não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Em relação à massa corporal, constatou-se, através das médias, que não houve uma diferença estatística entre os instantes iniciais e finais do GC, ocorrendo diferença estatística no GS e GR. Concluiu-se que a obesidade induziu um aumento da densidade mineral óssea no GS.

Palavras-chave: Densidade Mineral óssea, Metabolismo ósseo, Obesidade, Restrição Calórica.

Abstract

This study deals with living bone is a tissue that continuously suffers modeling and remodeling through static and dynamic forces, such as obesity, characterized by a body mass index less than 30 kg / m², and also calorie restriction, through the intervention to promote the reduction of caloric intake without causing innutrition. The aim of this study was to analyze the Bone Mineral Density of right femurs of rats subjected to body obesity and caloric restriction. Analyzed with 30 Wistar rats were divided into three groups: control (GC), sucrose (GS) and caloric restriction (GR), containing 10 animals per group. Densitometric analysis was performed through the DXA- ALPHA LUNAR. Body mass was admitted through a precision scale. After statistical analysis, a statistically significant difference was observed when the GC and GR are compared to the GS in relation to bone mineral density - BMD (g / cm). Compared GC and GR, there were no statistical differences between groups. In

¹Acadêmica do 10º termo do curso de Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Araçatuba-SP.

²Acadêmica do 10º termo do curso de Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Araçatuba-SP.

³Professora Mestre Carolina Rubio Vicentini, professora do curso de Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Araçatuba-SP. Mestrado em Ciência Animal pela UNESP Campus Araçatuba-SP.

relation to body mass, it was found through the middle, that there was no statistical difference between the initial and final moments of the GC, occurring statistical difference in the GS and GR. It was concluded that obesity induced an increase in bone mineral density in the GS.

Keywords: Bone metabolism, obesity, caloric restriction, bone mineral density.

Introdução

A densidade mineral óssea (DMO) é produto final de um processo dinâmico de formação e reabsorção do tecido ósseo chamado de remodelação. A reabsorção causa perda de qualidade desse tecido, enquanto a formação do mesmo é responsável pelos reparos e renovação do tecido que foi absorvido. A manutenção da densidade mineral óssea é essencial para prevenção de diferentes situações, causadas, por exemplo, pela influência da obesidade e restrição calórica (RC) [1]. Já que o osso vivo comporta-se de forma bastante ativa, sofre continuamente modelação e remodelação, por influência de forças estáticas e dinâmicas, como a ação da gravidade, força muscular, obesidade e privação de alimentos [2, 3].

A obesidade, uma condição determinada pelo índice de massa corpórea igual ou superior a 30kg/m^2 , promove acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo que pode ocasionar prejuízo à saúde do indivíduo [4]. A obesidade é caracterizada por uma desordem nutricional de múltiplas causas, entre elas, fatores genéticos, metabólicos, o ambiente externo e as interações psicossociais, que são partes integrantes dos fatores etiológicos [5,6]. Quando o ganho da massa corpórea está associado a fatores externos, como o excesso do consumo de açúcares, carboidratos, tanto nos seres humanos quanto em modelos experimentais, como os ratos Wistar, são observadas alterações orgânicas sistêmicas, e o metabolismo ósseo também recebe essas alterações [7].

Estudos sugerem que indivíduos obesos apresentam um aumento da densidade mineral óssea. A associação entre obesidade e aumento da massa óssea é conhecida há algum tempo. Em um estudo com 103 obesos, foi demonstrado aumento significativo da densidade mineral óssea nos indivíduos obesos quando comparados àqueles com massa corpórea normal, parâmetro avaliado pela densitometria óssea - sistema DXA. Esses dados sugerem que a obesidade pode ser um fator importante e positivo para a resistência óssea [8]. Uma das explicações para esse incremento da densidade mineral óssea é que o estresse mecânico exercido sobre o esqueleto humano proporciona ativação

da osteogênese, aumentando assim a formação óssea [4, 9, 10].

Em contrapartida à obesidade, RC é uma intervenção que promove a redução da ingestão calórica, em comparação à alimentação típica, sem causar desnutrição. Essa intervenção retarda o aparecimento de distúrbios relacionados à idade e prolonga o tempo de vida de diferentes espécies animais, inclusive a espécie humana, através de um mecanismo biológico responsável pela redução de gordura corporal e sinalização da insulina, que levará a diminuição da produção de insulina pelas células betas do pâncreas e como consequência, ocorrerá a diminuição do depósito de tecido adiposo, principalmente tecido adiposo branco [6, 11, 12, 13].

Em oposição aos efeitos benéficos da restrição, a baixa massa corporal, observada pela redução alimentar, é considerada um fator que pode promover prejuízo ósseo e aumento da incidência de doenças osteometabólicas, podendo ser resultado de vários fatores como, por exemplo, a diminuição da densidade mineral óssea [14, 15].

Sendo assim, o metabolismo ósseo se comportará de diferentes formas quando submetido às condições de Obesidade e RC. Estas condições podem ser avaliadas através de exames clínicos como a densitometria óssea, a fim de verificar a vulnerabilidade e condição óssea.

A densitometria óssea é realizada por absorção de raios-X de dupla energia, sendo baseada pela atenuação do feixe de radiação quando mover-se através do osso. É atualmente considerada a técnica padrão para avaliar a massa óssea, podendo ser expressa em gramas de mineral ósseo por área (g/cm²), em uma determinada região [4, 16, 17]. Portanto, foi objetivo deste trabalho analisar a Densidade Mineral Óssea de fêmures direitos de ratos submetidos à obesidade corporal e à restrição calórica.

Material e Método

Animais;

Foram utilizados 30 ratos, machos, com 3 meses de idade, da raça *Rattusnovegicusalbinus*, Wistar, escolhidos aleatoriamente, que foram fornecidos pelo Biotério do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UniSALESIANO/Araçatuba. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (21 +/- 2°C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no biotério do UniSALESIANO/

Araçatuba, localizado na unidade 2, UNA. (figura 1)

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA). Protocolo 02/2013.



Figura 1. Biotério Unisalesiano – Araçatuba

Grupos Experimentais;

Todos os animais foram mantidos em caixas próprias para animais experimentais (5 animais por caixa). O período experimental para todos os grupos foi de 8 semanas.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais:

GC - Grupo Controle - contendo 10 animais com livre acesso à ração e água.

GS - Grupo Sacarose- contendo 10 animais com livre acesso à sacarose 30%, ração e água.

GR- Grupo Restrição Calórica – contendo 10 animais submetidos à RC, sendo alimentados com 50% do consumo do grupo controle.

Solução de Sacarose 30%;

A solução foi preparada com a adição de 150 gramas de sacarose diluída em 500 ml de água destilada homogeneizada com agitador magnético. (figura 2)



Figura 2. Agitador

Massa Corporal;

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana, utilizando-se a balança digital de precisão BIOPRECISA® sendo a primeira determinação no início do experimento e a última mensuração no dia do sacrifício dos animais. (figura 3)



Figura 3. Aquisição da Massa corpórea

Ingestão de água, consumo de ração e solução de sacarose;

A ingestão de água para todos os animais foi de 500 ml. O consumo de ração Primor® foi realizado três vezes por semana, sendo oferecidos ao GC 240 gramas, ao GS 240 gramas e ao GR 120 gramas de ração. As sobras foram mensuradas. Para a solução de sacarose foi utilizada uma proveta, e para a ração, uma balança digital. Logo após foram desprezadas, fazendo-se reposição de água e ração e, em seguida, a quantificação dos valores preestabelecidos. O mesmo ocorreu para o de ingestão de solução de sacarose a 30%. (figuras 4 e 5)



Figura 4. Pesagem da Ração



Figura 5. Pesagem da Sacarose

Eutanásia dos animais;

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados com excesso de anestésico Xelazin e Cetamin, via intraperitoneal. Houve a presença do médico veterinário, representante da Comissão de Ética e Uso animal e Associação Protetora dos Animais. (figuras 6 e 7)



Figura 6. Anestésico



Figura 7. Aplicação via intraperitoneal

Dissecação e Armazenamento dos materiais;

Após os sacrifícios, os membros posteriores foram dissecados, e as unidades femorais direitas foram retiradas e limpas das partes moles circundantes. Após a dissecação, os ossos foram identificados, envolvidos em gaze umedecida em soro fisiológico e estocados em “freezer” -20°C .

Densitometria óssea;

A densidade mineral óssea – DMO - (em g/cm^2), foi medida em todos os fêmures direitos, utilizando densitômetro modelo DXA – ALPHA LUNAR, com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP-Araçatuba. (figuras 8 e 9)



Figura 8. DXA ALPHA LUNAR



Figura 9. Unidades Femurais

Análise Estatística

Na realização do experimento, foi realizada a análise estatística Anova One-Way, seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi utilizado o programa estatístico PRISM. 6.0.

Resultados

A tabela e os respectivos gráficos a seguir, representam os resultados obtidos na análise através da comparação da média e desvio padrão dos grupos GC, GS e GR em relação à DMO e Massa corpórea.

	DMO (g/cm ²)
GC	0,16±0,015
GS	0,21±0,018
GR	0,15±0,016

Tabela I. Representam os valores da média e desvio padrão dos grupos controle (GC), sacarose (GS) e restrição calórica (GR), em relação à densidade mineral óssea – DMO (g/cm²)

Fonte: Belorti; Ike – 2015

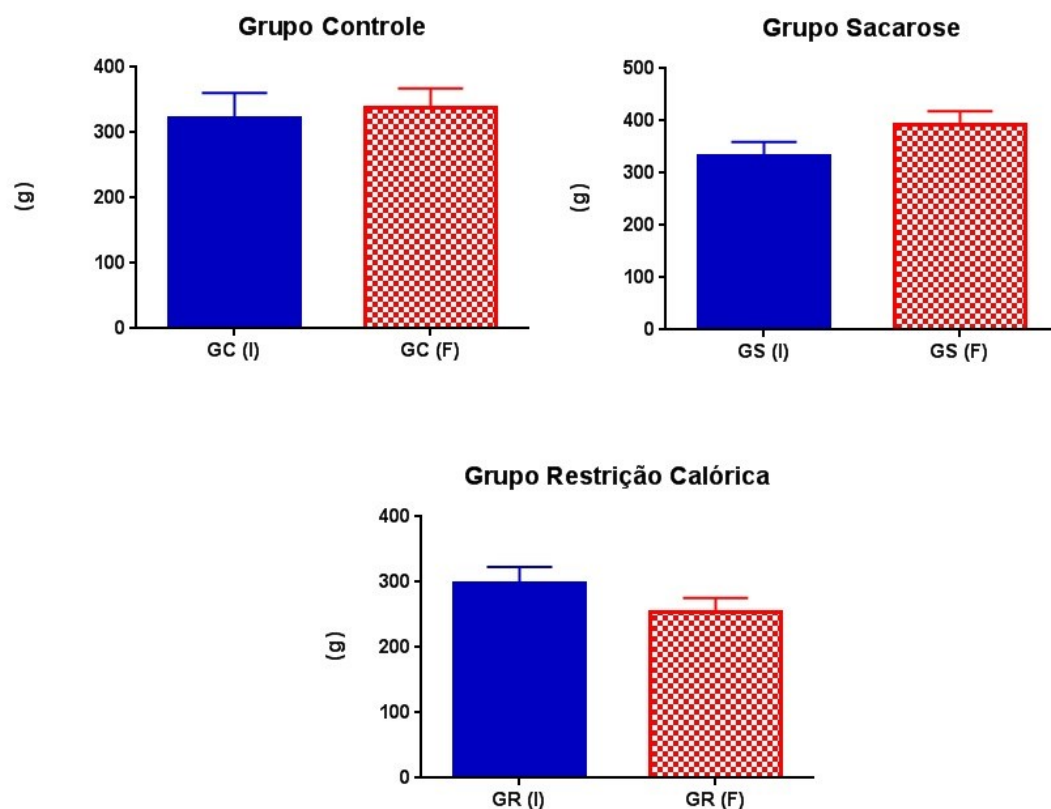


Gráfico I, II e III. Representa os valores da média nos instantes iniciais e finais da massa corpórea.

Fonte: Belorti; Ike–2015

Os gráficos acima demonstram os valores das médias da massa corpórea inicial e final, admitidas pelo peso dos ratos, através de uma balança de precisão nos grupos experimentais Controle (GC), Sacarose (GS) e Restrição Calórica (GR). Constatou-se através das médias, que não houve uma diferença estatística entre os instantes iniciais e finais do GC, ocorrendo diferença estatística no GS ($p=0,0001$), com aumento da massa corpórea, e GR ($p=0,0005$) com diminuição da massa corpórea.

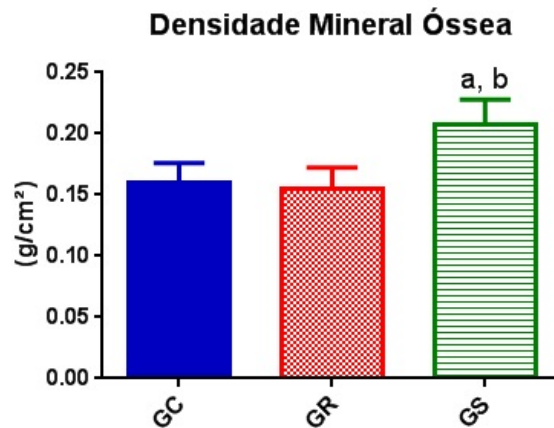


Gráfico IV. Demonstra os valores comparativos da média e do desvio padrão da Densidade Mineral Óssea, admitidos na densitometria óssea, através do DXA-ALPHA LUNAR dos GC, GR, e GS.

Fonte: Belorti; Ike – 2015

O gráfico acima representa os valores comparativos da média e do desvio padrão da densidade mineral óssea entre os grupos experimentais GC, GS e GR, sendo a= GS vs GC e b= GS vs GR, no qual foi verificado uma diferença estatística significativa da DMO (g/cm²) quando os GC e GR são comparados ao GS ($p < 0,0001$). Quando comparados GC e GR, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,7821$).

Discussão

Vários estudos têm abordado os diversos efeitos que a obesidade e a restrição calórica ocasionam especialmente no osso. O aumento ou a diminuição da massa corporal podem promover interferência nos aspectos da quantidade e qualidade óssea [18].

A massa corporal está intimamente correlacionada com diferentes propriedades do osso [19, 20]. As respostas adaptativas às cargas mecânicas promovem liberação de fatores locais e sistêmicos que regulam a diferenciação das células do tecido ósseo e de outros tecidos envolvidos [6,19]. Porém, o real conceito da relação entre obesidade e tecido ósseo permanece obscuro, uma vez que os relatos da literatura são conflitantes e os mecanismos envolvidos pouco compreendidos. Embora seja muito complexo identificar os fatores etiológicos da obesidade, as causas principais são o aumento do consumo de alimentos energéticos e ricos em gorduras saturadas e açúcares. Há alguns anos, acreditava-se que a alta ingestão de gorduras era um dos fatores que

mais contribuíam para obesidade. No entanto, hoje se sabe que a redução da quantidade de gordura ingerida não resulta necessariamente na diminuição da prevalência da obesidade, já que tal medida está, na maioria das vezes, associada ao aumento do consumo de carboidratos. A adoção de dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas vem sendo utilizadas como modelo de indução da obesidade em animais, devido à sua semelhança com a gênese e às respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos [7, 21]. Desta forma, é de suma importância avaliar os efeitos da obesidade, induzida por meio de dieta rica em sacarose, no tecido ósseo de roedores. Em um estudo realizado por Diniz [22], para avaliar a densidade mineral óssea no colo do fêmur e coluna vertebral, verificou-se que houve um aumento na densidade mineral óssea, devido ao aumento da massa corporal induzida por sacarose. Kobayashi e colaboradores [10] observaram maior densidade mineral óssea em adolescentes que apresentavam sobrepeso e obesidade, justificando os resultados do presente estudo, no qual, houve um aumento da densidade mineral óssea no GS quando comparados aos GC e GR. Uma explicação aceitável para tal acontecimento, refere-se ao fato da obesidade promover maior estresse mecânico, decorrente do trabalho muscular aumentado para a sustentação e locomoção [23] dos animais do GS, induzindo à ativação de sítios de formação óssea na superfície periosteal do osso pela atividade osteoblástica [24].

Embora a restrição calórica pareça ser benéfica, e os resultados fornecidos pelos estudos demonstrarem vantagens para o sistema cardiovascular e metabolismo da glicose e lipídios, para a densidade mineral óssea os resultados são insatisfatórios, comprovados através de um estudo que avaliou a massa óssea, observando uma diminuição significativa da densidade mineral óssea total do quadril e na densidade mineral óssea da coluna lombar, em comparação a indivíduos saudáveis [13]. Nos resultados do presente estudo, não houve diferença entre os grupos GC e GR em relação à densidade mineral óssea, sendo os resultados justificados pela duração e protocolo de experimentação, utilizando-se 50% de privação de alimento em comparação à alimentação do GC, tratados durante 8 semanas, uma vez que, sendo submetidos a um período de experimentação prolongado, apresentariam uma redução da densidade mineral óssea. Quando comparados GR e GS,

houve um aumento significativo na densidade mineral óssea do GS, sendo os resultados justificados pelo fato dos animais do GS, terem sido submetidos a um processo de indução da obesidade por meio de sacarose, exercendo dessa forma, maior estresse mecânico aos animais, estimulando a formação óssea, efeito não observado nos animais do GR, já que passaram por um processo de privação de alimentos, tendo como consequência, a diminuição da massa corpórea. Tatsumi e colaboradores observaram em seu estudo, um efeito protetor da RC na estrutura óssea de ratos após a meia idade, mas não em ratos adultos jovens [25]. Paralelamente, Devlin e colaboradores sugerem que novos estudos sejam necessários para investigar se a RC possui efeitos específicos de acordo com idade e local analisado [26].

Conclusão

Concluiu-se que, a obesidade atuou como uma força mecânica sobre os fêmures direitos dos ratos e no metabolismo ósseo, induzindo ao aumento da densidade mineral óssea. Em relação à restrição calórica não ocorreu diferença estatística.

Referências

1. Cadore EL, Brentano MA, & Kruegel FM. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo. [periódico na internet]. Rev Bras Med Esporte. 2005 nov/dez [acesso em 2015 Set 18]. 11(6): 373-9. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v11n6/a13v11n6.pdf>.
2. Hall SJ. Biomecânica do Crescimento e Desenvolvimento dos Ossos. In: Biomecânica Básica. 4ª ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 2005. p. 85-114.
3. Judas F. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. [periódico da internet]. 2012 [acesso em 2015 Set 12]. Disponível em: <http://rihuc.huc.minsaude.pt/bitstream/10400.4/1346/1/TECIDO%20%C3%93SSEO%20.pdf>.
4. Dos Santos LC. Efeitos da perda de peso na massa óssea e alterações metabólicas em adolescentes obesos pós-púberes. [periódico da internet]. 2007 [acesso em 2015 Out 20]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-11042008-162645/en.php>.
5. Who. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Technical Report Series 894. Geneva; 2000. p.101-151.
6. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of Obesity With osteoporosis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 92. 2007. p.1640-1646.

7. Malafaia AB, Nassif PAN, Ribas CAPM, Ariede BL, Sue KN, Cruz MA. Indução de obesidade com sacarose em ratos. ABCD ArqBrasCirDig. [periódico na internet]. 2013 [acesso em 2015 Out 22]; 26: 17-21. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abcd/v26s1/a05v26s1.pdf>.
8. Bandeira F. A obesidade realmente fortalece os ossos? ArqBrasEndocrinolMetab. [periódico na internet]. 2007 [acesso em 2015 Ago 19]; 51(6): 895-897. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302007000600001&script=sci_arttext&tlng=es.
9. Monteiro PA, De MM Antunes B, Silveira LS, Agostinete RR, Picolo MR, & Junior IFF. Influência do treinamento concorrente na composição corporal e óssea de adolescentes obesos. Medicina (Ribeirão Preto).Online. [periódico na internet]. 2015 [acesso em 2015 Out 23]; 48(3):308-314. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/104324/0>.
10. Cobasyashi F, Lopes LA, & Taddei JA. Densidade mineral óssea de adolescentes com sobrepeso e obesidade. Jornal da Pediatria (Rio J). [periódico na internet]. 2005 [acesso em 2015 Out 02]; 81(4): 337-42. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jped/v81n4/v81n4a13.pdf>.
11. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. Annu Rev Med. 2003;54: p. 131-52.
12. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone Nat. Clin. Pract. Rheumatol., 2006; 2(1):p. 35-43.
13. De Souza Genaro P, Sarkis KS; Martini LA. O efeito da restrição calórica na longevidade. ArqBrasEndocrinolMetab. [periódico na internet]. 2009 Mai [acesso em 2015 Set 12]; 53: p. 5. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v53n5/19.pdf>.
14. Sarmiento R, Casagrande D, & Schaan B. Cirurgia Bariátrica no tratamento da obesidade: impacto sobre o metabolismo ósseo. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. [periódico na internet]. 2014 Fev [acesso em 2015 Set 26]; 13(1). Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=451.
15. Rodrigues MEDS. Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão. Doctoral dissertation, Instituto de Química de São Carlos. [Dissertação na internet]. 2003 Abr [acesso em 2015 Set 01]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-22042004-093459/en.php>.
16. Meirelles EDS. Diagnóstico por imagem na Osteoporose. ArqBrasEndocrinolMetab. [periódico na internet]. 1999 [acesso em 2015 Out 28]; 43(6): 423-427. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27301999000600006&script=sci_arttext.
17. Silva MDC. Densitometria óssea. [periódico na internet]. [acesso em 2015 Set 14]. Disponível em: http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Densitometria_ossea.pdf.
18. Biffe, BG. Influência do ganho de massa corporal, induzido por dieta rica em sacarose, em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos de

- ratos wistar. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araçatuba;2011.
19. Reid IR. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**. 2002; 31(5): p.547-555.
 20. Reid, I.R. Relationships between fat and bone. *Osteoporos. Int.*, 2008; 19(5): p.595-606.
 21. Guttierres APM, Alfenas RDCG. Efeitos do Índice Glicêmico no Balanço Energético. *ArqBrasEndocrinolMetab.* [periódico na internet]. 2007 Dez [acesso em 2015 Out 13]; 51(3): 382-388. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v51n3/a05v51n3.pdf>.
 22. Diniz JS. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica. [periódico na internet]. 2014 [acesso em 2015 Set 12]; 9. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2005/epg/EPG4/EPG4-13_a.pdf.
 23. Lewin S, Gouveia CHDA, Marone MMS, Wehba S, Malvestiti LF, Bianco AC. Densidade mineral óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal. *Ver. Assoc. Med. Bras.* [periódico na internet]. 1997 [acesso em 2015 Set 29]; 43(2): 127-136. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n2/2054.pdf>.
 24. Lopes RR, apud Notelovitz M (2002). Avaliação da ação tópica da testosterona sobre o tecido ósseo e sua relação com a estimulação da neoformação óssea. Estudo em ratos machos. [Dissertação na internet]. 2009 [acesso em 2015 Nov 01]; Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17379/000716125.pdf?sequence=1>.
 25. 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.* 2008; 149(2): p.634-641.
 26. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):2078-88.