UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JÉSSICA SUZUKI YAMANAKA

Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação
de tíbias de ratas em crescimento

Ribeirão Preto

2016

JÉSSICA SUZUKI YAMANAKA

Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação de tíbias de
ratas em crescimento

Dissertação apresentada a Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos
Shimano

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Yamanaka, Jéssica Suzuki
Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação de tíbias de ratas em crescimento. Ribeirão Preto, 2016.

114 p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Osso. 3. Consolidação da fratura. 4. Osteotomia.

Nome: YAMANAKA, Jéssica Suzuki

Título: Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação de tíbias de ratas em crescimento

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

*A minha mãe **Eunice Raimunda da Silva**
por dar asas aos meus sonhos.*

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano por acreditar na minha capacidade e ter me permitido essa conquista. Pela afável preocupação, não só com nosso crescimento profissional, mas também pessoal, se fazendo nosso instrutor em todos os momentos. Agradeço por todos seus ensinamentos.

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Batista Volpon por permitir o acesso ao laboratório da Bioengenharia.

Ao professor João Paulo Mardegan Issa pela orientação e colaboração com a realização das análises histológicas.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Ariane Zamarioli, Carlos Alberto Moro, Francisco Carlos Mazzocato, Luís Henrique Alves Pereira, Maria Teresinha de Moraes, Reginaldo Trevilato da Silva e Ismar Ribeiro por toda colaboração e pelo convívio agradável.

Ao coordenador Prof. Dr. Marcelo Riberto e a secretária da pós-graduação Rita de Cássia Stela Cossalter pela paciência e cordialidade em me atender.

A técnica Junia Ramos pelo profissionalismo e generosidade, e por todos os ensinamentos histológicos. A Dra. Bruna Gabriela Kotake de Oliveira pela colaboração para realização da análise imunohistoquímica.

A técnica Ana Paula Macedo, pela qual desprendo grande respeito e admiração, por ser exemplo de competência e gentileza.

Ao colega Álvaro César de Oliveira Penoni por toda instrução no meu percurso e exemplo profissional. Desprendo a ela toda gratidão, pois sem ele provavelmente não estaria aqui.

As colegas Gabriela Rezende Yanagihara, Jacqueline Atsuko Tida e Roberta Carminati Shimano por terem me acolhido desde o início e permitirem trilhar seus passos, compartilhando das suas tantas aprendizagens.

As colegas Brígida Batista Brancaleon e Bruna Leonel Carlos pelo companheirismo, por todos os momentos que compartilhamos na vida acadêmica e pessoal.

Aos meus familiares, ao meu pai Nelson Hidechi Yamanaka, minha mãe Eunice Raimunda da Silva, minhas irmãs Karina Suzuki Yamanaka e Soraya Suzuki Yamanaka, alicerces da minha formação, pelo apoio, carinho e por tudo que

representam em minha vida. Ao meu namorado Allyson Campos Dantas Ribeiro pelo companheirismo e incentivo. A minha afilhada Ana Livia Costa, presente de Deus em minha vida, razão de motivação.

Ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Laboratório da Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Tente mover o mundo -
o primeiro passo será mover a si mesmo”*

Platão

RESUMO

YAMANAKA, J. S. Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação de tíbias de ratas em crescimento. 2016. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O acúmulo de gordura corporal é considerado um problema de saúde pública com diversas consequências negativas, inclusive relacionado à redução da qualidade do osso, que afeta cada vez mais indivíduos jovens. São crescentes as investigações que buscam esclarecer a relação entre massa gorda e massa óssea. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do consumo excessivo de lipídios na estrutura e no processo de consolidação óssea em tíbias de ratas em crescimento. Foram utilizadas cinquenta e duas ratas *Wistar* com 21 dias de vida, distribuídas em quatro grupos (n=13), sendo: animais submetidos à dieta padrão (DP), animais submetidos à dieta hiperlipídica (DH), animais submetidos à dieta padrão e osteotomia (DPO) e animais submetidos à dieta hiperlipídica e osteotomia (DHO). Cada um deles com período experimental de 5 semanas. Os animais dos grupos DP e DH foram mantidos sem intervenção, enquanto os animais dos grupos DPO e DHO foram submetidos à osteotomia da tíbia esquerda na terceira semana experimental. Durante o experimento a massa corporal e o consumo de ração dos animais foram avaliados. Um dia precedente à eutanásia foi realizado o teste de tolerância à insulina em 5 animais de cada grupo. Após a eutanásia a tíbia esquerda de cada rata foi dissecada, limpa das partes moles e submetidas a análises macroscópica, densitometria, ensaio mecânico, histomorfometria, estereologia do osso neoformado e imunohistoquímica. Os dados foram analisados por teste estatístico em modelo linear geral com ajuste para múltiplas comparações de Bonferroni para comparação entre as variáveis, e teste *T-Student* e *Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos. Ao final do experimento os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram massa corporal similar aos animais alimentados com dieta padrão ($p=0,115$), no entanto tiveram consumo reduzido de ração ($p<0,001$) e menor sensibilidade à insulina ($p=0,018$). A variável cirurgia afetou o consumo de ração sendo que animais operados consumiram menos ração do que animais não operados ($p=0,017$). Os animais alimentados com dieta hiperlipídica tiveram tíbias mais compridas ($p=0,041$), menor

força máxima ($p<0,001$) e rigidez relativa ($p=0,003$) quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão, embora a densidade mineral óssea (DMO) tenha sido similar ($p=0,958$). Os animais operados tiveram menor força máxima ($p<0,001$), rigidez ($p=0,020$) e menor quantidade de colágeno proximal ($p=0,029$) quando comparados aos não operados. O volume de osso neoformado das tíbias submetidas à osteotomia tendeu a ser menor no grupo DHO ao grupo DPO ($p=0,054$). A avaliação imunohistoquímica não revelou diferença entre os grupos DHO e DPO ($p<0,05$). Concluímos que a dieta hiperlipídica prejudicou a resistência mecânica das tíbias e causou uma redução do volume de osso neoformado, prejudicando dessa forma a estrutura e consolidação óssea das tíbias de ratas em crescimento.

Palavras-chave: Dieta Hiperlipídica; Osso; Consolidação da Fratura; Osteotomia.

ABSTRACT

YAMANAKA, J. S. Effects of high-fat diet on structure and bone healing in tibias of growing rats. 2016. 114 p. Dissertation (Master degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016.

The body fat accumulation have been considered a public health issue with several negative consequences, including reduction of bone quality, that affects young people increasingly. The studies that seek to clarify the relationship between fat mass and bone mass have been increasing. Therefore the aim of this study was to investigate the effect of high consumption of lipids on bone structure and bone healing in growing rats. Fifty-two female Wistar rats 21 days old were used, divided into four groups (n=13), as follows: animals treated with standard diet (SD), animals treated with high-fat diet (HFD), animals treated with standard diet and osteotomy (SDO) and animals treated with high-fat diet and osteotomy (HFDO). Experimental period was of 5 weeks for every groups. The SD and HFD animals were maintained without intervention, while SDO and HFDO groups were submitted to osteotomy in left tibia at third experimental week. Animal body mass and feed intake were assessed during experimental period. One day before euthanasia insulin tolerance test was performed in 5 animal of each group. After euthanasia, the left tibia of each rat was dissected and cleaned of soft tissues and submitted to macroscopy analysis, densitometry, mechanical analysis, histomorphometry, stereology of newly formed bone and immunohistochemistry. Data were analyzed by general linear model with adjustment to multiple comparisons of Bonferroni for comparisons between variables and T-Student e Mann-Whitney test for comparisons between two groups. At end of the experiment the high-fat diet fed animals had body mass similar to standard diet fed animals ($p=0.115$), however they had lower feed intake ($p<0.001$) and lower insulin sensibility ($p=0.018$). Surgery affected feed intake, operated animals had lower feed intake than non-operated animals ($p=0.017$). High-fat diet fed animals had longer tibias ($p=0.041$), lower maximal load ($p<0.001$) and lower stiffness ($p=0.003$) than standard diet fed animals, although bone mineral density (BMD) had been similar ($p=0.958$). Operated animals had lower maximal load ($p<0.001$), stiffness ($p=0.020$) and lower collagen quantity ($p=0.029$) than non-operated animals. Newly formed bone of tibias

submitted to osteotomy trended to be lower in HFDO group than SDO group ($p=0.054$). Immunohistochemistry presented no difference between HFDO e SDO group ($p<0.05$). We concluded high-fat diet affected bone in order to harm tibia strength and caused a decrease in the newly formed bone volume, impairing structure and bone healing.

Keywords: Diet, High-fat; Bone; Fracture Healing; Osteotomy.

Lista de figuras

Figura 1 – Fluxograma do experimento.....	48
Figura 2 – Ração padrão.....	49
Figura 3 – Ração hiperlipídica.....	49
Figura 4 – A) Mensuração da tíbia do animal para que fosse localizada a porção central. B) Incisão de 1 cm na porção central do membro. C) Posicionamento do afastador após secção da pele e da musculatura para exposição da tíbia.	51
Figura 5 – A) Foto do disco de carborundum. B) Esquema representativo da dimensão do disco e da tíbia em corte transversal. A seta representa o movimento perpendicular com o qual o disco faz contato com a tíbia. C) Contato entre o disco e a tíbia que provoca a osteotomia parcial, destacado em vermelho a superfície de contato entre eles.....	51
Figura 6 – A) Disco de carborundum posicionado perpendicularmente ao osso de forma a criar um corte e provocar um defeito na face medial da tíbia. Procedimento irrigado constantemente com soro fisiológico. B) Defeito produzido na tíbia de aproximadamente 0,2 mm de espessura e 1 cm de profundidade. C) Inspeção com a sonda milimétrica para avaliar a profundidade do defeito.	52
Figura 7 – Radiografia da tíbia esquerda em incidência látero-lateral (LL) e pósterio-anterior (PA), sendo possível visualizar o defeito ósseo indicado com a seta.	53
Figura 8 – Radiografia da tíbia. Estão destacados na imagem o comprimento da tíbia (C1) em vermelho e a posição do defeito (P1) em amarelo.	55
Figura 9 – Imagem da tíbia no densitômetro. Estão destacados na imagem o comprimento da tíbia (c2) pela linha vermelha e a posição do defeito (p2) pela linha amarela. O quadrado vermelho representa o ROI1 posicionado abaixo do disco epifisário. O quadrado amarelo representa o ROI2 posicionado, de acordo com o cálculo, sobre o defeito.	55
Figura 10 – Tíbia de rata preparada para ensaio de flexão de três pontos	56
Figura 11 – A) Tíbia com o defeito (na face medial) foi girada em 90º, de modo que o defeito ficasse para a baixo, ao ser preparado os blocos de parafina. B) De acordo com	

esse procedimento a face medial da tíbia ficou exposta para corte. O desenho esquemático representa a profundidade total do defeito da tíbia, a partir do qual foram seccionados cortes por toda profundidade do defeito, respeitando um intervalo entre eles.	57
Figura 12 – A) Área de seleção imediatamente abaixo do disco epifisário. B) Seleção da área de colágeno C) Seleção final excluindo a região correspondente área do disco epifisário e epífise. (Picro sirius, aumento de 50x)	58
Figura 13 – A) Área de osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de separação em vermelho para exclusão da área que representa tecido cartilaginoso e epífise. (Tricrômico de Masson, aumento de 50x) 59	
Figura 14 – Aparência do defeito a partir de corte corado de Masson em aumento de 50x.	60
Figura 15 – A) Área de interesse contornada na cor rosa. B) Área de interesse preenchida por sistema de contagem de pontos. C) Representação da área final desprezando a região que não representa tecido ósseo (nas lacunas vazias). D) Representação tridimensional do corte a partir do qual o volume é calculado. (Tricrômico de Masson, aumento de 100x).....	61
Figura 16 – Gráfico do Ganho de peso através da média da massa corporal x semanas	67
Figura 17 – Gráfico do consumo de ração semanal.	68
Figura 18 – Gráfico da glicemia dos animais em relação ao tempo	69
Figura 19 – Gráfico da morfologia das tíbias quanto ao comprimento.....	70
Figura 20 – A) Densidade mineral óssea da região proximal das tíbias. B) Densidade mineral óssea da região medial da diáfise das tíbias	70
Figura 21 – Limite da resistência mecânica (força máxima) das tíbias ao ensaio de flexão de três pontos.....	71
Figura 22 – Rigidez relativa das tíbias ao ensaio de flexão de três pontos.	72
Figura 23 – Fotomicrografias das fibras de colágeno sob luz polarizada na região proximal das tíbias. (Picro sirius, aumento de 100x)	72

Figura 24 – Gráfico do percentual da área de colágeno entre os grupos, obtido por meio da razão da área de colágeno pela área total avaliada em μm^2	73
Figura 25 – Fotomicrografias do osso trabecular na região proximal das tíbias. (Tricômico de Masson, aumento de 100x)	74
Figura 26 – Gráfico do percentual de osso trabecular, obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2	74
Figura 27 – Fotomicrografias das fibras de colágeno expressas em verde-amarelado e vermelho-alaranjado sob luz polarizada, na região do defeito ósseo nos grupos DHO e DPO. (Picro sirius, aumento de 100x)	75
Figura 28 – Gráfico do percentual da área de colágeno no defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada μm^2	75
Figura 29 – Fotomicrografia do osso neoformado expresso em azul, na região do defeito nos grupos DHO e DPO. (Tricômico de Masson, aumento de 100x)	76
Figura 30 – Gráfico do volume ósseo neoformado expresso na razão do volume de osso do segmento pelo volume total da região avaliada em μm^3	76
Figura 31 – Área imunomarcada positivamente para osteocalcina expressa em cor castanha. (Osteocalcina, aumento de 100x)	77
Figura 32 – Gráfico do percentual da área imunomarcada positivamente para osteocalcina, obtida por meio da razão da área de osteocalcina pela área total avaliada em μm^2	77
Figura 33 – Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 100x).....	78
Figura 34 – Gráfico do percentual da área imunomarcada positivamente para osteopontina, obtido por meio da razão da área de osteopontina pela área total avaliada em μm^2	78

Lista de tabelas

Tabela 1 – Resultados do consumo de ração em relação as variáveis.....	68
--	----

Lista de siglas

EUA	Estados Unidos da América
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
OMS	Organização Mundial de Saúde
USP	Universidade de São Paulo
B.Ar	Área de osso
BMPs	Proteínas morfogenéticas do osso
BV	Volume de osso
Col.Ar	Área de colágeno
DH	Grupo experimental submetido à dieta hiperlipídica
DHO	Grupo experimental submetido à dieta hiperlipídica e a osteotomia
DMO	Densidade mineral óssea
DP	Grupo experimental submetido à dieta padrão
DPO	Grupo experimental submetido à dieta padrão e a osteotomia
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
IL1	Interleucina 1
μCT	Microtomografia computadorizada
OC	Osteocalcina
OC.Ar	Área imunomarcada positivamente para osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN.Ar	Área imunomarcada positivamente para osteopontina
OPN	Osteopontina

PBS	Solução de tampão de fosfato salina
PGE2	Prostaglandina 2
RANK	Receptor ativador de fator nuclear
RANKL	Receptor ativador de fator nuclear ligante
ROI	Região de interesse do objeto
Runx	Fator de transcrição Runt
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tt.Ar	Área total
TV	Volume total
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de símbolos

%	porcentagem
α	alfa
°C	grau Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
g	gramas
N	Newton
min	minuto
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
μm	micrometro
μm^2	micrometro quadrado
mg	miligrama
N	Newton
kcal	kilocaloria
kg	kilograma
rpm	rotações por minuto
U	unidade de insulina

SÚMARIO

1.	INTRODUÇÃO	31
1.1.	Lipídios e adipócitos	32
1.2.	O osso	33
1.3.	A consolidação óssea	35
1.4.	Tecido adiposo e tecido ósseo	37
2.	OBJETIVO	43
2.1.	Objetivo Geral	43
2.2.	Objetivos Específicos	43
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1.	Grupos experimentais:	47
3.2.	Dietas	48
3.3.	Dieta padrão	49
3.4.	Dieta hiperlipídica	49
3.5.	Controle da massa corporal	50
3.6.	Osteotomia	50
3.7.	Teste de tolerância à insulina	53
3.8.	Eutanásia e coleta do material	53
3.9.	Análise macroscópica	54
3.10.	Análise de densidade mineral óssea	54
3.11.	Ensaio mecânico	56
3.12.	Análises histológicas	56
3.12.1.	Quantificação do colágeno na região proximal	58
3.12.2.	Quantificação do osso trabecular	59
3.12.3.	Quantificação do colágeno na região do defeito	59
3.12.4.	Quantificação do osso neoformado	60
3.13.	Análise imunohistoquímica	61
3.13.1.	Quantificação dos imunomarcadores	62
3.14.	Análise estatística	62

4.	RESULTADOS.....	67
4.1.	Massa corporal	67
4.2.	Consumo de ração	68
4.3.	Sensibilidade à insulina	69
4.4.	Comprimento das tíbias	69
4.5.	Densidade mineral óssea	70
4.6.	Força máxima	71
4.7.	Rigidez relativa	71
4.8.	Fibras de colágeno da região proximal	72
4.9.	Osso trabecular da região proximal	73
4.10.	Fibras de colágeno no defeito ósseo	75
4.11.	Volume de osso neoformado	76
4.12.	Percentual de osteocalcina	77
4.13.	Percentual de osteopontina	78
5.	DISCUSSÃO.....	81
6.	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS.....	109
	APÊNDICES	113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As mudanças socioeconômicas, culturais e tecnológicas nos trazem a frente de uma geração propensa ao sedentarismo e à alimentação com alto teor de gordura (SANTOS et al., 2013). As comorbidades associadas a esse estilo de vida é de preocupação global, pois eleva o índice de mortalidade associada a doenças não transmissíveis. Embora o índice de desnutrição mantenha-se elevado, também é alarmante o alto índice de indivíduos obesos e com sobrepeso, com atenção especial às crianças.

A alimentação gordurosa é um hábito comum na atualidade, advindo da praticidade e agilidade peculiares à rotina moderna. Nesse contexto, há cada vez mais indivíduos jovens obesos (BOSE; BHADRA; MUKHOPADHYAY, 2007). Em 2014 a prevalência de sobrepeso em indivíduos maiores de 18 anos era de 39%, e de obesidade era de 13% da população global, com maior prevalência de sobrepeso na Região das Américas, sendo de 54,1% no Brasil e 67,3% nos Estados Unidos da América (EUA). Em todas as regiões da Organização Mundial da Saúde (OMS) as mulheres eram mais propensas a serem obesas do que os homens (WHO, 2014).

As crianças são altamente atraídas ao consumo inadequado de nutrientes. Segundo a World Health Organization (2014), cerca de 41 milhões de crianças com até 5 anos de idade estavam com obesidade ou com sobrepeso no ano de 2014. Poucas crianças tem uma alimentação adequada, sendo que menos de um quarto das crianças de 6-23 meses de idade recebem alimentos que respeitem os critérios de diversidade alimentar apropriados para a sua idade (WHO, 2014).

A epidemia da obesidade no mundo atual torna crescente o interesse na investigação do tecido adiposo. O índice elevado de dietas hipercalóricas é um fator crítico. Dados na literatura demonstram que, além das consequências prejudiciais envolvendo vários sistemas orgânicos, a alimentação desbalanceada é apontada como fator de risco para a saúde óssea (MORAIS; BURGOS, 2007). Segundo Corwin et al. (2003) a ingestão excessiva de gordura saturada interfere negativamente no conteúdo mineral ósseo, tanto em idosos como em pessoas mais jovens.

A saúde na infância é fator protetor de doenças não transmissíveis. Na infância a estrutura óssea é constantemente remodelada, em conteúdo mineral e

tamanho, a fim de atender a demanda mecânica ideal do crescimento (CRABTREE et al., 2004). Sendo assim, a alimentação adequada na infância, além de suprimir a obesidade, pode melhorar a saúde óssea e prevenir osteopenia em idade mais avançada (KIN et al., 2007).

1.1. Lipídios e adipócitos

O corpo humano é composto de diversas substâncias que exercem papel no funcionamento e estruturação do organismo. A ingestão adequada de nutrientes é essencial para a manutenção do equilíbrio metabólico e da reserva energética do organismo.

Os lipídios são macromoléculas constituintes da membrana plasmática de todas as células vivas, estas membranas são reguladoras seletivas do transporte de macromoléculas através dela (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). A principal fonte de lipídios é a alimentação. Os lipídios ingeridos são catabolizados no intestino delgado em ácidos graxos e glicerol pela ação da lipase pancreática. São então absorvidos pelo epitélio de revestimento do intestino e nessas células são transformados em quilomícrons, nessa forma são transportados na corrente sanguínea, onde são atraídos até os adipócitos, reesterificados e armazenados novamente na forma de triglicérides e ácidos graxos nos adipócitos (SANTOS et al., 2013).

Os lipídios se apresentam de 3 formas distintas de acordo com sua composição molecular: insaturado, transverso (trans) e saturado. Ácidos graxos insaturados possuem ligação dupla dos átomos de carbono; ácidos graxos transversos, conhecidos como gordura trans, são insaturados, porém possuem átomos de carbono ligados à átomos de hidrogênio de lados opostos da cadeia de carbono; e ácidos graxos saturados são aqueles que possuem todos átomos de carbono ligados entre si por ligações simples (SANTOS et al., 2013; SPOSITO et al., 2007).

O consumo excessivo de lipídios favorece o acúmulo de tecido adiposo. A obesidade se desenvolve quando o nível de energia consumida é superior ao de energia gasta, podendo se desenvolver de forma hipertrófica, com o aumento do tamanho dos adipócitos, ou de forma hiperplásica, quando ocorre aumento do número de adipócitos. A alimentação excessiva de bebês acarreta no aumento anormal de

adipócitos, levando a uma obesidade logo na infância ou mais tardia (GARTNER; HIATT, 2011). O valor recomendado de consumo de gordura é de no máximo 35% do valor energético total, sendo que a gordura saturada não deve ser maior do que 10% do valor energético total (SANTOS et al., 2013).

Os adipócitos tem ampla capacidade para responder as demandas energéticas do corpo, o que reflete sua facilidade em adaptar-se a uma nutrição inadequada. Mudanças no metabolismo dos adipócitos estão relacionadas a distúrbios metabólicos, incluindo obesidade, dislipidemias, hiperglicemia e resistência à insulina (RUTKOWSKI; STERN; SCHERER, 2015).

1.2. O osso

A estrutura óssea é composta por um complexo e dinâmico tecido que exerce diversas funções no organismo. Exerce função de sustentação, proteção dos órgãos internos e locomoção, ainda atua como reservatório mineral e exerce papel importante na hematopoiese (GUYTON; HALL, 2006).

Os ossos podem ser classificados de acordo com sua morfometria em longos, chatos e curtos. Os ossos longos, tais como a tíbia e o fêmur, apresentam uma diáfise, que é o corpo do osso, no centro da qual é abrigado um canal central, a cavidade medular. Em suas extremidades encontram-se as epífises, compostas principalmente por osso esponjoso, e entre a diáfise e a epífise encontra-se uma região de transição denominada metáfise. Durante a fase de crescimento uma remanescente camada de cartilagem se interpõe entre a metáfise e a epífise, chamada de placa epifisária ou placa de crescimento (GARTNER; HIATT, 2011).

A matriz óssea é composta por componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A porção inorgânica é representada na maior parte por cristais de hidroxiapatita, enquanto a porção orgânica abrange proteínas colágenas e não colágenas, sendo que colágeno tipo I corresponde a cerca de 90% da matriz orgânica. Dentre as proteínas não colágenas podemos citar a osteocalcina e a osteopontina (ANDRADE et al., 2007).

O colágeno é uma proteína estrutural presente em todos os tecidos conjuntivos. Há vários tipos de colágenos classificados de acordo com sua

composição de aminoácidos, sendo que no osso o colágeno tipo I é o mais abundante. O colágeno possui característica elástica fornecendo resistência à tração. Os tecidos biológicos como o osso, sujeitos a estresse, normalmente apresentam grande quantidade de fibras colágenas espessas (OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

A osteopontina (OPN) e a osteocalcina (OC) são proteínas importantes para a reparação óssea. A OPN é uma molécula multifuncional relacionada à maturação dos osteoblastos. Dentre suas funções fisiológicas pode-se destacar a participação na mineralização, proliferação e adesão celular (SUBRAMANI, 2015). A OC é uma proteína expressa em osteoblastos maduros que tem função específica na ligação do cálcio à matriz orgânica do osso. Esta proteína é um importante marcador de osteoblastos expressa durante a fase mais tardia da formação óssea (AUBIN, 1998).

O osso é um órgão que possui constante modificação de sua estrutura durante a vida de um ser humano. A fase do crescimento, por exemplo, exige adaptações particulares referentes à deposição de matriz óssea nas metáfises e consequente crescimento longitudinal ósseo. Já na fase adulta, decorrente das adaptações às demandas mecânicas, o osso passa por constante processo de remodelação. Esse processo foi descrito por Roux e Wolf, conhecido como Lei de Wolf, que descreve que a área do osso é proporcional à força mecânica exercida sobre ela (RALSTON, 2005; TURNER, 1998).

O processo de remodelação em ossos longos acontece geralmente pelo mecanismo endocondral, ou seja, primariamente ocorre formação de tecido cartilaginoso que se mineraliza e passa pelo processo de ossificação. Células mesenquimais se agrupam em sítios específicos e dentro deste agrupamento as células se diferenciam em condrócitos que se proliferam. Devido à secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ocorre a vascularização do local, e atração das células progenitoras periostais que se diferenciam em osteoblastos. Os osteoblastos e condroblastos invadem o local formando osso novo. Os osteoclastos atuam na absorção do osso remanescente (DESCHASEAUX; PONTIKOGLU; SENSÉBÉ, 2010).

O ciclo de remodelação envolve a ação de duas células principais: os osteoclastos e os osteoblastos. Os osteoclastos pertencem à linhagem dos macrófagos, células abundantes no tecido conjuntivo que exercem função fagocitária (OVALLE; NAHIRNEY, 2008), sintetizam e liberam moléculas sinalizadores como fator α de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL1), também apresentam antígeno nos

receptores da membrana para linfócitos (GARTNER; HIATT, 2011). Os osteoclastos são recrutados da circulação para a superfície óssea onde criam um ambiente ácido que propicia a dissolução e digestão dos componentes orgânicos e minerais do osso. Após sua atividade fagocitária os osteoclastos sofrem apoptose (PEEL, 2009). Nessa lacuna formada, os osteoblastos, células derivadas de progenitores mesenquimais, depositam nova matriz óssea que posteriormente é mineralizada.

Antes da puberdade o tamanho e o volume ósseo são similares em meninos e meninas. Durante a puberdade essas taxas tendem a subir, no entanto diferem entre os gêneros, sendo que meninos têm puberdade atrasada e maior duração quando comparada a meninas. (RIGGS; KHOSIA; MELTON, 2002)

O crescimento longitudinal do osso na infância ocorre na placa epifisária, onde os condrócitos se dividem e se alinham na zona de proliferação, sofrem hipertrofia seguida de apoptose. Na zona de ossificação é depositada nova matriz óssea que se calcifica. Durante a puberdade com o esgotamento da zona de reserva de cartilagem a placa epifisária desaparece e o crescimento longitudinal do osso é interrompido (RALSTON, 2005).

O processo de remodelação envolve regulação local e sistêmica, no qual são influentes a atividade hormonal, citocinas, fatores de crescimento entre outros (PEEL, 2009). A ingestão de nutrientes pode afetar o pico de massa óssea (RALSTON, 2005). As mudanças fisiológicas na remodelação óssea ocorrem no envelhecimento. No entanto o desequilíbrio da remodelação compromete a estrutura, massa e a resistência do osso (PEEL, 2009).

1.3. A consolidação óssea

A consolidação óssea é um processo que visa restabelecer a integridade biomecânica do osso. Apresenta eventos sequenciais dividindo-se em três fases: inflamação, reparo e remodelação. Com a descontinuidade óssea proveniente da lesão, há rompimento das estruturas vasculares, criando um ambiente hipóxico e ácido resultando na formação do hematoma. O coágulo sanguíneo contém células imunes resistentes a este ambiente inflamatório desfavorecido, elas secretam mediadores pro-inflamatórios e anti-inflamatórios que são essenciais para o desfecho

da consolidação óssea (LEI et al., 2015). A formação do tecido cartilaginoso proveniente da proliferação e diferenciação das células progenitoras dá a estabilização dos fragmentos da fratura com a estrutura conhecida como calo mole. Essa estabilização é relativa, pois permite movimentação interfragmentária adequada para bom desenvolvimento da consolidação. Os condrócitos se hipertrofiam, são posteriormente calcificados e sofrem apoptose, preparando uma matriz calcificada que é substituída pela deposição de osteoblastos. Devido as alterações locais as células osteoblásticas do osso cortical e preosteoblastos do periósteo também são ativadas e iniciam a diferenciação, desencadeando o processo de consolidação intramembranosa. O osso novo é então remodelado por meio da ação de osteoblastos e osteoclastos (BARNES et al., 1999; LEI et al., 2015; MCKIBBIN, 1978).

Os componentes da matriz óssea regulam o metabolismo ósseo, criando um microambiente com compostos bioquímicos que pode afetar a migração, proliferação e diferenciação celular. Uma das condições essenciais para a ossificação consiste na presença de colágeno, fosfato e cálcio e regulação de inibidores de osteogênese (ALLORI; SAILON; WARREN, 2008)

A consolidação da fratura é um dos processos biológicos mais perfeitos, pois, em condições normais, não cria uma cicatriz e sim um tecido perfeito a sua forma original (MCKIBBIN, 1978).

As fraturas em crianças comumente são ocasionadas por acidentes. A aplicação de cargas diretas em ossos longos tende a criar fraturas transversas na diáfise do osso. Em crianças a consolidação ocorre rapidamente, no entanto crianças obesas podem apresentar maior risco e propensão a maior gravidade de determinadas fraturas (FORNARI et al., 2013). As lesões sustentadas durante a infância podem afetar o crescimento (WRAIGHTE; SCAMMELL, 2006).

O mecanismo de fraturas e de consolidação óssea é amplamente investigado, utilizando diferentes modelos experimentais. O modelo animal permite o estudo da regeneração óssea em um microambiente com presença de condições fisiológicas, como o transporte de nutrientes e gases, presença de fatores de crescimento, além de ser passível de angiogênese e estímulo mecânico. (HORNER et al., 2010). Ainda é possível analisar as características do osso regenerado com análises que não seriam factíveis em humanos. Os modelos mais usados são a osteotomia e a fratura traumática. A osteotomia é um modelo que consiste na produção de um corte na superfície óssea por método cirúrgico, criando defeito limpo (ALBERTIN, 2004;

GUERINO et al., 1995). Esse modelo não corresponde as reais condições de uma lesão, mas é passível de alta padronização para estudo biológico. A osteotomia em ossos longos é indicada para estudo das cargas mecânicas e do aparelho locomotor (JONES; YANG, 2011).

1.4. Tecido adiposo e tecido ósseo

Acreditava-se inicialmente que o tecido adiposo funcionava apenas como um reservatório de energia inerte. No entanto, foi observado que o tecido adiposo tem função ativa na homeostase da energia através da secreção de citocinas inflamatórias, como grelina, resistina e adiponectina (VENDRELL et al., 2004) que também estão relacionadas ao metabolismo ósseo.

Uma vez que a sobrecarga mecânica é fator influente do incremento de massa óssea, levantou-se a hipótese de que a massa gorda seria fator de proteção contra osteoporose, devido, principalmente, à propriedade piezoelétrica do osso. No entanto, novos estudos demonstram que existem outros fatores relacionados entre massa gorda e massa óssea do que apenas a influência mecânica, sendo que essa relação positiva pode não existir. Novas convicções de que a gordura acumulada pode não favorecer a estrutura óssea foram observadas em mulheres obesas, apontadas como mais susceptíveis à fratura do que mulheres de peso corporal normal. Premaor et al. (2010) relatou que a obesidade em mulheres pós-menopausa não é fator benéfico, pelo contrário, pode aumentar o risco de fraturas. Neste caso a dieta hiperlipídica poderia prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

A obesidade e a osteoporose são problemas metabólicos que afetam amplamente a população, e parece haver uma possível relação no desenvolvimento de ambas. Os adipócitos e osteoblastos são originados de um progenitor comum: as células estromais mesenquimais. Além do mais possuem outras similaridades, a obesidade e a osteoporose são doenças que podem ser afetadas por fatores genéticos e ambientais e, ambas possuem seu centro regulador no hipotálamo (ROSEN; BOUXSEIN, 2006; ZHAO et al., 2008).

As células osteoblásticas tem origem nas células mesenquimais. As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são importantes indutoras da osteogênese, pois são

precursoras da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (LIND; BÜNGER, 2001). O processo de diferenciação das células mesenquimais também dá origem aos adipócitos. Essa origem em comum, entre osteoblastos e adipócitos, induz a uma relação recíproca entre eles. Quando o processo de diferenciação, por algum fator, prioriza a formação de adipócitos, a formação de osteoblastos pode ser inibida mutuamente (BERESFORD et al., 1992; NUTTALL et al., 1998; ROSEN; MACDOUGALD, 2006). Fatores como ingestão de calorias, tipo de nutrientes, consumo de álcool, tensão de oxigênio, e oxidação celular podem influenciar a diferenciação das células mesenquimais da medula óssea. Essas células têm vários caminhos de diferenciação e transdiferenciação e sua ação pode ser influenciada de acordo com as respostas as mudanças de seu microambiente (GRECO; LENZI; MIGLIACCIO, 2015; NUTTALL; GIMBLE, 2000).

Além disso, o tecido adiposo libera citocinas que estão intimamente ligadas ao metabolismo ósseo. A desregulação dessas citocinas acarreta em modificações metabólicas que levam a doenças cardiovasculares, resistência a insulina, diabetes mellitus ou perda óssea (GRECO; LENZI; MIGLIACCIO, 2015; KAWAI; DE PAULA; ROSEN, 2012).

O baixo índice de massa corporal é visto como fator predispor de fraturas em alguns ossos. De Laet et al. (2005) consideram o baixo peso corporal um fator de risco de fratura maior do que a obesidade. No entanto, em indivíduos jovens, mesmo com baixo peso, as fraturas são menos prevalentes. A perda de peso pode ser um fator de risco para fraturas que estão relacionadas a fragilidade e a deteriorização da matriz orgânica óssea, e não diretamente apenas ao índice de massa corpórea (SHAPSES; RIEDT, 2006). Portanto, deve ser considerada também a relação entre a massa magra e qualidade óssea.

Sabe-se que a tensão externa exercida nos ossos contribui para a formação óssea, ativando o processo de remodelamento acima dos níveis basais (HAMMER, 2015). No entanto, as cargas dinâmicas são mais influentes na remodelação óssea do que as cargas estáticas, dando a entender que a massa magra é mais importante que a massa gorda para o tecido ósseo (LANYON; RUBIN, 1984; TURNER, 1998).

Além do mais, indivíduos obesos, em grande parte, desenvolvem resistência à insulina, que é considerada um fator desencadeador de diabetes do tipo II. A diabetes está relacionada com o mau reparo do tecido ósseo revelando outro possível ponto negativo da obesidade na massa óssea (KAYAL et al., 2009).

O estudo dos mecanismos de remodelação óssea associado a uma alimentação hiperlipídica é importante e necessário para elucidar o papel do tecido adiposo como possível mediador da estrutura e da consolidação óssea. Os estudos, em humanos e animais, têm sido realizados a fim de compreender a influência de uma alimentação hiperlipídica sobre o tecido ósseo. Para elucidar os efeitos de uma dieta hiperlipídica em diversos sistemas orgânicos é comum o uso de modelos animais experimentais. A indução de hiperlipidemia em animais consiste em rações específicas com alto teor de gordura.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar o efeito do consumo excessivo de lipídios na estrutura e no processo de consolidação óssea em tíbias de ratas em crescimento.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos sistêmicos da dieta hiperlipídica em ratas em crescimento na massa corporal e sensibilidade à insulina;
- Avaliar a influência da dieta hiperlipídica no comprimento dos ossos;
- Avaliar a influência da dieta hiperlipídica na densidade mineral óssea;
- Avaliar a influência da dieta hiperlipídica na resistência óssea;
- Avaliar a influência da dieta hiperlipídica na microestrutura óssea por métodos histológicos e imunohistoquímico.
- Avaliar os efeitos sistêmicos e na estrutura óssea da cirurgia.

MATERIAIS E
MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - USA, 2011). A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) aprovou a realização do projeto de pesquisa, protocolo 15/2015 (Anexo A).

Foram utilizadas cinquenta e duas (52) ratas da raça *Rattus norvegicus albinus*, da variedade *Wistar*, com 21 dias de vida e massa corporal entre 50 e 75 g. Nesta idade, são animais adquiridos logo após o desmame. Os animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP e foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. O ambiente foi controlado com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade de $55\% \pm 10$ e controle de luminosidade 12 horas claro e 12 horas escuro. Não houve restrição de ração e água.

As caudas foram enumeradas com algarismos arábicos, por caneta de tinta permanente, para identificação dos animais. Os animais foram alojados em caixas plásticas forradas com granulados vegetais biodegradáveis Bioflakes 24, adquiridos da empresa Flakes do Brasil Indústria e Comércio de Granulados Vegetais Ltda. Esses granulados têm grande absorção de líquido, o que melhora o controle de odor e mantém a cama seca, livre do acúmulo de dejetos evitando a contaminação da incisão cirúrgica. Durante as 3 semanas iniciais do experimento os animais foram alojados em caixas coletivas (máximo de 5 animais por caixa) devido a característica de animais sociais. A partir do dia da cirurgia os animais dos grupos com defeito ósseo foram alocados em caixas individuais para acompanhamento de cada um no período pós-cirúrgico. Foram avaliadas a alimentação dos animais, aspectos físicos, atividade e cicatrização diariamente.

3.1. Grupos experimentais:

Os animais foram divididos ao acaso em 4 grupos (n=13) conforme delineamento experimental apresentado na Figura 1:

- DP: ratas sem intervenção, alimentadas com ração padrão durante cinco semanas.
- DH: ratas sem intervenção, alimentadas com ração hiperlipídica durante cinco semanas.
- DPO: ratas submetidas ao procedimento cirúrgico de osteotomia após três semanas de experimento, alimentadas com ração padrão durante cinco semanas.
- DHO: ratas submetidas ao procedimento cirúrgico de osteotomia após três semanas de experimento, alimentadas com ração hiperlipídica durante cinco semanas.

Figura 1 – Fluxograma do experimento.

3.2. Dietas

A quantidade de ração oferecida foi sempre superior ao consumo estimado para que os animais não tivessem restrição alimentar. A ração foi pesada antes e após a oferta, em uma balança da marca Marte®, modelo AC-2000 da FMRP/USP, de modo que houve o controle da quantidade de ração consumida pelos animais.

Nas 3 semanas iniciais foi calculada a média do consumo de ração entre os animais da caixa coletiva. Durante as 2 semanas seguintes, os animais dos grupos DPO e DHO foram alocados em caixas individuais, e o controle feito individualmente para estes grupos.

As rações foram adquiridas da empresa Rhoster® Indústria e Comércio Ltda., que segue as recomendações da *American Institute of Nutrition* (AIN) (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1939).

3.3. Dieta padrão

A dieta padrão utilizada foi a AIN-93G, ração purificada RH19501 para roedores de laboratório em crescimento, fornecida em peletes (Figura 2).

Figura 2 – Ração padrão

3.4. Dieta hiperlipídica

A dieta hiperlipídica utilizada foi a ração purificada em pasta (60% kcal), composta por caseína láctea, amido dextrinizado, banha de porco, sacarose, óleo de soja, celulose, mix mineral RH9501, mix vitamínico RH9503, fosfato de cálcio, bitartarato de colina, L-cistina, tert-butilhidroquinona Sigma-Aldrich¹ (Figura 3).

Figura 3 – Ração hiperlipídica

¹Informações fornecidas pela empresa fabricante.

3.5. Controle da massa corporal

A mensuração da massa dos animais foi realizada uma vez por semana. A pesagem foi realizada individualmente, com os animais acomodados em uma caixa plástica e pesados em uma balança técnica (C&F Modelo P15, Ribeirão Preto, Brasil) com capacidade de até 1500g e divisão de 5g, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

3.6. Osteotomia

Os animais receberam anestesia composta por Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), aplicada via intramuscular na região glútea. Depois de instalado o efeito do anestésico foi realizado a tricotomia e a assepsia do membro posterior esquerdo. Os animais foram então posicionados em supino, fixando o membro posterior esquerdo em rotação externa e tríplice flexão.

O terço central da tíbia foi medido com auxílio de um paquímetro (Figura 4A) e foi realizada uma incisão correspondente na pele e na musculatura de aproximadamente 1 cm de extensão (Figura 4B) com lâmina de bisturi número 10, previamente montada em cabo de bisturi número 3. Em seguida a pele e os músculos foram cuidadosamente afastados e posicionados com auxílio de um afastador para expor a superfície óssea (Figura 4C).

Figura 4 – A) Mensuração da tíbia do animal para que fosse localizada a porção central. B) Incisão de 1 cm na porção central do membro. C) Posicionamento do afastador após secção da pele e da musculatura para exposição da tíbia.

A osteotomia parcial foi realizada na face medial da tíbia com auxílio de um disco de carborundum de 2 cm de diâmetro e 0,2 mm de espessura (Figura 5A) acoplado a um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/ 105L, Strong®, Korea) usado na Odontologia, ajustado em 3000 rpm. O disco foi posicionado perpendicularmente ao osso (Figura 5B e 6A) para cortar em um único movimento, sob irrigação constante de solução fisiológica estéril. O diâmetro do disco utilizado é de aproximadamente 6,6 vezes o diâmetro do osso, dessa forma a face de contato entre eles era pouco côncava (Figura 5C).

Figura 5 – A) Foto do disco de carborundum. B) Esquema representativo da dimensão do disco e da tíbia em corte transversal. A seta representa o movimento perpendicular com o qual o disco faz contato com a tíbia. C) Contato entre o disco e a tíbia que provoca a osteotomia parcial, destacado em vermelho a superfície de contato entre eles.

Foi produzida separação das corticais mediais (Figura 6B) com espessura aproximada de 0,2 mm, referente à espessura do disco, e profundidade de 1 mm, confirmada através de sonda milimétrica utilizada na odontologia (Figura 6C). Posteriormente, a musculatura foi suturada com fio absorvível de Vicryl 0,5 e a pele com fio não absorvível de Nylon 0,3.

Figura 6 – A) Disco de carborundum posicionado perpendicularmente ao osso de forma a criar um corte e provocar um defeito na face medial da tíbia. Procedimento irrigado constantemente com soro fisiológico. B) Defeito produzido na tíbia de aproximadamente 0,2 mm de espessura e 1 cm de profundidade. C) Inspeção com a sonda milimétrica para avaliar a profundidade do defeito.

Após esses procedimentos, com o animal ainda anestesiado, foi realizada radiografia da tíbia submetida à osteotomia, para inspeção do defeito. A técnica radiográfica foi: distância de 115 cm entre o foco e o cassete digital, marca Kodak-View 25x30 cm, com parâmetros de 5 mA e 44 kV em aparelho portátil de radiografias (Siemens-Unimax 2B, Rio de Janeiro).

Foram administradas duas doses subcutâneas diárias de Dipirona Ibaso (2,5 mg/kg) em cada animal durante 3 dias.

Ao 7º dia pós-operatório foi novamente realizada radiografia, utilizando o mesmo método já apresentado, para verificar o alinhamento da estrutura óssea (Figura 7).

Figura 7 – Radiografia da tíbia esquerda em incidência látero-lateral (LL) e pósterio-anterior (PA), sendo possível visualizar o defeito ósseo indicado com a seta.

3.7. Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi realizado em 5 animais de cada grupo, um dia precedente à eutanásia. Foi utilizada uma dose de 1U de insulina humana/kg administrada via intraperitoneal.

A coleta do sangue foi feita através de uma picada na região distal da cauda e dosada a glicemia imediatamente após as coletas. As medidas de glicemia foram feitas no tempo basal e 20, 40, 60, 100, 120 e 150 minutos após a injeção de insulina, utilizando um aparelho de glicosimetria (Optium mini Abbott®).

A partir dos resultados foi criada uma curva glicêmica pelo tempo. A área abaixo da curva foi comparada em relação às variáveis.

3.8. Eutanásia e coleta do material

Todos os grupos foram submetidos à eutanásia após o período de 5 semanas experimentais. Para a eutanásia dos animais foi utilizada dose excessiva de Xilazina e Ketamina.

Foram dissecadas as tíbias esquerdas e identificadas. O total de 13 tíbias esquerdas de cada grupo foi dividido da seguinte forma para as análises: oito tíbias foram avaliadas por análise macroscópica, densitometria e ensaio mecânico e cinco tíbias foram destinadas à histologia e imunohistoquímica.

3.9. Análise macroscópica

As tíbias (n=8) foram armazenadas em freezer -20°C após dissecação e descongeladas 24 horas antes da análise.

O comprimento das tíbias foi medido com paquímetro digital da marca Mitutoyo® com precisão de 0,01mm.

3.10. Análise de densidade mineral óssea

A análise densitométrica foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios X, modelo DPX-IQ, Lunar®, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi utilizado o programa para exames em pequenos animais em modo de alta resolução. As aquisições de imagem foram realizadas com os ossos alinhados na mesma posição e imersos sob profundidade de 2 cm de solução fisiológica em um recipiente plástico. Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens, foram realizadas as análises dos exames. Usando a ferramenta de seleção, os ossos foram demarcados na região de interesse do objeto (ROI) em uma área de 90 mm² na região proximal da tíbia (ROI1) e em uma área de 40 mm² na região medial da tíbia (ROI2), colhendo as informações de densidade mineral óssea (DMO) das áreas de interesse.

O ROI1 foi posicionado logo abaixo do disco epifisário. Para posicionamento do ROI2 nos grupos DPO e DHO foi adotado o protocolo pelo qual o local do defeito foi mensurado com auxílio de um paquímetro, utilizando a imagem radiográfica do animal. Para auxílio da mensuração foram delimitadas retas que demarcavam a superfície proximal, distal e o local da incisão cirúrgica (Figura 8).

Figura 8 – Radiografia da tíbia. Estão destacados na imagem o comprimento da tíbia (C1) em vermelho e a posição do defeito (P1) em amarelo.

Por meio dessa medida foi feita uma transposição da escala para a imagem escaneada no *software* do equipamento, através dessa escala foi possível posicionar o ROI2 no mesmo ponto do defeito, seguindo o seguinte cálculo:

$$p2 = \frac{P1 \times C1}{C2} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: C1 é o comprimento da tíbia na imagem radiográfica

P1 é a posição do defeito na imagem radiográfica

c2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro

p2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro.

O ROI2 foi posicionado no canto esquerdo da imagem, uma vez que por motivos estruturais a tíbia foi posicionada em ântero-posterior para escaneamento no densitômetro e já na análise radiográfica, para melhor acomodação dos animais, a imagem foi obtida a partir de uma incidência de pósterio-anterior (Figura 9).

Figura 9 – Imagem da tíbia no densitômetro. Estão destacados na imagem o comprimento da tíbia (c2) pela linha vermelha e a posição do defeito (p2) pela linha amarela. O quadrado vermelho representa o ROI1 posicionado abaixo do disco epifisário. O quadrado amarelo representa o ROI2 posicionado, de acordo com o cálculo, sobre o defeito.

Para os grupos DP e DH, foi utilizada metodologia semelhante, posicionando o ROI2 no ponto médio do comprimento c2.

3.11. Ensaio mecânico

Após a densitometria as tíbias foram submetidas aos ensaios mecânicos de flexão em três pontos. Os ensaios mecânicos foram realizados na Máquina Universal de Ensaio da marca EMIC® (Modelo DL10.000) do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, utilizando uma célula de carga com capacidade de 500N. O osso foi apoiado sobre dois apoios distanciados de 25 mm. A carga foi aplicada em sentido pósterio-anterior da tíbia e a velocidade de aplicação da carga foi padronizada em 1mm/min (Figura 10). Um programa Tesc® foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento para cada ensaio. As propriedades mecânicas analisadas foram força máxima e rigidez relativa.

Figura 10 – Tíbia de rata preparada para ensaio de flexão de três pontos

3.12. Análises histológicas

Após a dissecação e remoção das partes moles, as tíbias esquerdas (n=5) foram mantidas em formol 10% durante 24 horas para fixação. Foram então

descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 30 dias à temperatura ambiente, com troca da solução realizada a cada 2 dias.

Após descalcificação os ossos foram lavados em água corrente *overnight* e desidratados em álcool com concentração crescente de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração. Subsequentemente os materiais foram diafanizados em uma sequência de três xilóis, por 1 hora em cada e em três banhados em parafina (55°C) por 1 hora em cada. Em seguida foram confeccionados os blocos retangulares de parafina de modo que a face medial da tíbia ficasse voltada para baixo (Figura 11A).

Figura 11 – A) Tíbia com o defeito (na face medial) foi girada em 90°, de modo que o defeito ficasse para a baixo, ao ser preparado os blocos de parafina. B) De acordo com esse procedimento a face medial da tíbia ficou exposta para corte. O desenho esquemático representa a profundidade total do defeito da tíbia, a partir do qual foram seccionados cortes por toda profundidade do defeito, respeitando um intervalo entre eles.

As peças foram seccionadas em cortes longitudinais de 5 µm de espessura. Em cada tíbia foram coletados 48 cortes semi-seriados, em que após a coleta de 8 cortes, os 4 cortes subsequentes eram descartados e o procedimento era repetido até percorrer toda a profundidade do defeito e região proximal da tíbia (Figura 11B). Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro com polilisina, sendo posicionados 2 cortes em cada lâmina. Das 24 lâminas obtidas seis foram coradas pela técnica de

Picro sirius red (lâminas 3, 7, 11, 15, 19 e 23), 12 pela técnica de tricrômico de Masson (lâminas pares), e 2 destinada a imunohistoquímica (lâminas 13 e 17).

Para o exame das lâminas foi utilizado o microscópio óptico AxionImager® Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss®) pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP.

3.12.1. Quantificação do colágeno na região proximal

A avaliação da área de colágeno foi realizada através das lâminas coradas com *picro sirius red*. As lâminas foram analisada no microscópio (Zeiss, Germany) com luz polarizada e através da birrefringência foi possível observar as fibras colágenas com a cor vermelha-alaranjada e verde-amarelada. A área avaliada foi de 3,5 X 2,5 mm, na objetiva de 5x, imediatamente abaixo do disco epifisário (Figura 12A). Foi realizada a análise de densitometria óptica das fibras colágenas no programa Axiovision® que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde e quantifica a somatória das áreas em μm^2 referentes às diferentes fibras sobre a luz polarizada. A área foi expressa pela razão da área de colágeno pela área total (Col.Ar/Tt.Ar - %) (PARFITT et al., 1987)

Após a demarcação (Figura 12B), as seleções fora da região de interesse foram excluídas da quantificação (Figura 12C). Essa região foi avaliada para comparar a quantidade de matriz colágena na estrutura óssea dos animais.

Figura 12 – A) Área de seleção imediatamente abaixo do disco epifisário. B) Seleção da área de colágeno C) Seleção final excluindo a região correspondente área do disco epifisário e epífise. (Picro sirius, aumento de 50x)

3.12.2. Quantificação do osso trabecular

Por meio das lâminas coradas com tricrômico de Masson foi avaliada a área de osso trabecular. Foi selecionada área de 3,5 x 2,5 mm, na objetiva de 5x, imediatamente abaixo do disco epifisário. Tal área foi avaliada para comparar os 4 grupos entre si e avaliar possíveis alterações na área trabecular óssea afetadas pela dieta ou cirurgia. Por meio do programa Axionvision® foi selecionada a cor azul referente a osso trabecular, toda a área foi demarcada (Figura 13 A) e foram excluídas as regiões que não representavam osso trabecular abaixo do disco epifisário (Figura 13B). A área foi expressa pela razão da área de osso pela área total ($B.Ar/Tt.Ar - \%$) (PARFITT et al., 1987).

Figura 13 – A) Área de osso trabecular selecionada em verde a partir da demarcação dos tons de azul B) Linha de separação em vermelho para exclusão da área que representa tecido cartilagenoso e epífise. (Tricrômico de Masson, aumento de 50x)

3.12.3. Quantificação do colágeno na região do defeito

A avaliação da área de colágeno na região do defeito dos grupos DPO e DHO foi realizada através das lâminas coradas com *picro sirius red*. A área avaliada foi de 500 x 700 µm na região central do defeito, na objetiva de 10x. As lâminas foram analisadas no microscópio (Zeiss, Germany) com luz polarizada, utilizando o programa Axiovision®. A análise foi feita assim como descrito na quantificação de colágeno na região proximal.

3.12.4. Quantificação do osso neoformado

Na região do defeito ósseo (Figura 14) dos grupos DPO e DHO foi avaliada a razão de volume de osso neoformado pelo volume total (BV/TV - %) (PARFITT et al., 1987) utilizando a técnica de Cavalieri no *software* StereoInvestigator (MBF, USA). A técnica de Cavalieri estima o volume do objeto a partir de uma imagem bidimensional com conhecida espessura. As áreas de interesse da superfície do corte são avaliadas e multiplicadas pela espessura do corte, obtendo-se o volume estimado do objeto. Os cortes corados de masson foram analisados na objetiva de 10x. Através de um sistema de grades formado por pontos de 250 µm de distância, foi criada uma caixa de seleção de 375.000 µm². A caixa de seleção foi posicionada sobre a região central do defeito desprezando as corticais ósseas (Figura 15A). Por meio da técnica de Cavalieri foi criando um sistema de pontos de seleção de 25 µm de distância dentro da região contornada (Figura 15B). Os pontos sobrepostos sobre a área que não correspondia a tecido ósseo foram excluídos (Figura 15C) e os pontos que correspondiam à área de interesse foram contados. O volume ósseo foi então calculado pelo programa, considerando a espessura do corte de 5 µm (Figura 15D). O cálculo é dado pela Equação 2:

$$V = t \times ap \times \sum P \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: t é a espessura do corte,

ap é a área representada por cada ponto dentro do sistema de grade

$\sum P$ é o número total de pontos contados (ODACI et al., 2003).

Figura 14 – Aparência do defeito a partir de corte corado de Masson em aumento de 50x.

Figura 15 – A) Área de interesse contornada na cor rosa. B) Área de interesse preenchida por sistema de contagem de pontos. C) Representação da área final desprezando a região que não representa tecido ósseo (nas lacunas vazias). D) Representação tridimensional do corte a partir do qual o volume é calculado. (Tricrômico de Masson, aumento de 100x)

3.13. Análise imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à remoção da parafina em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°, 100°, 100°, 90° e 70°). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em solução de tampão de fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio durante 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois das lavagens em PBS,

os cortes histológicos foram tratados em 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

As lâminas histológicas contendo amostras dos grupos experimentais DHO e DPO foram submetidas à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OC (osteocalcina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-OPN (osteopontina) do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se o Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, as amostras foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

3.13.1. Quantificação dos imunomarcadores

As lâminas previamente preparadas foram avaliadas para quantificar a região demarcada. Os cortes foram analisados na objetiva de 10x, em uma região de 375.000 μm^2 na região central do defeito ósseo. Utilizando o programa Axionvision® as regiões marcadas positivamente foram quantificadas por meio da expressão da cor castanha. Os resultados foram apresentados em porcentagem pela razão das áreas marcadas positivamente pela área total.

3.14. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico em modelo linear geral e ajuste para múltiplas comparações de Bonferroni.

Foi utilizado o teste *T-Student* e *Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos separadamente.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS® (Versão 20.0) e foi adotado nível de significância de 5%.

Para formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5®.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Massa corporal

A partir da massa corporal de cada animal, fez-se a avaliação da média da massa corporal dos grupos a cada semana (Figura 15).

Nas três primeiras semanas de experimento, semanas precedentes à cirurgia, os animais foram avaliados quanto a variável dieta: alimentados com dieta padrão (padrão) e alimentados com dieta hiperlipídica (hiper). Não houve diferença da massa corporal inicial dos animais ($p=0,414$). A comparação da massa corporal, dos animais padrão e hiperlipídica, também não apresentou diferença na primeira ($p=0,817$), segunda ($p=0,432$) e terceira semana ($p=0,790$) de experimento.

Na quarta e na quinta semanas os animais foram avaliados quanto as variáveis dieta e cirurgia. Na quarta semana não foi observada diferença significativa para as variáveis cirurgia ($p=0,056$) e dieta ($p=0,076$) e para a interação cirurgia x dieta ($p=0,487$). Do mesmo modo, na quinta semana (final do experimento) não foi observada diferença significativa para as variáveis cirurgia ($p=0,313$) e dieta ($p=0,115$) e para a interação cirurgia x dieta ($p=0,668$).

Figura 16 – Gráfico do Ganho de peso através da média da massa corporal x semanas

4.2. Consumo de ração

A comparação estatística do consumo de ração foi avaliada seguindo os mesmos critérios da avaliação da massa corporal, apenas a variável cirurgia até a terceira semana, e as variáveis dieta e cirurgia a partir da terceira semana (Figura 17). O consumo de ração foi visualmente crescente ao longo das três primeiras semanas, com consumo semanal 5,39% maior de ração padrão comparado à hiperlipídica durante a segunda semana ($p=0,038$) e 9,64% na terceira semana ($p<0,001$). A cirurgia foi influente no consumo de ração, sendo que na quarta semana os animais operados apresentaram decréscimo do consumo de ração em comparação aos animais não operados ($p=0,017$), com retorno a um maior consumo na quinta semana ($p=0,023$). A dieta também foi influente no consumo de ração, sendo que a dieta padrão foi 10,34% mais consumida do que a hiperlipídica nas semanas 4 ($p=0,023$) e 17,89% na semana 5 ($p<0,001$). A interação das variáveis não apresentou diferença significativa nas semanas 4 ($p=0,607$) e 5 ($p=0,984$). As comparações do consumo de ração em relação as variáveis estão descritas na tabela 2.

Figura 17 – Gráfico do consumo de ração semanal.

Tabela 1 – Resultados do consumo de ração em relação as variáveis.

Semana	0	1	2	3	4	5
Cirurgia	////	////	////	////	OP<NOP*	OP>NOP*
Dieta	Padrão=Hiper	Padrão>Hiper	Padrão>Hiper*	Padrão>Hiper*	Padrão>Hiper*	Padrão>Hiper *

//// significa ausência da cirurgia. OP = animais operados, NOP = animais não-operados. * < 0,05

4.3. Sensibilidade à insulina

Na avaliação do teste de tolerância à insulina foi possível observar rápido decaimento do nível glicêmico dos 4 grupos nos 20 primeiros minutos. O mais baixo nível ocorreu aos 60 minutos no grupo DP e DHO e aos 100 min no grupo DH e DPO (Figura 18). Foram avaliadas as áreas abaixo da curva para comparação entre os grupos. Para a variável dieta houve diferença significativa na resposta glicêmica em relação à insulina ($p=0,018$), os grupos alimentados com dieta hiperlipídica mantiveram-se com maior área abaixo da curva, ou seja, elevado nível glicêmico sugestivo de insensibilidade à insulina, quando comparado com os grupos alimentados com dieta padrão. A variável cirurgia ($p=0,908$) não influenciou o perfil glicêmico e a interação dieta x cirurgia não foi significativa ($p=0,607$).

Figura 18 – Gráfico da glicemia dos animais em relação ao tempo

4.4. Comprimento das tíbias

Quanto a avaliação do comprimento das tíbias (Figura 19), animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram valores significativamente maiores do que animais alimentados com dieta padrão ($p=0,041$). A cirurgia ($p=0,670$) e a interação entre as variáveis ($p=0,787$) não foram significantes.

Figura 19 – Gráfico da morfologia das tíbias quanto ao comprimento

4.5. Densidade mineral óssea

Com a densitometria foram obtidas a DMO da região proximal (Figura 20A) e medial (Figura 20B) das tíbias.

Ao avaliar a DMO proximal das tíbias para as variáveis cirurgia ($p=0,282$) e dieta ($p=0,075$) não foi observada diferença significativa, assim como na interação entre elas ($p=0,360$).

A DMO medial das tíbias também não apresentou diferença significativa para as análises das variáveis cirurgia ($p=0,857$) e dieta ($p=0,958$), assim como para a interação entre elas ($p=0,191$).

Figura 20 – A) Densidade mineral óssea da região proximal das tíbias. B) Densidade mineral óssea da região medial da diáfise das tíbias

4.6. Força máxima

Ao comparar o efeito das variáveis na resistência mecânica ao ensaio de flexão de três pontos foi possível observar diferença significativa para a cirurgia ($p<0,001$), em que os grupos com cirurgia apresentaram maior força máxima do que os grupos sem cirurgia. A dieta também foi influente na força máxima ($p<0,001$), os grupos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menor força máxima quando comparados com os grupos alimentados com dieta padrão. A interação entre as variáveis não foi significativa ($p=0,670$). A Figura 21 representa graficamente o efeito da dieta e da cirurgia na resistência das tíbias no grupos.

Figura 21 – Limite da resistência mecânica (força máxima) das tíbias ao ensaio de flexão de três pontos.

4.7. Rigidez relativa

Analisando as variáveis observou-se que a cirurgia foi influente na rigidez relativa das tíbias, onde as tíbias não submetidas à cirurgia apresentaram maior rigidez quando comparadas às tíbias que passaram por cirurgia ($p=0,020$). O tipo de dieta também influenciou na rigidez relativa, no qual as tíbias dos animais que receberam dieta padrão apresentaram maior rigidez quando comparadas as tíbias dos animais que receberam dieta hiperlipídica ($p=0,003$). A interação entre as variáveis não foi significativa ($p=0,875$). A Figura 22 representa graficamente a rigidez relativa das tíbias submetidas ao ensaio mecânico entre os grupos.

Figura 22 – Rigidez relativa das tíbias ao ensaio de flexão de três pontos.

4.8. Fibras de colágeno da região proximal

A Figura 23 apresenta o aspecto das fibras de colágeno nos grupos.

Figura 23 – Fotomicrografias das fibras de colágeno sob luz polarizada na região proximal das tíbias. (Picro sirius, aumento de 100x)

O percentual de colágeno foi avaliado por análise histomorfométrica. Na análise das variáveis, o percentual de colágeno da região proximal das tíbias (Figura 24) apresentou diferença significativa em relação à cirurgia ($p=0,029$), sendo que os grupos sem cirurgia apresentaram maior área de colágeno comparado aos grupos com cirurgia. A variável dieta ($p=0,336$), assim como a interação entre as variáveis ($p=0,368$), não apresentou diferença significativa.

Figura 24 – Gráfico do percentual da área de colágeno entre os grupos, obtido por meio da razão da área de colágeno pela área total avaliada em μm^2

4.9. Osso trabecular da região proximal

Foi possível observar o aspecto histológico das trabéculas ósseas por meio das lâminas coradas com tricômico de Masson (Figura 25).

Figura 25 – Fotomicrografias do osso trabecular na região proximal das tíbias.
(Tricômico de Masson, aumento de 100x)

O resultado da análise histomorfométrica da região proximal das tíbias evidenciou que o percentual de osso trabecular não diferiu entre os grupos em relação à dieta ($p=0,192$) ou em relação à cirurgia ($p=0,142$). A interação entre as variáveis também não apresentou diferença significativa ($p=0,585$) (Figura 26).

Figura 26 – Gráfico do percentual de osso trabecular, obtido por meio da razão da área de osso pela área total avaliada em μm^2

4.10. Fibras de colágeno no defeito ósseo

As fibras de colágeno foram avaliadas na região central do defeito nos grupos com cirurgia (Figura 27).

Figura 27 – Fotomicrografias das fibras de colágeno expressas em verde-amarelado e vermelho-alaranjado sob luz polarizada, na região do defeito ósseo nos grupos DHO e DPO. (Picro sirius, aumento de 100x)

O percentual de colágeno no defeito ósseo foi avaliado por meio da análise histomorfométrica (Figura 28). O percentual de colágeno não apresentou diferença significativa entre os grupos DPO ($23,00 \pm 6,00\%$) e DHO ($20,00 \pm 8,70\%$) ($p=0,293$).

Figura 28 – Gráfico do percentual da área de colágeno no defeito ósseo, obtido por meio da razão de área de colágeno pela área total avaliada μm^2

4.11. Volume de osso neoformado

O volume de osso neoformado foi avaliado na região central do defeito ósseo nos grupos com cirurgia (Figura 29).

Figura 29 – Fotomicrografia do osso neoformado expresso em azul, na região do defeito nos grupos DHO e DPO. (Tricômico de Masson, aumento de 100x)

O percentual do volume de osso neoformado foi avaliado por meio da análise estereológica. Na comparação entre os grupos DHO e DP, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, porém houve uma tendência de maior formação óssea nos animais com dieta padrão. A razão BV/TV(%) foi ligeiramente maior no grupo DPO ($85,11 \pm 7,00\%$) quando comparada ao grupo DHO ($92,81 \pm 3,08\%$), ($p=0,054$) (Figura 30).

Figura 30 – Gráfico do volume ósseo neoformado expresso na razão do volume de osso do segmento pelo volume total da região avaliada em μm^3

4.12. Percentual de osteocalcina

A área imunomarcada para osteocalcina foi avaliada na região central do defeito ósseo nos grupos operados (Figura 31).

Figura 31 – Área imunomarcada positivamente para osteocalcina expressa em cor castanha. (Osteocalcina, aumento de 100x)

O percentual da área imunomarcada positivamente para osteocalcina foi avaliado por meio da análise histomorfométrica (Figura 32). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos DHO ($0,49 \pm 0,45\%$) e DPO ($0,54 \pm 0,37\%$), ($p=0,496$).

Figura 32 – Gráfico do percentual da área imunomarcada positivamente para osteocalcina, obtida por meio da razão da área de osteocalcina pela área total avaliada em μm^2

4.13. Percentual de osteopontina

A área imunomarcada positivamente para osteopontina também foi avaliada na região do defeito ósseo nos grupos operados (Figura 33).

Figura 33 – Área imunomarcada positivamente para osteopontina expressa em cor castanha. (Osteopontina, aumento de 100x)

O percentual da área imunomarcada positivamente para osteopontina foi avaliado por análise histomorfométrica (Figura 34). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos DHO ($0,87 \pm 0,38$)% e DPO ($0,81 \pm 0,46$)%, ($p=0,743$).

Figura 34 – Gráfico do percentual da área imunomarcada positivamente para osteopontina, obtido por meio da razão da área de osteopontina pela área total avaliada em μm^2

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços científicos para obter uma consolidação óssea normal, aproximadamente 10% das fraturas apresentam má consolidação ou atraso na mesma (AZAD et al., 2009). Diversos fatores podem contribuir no atraso do reparo ósseo pós-fratura, como idade, tabagismo, doenças osteometabólicas, agentes farmacológicos, alimentação e diabetes mellitus (DINIZ et al., 2008; OGASAWARA et al., 2008).

A alimentação, apesar de ser considerado um fator modificável, ainda representa grande impacto relacionado a doenças não transmissíveis. Segundo WHO (2000) a osteoporose pode ser consequência de alguma alteração do desenvolvimento ósseo durante a adolescência. Assim, como o metabolismo ósseo é acelerado na fase da infância, a consolidação óssea, em condições normais, é eficiente nessa fase. No entanto, problemas como má consolidação e desvio da fratura podem alterar toda a estrutura óssea, inclusive o crescimento e desenvolvimento adequado. Sabe-se que a consolidação de fraturas em crianças é eficaz, porém não há evidências de que crianças submetidas a dietas hiperlipídicas possuem respostas semelhantes às crianças que mantêm um padrão de alimentação saudável. Diversos estudos relacionam o fator alimentar na predisposição de doenças, para tanto o presente estudo visou estudar a influência da alimentação hiperlipídica na estrutura óssea e também na consolidação óssea de ratas durante a fase de crescimento.

Antes de estudos serem realizados na prática clínica, os estudos experimentais são necessários, para obter uma avaliação mais específica do comportamento mecânico e morfológico dos materiais biológicos (AERSSSENS, 1998). O objetivo do estudo em animais é conhecer o impacto de uma variável, neste caso a dieta hiperlipídica, no osso. Dessa forma o estudo com animais além do aspecto ético permitiu o controle e padronização das amostras para garantir a credibilidade do resultado.

As ratas encontraram-se durante o experimento na fase de crescimento. Nessa fase, em humanos, é comum a presença de nutrição inadequada e predileção ao consumo de gordura e açúcar (PEREIRA; FRANSISCHI; LANCHETA JR., 2003; WHO, 2014). Os hábitos de vida durante a fase de desenvolvimento podem prever a

qualidade de vida tardia. Portanto, os cuidados preventivos logo na infância são de suma importância para conferir saúde da futura população adulta, que justifica o interesse do presente estudo em analisar animais em crescimento.

Foram utilizadas ratas devido à grande incidência de problemas osteometabólicos em mulheres. As alterações hormonais oriundas ao gênero feminino é um dos fatores que justifica esse índice. A osteoporose, por exemplo, é prevalente em mulheres pós-menopausa e induz complicações relacionadas ao risco de fratura (WHO, 2000).

O paradigma de que as gorduras podem ser prejudiciais à saúde ainda é distorcido, pois a ingestão de gordura, desde que em seus níveis adequados, é essencial para o bom funcionamento do organismo. No entanto, o amplo consumo de produtos industrializados, enriquecidos de gordura saturada e TRANS, influi negativamente no perfil lipídico (SPOSITO et al., 2007). Os efeitos sistêmicos do consumo da dieta hiperlipídica composta por 60% kcal de gordura foram avaliados na massa corporal, ingestão de ração e análise da glicemia.

A avaliação da massa corporal demonstra que os animais foram recebidos com mesma média de massa corporal. Ao final do experimento os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram massa corporal superior aos animais alimentados com dieta padrão em valor absoluto, no entanto sem diferença significativa. Nossos resultados corroboram com os achados de Fiorino et al. (2016) que não encontraram diferença no peso corporal de ratos Wistar pós-desmame alimentados com dieta hiperlipídica durante 8 semanas. O ganho de peso advém do desequilíbrio entre energia consumida e energia gasta. Jackman; Maclean e Bessesen (2010) descrevem que ratos com resistência a obesidade tem aumento do total de gasto energético ou redução da ingestão alimentar.

Os lipídios são grandes fontes de energia e os adipócitos tem grande potencial para hipertrofia e hiperplasia frente às demandas de gordura ingerida, podendo formar grandes depósitos de gordura corporal (BILLON; DANI, 2012; MUELLER, 2014). Sendo assim, a energia armazenada pode ter sido suficiente para suprir o gasto energético com menor ingestão de alimento. Não foi avaliado o gasto energético dos animais, mas foi possível observar redução da ingestão de dieta hiperlipídica. Esses achados sugerem que a dieta, logo após o desmame, revelou uma possível resposta adaptativa do corpo para manutenção do peso, relacionados ao consumo de energia. Nem todas as pessoas alimentadas com alto teor calórico desenvolvem obesidade

(JACKMAN; MACLEAN; BESSESEN, 2010), assim como um significativo número de indivíduos não obesos apresentam distúrbios metabólicos.

Assim como no presente estudo, Higa et al. (2014) em seu estudo, não observaram diferença no ganho de peso de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas, mas notaram aumento da gordura visceral e alterações no perfil lipídico. O índice de massa gorda nem sempre acompanha o aumento de massa corporal total, podendo existir discordância entre eles (ZHU et al., 2016). Não foram no entanto avaliados no presente estudo os índices de massa gorda ou massa magra.

Alguns hormônios participam do controle da massa corporal como a grelina, que induz o apetite, enquanto o neuropeptídeo Y e a leptina induzem a saciedade. A insulina também se relaciona ao acúmulo de gordura uma vez que induz a conversão de glicose em triglicerídeos nos adipócitos (GARTNER; HIATT, 2011). A leptina é um hormônio excretado pelo tecido adiposo. Quando as reservas de energia estão limítrofes a leptina interage com os receptores do hipotálamo reduzindo o apetite (THOMAS, 2004).

Histing et al. (2016) avaliaram a concentração de leptina sérica 2 e 4 semanas após fratura, sendo que foram encontradas concentrações elevadas de leptina no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. Vendrell et al. (2004) ainda afirmam que a perda de peso é preditiva da redução dos níveis de leptina ao avaliar indivíduos com obesidade-mórbida antes e 6 meses após cirurgia bariátrica. Sendo assim, altos níveis de leptina associados ao acúmulo de gordura poderiam explicar a redução do apetite dos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Portanto, é uma limitação do presente estudo a ausência da mensuração de leptina sérica dos animais experimentais.

Nossos resultados contrariam alguns achados na literatura. Histing et al. (2016) encontraram maior ganho de peso nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6J machos durante 20 semanas, permanecendo no período pós-operatório. Da mesma forma os estudos de Brown et al. (2014) e Cao, Gregoire e Gao (2009) também encontraram ganho superior da massa corporal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 e 14 semanas, respectivamente. O período experimental do presente estudo pode não ter sido suficiente para evidenciar diferença significativa na massa corporal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, notando que os estudos que apontam diferença

significativa da massa corporal dos animais tiveram longos períodos experimentais comparados ao nosso estudo.

Em relação à cirurgia, os grupos operados tiveram decréscimo no consumo de ração na quarta semana, mas esse fato pode ser explicado pelo período de realização da cirurgia, no qual os animais estiveram sob anestesia e fase de recuperação, e submetidos a possível estresse decorrente da manipulação.

A alimentação gordurosa é fato predisponente de resistência à insulina. O acúmulo de lipídio no tecido, bem como a hipertrofia do tecido adiposo, pode desencadear resistência à insulina (GUSTAFSON et al., 2015). A insulina está envolvida no metabolismo e, muitas vezes, sua capacidade secretora não é capaz de atender ao aumento da demanda. Resistência à insulina é então caracterizada pela incapacidade da insulina em otimizar a absorção de glicose (PEREIRA; FRANSISCHI; LANCHI JR., 2003).

A queda de glicose após aplicação de insulina se dá pela captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina e pela inibição da liberação de glicose. Portanto, maior queda de glicose sugere maior sensibilidade à insulina (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006). Alguns autores descrevem a resistência à insulina como consequência de uma modificação da composição da membrana celular, com aumento da saturação de fosfolipídios. Uma outra explicação é a redução dos transportadores de glicose, as proteínas GLUT4 (PEREIRA; FRANSISCHI; LANCHI JR., 2003).

A área sob a curva glicêmica foi maior nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Este resultado sugere uma insensibilidade à insulina em comparação aos animais alimentados com dieta padrão. A ingestão excessiva de lipídios leva ao acúmulo de ácidos graxos livres em diversos tecidos, além do tecido adiposo, utilizado como substrato energético, o que causa redução da mobilização de glicose e consequente resistência à insulina (PEREIRA; FRANSISCHI; LANCHI JR., 2003). Estudos experimentais demonstram que animais alimentados com dieta hiperlipídica tendem a desenvolver resistência à insulina (HIGA et al., 2014), corroborando com nossos achados.

A captação de glicose pelos tecidos é fundamental, e o desequilíbrio deste mecanismo pode causar diabetes mellitus tipo 2. Além do mais, a resistência à insulina, bem como a diabetes, tem sido descrita como fator prejudicial para a

qualidade óssea. Segundo estudo de Kayal et al., (2009) a consolidação óssea é prejudicada em camundongos diabéticos.

A alimentação hiperlipídica, além de efeitos sistêmicos, é apontada como prejudicial para o osso. As avaliações macroscópicas do osso são importantes para buscar entender e observar possíveis alterações estruturais.

A morfometria das tíbias esquerdas demonstra que a variável dieta influenciou o comprimento das tíbias, sendo que os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram tíbias com maior comprimento do que os animais alimentados com dieta padrão. Um mecanismo proposto para explicar o maior crescimento ósseo de animais alimentados com dieta hiperlipídica é o aumento da leptina. A leptina inibe a ação do neuropeptídeo Y, um potente inibidor de crescimento ósseo. Sendo assim o nível elevado de leptina pode ser associado ao aumento do crescimento ósseo (IONOVA-MARTIN et al., 2010).

Não é possível afirmar que a maior quantidade do osso refere-se a um osso de melhor qualidade, visto que a aceleração do processo de crescimento ósseo pode ser considerada fator de risco para problemas ósseos tardios devido a uma qualidade estrutural óssea inferior (IONOVA-MARTIN et al., 2010). Durante a infância o osso está passando por alto nível de remodelação para adequar-se as alterações estruturais da criança relacionadas ao seu crescimento. Assim ocorre grande deposição de matriz óssea, principalmente nas metáfises, mas também nas diáfises. Quanto mais duradouro o pico de massa óssea melhor a composição da matriz óssea (LEONARD et al., 2004). A osteoporose, por exemplo, pode ser relacionada, não só a taxa de perda óssea, mas também ao pico de massa óssea (ALABDULKARIM; BAKEET; ARZOO, 2012).

A mineralização confere ao tecido ósseo dureza, característica essencial para o desempenho das funções estruturais de sustentação e proteção. Além do mais é importante para a função metabólica do osso atuar como reservatório de cálcio e fósforo (JUDAS et al., 2012). A DMO fornece informações sobre a disposição de minerais em dada superfície óssea. O desequilíbrio desse fator causa alterações metabólicas com grande prejuízo estrutural e funcional.

A DMO da região medial da tíbia, onde foi feita a osteotomia, não apresentou diferença entre os grupos no presente estudo. Cao, Gregoire e Gao (2009) avaliaram a tíbia de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 14 semanas, por meio de μ CT. Eles também não encontraram diferença entre a DMO do grupo alimentado

com dieta hiperlipídica quando comparado ao alimentado com dieta padrão. Os resultados na densitometria não confirmaram os resultados da resistência mecânica das tíbias no presente estudo. A densitometria óssea é considerada padrão ouro para determinar fragilidade óssea no entanto pode não ser a melhor forma de demonstrar sozinha a qualidade da regeneração óssea.

Malvi et al. (2014) encontraram aumento na DMO de ratos em crescimento alimentados com dieta hiperlipídica após 210 dias. No entanto, aos 150 dias não houve diferença estatisticamente significativa. O período em que analisamos pode também não ter sido suficiente para causar alteração da DMO.

A cirurgia e a dieta não afetaram a DMO da região proximal, no entanto teve tendência a ser superior nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica quando levada em consideração a variável dieta. Esse fato corrobora com os nossos resultados relativos ao comprimento das tíbias serem maiores nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, pois a mineralização da região proximal acompanha a etapa de crescimento longitudinal do osso, enquanto não foi observada diferença da DMO da região medial, menos propensa a remodelação nessa fase.

O comportamento mecânico de uma estrutura é determinado pela geometria e pela composição do material. O ensaio mecânico é um dos melhores métodos para caracterizar a resposta mecânica e avaliar o efeito da intervenção na resistência óssea. Para tanto, complementar o estudo morfológico do osso ao ensaio mecânico nos permite ter uma visão mais abrangente dos aspectos sobre a qualidade do osso e sua capacidade para resistir a fraturas (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008).

Quando o material é submetido a uma tensão ele tende a sofrer deformação, até a ruptura. A rigidez é a inclinação da curva tensão x deformação e corresponde à capacidade do corpo de prova de deformar sob determinada carga. A carga máxima que o corpo de prova suporta até sua ruptura é chamada de força máxima e representa a resistência do material (SHARIR; BARAK; SHAHAR, 2008). As propriedades mecânicas avaliadas em nosso trabalho foram a força máxima e a rigidez relativa, devido a irregularidade da área da secção transversal do corpo de prova avaliado.

No ensaio mecânico houve diferença significativa no comportamento de acordo com a variável dieta, onde a força máxima foi maior nos grupos alimentados com dieta padrão do que com a dieta hiperlipídica. A rigidez relativa também foi maior nos grupos alimentados com dieta padrão. Corroborando com nosso estudo, Ionova-

Martin et al. (2010) observaram em seu estudo menor resistência mecânica de fêmures de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Os mesmos autores descreveram que a dieta hiperlipídica aumenta a quantidade de osso em tamanho e conteúdo mineral, mas pode diminuir a qualidade do osso relacionada às propriedades biomecânicas, independente de obesidade. Shen et al. (2012) observaram maior força máxima ao ensaio de flexão em três pontos do fêmur de ratas alimentadas com dieta de baixo teor de gordura quando comparadas as ratas alimentadas com dieta hiperlipídica, ao mesmo tempo que não observaram diferença na DMO, confirmando os nossos resultados.

Além do mais, a prevalência de fraturas é superior em crianças com sobrepeso. O aumento da DMO descrita por outros autores não é suficiente para proteger contra o risco de fratura. Crianças com sobrepeso tendem a apresentar maior risco de queda devido a menor mobilidade, o que, associado à adiposidade, pode contribuir para o aumento do risco de fratura (TAYLO et al., 2006).

Considerando a variável cirurgia, a força máxima foi maior nos animais não operados do que nos animais operados. Esse dado confirma que o reparo ósseo consiste na restauração da função biomecânica do osso e que, nesse período de 14 dias, ainda não estava completo. Como observado nas imagens histológicas o defeito ósseo apresentava um aspecto cicatricial, sendo observado que o osso neoformado ainda se encontrava em remodelação, não tendo reestabelecido sua estrutura original e, portanto, não tendo adquirido sua resistência natural.

A avaliação histológica foi essencial para comparar os efeitos macroscópicos com os efeitos microscópicos das variáveis no tecido ósseo. Um fator importante observado em nosso trabalho foi a quantidade de colágeno, existindo uma relação complexa entre ele e a mineralização óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O estudo do colágeno é importante para entender o comportamento mecânico do osso (RIZK et al., 2008). A presença de colágeno no osso é essencial para boa resposta as cargas mecânicas, e o desequilíbrio do colágeno tende à fragilidade óssea (FORLINO; MARINI, 2016). Além de que o colágeno é um dos principais componentes da matriz, essencial para o reparo ósseo. Por meio da técnica de picro sirius foi possível avaliar a presença de colágeno na matriz óssea.

O percentual de colágeno na região proximal das tíbias, em relação à variável cirurgia, foi menor nos animais submetidos à osteotomia. A influência da cirurgia no colágeno proximal da tíbia demonstra que o processo de consolidação pode

influenciar a estrutura óssea como um todo, levando em consideração não só modificações locais, mas efeito sistêmicos intervindo no reparo da lesão (FAZZALARI, 2011). Em relação a variável dieta a quantidade de colágeno na região proximal não apresentou diferença significativa. Semelhantemente a quantidade de colágeno na região do defeito ósseo não apresentou diferença significativa entre os grupos DPO e DHO. Desse modo, a manutenção da quantidade de colágeno nos leva a concluir que a adiposidade se relacionou ao osso por interação com a osteogênese e não influenciou a matriz de colágeno.

A quantificação do osso trabecular também foi feita na região proximal das tíbias. A região proximal foi escolhida, pois é onde está localizada a maior quantidade de trabéculas, nas quais é mais natural perceber alterações estruturais devido a seu amplo número de faces trabeculares susceptíveis a reabsorção. A área de osso trabecular não diferiu entre os grupos, corroborando com os achados de Macedo et al. (2016) que não observaram diferença significativa na área de osso trabecular em ratas Wistar alimentadas com dieta hiperlipídica durante 12 semanas.

Assim como em nosso estudo, Cao e Gregoire (2016) não encontraram diferença significativa na razão de BV/TV da região proximal de tíbias de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, mas observaram uma tendência à redução de 13% de BV/TV de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparados ao controle. Os mesmos autores encontraram aumento de 27,4% da massa corporal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica quando comparada ao controle. Esses achados indicam que, embora a sobrecarga mecânica possa ser vista como estímulo para formação óssea, o acúmulo de gordura não é protetor de perda óssea.

Woo et al. (2009) encontraram perda óssea trabecular e aumento da porosidade trabecular de vértebras de ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 15 semanas. Os autores avaliaram os parâmetros estruturais BV/TV, número de trabéculas e espessura das trabéculas por μ CT, sendo que estes foram reduzidos no grupo alimentado com dieta hiperlipídica quando comparados ao grupo alimentado com dieta padrão. Dessa forma é possível inferir que os efeitos da dieta podem ser notados em diferentes ossos.

Contrariando nossos resultados, Malvi et al. (2014) encontraram uma tendência a maior BV/TV nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, a composição da dieta com óleos insaturados (amendoim e coco) pode ter gerado os

resultados controversos. Wang et al. (2016), por sua vez, observaram prejuízo do tecido ósseo dos animais alimentados com dieta rica em gordura saturada enquanto o efeito oposto foi observado no grupo alimentado com dieta rica em gordura monossaturada. Desse modo os autores concluíram que o osso pode ser afetado de forma distinta de acordo com o tipo de gordura que compõe a dieta.

O osso é capaz de se regenerar perfeitamente, restituindo a função e forma originais após recuperação de uma lesão. O desequilíbrio de fatores biológicos podem causar prejuízo funcional e estrutural ao osso, bem como afetar seu poder regenerativo, podendo gerar um retardo na consolidação ou má consolidação (RALSTON, 2005).

Para avaliar o efeito da dieta hiperlipídica na consolidação óssea foi realizada a osteotomia em modelo animal. Como foi utilizado modelo de possível fragilidade óssea, a fratura traumática poderia gerar fragmentação óssea e dessemelhança entre os grupos. Diante da dificuldade de produzir fraturas padronizadas em modelo animal optamos pela realização de uma osteotomia, assim como Brown et al. (2014) e Paiva et al. (2016). E para que não houvesse também a possível interferência de fixadores foi feita a osteotomia parcial obedecendo a protocolo criado de acordo com o estudo piloto do experimento, no qual a média do diâmetro das tíbias foi de 3 mm, e então padronizado corte com profundidade de 1 mm. Ainda foi realizado o acompanhamento por meio de radiografia para que fosse observado o alinhamento da fratura, evitando o sofrimento prolongado do animal proveniente de uma refratura ou má consolidação.

A área da diáfise correspondente ao defeito foi avaliada por estereologia para observar a neoformação óssea; a área central do defeito foi avaliada para que houvesse padronização das dimensões da área e de forma a abranger uma região não influenciada pelas corticais adjacentes.

Brown et al. (2014) revelaram maior adiposidade do calo ósseo de tíbias de camundongos submetidas à osteotomia. O volume de osso do calo foi avaliado por μ CT em diferentes tempos, observando que o grupo alimentado com dieta hiperlipídica apresentou menor volume de osso do calo ao dia 21, e por meio de histologia a área de osso neoformado (%) foi menor apenas no dia 28. No entanto aos dias 7 e 14 essas diferenças não foram visíveis. Esses resultados podem explicar nossos achados de apenas uma pequena diferença no volume de osso neoformado observada ao dia 14. Brown et al. (2014) ainda confirmaram por histomorfometria que, ao dia 21, a área de adipócitos no calo ósseo dos animais alimentados com dieta

hiperlipídica foi maior quando comparado ao controle, enquanto que a área de osteoblastos sobre a superfície óssea foi menor. Deste modo, os autores puderam concluir que a adipogênese e osteoblastogênese são inter-relacionadas e, a dieta hiperlipídica pode causar alterações no microambiente que afetam equilíbrio entre elas, com provável aumento na formação de adipócitos e redução de osteoblastos.

Sabe-se que as células estromais mesenquimais dão origem a osteoprogenitores, e progenitores adipócitos (AUBIN, 1998). Derivado da plasticidade dessas células, a diferenciação e determinação da linhagem celular são mediadas por fatores extracelulares. Por fim, observa-se que osteoblastos e adipócitos são provenientes de células precursoras comum e esse fato pode gerar um efeito competitivo entre eles em condições alteradas (TANG; LANE, 2012).

Histing et al. (2016), por outro lado, optaram pela fratura traumática, utilizando uma carga em flexão de três pontos e fixação interna. Os autores utilizaram camundongos de 4 semanas de idade que receberam dieta hiperlipídica por 20 semanas precedentes a cirurgia bem como nas 2 e 4 semanas pós-cirurgia. A razão de BV/TV não diferiu entre o grupo alimentado com dieta hiperlipídica e o controle após 2 e 4 semanas de consolidação. Enquanto que, por análise histológica, revelou maior quantidade de adipócitos na medula óssea dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, mas não no calo ósseo, concluindo que tal adiposidade não afetou o processo de consolidação de fratura do fêmur. Os diferentes métodos utilizados podem ter ocasionado os diferentes resultados entre os estudos.

Como descrito anteriormente, a consolidação óssea é organizada em uma série de eventos biológicos. Para o desfecho adequado desses eventos são necessários fatores de crescimento, vasculares e celulares. Para analisar o efeito da dieta hiperlipídica na consolidação óssea alguns marcadores foram quantificados.

As proteínas osteocalcina e osteopontina são marcadores de formação óssea. Foi possível observar que não houve diferença significativa na expressão de osteocalcina e de osteopontina entre os grupos DHO e DPO, sugerindo que a dieta hiperlipídica não afetou a adesão celular na matriz óssea e a mineralização. Esses dados se relacionam com os resultados da densitometria na região do defeito ósseo, nos quais não foi observada diferença na DMO entre os grupos. A adesão celular e a mineralização são etapas pertinentes à formação de tecido ósseo e consequente reparo ósseo. Portanto esses dados, associados aos demais resultados, nos levam a concluir que a dieta hiperlipídica durante 5 semanas não prejudicou esses fatores

relacionados a estimulação da formação óssea, no entanto a diferenciação celular em etapas subsequentes pode ter sido afetada.

O modelo animal em ratos, embora não transcreva realmente o processo em humanos devido ao perfil quadrúpede dos roedores, parece ser um modelo adequado para estudar e identificar os mecanismos da influência do tecido adiposo no osso. Portanto, foi fundamental a realização deste estudo experimental para elucidar o papel do tecido adiposo como possível mediador da estrutura e da consolidação óssea.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os efeitos sistêmicos da dieta hiperlipídica, da maneira como usada no presente trabalho, nos permitem concluir que a dieta hiperlipídica causou redução do consumo de ração como adaptação para o equilíbrio energético. E embora não tenha levado a uma maior massa corporal causou aumento da sensibilidade à insulina. A dieta hiperlipídica afetou o osso de forma a proporcionar rápido crescimento ósseo longitudinal, no entanto não afetou a DMO e a microestrutura proximal das tíbias. Também foi possível observar que a dieta hiperlipídica causou prejuízo na resistência mecânica das tíbias e uma redução da formação óssea no local do defeito. A cirurgia afetou negativamente a resistência mecânica, o que permite inferir que a 14 dias de reparo o osso ainda não reestabeleceu sua integridade biomecânica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AERSSSENS, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 663–670, 1998.

ALABDULKARIM, B.; BAKEET, Z. A. N.; ARZOO, S. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. **Journal of King Saud University - Science**, v. 24, n. 4, p. 319–329, 2012.

ALBERTIN, L. M. Efeito do ultra-som sobre o reparo de falha óssea experimental: avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2004.

ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; WARREN, S. M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 3, p. 275–283, 2008.

ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea : uma revisão da literatura. **Revista Implantinews**, v. 4, n. 6, p. 659–662, 2007.

AUBIN, J. E. Bone stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 30–31, p. 73–82, 1998.

AZAD, V. et al. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 23, n. 4, p. 267–276, 2009.

BARNES, G. L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 11, p. 1805–1815, 1999.

BERESFORD, J. N. et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. **Journal of Cell Science**, v. 102, p. 341–51, 1992.

BILLON, N.; DANI, C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 1, p. 55–66, 2012.

BOSE, K.; BHADRA, M.; MUKHOPADHYAY, A. Causes and consequences of obesity. **Anthropology Today: Trends, Scope and Applications**, p. 223–240, 2007.

BROWN, M. L. et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity

in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–11, 2014.

CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. **Nutrition Research**, v. 36, n. 4, p. 320–327, 2016.

CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R.; GAO, H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1097–1104, 2009.

CORWIN, R. L. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 6, p. 379–386, 2003.

CRABTREE, N. J. et al. The relationship between lean body mass and bone mineral content in paediatric health and disease. **Bone**, v. 35, n. 4, p. 965–972, 2004.

DE LAET, C. et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 11, p. 1330–1338, 2005.

DESCHASEAUX, F.; PONTIKOGLOU, C.; SENSÉBÉ, L. Bone regeneration: The stem/progenitor cells point of view. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 103–115, 2010.

DINIZ, S. F. et al. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 373–379, 2008.

FAZZALARI, N. L. Bone fracture and bone fracture repair. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 6, p. 2003–2006, 2011.

FIORINO, P. et al. Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. **Life Sciences**, v. 160, p. 12–17, 2016.

FORLINO, A.; MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta. **Lancet**, v. 387, p. 1657–1651, 2016.

FORNARI, E. D. et al. Childhood obesity as a risk factor for lateral condyle fractures over supracondylar humerus fractures pediatrics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 471, n. 4, p. 1193–1198, 2013.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.

50, n. 2, p. 208–215, 2006.

GRECO, E. A.; LENZI, A.; MIGLIACCIO, S. The obesity of bone. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 273–286, 2015.

GUERINO, M. R. et al. Atividade física e osteotomia experimental em ratos: aspectos mecânicos, radiológicos e enzimáticos. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 1, n. 2, p. 59–64, 1995.

GUSTAFSON, B. et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193–200, 2015.

GUYTON; HALL. **Tratado de fisiologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2006.

HAMMER, A. The paradox of Wolff's theories. **Irish Journal of Medical Science**, v. 184, n. 1, p. 13–22, 2015.

HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47–54, 2014.

HISTING, T. et al. Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. **Injury**, v. 47, n. 7, p. 1435–1444, 2016.

HORNER, E. A. et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. **Tissue Engineering. Part B**, v. 16, n. 2, p. 263–71, 2010.

IONOVA-MARTIN, S. S. et al. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. **Bone**, v. 46, p. 217–225, 2010.

JACKMAN, M. R.; MACLEAN, P. S.; BESSESEN, D. H. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 4, p. 1097–1105, 2010.

JONES, E.; YANG, X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 562–568, 2011.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. Texto de apoio para disciplina de ortopedia. Faculdade de Medicina de Coimbra, 2012.

KAWAI, M.; DE PAULA, F. J. A.; ROSEN, C. J. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 4, p. 317–329, 2012.

KAYAL, R. A. et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during

fracture repair which is reversed by insulin treatment. **Bone**, v. 44, n. 2, p. 357–363, 2009.

KIN, C. F. W. et al. Experience of famine and bone health in post-menopausal women. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 1143–1150, 2007.

LANYON, L. E.; RUBIN, C. T. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. **Journal of Biomechanics**, v. 17, n. 12, p. 897–905, 1984.

LEI, H. et al. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

LEONARD, M. B. et al. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 514–523, 2004.

LIND, M.; BÜNGER, C. Factors stimulating bone formation. **European Spine Journal**, v. 10, n. suppl. 2, p. 102–109, 2001.

MACEDO, A. P. et al. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, p. 1–10, 2016.

MALVI, P. et al. High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 455, n. 1–2, p. 133–138, 2014.

MCKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 2, p. 150–162, 1978.

MORAIS, G. Q.; BURGOS, M. G. P. DE A. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. **Revista Brasileira de Ortopedia**, n. 81, p. 189–194, 2007.

MUELLER, E. Understanding the variegation of fat: Novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 3, p. 352–357, 2014.

NUTTALL, M. E. et al. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 3, p. 371–382, 1998.

NUTTALL, M. E.; GIMBLE, J. M. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? **Bone**, v. 27, n. 2, p. 177–184, 2000.

ODACI, E. et al. Rapid estimation of the vertebral body volume: A combination of the Cavalieri principle and computed tomography images. **European Journal of**

Radiology, v. 48, n. 3, p. 316–326, 2003.

OGASAWARA, A. et al. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 832–839, 2008.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PAIVA, A. G. et al. Analysis of fracture healing in osteopenic bone caused by disuse: experimental study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, p. 3–9, 2016.

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. **Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595–610, 1987.

PEEL, N. Bone remodelling and disorders of bone metabolism. **Surgery**, v. 27, n. 2, p. 70–74, 2009.

PEREIRA, L. O.; FRANSISCHI, R. P. DE; LANCHÁ JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.

PREMAOR, M. ORLANDIN et al. Obesity and fractures in postmenopausal women. **Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 2, p. 292–297, 2010.

RALSTON, S. Structure and metabolism of bone. **Calcium and Bone**, v. 33, n. 12, p. 58–60, 2005.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RIGGS, B.; KHOSIA, S.; MELTON, L. Sex steroids and the conservation of the adult skeleton. **Endocrinology Review**, v. 23, n. 3, p. 279–302, 2002.

ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nature Clinical Practice. Rheumatology**, v. 2, n. 1, p. 35–43, 2006.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 12, p. 885–96, 2006.

RUTKOWSKI, J. M.; STERN, J. H.; SCHERER, P. E. The cell biology of fat expansion. **Journal of Cell Biology**, v. 208, n. 5, p. 501–512, 2015.

SANTOS, R. D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o

consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 1–40, 2013.

SHAPSES, S. A.; RIEDT, C. S. Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns? **Journal of Nutrition**, p. 1453–1456, 2006.

SHARIR, A.; BARAK, M. M.; SHAHAR, R. Whole bone mechanics and mechanical testing. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 8–17, 2008.

SHEN, C. L. et al. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 32, n. 6, p. 448–457, 2012.

SPOSITO, A. C. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 2–19, 2007.

SUBRAMANI, V. OPN – revisited. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. ii, p. 10–13, 2015.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 81, p. 715–736, 2012.

TAYLO, E. D. et al. Orthopedic complications of overweight in children and adolescents. **Pediatrics**, v. 117, n. 6, p. 2167–2174, 2006.

THOMAS, T. The complex effects of leptin on bone metabolism through multiple pathways. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 295–300, 2004.

TURNER, C. H. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. **Bone**, v. 23, n. 5, p. 399–407, 1998.

VENDRELL, J. et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines : relationships in obesity. **Obesity Research**, v. 12, n. 6, p. 962–971, 2004.

WANG, Y. et al. High fat diet enriched with saturated, but not monounsaturated fatty acids adversely affects femur, and both diets increase calcium absorption in older female mice. **Nutrition Research**, v. 36, n. 7, p. 742–750, 2016.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Prevention and management of osteoporosis. **WHO Technical Report Series**, p. 1–192, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Obesity and Overweight**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/index1.html>. Acesso em: 29 jun. 2016.

WOO, D. G. et al. Relationship between nutrition factors and osteopenia: Effects of experimental diets on immature bone quality. **Journal of Biomechanics**, v.

42, n. 8, p. 1102–1107, 2009.

WRAIGHTE, P. J.; SCAMMELL, B. E. Principles of fracture healing. **Surgery**, v. 24, n. 6, p. 198–207, 2006.

ZHAO, L.-J. et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 1, p. 17–29, 2008.

ZHU, K. et al. Discordance between fat mass index and body mass index is associated with reduced bone mineral density in women but not in men: the Busselton Healthy Ageing Study. **Osteoporosis International**, p. 1–10, 2016.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 015/2015, sobre o projeto intitulado “Efeitos da dieta hiperlipídica na consolidação óssea observados em tíbias de ratas submetidas à osteotomia”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Antonio Carlos Shimano** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de outubro de 2015.

We certify that the protocol nº 015/2015, entitled “Effects of high fat diet in the bone consolidation observed in tibias of female rats submitted to osteotomy”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/26/2015.

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
 Presidente da CEUA FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)33315-3301

ANEXO B – Mudança de título do trabalho

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
LABORATÓRIO DE BIOENGENHARIA

Ribeirão Preto, 03 de outubro de 2016

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Marcelo Riberto
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Prezado Professor,

Como orientador da aluna *Jéssica Suzuki Yamanaka* gostaria de comunicar a troca do título da Dissertação de Mestrado de *"Efeitos da dieta hiperlipídica na consolidação óssea observados em tíbias de ratas submetidas à osteotomia"* para *"Efeitos da dieta hiperlipídica na estrutura e consolidação de tíbias de ratas em crescimento"*.

O título modificado melhor se adapta aos aspectos que envolvem os objetivos e a metodologia utilizada neste Projeto de Pesquisa.

Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano
Depto. de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICES A – Tabelas de resultados

Tabela A.1 – Resultados do comprimento, DMO, propriedades mecânicas e estruturais das tíbias em relação as variáveis estudadas, exibidas em média, desvio padrão e p valor

Propriedade	DH	DP	DHO	DPO	Bonferroni (p)		
					Cirurgia	Dieta	Cirurgia*Dieta
Comprimento (mm)	36,14 (±0,77)	35,65 (±0,79)	36,33 (±0,60)	35,69 (±0,79)	0,670	0,041	0,787
DMO proximal (g/cm ²)	0,124 (±0,013)	0,103 (±0,018)	0,125 (±0,021)	0,119 (±0,028)	0,282	0,075	0,360
DMO medial (g/cm ²)	0,128 (±0,015)	0,121 (±0,019)	0,120 (±0,011)	0,128 (±0,018)	0,857	0,958	0,191
Força máxima (N)	45,80 (±4,78)	56,23 (±6,19)	30,22 (±3,63)	38,65 (±9,90)	<0,001	<0,001	0,670
Rigidez relativa (N/mm)	63,26 (±13,47)	73,35 (±4,55)	54,61 (±6,66)	65,74 (±10,02)	0,020	0,003	0,875
Col.Ar/Tt.Ar (%)	42,38 (±9,04)	42,71 (±17,52)	25,35 (±3,88)	35,17 (±10,96)	0,029	0,336	0,368
B.Ar/TV.Ar (%)	22,94 (±5,18)	24,92 (±6,45)	17,76 (±5,47)	22,50 (±4,79)	0,142	0,192	0,585

Tabela A.2 – Propriedades do tecido ósseo neoformado, exibidas em média, desvio padrão e p valor

Propriedade	DHO	DPO	p
Col.Ar/Tt.Ar (%)	20,00 ($\pm$ 8,70)	23,00 ($\pm$ 6,00)	0,293
BV/TV (%)	92,81 ($\pm$ 3,08)	85,11 ($\pm$ 7,00)	0,054
Ar.OC/Tt.Ar (%)	0,49 ($\pm$ 0,45)	0,54 ($\pm$ 0,37)	0,496
Ar.OPN/Tt.Ar (%)	0,87 ($\pm$ 0,38)	0,81 ($\pm$ 0,46)	0,743