

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.**

WAGNER GARCEZ DE MELLO

**EFEITOS DA TIMECTOMIA NEONATAL SOBRE O
DIMORFISMO SEXUAL ESQUELÉTICO E
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LEPTINA EM
RATOS**

ARAÇATUBA-SP

2016

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia**

WAGNER GARCEZ DE MELLO

**EFEITOS DA TIMECTOMIA NEONATAL SOBRE O
DIMORFISMO SEXUAL ESQUELÉTICO E
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LEPTINA EM
RATOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Titular João Cesar Bedran de Castro FOA/UNESP

Co-orientador: Prof. Emérito José Antunes-Rodrigues FMRP/USP

ARAÇATUBA-SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M527e Mello, Wagner Garcez de.
Efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual
esquelético e concentrações plasmáticas de leptina em ratos /
Wagner Garcez de Mello. - Araçatuba, 2016
57 f. : il. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. João Cesar Bedran de Castro

Coorientador: Prof. José Antunes-Rodrigues

1. Timectomia 2. Timo 3. Leptina 4. Caracteres sexuais
I. Título.

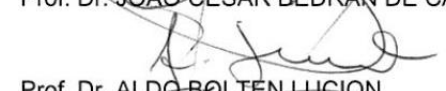
CDD 612

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE WAGNER GARCEZ DE MELLO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA.

Aos 21 dias do mês de março do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro do CAOE - Câmpus Rodovia, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOAO CESAR BEDRAN DE CASTRO - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Prof. Dr. ALDO BOLTEN LUCION do(a) Departamento de Fisiologia / Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Prof. Dr. ISMAEL FORTE FREITAS JUNIOR do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof.ª Dr.ª KEICO OKINO NONAKA do(a) Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- UFSCar, Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de WAGNER GARCEZ DE MELLO, intitulada **Efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético e concentração plasmática de leptina em ratos**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão



Prof. Dr. JOAO CESAR BEDRAN DE CASTRO



Prof. Dr. ALDO BOLTEN LUCION



Prof. Dr. ISMAEL FORTE FREITAS JUNIOR



Prof.ª Dr.ª KEICO OKINO-NONAKA



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Vinícius, Gabriel e Melina,
frutos do amor mais forte e verdadeiro, minha continuidade.

AGRADECIMENTOS

Percorrer o longo, demorado e, muitas vezes, sinuoso trajeto para a realização deste trabalho só foi possível com o apoio de muitas pessoas, de diferentes lugares. Por isso, serei sempre grato:

A Sociedade Brasileira de Fisiologia e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade concedida.

Ao meu orientador, Prof. Titular João Cesar Bedran de Castro, pelos sábios conselhos e ensinamentos e pela interminável tolerância digna de um pai, neste caso, meu pai na ciência. Gostaria de agradecer por ter acreditado em mim e pelas inúmeras vezes que me enxergou melhor do que sou. Esses anos de convivência me proporcionaram não apenas saberes científicos como também saberes da vida.

Ao meu co-orientador, Prof. Emérito José Antunes-Rodrigues que sempre nos estendeu a mão e proporcionou a oportunidade de trabalhar em um excelente laboratório sob a sua orientação. É uma honra poder conviver com alguém de tamanha grandeza. Seu modo humilde, educado, acolhedor e dedicado são exemplos que busco sempre seguir.

Ao Prof. Adj. Marcelo Macedo Crivelini, por ter nos acolhido em seu laboratório sem restrições, pela generosidade desse ato que sempre será lembrado com profunda gratidão. Agradeço pela oportunidade, confiança, paciência, exemplo profissional e, principalmente, pela amizade formada.

A Prof. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles pelo agradável convívio, por sua discreta e constante presença, sempre disposta a colaborar no que fosse preciso.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Patologia, Marcelo Tamarim, pelos valiosos ensinamentos, pelo entusiasmo contagiante e pela forma que consegue cativar e envolver as pessoas.

Ao amigo Samuel, companheiro nesta jornada desde o início. Quem sabe um dia estaremos mais uma vez na mesma bancada. Que todas as suas expectativas sejam traduzidas em conquistas profissionais e pessoais. Desejo que seja muito feliz.

As minhas companheiras de laboratório, Noéle, Gisele, Olívia e Narayana, minha eterna gratidão por toda a ajuda ofertada, sem vocês não teria realizado esse trabalho. Obrigado pela amizade, confiança e paciência. O trabalho foi sempre mais leve com a presença de vocês.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pelo convívio e aprendizado diário.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas: Gim e Mauro (em memória), e também, aos técnicos do Biotério Central da UNESP, Camilo, João e Alan, pelo apoio prestado em todos os momentos de precisão.

A Valéria, Cristiane e Lilian da seção de pós-graduação, pela ajuda e paciência em todas as etapas desse processo. Serei eternamente grato.

Ao Centro Universitário Toledo, pela confiança e oportunidade de iniciar minha carreira como docente e pelo apoio e compreensão incondicionais em todos os momentos que me ausentei por causa dos experimentos ou congressos.

Por fim e não menos importante...

Aos meus pais, avós e familiares que muito me ampararam no meu caminhar, fortaleceram minhas energias e deram suporte à minha determinação me fazendo entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Palavras não são suficientes para expressar a importância de cada um de vocês em minha vida.

A minha querida esposa, Ana Lúcia, pela força que nos une e faz do nosso amor o mais intenso e o maior. Obrigado por sua força, sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, por sua presença em minha vida.

A todos aqueles que, de diferentes formas me ajudaram neste percurso e que por limitações da memória, não tenham sido aqui referenciados...

Sinceramente, muito obrigado!

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

***“If I have seen further than others, it is by standing upon the
shoulders of giants.”***

Sir Isaac Newton (February 5, 1676)

de MELLO, W.G.. **Efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético e concentração plasmática de leptina em ratos**. 2016. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Ciências Básicas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia. Araçatuba – 2016.

Resumo

O presente trabalho avaliou os efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético e qualidade óssea, bem como, determinou se as alterações causadas por este modelo podem influenciar as secreções de leptina em animais pré-púberes, púberes e adultos-jovens. Para isso, Ratos Wistar, neonatos foram divididos em grupo controle e grupo timectomizado, de ambos os sexos, totalizando quatro grupos experimentais (n = 06-08 por grupo). Os animais foram timectomizados no terceiro dia pós-natal. Os grupos foram eutanasiados aos 20, 40 e 120 dias pós-natais, que correspondem, respectivamente, às fases pré-púbere, púbere e adultos-jovens. Foram coletados sangue e ambos os fêmures. Os fêmures esquerdos foram usados para determinação do comprimento, realizado com auxílio de um paquímetro. Avaliação das propriedades biofísicas do fêmur foram determinadas por meio do teste de densitometria óssea, e o comportamento biomecânico avaliado por meio do o ensaio mecânico de compressão da cabeça do fêmur. Os fêmures direitos foram usados para avaliação histométrica da base do colo femoral. As amostras sanguíneas foram utilizadas para determinar as concentrações plasmáticas de leptina. Em conjunto os dados do presente trabalho demonstram que em animais controle, as diferenças sexualmente dimórficas em relação ao desenvolvimento corporal e esquelético, bem como na secreção de leptina, existem durante o período pré-púbere, mas são consolidadas após a puberdade. Demonstram ainda, que a timectomia neonatal causa alterações sexo- e tempo-dependentes no desenvolvimento corporal, propriedades estruturais e biomecânicas do tecido ósseo, além de modular a secreção plasmática de leptina, sugerindo uma comunicação bidirecional entre o Timo e esse hormônio. Estes resultados fornecem uma nova visão sobre a complexidade dinâmica da homeostase da massa óssea e sugerem que a presença do Timo durante o período perinatal é importante para o desenvolvimento esquelético normal.

Palavras-chave: Dimorfismo sexual esquelético. Timo. Leptina.

de MELLO, W.G.. **Effects of neonatal thymectomy on skeletal sexual dimorphism and plasma leptin concentration in rats**. 2016. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Ciências Básicas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia. Araçatuba, 2016.

Abstract

This study evaluates the effects of neonatal thymectomy on skeletal sexual dimorphism and bone quality. In addition, we verified whether the changes caused by this model may influence the leptin secretion in prepubertal, puberty and adulthood. For this, Wistar, newborns were divided into control group and thymectomized group, of both sexes, totaling four experimental groups (n = 08 per group). The animals were thymectomized at the third postnatal day. The groups were euthanized at 20, 40 and 120 days' postnatal life, which correspond respectively to the prepuberty, puberty and adulthood periods. Blood and both femurs were collected. The left femurs were used to determine the length, conducted with the aid of a caliper. The biophysical properties of the femur were evaluated using dual-energy x-ray absorptiometry, and the biomechanical properties assessed by the mechanical compression of the femoral head. In the right femurs, the base of the femoral neck was used to quantitative histometric analysis. The blood samples were used to determine plasma concentrations of leptin. Taken together, the data of the present study demonstrates that control animals, sexually dimorphic differences in relation to body and skeletal development as well as the secretion of leptin, there during the prepubertal period but are consolidated after puberty. Demonstrate further that the neonatal thymectomy causes changes sex- and time-dependent on body development, structural and biomechanical properties of bone tissue, as well as plasma leptin secretion, suggesting a cross-talk between Thymus and this hormone. These findings provide new insight into the dynamic complexity of bone homeostasis and suggest that the presence of Thymus during the perinatal period is important for normal skeletal development.

Keywords: Skeletal sexual dimorphism. Thymus. Leptin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Timectomia neonatal.	21
Figura 2 -	Modelo de curva força-deslocamento.	25
Figura 3 -	Macroscopia do fêmur.	26
Figura 4 -	Corte histológico da base do colo femoral.	27
Figura 5 -	Desenvolvimento corporal e concentrações plasmáticas de Leptina.	33
Figura 6 -	Densitometria óssea.	36
Figura 7 -	Ensaio mecânico de compressão da cabeça do fêmur.	39
Figura 8 -	Histometria da base do colo femoral (adultos-jovens – 20 dias)	42
Figura 9 -	Histometria da base do colo femoral (adultos-jovens – 40 dias)	43
Figura 10 -	Histometria da base do colo femoral (adultos-jovens – 120 dias)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação dos machos – Massa úmida dos órgãos.	30
Tabela 2 -	Avaliação das fêmeas – Massa úmida dos órgãos.	31

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 JUSTIFICATIVA	17
2.0 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL:	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
3.0 MATERIAL E MÉTODO	20
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1.1 Timectomia neonatal	21
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA.....	21
3.3 PARÂMETROS AVALIADOS	22
3.3.1 Parâmetros biométricos gerais	22
Massa Corporal	22
Medidas do comprimento fêmur esquerdo.....	23
3.3.1.2 Parâmetros relacionados ao sexo	23
Determinação do início da puberdade em machos por meio da avaliação da separação prepucial completa.....	23
Massa úmida dos órgãos.....	23
Determinação do início da puberdade em fêmeas por meio da avaliação da abertura do canal vaginal	23
Regularidade do ciclo estral	23
Massa úmida dos órgãos.....	24
3.3.2 Parâmetros Biofísicos.....	24
Densidade mineral óssea areal	24
Ensaio Mecânico.....	24
3.3.3 Parâmetros histométricos.....	25
3.3.4 Dosagem de Leptina.....	27
4.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
4.0 RESULTADOS	29
Desenvolvimento corporal.....	29
Densitometria óssea.....	34
Ensaio mecânico.....	37
Análises histométricas da base do Colo Femoral.....	40
5.0 DISCUSSÃO	45

Em animais controle, as diferenças sexualmente dimórficas existem durante o período pré-púbere, mas são consolidadas apenas após a puberdade.....	45
A timectomia neonatal causa alterações sexo- e tempo-dependentes no desenvolvimento corporal, propriedades estruturais do tecido ósseo e concentração de leptina.....	47
6.0 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO A.....	56
ANEXO B.....	57

1.0 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a programação dos sistemas endócrinos em desenvolvimento evoluiu nas últimas décadas. Experimentos em diversas espécies de mamíferos indicam que as programações hormonais ocorrem durante janelas críticas de diferenciação nos períodos fetal e/ou perinatal.

O desenvolvimento durante o período pós-natal é resultado da integração entre mecanismos complexos (PATEL; SRINIVASAN, 2011) e sabe-se que diversas características fisiológicas não estão completamente desenvolvidas ao nascimento e continuarão seu processo de maturação durante as fases do desenvolvimento pós-natal e a vida adulta (PATEL; SRINIVASAN, 2011). A programação é um fenômeno epigenético em que o ambiente hormonal, estresse e o estado nutricional atuando durante os períodos críticos de diferenciação modificam o desenvolvimento do organismo (DE MOURA; PASSOS, 2008).

A manipulação neonatal tem sido utilizada com sucesso há anos no estudo da programação do controle central das funções homeostáticas. Esta abordagem evidenciou que o ambiente hormonal no início na vida determina características permanentes (efeitos organizacionais) sobre a arquitetura neural, programando as respostas fisiológicas e comportamentais (efeitos ativacionais) na vida adulta (MCCARTHY, 2004). Durante o período neonatal o eixo hipotalâmico-hipofisário estabelece circuitos básicos para a dinâmica de secreção hormonal e controle de diversos sistemas fisiológicos (BECU-VILLALOBOS et al., 1997; BERREBI et al., 1988; MCCORMICK et al., 1998).

Recentemente, demonstramos que modificações do ambiente androgênico, realizadas por meio da castração e androgenização neonatal em machos e fêmeas respectivamente, durante o período crítico de diferenciação sexual do cérebro, causam modificações organizacionais do eixo neuroendócrino. Estas alterações foram observadas na secreção de hormônios como, leptina, corticosterona, e ainda, no desenvolvimento do dimorfismo sexual esquelético, com alterações significativas da densidade mineral e biomecânica óssea em ambos os sexos (DE MELLO et al., 2012).

Diversos trabalhos confirmam o envolvimento do Timo com a atividade eixo hipotalâmo-hipofisário, bem como, em diversas glândulas como gônadas, adrenais, tireoide e paratireoide, participando ainda da programação da função neuroimunoendócrina do hipotálamo (ANDERSON et al., 1996; BESEDOVSKY; SORKIN, 1974; PIERPAOLI; BESEDOVSKY, 1975).

No Homem, o Timo é o primeiro órgão linfóide a se formar durante a gestação, ele deriva das 3ª e 4ª bolsas faríngeas. Este órgão é dedicado ao desenvolvimento de células T e contém células T imaturas, denominadas Timócitos, que estão embebidas em uma rede de células epiteliais, o estroma tímico. É sabido que o Timo é altamente ativo nos primeiros meses de vida humana (PARHAM, 2011). A atividade de maturação de linfócitos T no Timo é muito intensa durante a gestação. A partir do primeiro ano de vida esta atividade sofre uma redução de aproximadamente 3% ao ano até os 40 anos de idade. Esse processo, que continua por toda a vida, é denominado involução tímica e na fase adulta ele apresenta apenas atividade residual (ARKACHAISRI; BALLOW, 1999; DOMÍNGUEZ-GERPE; REY-MÉNDEZ, 2003; PARHAM, 2011). A redução da produção de novas células T pelo Timo, que ocorre com o avançar da idade, não prejudica a imunidade de células T no adulto (PARHAM, 2011). Essas observações sugerem que a função do Timo no organismo pode variar de acordo com a fase da vida, especialmente quando avaliamos a fase gestacional e perinatal.

Segundo Nishizuka e Sakakura (1969), o período no qual a timectomia afeta a função neuroendócrina em roedores ocorre paralelamente ao momento da diferenciação sexual hormônio-dependente do cérebro (GORSKI, 1985; MCEWEN, 1980). As experiências iniciais de Besedovsky e Sorkin, (1974) demonstraram que, em fêmeas, a timectomia neonatal promove atrofia ovariana. Além disso, foi demonstrado que a produção de esteroides sexuais é potencializada *in vivo* e *in vitro* pela timulina, um hormônio tímico. Além da ação sobre os órgãos sexuais, a timectomia ao nascimento promoveu diminuição no número de células acidófilas da adenohipófise (RUITENBERG; BERKVENS, 1977).

Reforçando o conceito de bidirecionalidade do eixo neuroimunoendócrino, Dardenne, (2000), demonstraram os efeitos dos hormônios adrenais e gonadais sobre a secreção de timulina em ambos os sexos, onde a ablação de uma das glândulas (adrenalectomia ou gonadectomia) determinou queda transitória de aproximadamente

um mês nas concentrações plasmáticas de timulina com posterior retorno à normalidade. Entretanto, a extração de ambas as glândulas resultou em decréscimo em longo prazo da concentração plasmática da timulina, persistindo por até três meses após a cirurgia, sendo seguido por recuperação gradual da normalidade em seis meses após a cirurgia. A leptina, um hormônio secretado por adipócitos, também exerce função importante na manutenção da massa tímica. Howard et al., (1999) demonstraram que em camundongos com restrição alimentar severa (48-h de jejum) a massa relativa do Timo diminuiu até 60%, efeito este que é completamente suprimido pelo tratamento com leptina. Os resultados sugerem que mecanismos diretos e/ou indiretos modulam essa resposta. As ações diretas da leptina, sejam agudas ou crônicas, na inibição da apoptose no Timo, evidenciam a leptina como um dos fatores de controle da função imune (PALMER et al., 2006; RITTER; PALMER, 1999).

Os estudos sobre as funções do Timo apresentam uma vasta bibliografia, que se prendem quase exclusivamente às observações relacionadas com suas atividades imunológicas, hormonais e algumas interações com diversas glândulas endócrinas, sem avaliar, entretanto, a influência desse órgão sobre o desenvolvimento esquelético normal. Com base em evidências radiográficas e análises morfológicas, Berek et al. (1968) evidenciaram um padrão anormal de crescimento e ossificação da placa de crescimento de ratos timectomizados na fase neonatal, sugerindo o envolvimento do Timo na formação e remodelação do esqueleto, entretanto, a capacidade do Timo de influenciar, direta ou indiretamente, o desenvolvimento esquelético, a qualidade óssea e a secreção de leptina permanecem pouco esclarecidos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A timectomia neonatal é necessária em diversos procedimentos cirúrgicos. De acordo com a The Children's Heart Foundation, a cada 100 nascimentos, uma criança nasce com algum defeito cardíaco congênito. Alguns destes defeitos podem ser tratados com medicamentos até a idade adulta, entretanto, outros podem ser letais ainda na fase neonatal, tornando-se necessária uma cirurgia invasiva para correção do defeito. Devido a sua localização, o Timo dificulta o acesso cirúrgico ao coração e suas estruturas associadas, pois está logo à frente do coração e de grandes vasos.

Exigindo então, a timectomia, parcial ou total, para a exposição do campo cirúrgico (AFIFI et al., 2010; BREARLEY et al., 1987). Após a cirurgia, não é feito o replante do órgão para evitar a fibrose pós-cirúrgica, o que dificultaria o acesso em caso de necessidade de nova cirurgia. A miastenia grave é outro exemplo de doença em que a timectomia é bastante utilizada. A prevalência da miastenia grave é mostrada na literatura com diferentes taxas que variam de 0,5 a 4,2:100.000 habitantes. O tratamento cirúrgico, com a retirada do Timo, segundo a literatura mundial, obtém melhora ou cura definitiva da miastenia em 80 a 94% dos casos, desde que seja realizada o mais breve possível na fase pós-natal (CUNHA; SCOLA; WERNECK, 1999).

Assim, considerando a inter-relação do sistema imunológico com o eixo neuroendócrino e sua possível modulação sobre o metabolismo osteomineral em condições normais e patológicas, o conhecimento dos mecanismos básicos de como o Timo, durante o período neonatal, pode influenciar o desenvolvimento esquelético e a secreção de hormônios importantes para manutenção da homeostase osteomineral representará avanços nos conhecimentos básicos da fisiologia óssea.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético e qualidade óssea, bem como, determinar se as alterações causadas por este modelo podem influenciar a secreção de leptina em animais pré-púberes, púberes e adultos-jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar o desenvolvimento corporal avaliado por meio da determinação da massa corporal, massa de órgãos e medida de comprimento do fêmur direito.
- b) Determinar se a timectomia neonatal causa alterações biofísicas e estruturais da estrutura óssea por meio das análises de densitometria óssea, ensaio mecânico de compressão da cabeça do fêmur e histometria da base do colo femoral.
- c) Avaliar se a timectomia neonatal altera a concentração plasmática de leptina.

3.0 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo **Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESP-Araçatuba – CEUA: protocolo 2012-01081** (ANEXO A).

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) de ambos os sexos, provenientes do biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA-UNESP. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz 12h/12h com início da fase escura às 18 horas e ração comercial e água *ad libitum*.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As ratas prenhes tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento (até 24 horas) as ninhadas foram separadas, do total de descendentes, foram mantidos 8 filhotes por rata, com o objetivo de evitar que o tamanho da ninhada interferisse no desenvolvimento dos mesmos. Na ninhada foram mantidos animais de ambos os sexos (ao menos 2:6), de forma que não houvesse alterações no cuidado da mãe com a prole.

Com exceção aos grupos controle, no terceiro dia pós-natal, os animais foram timectomizados (figura 1).

O desmame ocorreu aos 20 dias de vida pós-natal. Para se evitar o “efeito ninhada”, os animais foram separados randomicamente, por sexo e tratamento e transferidos para gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por gaiola) até sua utilização nos experimentos.

Foram formados quatro grupos experimentais (n=6-8/grupo):

- 1) Machos controle;
- 2) Machos timectomizados;
- 3) Fêmeas controle;
- 4) Fêmeas timectomizadas.

Os grupos foram eutanasiados aos 20, 40 e 120 dias pós-natais, que correspondem, respectivamente, às fases pré-púbere, púbere e adultos-jovem.

3.1.1 Timectomia neonatal

Conforme o método descrito por Hard (1975); antes da remoção dos filhotes, a mãe foi sedada com tiopental sódico (30mg/kg p.c., I.P.), a fim de facilitar a reintegração dos filhotes após o procedimento cirúrgico, diminuindo assim, ocorrências de canibalismo. Como ilustrado na figura 1, os recém-nascidos foram submetidos à crioanestesia (15 minutos em freezer a -20°C). Usando tesoura íris reta, uma incisão mediana longitudinal de cerca de 1 cm foi feita sobre o manúbrio. O esterno foi dividido a partir do manúbrio com o nível do 2º espaço intercostal. A divisão torácica foi realizada até o acesso total aos dois lóbulos do Timo. A seguir, cada lobo do Timo foi aspirado suavemente por uma ponteira descartável (fabricada em polipropileno transparente atóxico, volume de 0 - 100µL) ligada a um aparelho de sucção. Após a remoção completa do Timo a incisão foi colada e a pele limpa de resíduos de sangue. Os animais foram colocados em estufa a 37°C até a recuperação total da coloração da pele e logo depois devolvidos as fêmeas.

Timectomia neonatal.

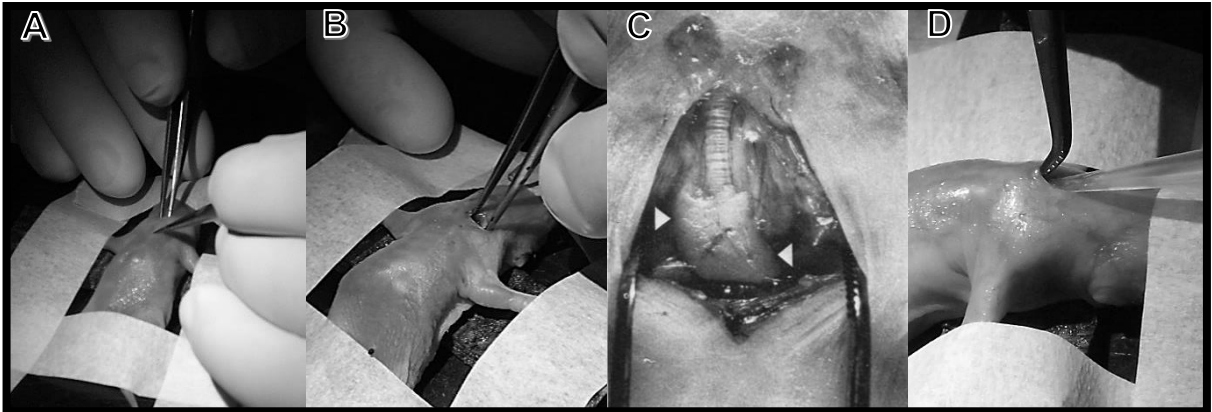


Figura 1: (A) e (B): rato neonato atado a placa de plástico com fita adesiva., a almofada que arqueia o pescoço e tórax permite melhor acesso ao Timo. (C): Incisão na face ventral da cavidade torácica que ilustra o acesso direto aos lobos do Timo (setas) e (D): Aspiração dos lobos tímicos. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA

Todos os experimentos foram realizados as 14h00min, para isso, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (80mg/kg de massa corporal) e cloridrato de xilazina (5mg/kg., I.P.). Após a anestesia, a cavidade torácica foi aberta por esternotomia mediana, foram coletados 3 a 4mL de sangue por punção cardíaca

e ao término da coleta, o animal foi morto por exsanguinação. Logo após a eutanásia, procedeu-se a toracotomia completa, para constatação da extirpação total do Timo. Como critério de inclusão do estudo, foram utilizados apenas animais que não apresentavam vestígios da glândula.

O sangue heparinizado foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 2°C em seguida o plasma foi separado e armazenado em alíquotas e conservados a -20°C até o momento das análises.

A laparotomia foi realizada para a retirada das glândulas suprarrenais, tecido adiposo visceral total e órgãos sexuais primários e glândulas anexas (machos: Testículos, Vesícula Seminal e Próstata; fêmeas: Útero e Ovários). Os tecidos foram pesados úmidos e descartados.

Os fêmures direitos foram desarticulados, dissecados e colocados em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos – Dinâmica), após 24 horas foram lavados em água corrente e colocados em solução de Plank-Rychlo (1952) por 15 dias para descalcificação. Após este período as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados transversais (ver seção 3.3.3) coletados a partir da área de interesse para posteriores análises, o estudo histológico compreenderá a realização da técnica para coloração de rotina laboratorial por Hematoxilina e Eosina.

Os fêmures esquerdos foram desarticulados, dissecados e armazenados em tubos criogênicos contendo solução fisiológica (NaCl 0.9%) e conservados a -20°C até o momento das análises.

3.3 PARÂMETROS AVALIADOS

3.3.1 Parâmetros biométricos gerais

Massa Corporal

A massa corporal foi determinada no momento da eutanásia com auxílio de Balança Eletrônica Digital c/ Bandeja (precisão de 1g).

Medidas do comprimento fêmur esquerdo

As medidas foram realizadas com ajuda de um paquímetro (precisão de 0,05mm) tomando como referência para o comprimento a distância entre a *pars cranialis* do *trochanter major* e o *condylus medialis*.

3.3.1.2 Parâmetros relacionados ao sexo

Determinação do início da puberdade em machos por meio da avaliação da separação prepucial completa

A separação prepucial foi investigada diariamente a partir do desmame, através da retração manual do prepúcio, até que a separação prepucial estivesse completa em todos os descendentes.

Massa úmida dos órgãos

Com auxílio de uma balança analítica (precisão de 0,0001g), foram determinadas as massas absolutas e relativas (massa absoluta do órgão x 100g/m.c.) dos testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, glândulas suprarrenais e tecido adiposo visceral total. Para órgãos pares (testículos, epidídimos e suprarrenais) foi utilizada a somatória entre os lados esquerdo e direito.

Determinação do início da puberdade em fêmeas por meio da avaliação da abertura do canal vaginal

Para cada grupo de tratamento, todas as descendentes fêmeas foram separadas randomicamente, no dia do desmame. A partir do 30º dia pós-natal, as descendentes foram examinadas diariamente para registro do dia da completa abertura do canal vaginal.

Regularidade do ciclo estral

A partir do dia da abertura completa do canal vaginal, foi realizado, diariamente, o esfregaço vaginal, para a observação, em microscopia ótica (aumento de 200x) segundo a técnica de LONG e EVANS (1922), dos tipos celulares do epitélio vaginal, para o registro da regularidade do ciclo estral, observando o tempo (dias) entre dois estros consecutivos durante quatro estros (três ciclos completos), em até no máximo 15 dias. Foram consideradas fêmeas regulares, aquelas que apresentaram 3 ou 4 estros durante os 15 dias de avaliação.

Massa úmida dos órgãos

Com auxílio de uma balança analítica (precisão de 0,0001g), foram determinadas as massas absolutas e relativas (massa absoluta do órgãox100g/m.c.) dos ovários, útero, glândulas suprarrenais e tecido adiposo visceral total. Para órgãos pares (ovários e suprarrenais) foi utilizada a somatória entre os lados esquerdo e direito.

3.3.2 Parâmetros Biofísicos

Aproximadamente doze horas antes do início dos processos de preparação para realização dos ensaios biofísicos, os fêmures esquerdos foram retirados da temperatura de -20°C e mantidos em geladeira e, duas horas antes, foram mantidos em temperatura ambiente.

Densidade mineral óssea areal

A massa óssea foi analisada pelo método de densitometria mineral óssea areal (BIERING-SORENSEN; BOHR; SCHAADT, 1988; DEMIREL et al., 1998), obtida por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA), modelo Lunar DPX Alpha (Madison – USA), com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP. Foram determinados o conteúdo mineral ósseo (g) - CMO, área (cm²) e densidade mineral óssea areal (g/cm²) – DMO areal, medidos em todo o fêmur dos animais.

Ensaio Mecânico

Após a realização do DEXA, os fêmures esquerdos foram submetidos ao ensaio mecânico, utilizando máquina universal de ensaio, modelo EMIC® - DL 3000 (São José dos Pinhais – Brasil), pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp sob orientação do Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada. Para este teste, cada fêmur foi fixado em um aparato que mantinha o mesmo em posição perpendicular, o ponto de compressão foi a cabeça do fêmur e a célula de carga utilizada de 2000 N à velocidade de 5 mm/min foi aplicada até o momento de fratura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software

próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deformação para os diversos parâmetros demonstrados na Figura 2.

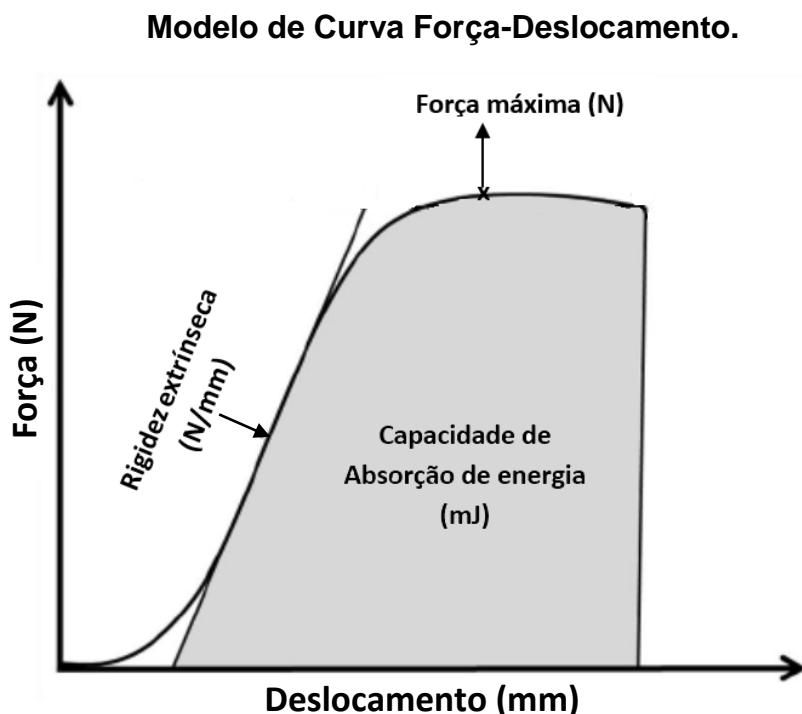


Figura 2: Modelo de curva força-deslocamento. Fonte: Elaborado pelo autor (modificado de TURNER e BURR, 1993).

Onde de acordo com Turner e Burr (1993):

- Força Máxima (N): Evidencia a maior força aplicada durante o ensaio, que não corresponde necessariamente ao momento da fratura do osso.
- Rigidez extrínseca (N/mm): Determinada através da inclinação da reta ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica.
- Capacidade de absorção de energia até a fratura (mJ): Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de ruptura óssea, obtida por meio de integração numérica.

3.3.3 Parâmetros histométricos

Todos os procedimentos, nomenclaturas, símbolos e unidades utilizadas seguem a padronização da American Society for Bone and Mineral Research (DEMPSTER et al., 2013).

De acordo com técnica desenvolvida por Araújo e Crivelini (2015), os fêmures diretos, foram removidos, fixados, desmineralizados e seccionados transversalmente

na região de metáfise. A secção ocorreu exatamente 02 mm abaixo da linha imaginária que tange o limite inferior da cabeça do fêmur, preservando a região intertrocantérica e colo femoral. Para facilitar a secção, o fêmur foi posicionado sobre uma prancha-guia contendo linhas de orientação (Figura 3A). Na inclusão da peça em parafina, a face da secção foi posicionada como face de corte no micrótomo (Figura 3 B-C).

Para a microtomia, quatro níveis de corte foram estabelecidos, equidistantes em 1.000 μm entre si, nos níveis, os cortes histológicos foram obtidos com espessura de 03 μm . Por fim foram corados em H.E. e fotomicrografados em aumentos de X50, para proceder a Histometria utilizando-se o software de domínio público ImageJ 1.5b.

No presente trabalho foi avaliada apenas o terceiro nível, a região corresponde a base do colo femoral - BCF (Figura 4A-B), obtendo-se as seguintes mensurações: 1) toda a área do corte histológico (tecido ósseo), denominada ÁREA TOTAL (BCF-Ar.T, Figura 4C); 2) a ÁREA ÓSSEA, compreendendo apenas o tecido mineralizado (BCF-Ar.O, Figura 4D); 3) a ÁREA MEDULAR (BCF-Ar.Me), obtida por meio do cálculo $[(\text{BCF-Ar.T})-(\text{BCF-Ar.O})]$ e 4) a ÁREA CORTICAL (BCF-Ar.Ct, Figura 4E).

Macroscopia do fêmur

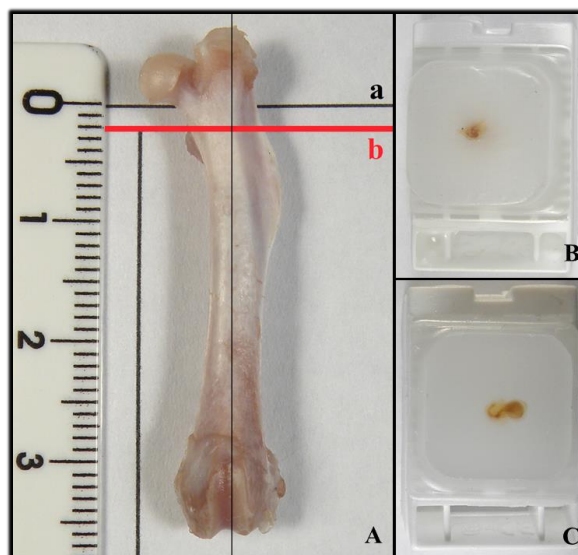


Figura 3: (A) secção transversal na linha vermelha “b”, situada 2 mm abaixo do plano tangencial ao limite inferior da cabeça do fêmur (linha preta “a”); (B) face de corte do fêmur voltado para a face de corte do bloco de parafina, correspondendo à base da região intertrocantérica (BRI); (C) corte aprofundado até a base do colo femoral. FOTO ILUSTRATIVA. Fonte: Araújo e Crivelini (2015)

Corte histológico da base do colo femoral.

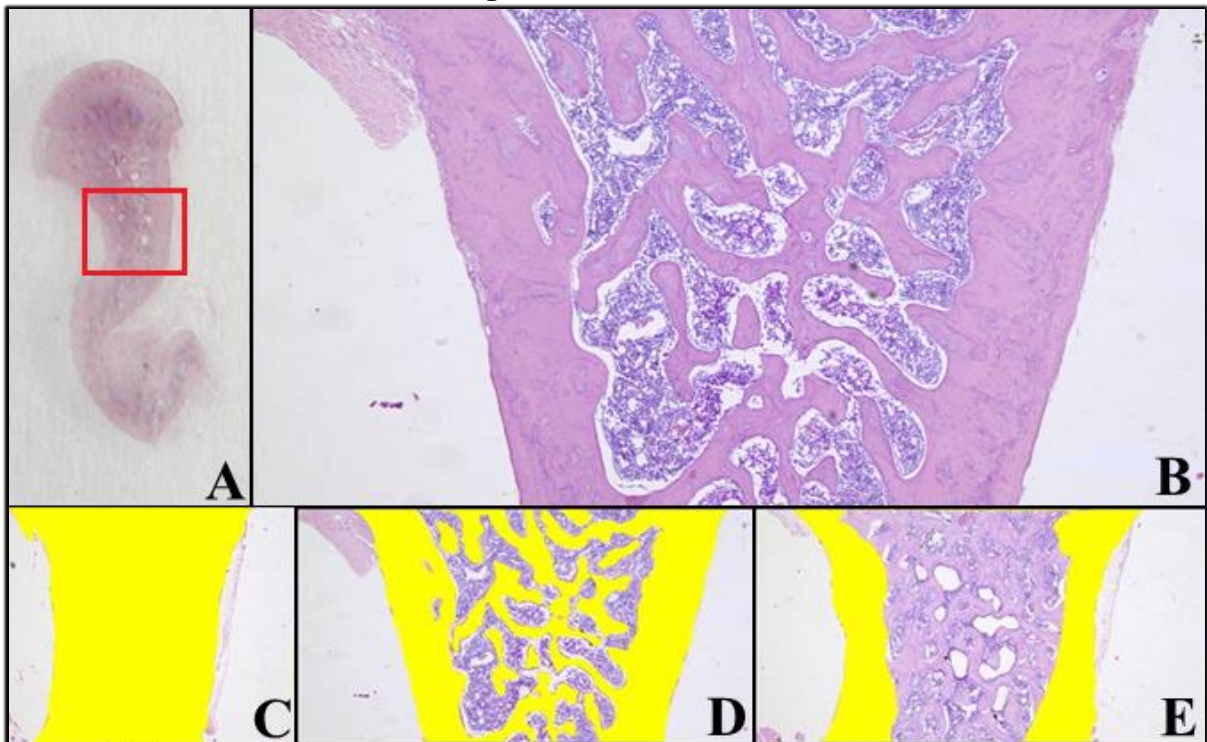


Figura 4: (A) fotografia panorâmica com destaque para a área de histometria; (B) área de histometria; (C) demarcação digital da área total (BCF-Ar.T); (D) demarcação digital da área óssea (BCF-Ar.O); (E) demarcação digital da área cortical (BCF-Ar.Ct); (B-H, HE X50). FOTO ILUSTRATIVA. Fonte: Araújo e Crivelini (2015)

As análises histométricas foram realizadas no Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob orientação do Prof. Adj. Marcelo Macedo Crivelini.

3.3.4 Dosagem de Leptina

Para a determinação das concentrações plasmáticas de Leptina, foi utilizado o ELISA Kit – Rat Leptin (Cat#EZRL-83K – EMD Millipore Corporation, Billerica, MA). Seguiu-se o protocolo conforme recomendado pelo fabricante (ANEXO B). As análises foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob orientação do Prof. Tit. José Antunes-Rodrigues.

4.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism (versão 6.0) e expressas em médias±EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (two-way ANOVA test) seguida pelo teste de Tukey. Utilizou-se o teste t-Student para amostras independentes a fim de comparar as médias entre os grupos do mesmo sexo. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas comparações.

4.0 RESULTADOS

Desenvolvimento corporal

Após o desmame, aos 20 dias pós-natais, todos animais foram acompanhados diariamente para determinação do início da puberdade. Machos controle e timectomizados apresentaram a separação prepucial completa em 40 ± 1 dias e fêmeas controle e timectomizadas apresentaram completa abertura do canal vaginal aos 33 ± 3 . Após a abertura completa do canal vaginal, o ciclo estral foi acompanhado e se mostrou regular em ambos os grupos. Conforme demonstrado na tabela 1, a massa úmida dos órgãos também foi avaliada nos diferentes períodos, nos machos, a massa das glândulas suprarrenais foi maior no grupo controle aos 20 dias ($p=0,0158$) e a próstata aos 40 dias ($p=0,0155$) quando comparados aos animais timectomizados. Os demais tecidos não apresentaram diferenças estatísticas significantes. A tabela 2 mostra os resultados para os grupos de fêmeas. Aos 120 dias, fêmeas timectomizadas apresentaram ovários com maior massa que seu respectivo grupo controle ($p=0,0410$), nas demais idades, não foram encontradas diferenças significantes nos tecidos avaliados.

Durante o período pré-púbere (figura 5, painel A), A massa corporal apresentou interação extremamente significativa entre os sexos e o tratamento ($F=51,13$. $DFn=1$ $DFd=29$, $p<0,0001$), onde fêmeas do grupo controle apresentaram maior massa corporal que os demais grupos avaliados e ambos os grupos timectomizados tiveram massa corporal maior que os machos do grupo controle. O comprimento dos fêmures (figura 5, painel B) também apresentou interação estatisticamente significativa ($F=12,79$. $DFn=1$ $DFd=25$ $p=0,0015$), demonstrando que tanto o sexo quanto o tratamento alteram o crescimento, já que tanto machos timectomizados, quanto fêmeas controle, apresentaram fêmures maiores que machos do grupo controle. A massa do tecido adiposo visceral total foi maior no grupo de fêmeas timectomizadas quando comparados aos demais grupos (figura 5, painel C), confirmando a interação positiva entre sexo e tratamento ($F=31,20$. $DFn=1$ $DFd=29$, $p<0,0001$). A secreção plasmática de Leptina (figura 5, painel D) apresentou interação extremamente significativa ($F=19,92$. $DFn=1$ $DFd=18$, $p=0,0003$), machos controle apresentaram concentrações maiores que machos timectomizados e, ao contrário, fêmeas

timectomizadas apresentando concentrações maiores do hormônio que fêmeas do grupo controle.

Ao analisarmos os parâmetros de desenvolvimento corporal nos grupos ao redor da puberdade (40 dias), a massa corporal (figura 5, painel A) não apresenta interação estatisticamente significativa ($F=0.98$. $DFn=1$ $DFd=33$, $p=0.3304$), entretanto, ao analisarmos as variáveis isoladamente, tanto o sexo ($F=54.41$. $DFn=1$ $DFd=33$, $p<0.0001$), quanto o tratamento ($F=71.31$. $DFn=1$ $DFd=33$, $p<0.0001$) alteram o desenvolvimento da massa corporal, já que machos controle tem massa corporal maior que os demais grupos e fêmeas timectomizadas são menores que seus controles e que machos timectomizados. A interação ($F=1.87$. $DFn=1$ $DFd=28$, $p=0.1819$) e o tratamento ($F=2.80$. $DFn=1$ $DFd=28$, $p=0.1053$) não foram significantes em relação ao comprimento dos fêmures (figura 5, painel B), mas o sexo influencia na resposta ($F=14.01$. $DFn=1$ $DFd=28$, $p=0.0008$), já que machos timectomizados tiveram os fêmures maiores que ambos os grupos de fêmeas. O sexo ($F=4.21$. $DFn=1$ $DFd=29$, $p=0.0494$) e o tratamento ($F=15.02$. $DFn=1$ $DFd=29$, $p=0.0006$) influenciam a quantidade de tecido adiposo visceral total, fêmeas controle apresentam maiores quantidades que ambos os grupos timectomizados (figura 5, painel C). A secreção plasmática de Leptina foi maior em machos controle quando comparados a ambos os grupos de animais timectomizados, porém sem diferenças com o grupo de fêmeas controle, demonstrando que somente o tratamento ($F=11.33$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0031$) afeta a secreção do hormônio nesse período (figura 5, painel D).

Na fase adulta (120 dias), ambos os grupos de machos tiveram massa corporal maiores que os grupos de fêmeas (figura 5, painel A), sugerindo que o sexo ($F=130.57$. $DFn=1$ $DFd=26$, $p<0.0001$) influencia o desenvolvimento da massa corporal, independentemente do tratamento ($F=0.31$. $DFn=1$ $DFd=26$, $p=0.5843$) e sem interação entre ambos ($F=2.73$. $DFn=1$ $DFd=26$, $p=0.1104$). O comprimento dos fêmures apresentou interação significativa entre tratamento e sexo ($F=8.99$. $DFn=1$ $DFd=29$, $p=0.0055$), já que os grupos de machos eram maiores que os grupos de fêmeas, e os machos timectomizados eram maiores que seus respectivos controles (figura 5, painel B). O sexo ($F=12.38$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0018$) e o tratamento ($F=4.48$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0454$) alteram o tecido adiposo visceral total, porém, sem interação estatística entre eles ($F=2.60$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.1203$), já que o grupo de fêmeas controle apresentou maior massa de tecido adiposo em comparação

a ambos os grupos de machos, porém sem diferenças com seu respectivo grupo timectomizados. A secreção de Leptina foi maior em machos controle em comparação a todos os demais grupos, demonstrando que o sexo ($F=7.92$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0107$) e o tratamento ($F=7.54$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0125$) influenciam a secreção desse hormônio.

Tabela 1 – Avaliação dos machos – Massa úmida dos órgãos.

Idade	Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
		Machos controle	Machos timectomizados	Valor de p
20 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,04628± 0,002	0,0363±0,002 ^a	p=0,0158
	Testículos (g/100g m.c.)	0,4553±0,012	0,4899±0,031	p>0,05
	Vesícula Seminal (g/100g m.c.)	0,0710±0,004	0,08293±0,005	p>0,05
	Próstata (g/100g m.c.)	0,04655±0,002	0,04919±0,004	p>0,05
40 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,03670±0,001	0,0338±0,002	p>0,05
	Testículos (g/100g m.c.)	1,018±0,025	1,037±0,103	p>0,05
	Vesícula Seminal (g/100g m.c.)	0,1120±0,007	0,08298±0,0121	p>0,05
	Próstata (g/100g m.c.)	0,08521±0,008 ^b	0,05417±0,007	p=0,0155
120 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,01726±0,001	0,02177±0,001	p>0,05
	Testículos (g/100g m.c.)	0,9068±0,020	0,8917±0,024	p>0,05
	Vesícula Seminal (g/100g m.c.)	0,4725±0,034	0,4528±0,025	p>0,05
	Próstata (g/100g m.c.)	0,1554±0,016	0,1619±0,012	p>0,05

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t-student (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos controle; ^b $p < 0.05$ VS. Machos timectomizados.

Tabela 2 – Avaliação das fêmeas – Massa úmida dos órgãos.

Idade	Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
		Fêmeas controle	Fêmeas timectomizadas	Valor de p
20 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,08182±0,046	0,05413±,005	p>0,05
	Útero (g/100g m.c.)	0,1537±0,006	0,1705±0,017	p>0,05
	Ovários (g/100g m.c.)	0,08126±0,005	0,08616±0,015	p>0,05
40 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,04399±0,001	0,04045±0,004	p>0,05
	Útero (g/100g m.c.)	0,2258±0,016	0,2379±0,041	p>0,05
	Ovários (g/100g m.c.)	0,06782±0,006	0,08077±0,004	p>0,05
120 dias	Glândulas suprarrenais (g/100g m.c.)	0,03195±0,001	0,03793±0,003	p>0,05
	Útero (g/100g m.c.)	0,2155±0,031	0,2758±0,031	p>0,05
	Ovários (g/100g m.c.)	0,05193±0,003	0,06348±0,003 ^c	p=0,0410

Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t-student (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ^cp<0.05 VS. Fêmeas controle e ^dp<0.05 VS. Fêmeas timectomizadas.

Desenvolvimento corporal e concentrações plasmáticas de leptina.

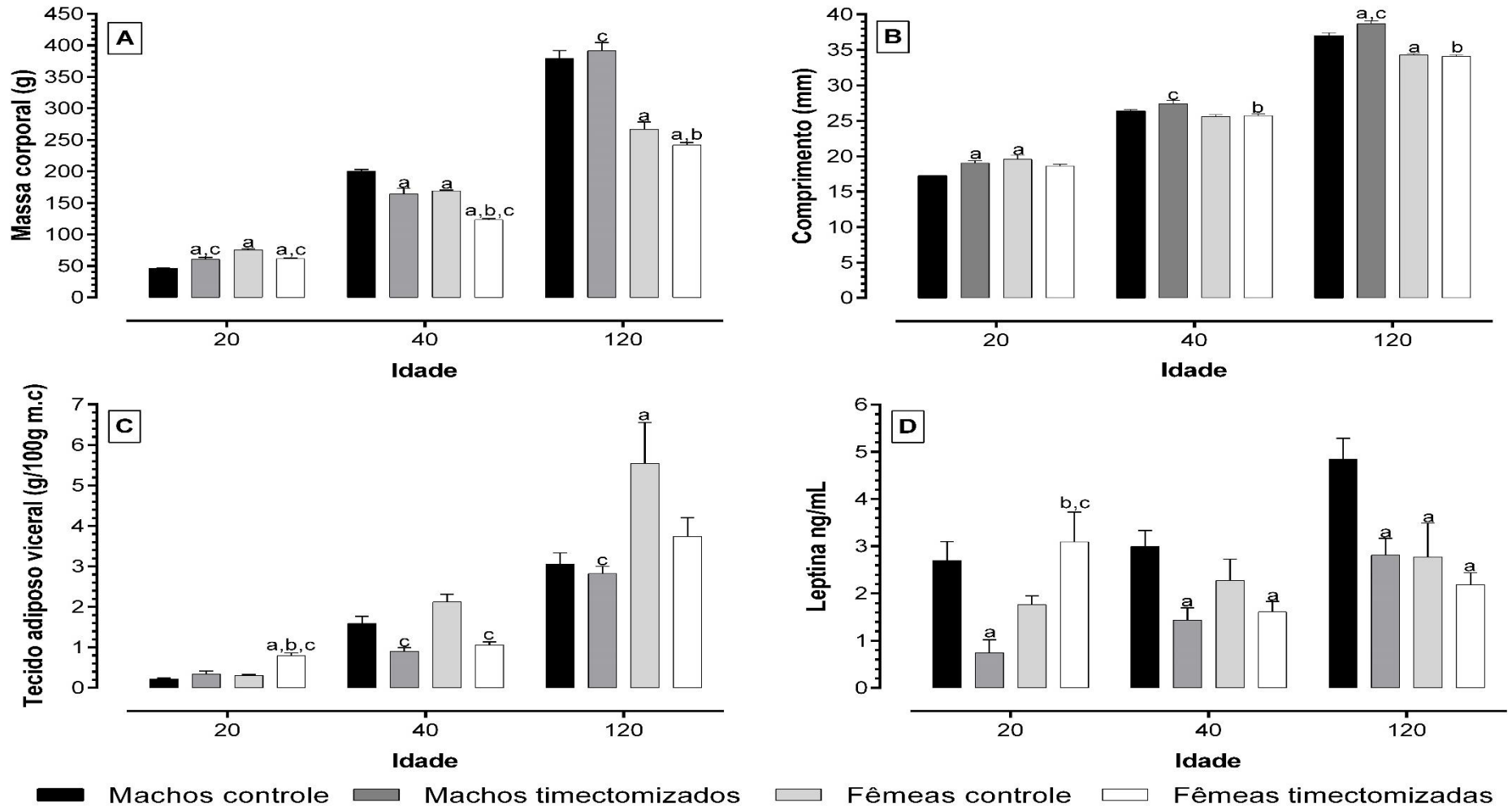


Figura 5: Painel A: Massa Corporal (g), Painel B: Comprimento (mm), Painel C: Tecido adiposo visceral total (g/100g m.c.) e Painel D: Concentração plasmática de Leptina (ng/dL). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos controle; ^b $p < 0.05$ VS. Machos timectomizados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle e ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas timectomizadas.

Densitometria óssea

A área total, conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea areal foram medidos no fêmur inteiro por dupla energia raio X absorptiometry (DEXA) (Lunar DPX alfa, WI, EUA); estas propriedades estão fortemente correlacionadas com o desempenho mecânico e risco de fratura óssea (MARSHALL, 1996; CUMMINGS, 2002).

Em animais pré-púberes, a figura 6 – painel A, demonstra que não foram encontradas diferenças estatísticas significantes em relação a área óssea total (Interação: $F=0.88$. $DFn=1$ $DFd=27$, $p=0.3557$; Tratamento: $F=0.85$. $DFn=1$ $DFd=27$, $p=0.3648$ e Sexo: $F=1.40$. $DFn=1$ $DFd=27$, $p=0.2475$). O conteúdo mineral ósseo (figura 6, painel D) apresentou interação positiva entre sexo e tratamento ($F=23.52$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p<0.0001$), já que machos timectomizados e fêmeas controle tiveram maior conteúdo mineral que o grupo de machos controle. A densidade mineral óssea areal (figura 6, painel G) também apresentou interação estatisticamente significativa ($F=8.51$. $DFn=1$ $DFd=26$, $p=0.0072$), pois fêmeas controle apresentaram densidade óssea maior que ambos os grupos de machos e fêmeas timectomizadas.

Ao avaliarmos o período ao redor da puberdade, tanto o sexo ($F=8.42$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0080$), quanto o tratamento ($F=10.03$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0043$) demonstraram influência sobre a área óssea total (figura 6, painel B), já que fêmeas timectomizadas apresentaram área total menor que seus respectivos controles e ambos os grupos de machos. Nesse período, apenas o tratamento ($F=11.59$. $DFn=1$ $DFd=19$, $p=0.0030$) influenciou a aquisição de conteúdo mineral ósseo (figura 6, painel E), pois fêmeas controle tiveram maior conteúdo mineral do o grupo de fêmeas timectomizadas e não foram encontradas diferenças entre os grupos de machos e entre os sexos ($F=0.03$. $DFn=1$ $DFd=19$, $p=0.8604$). A densidade mineral óssea areal (figura 6, painel H), foi maior em fêmeas controle apenas quando comparadas aos machos timectomizadas, mostrando um efeito positivo em relação ao sexo ($F=6.13$. $DFn=1$ $DFd=21$, $p=0.0219$), porém sem interação ($F=0.69$. $DFn=1$ $DFd=21$, $p=0.4147$) com o tratamento oferecido.

Aos 120 dias, a área óssea total (figura 6, painel C), apresentou interação estatisticamente significativa ($F=7.36$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0122$), ambos os grupos de machos tiveram área total maior que os grupos de fêmeas. O conteúdo mineral ósseo (figura 6, painel F) também foi maior nos grupos de machos quando comparados as fêmeas, análise estatística mostrou efeito significativo apenas em

relação ao sexo ($F=71.56$. $DFn=1$ $DFd=30$, $p<0.0001$) sem interação com o tratamento ($F=2.05$. $DFn=1$ $DFd=30$, $p=0.1626$). A densidade mineral óssea areal (figura 6, painel I), foi maior nos machos controle em relação a todos os demais grupos e, machos timectomizados, maiores que fêmeas timectomizadas, sugerindo que tanto o sexo ($F=50.57$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p<0.0001$), quanto o tratamento ($F= 15.93$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p=0.0006$) influenciam essa resposta na fase adulta, porém sem interação estatística entre eles ($F=0.00$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p=0.9911$).

Densitometria óssea

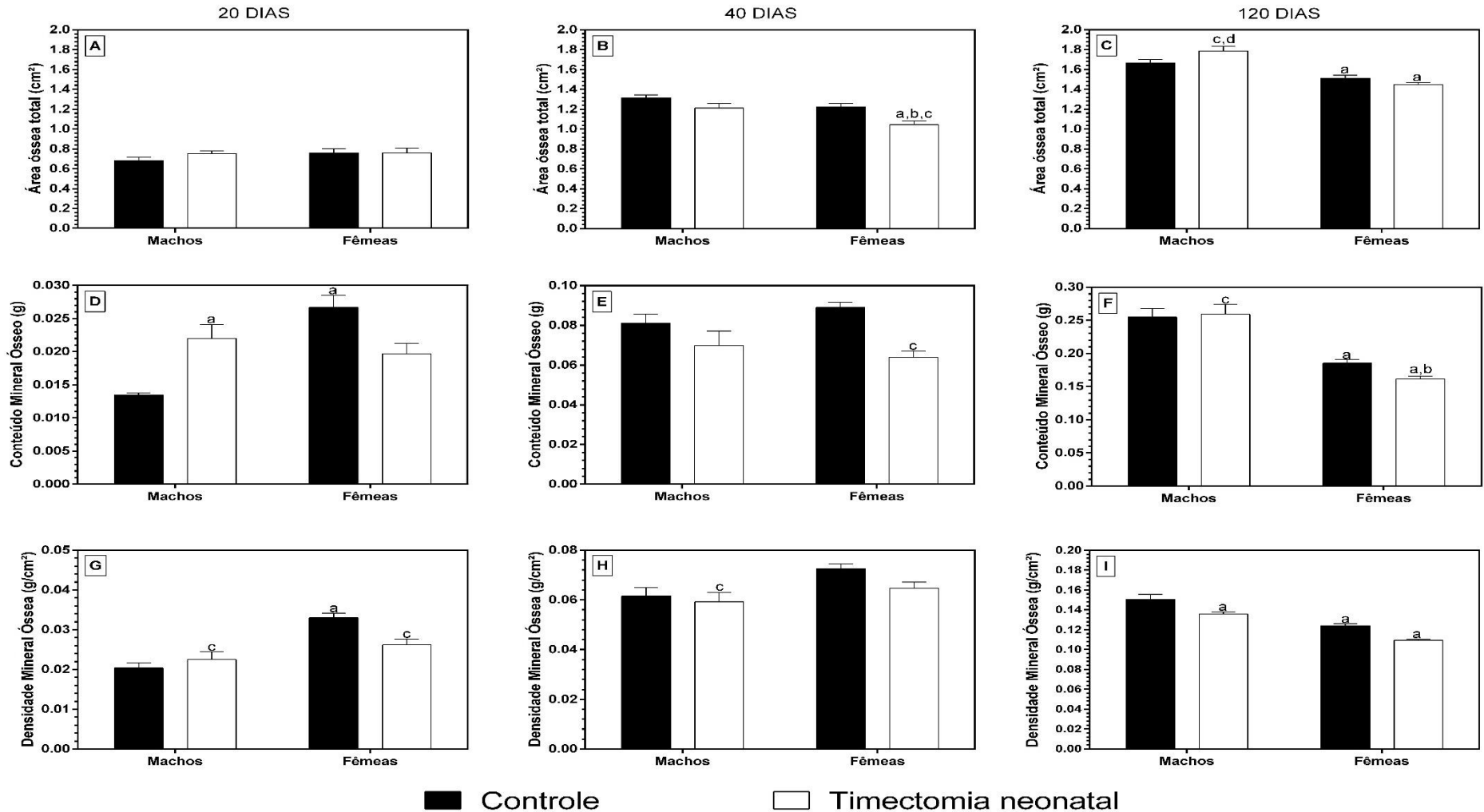


Figura 6. Densitometria Óssea – Painéis A-C (acima): Área Total (cm²), Painéis D-F: Conteúdo Mineral Ósseo (g), Painéis G-I (abaixo): Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ^ap<0.05 VS. Machos controle; ^bp<0.05 VS. Machos timectomizados; ^cp<0.05 VS. Fêmeas controle e ^dp<0.05 VS. Fêmeas timectomizadas

Ensaio mecânico

O desempenho biomecânico dos ossos foi avaliado por meio do ensaio mecânico de compressão da cabeça do fêmur. O teste mecânico reflete, em parte, a qualidade óssea., já que, a fratura clínica é um evento biomecânico. Sendo assim, qualquer alteração relevante da qualidade óssea deve mudar desempenho biomecânico desse tecido.

Durante o período pré-púbere, a timectomia neonatal aumentou a rigidez extrínseca do tecido ósseo de maneira significativa (figura 7, painel A), com interação positiva ($F=5.75$. $DFn=1$ $DFd=25$, $p=0.0243$) somente nos grupos de machos, não foram observadas alterações nos grupos de fêmeas. Já a capacidade de absorção de energia (figura 7, painel D) foi maior em ambos os grupos de fêmeas quando comparadas com os machos controle, mostrando a influência do sexo ($F= 5.75$. $DFn=1$ $DFd=25$, $p=0.0243$) nessa variável. A força máxima suportada durante o teste (figura 7, painel G) apresentou interação estatisticamente significativa entre tratamento e sexo ($F=7.58$. $DFn=1$ $DFd=25$, $p=0.0108$), pois machos timectomizados apresentaram valores maiores que seus respectivos controles e ambos os grupos de fêmeas tiveram fêmures mais resistente que os grupos de machos.

Ao redor da puberdade, o tratamento exerceu efeitos significativos ($F= 7.58$. $DFn=1$ $DFd=25$, $p=0.0108$) sobre a rigidez extrínseca (figura 7, painel B), fêmeas controle tiveram rigidez maior que ambos os grupos timectomizados, porém sem diferenças com machos do grupo controle. Já a capacidade de absorção de energia antes da fratura foi semelhante em todos os grupos analisados (figura 7, painel E), não foram observadas interações estatisticamente significantes entre sexo e tratamento ($F=0.24$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p=0.6283$). O tratamento influenciou a força máxima nesse período ($F=30.25$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p<0.0001$), pois, tanto machos quanto fêmeas controle, tiveram força máxima maior que ambos os grupos timectomizados (figura 7, painel H). Nos animais adultos-jovem, a rigidez extrínseca apresentou interação significativa entre sexo e tratamento ($F=17.46$. $DFn=1$ $DFd=26$, $p=0.0003$), fêmeas controle apresentaram resultados maiores que machos controle e fêmeas timectomizadas (figura 7, painel C). Conforme evidenciado pela figura 7 - painel F, a capacidade de absorção de energia foi maior em ambos os grupos de machos em relação ao grupo de fêmeas timectomizadas, e machos timectomizados tiveram ainda, valores maiores que fêmeas do grupo controle, evidenciando que o fator sexo interfere na variável estudada ($F=29.46$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p< 0.0001$), sem,

entretanto, interação positiva com o tratamento ($F=1.90$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.1838$). Os resultados foram estatisticamente significantes (figura 7, painel I), com interação entre tratamento e sexo ($F=7.54$. $DFn=1$ $DFd=25$, $p=0.0110$) para força máxima. Machos controle e fêmeas timectomizadas apresentaram resultados maiores que fêmeas do grupo controle.

Ensaio mecânico de compressão da cabeça do fêmur

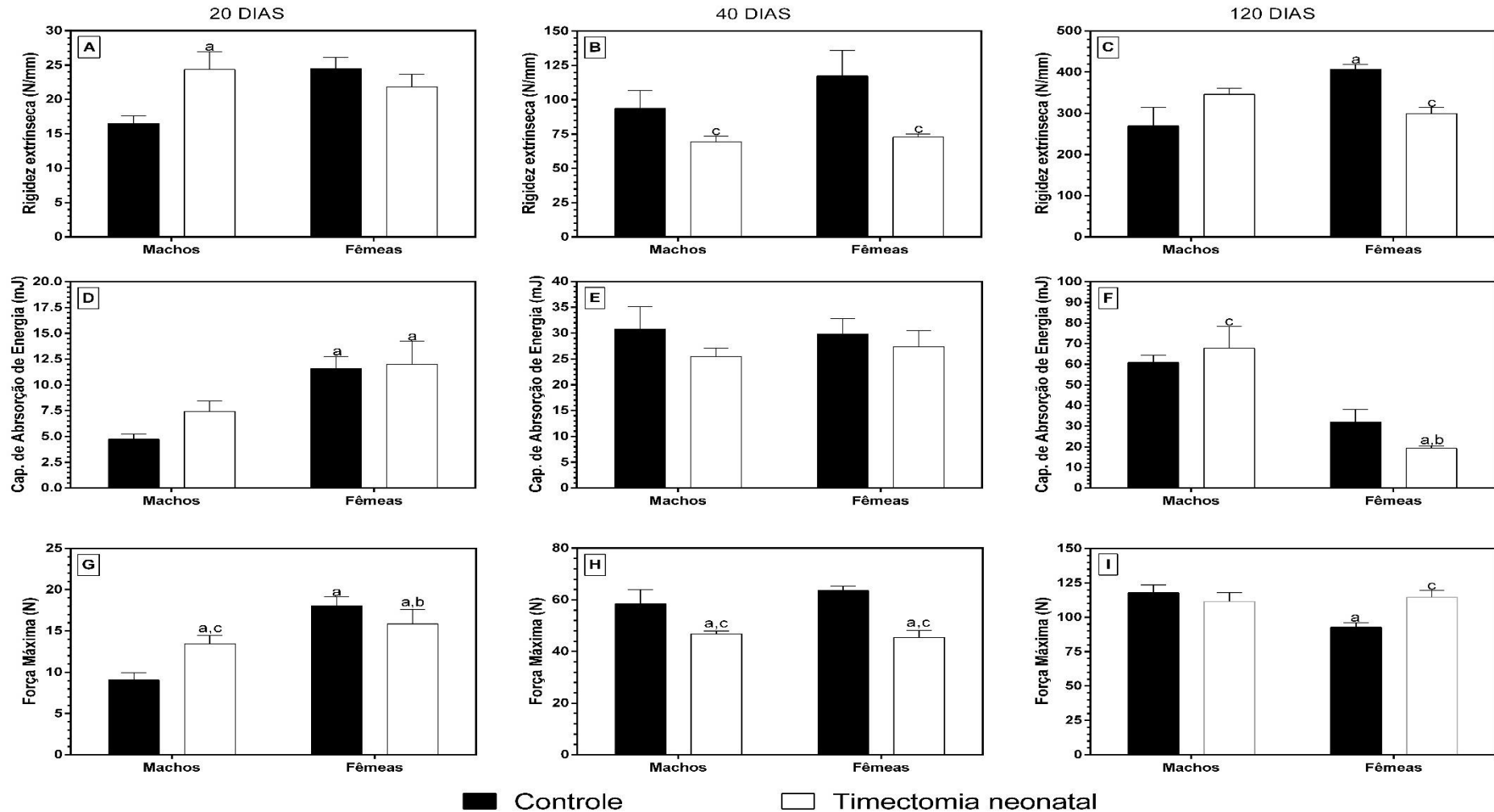


Figura 7. Ensaio Mecânico – Painéis A-C (acima): Rigidez (N/mm), Painéis D-F: Capacidade absorção de energia (mJ), Painéis G-I (abaixo): Painel A-C (acima): Força Máxima (N). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos controle; ^b $p < 0.05$ VS. Machos timectomizados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle e ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas timectomizadas.

Análises histométricas da base do Colo Femoral

Para esse trabalho, foram analisados cortes histológicos dos grupos de 120 dias. As análises histométricas da base do colo do fêmur evidenciaram alterações significativas na geometria óssea de animais adultos-jovem.

Ao analisarmos os animais de 20 dias, os resultados da área total (figura 8 – Painel A) não demonstram interação significativa ($F=3.40$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0782$), já a área óssea (figura 8 – Painel B) apresentou interação estatisticamente significativa entre sexo e tratamento ($F=4.90$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p=0.0375$). O tratamento alterou o desenvolvimento da região cortical (figura 8 – Painel C), machos timentomizados tiveram área da cortical maior que seus respectivos controles ($F=4.98$. $DFn=1$ $DFd=31$, $p=0.0331$), em fêmeas o tratamento não apresenta as mesmas respostas que em machos, já que não existem diferenças entre fêmeas controle e timentomizadas. A área da região medular não apresentou interação estatisticamente significativa ($F=2.87$. $DFn=1$ $DFd=22$, $p=0.1041$), conforme observado na figura 8, painel D.

Durante o período ao redor da puberdade, tanto a área total (figura 9 – Painel A; $F=30.58$. $DFn=1$ $DFd=19$, $p<0.0001$), quanto a área óssea (figura 9 – Painel B; $F=26.21$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p<0.0001$), apresentaram interação extremamente significativa entre tratamento e sexo, já que, ambos os grupos de fêmeas tiveram área maiores que os grupos de machos e machos timentomizados apresentaram áreas total e óssea maiores que machos do grupo controle. A área da região cortical não apresentou resultados estatisticamente significantes entre os grupos (figura 9 – Painel C; $F=0.65$. $DFn=1$ $DFd=34$, $p=0.4258$), mas a área do espaço medular foi maior em machos timentomizados quando comparados aos seus controles (figura 9 – Painel D, $F=11.96$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0020$).

Aos 120 dias, a área total analisada (figura 10 – Painel A) apresentou interação significativa entre o tratamento e sexo ($F=9.22$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0057$), machos do grupo controle tiveram área total maior que todos os demais grupos. A área óssea total (figura 10 – Painel B), que representa apenas a região mineralizada do tecido, também foi maior em machos controle quando comparados com os demais grupos, mostrando que tanto o tratamento ($F=3.99$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0572$), quanto o sexo ($F=4.41$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0464$), influenciaram na resposta, porém sem interação

significativa entre as variáveis ($F=1.74$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.1995$). A área da região cortical (figura 10 – Painel C), apresentou interação estatisticamente significativa ($F=8.51$. $DFn=1$ $DFd=24$, $p=0.0075$), onde machos controle tiveram área da cortical maior que fêmeas controle. A área do espaço medular foi influenciada apenas pelo sexo ($F=12.37$. $DFn=1$ $DFd=23$, $p=0.0018$), já que ambos os grupos de machos apresentaram áreas maiores que as fêmeas timectomizadas (figura 10 – Painel D).

Histometria da base do Colo Femoral (Adultos-jovem – 20 dias)

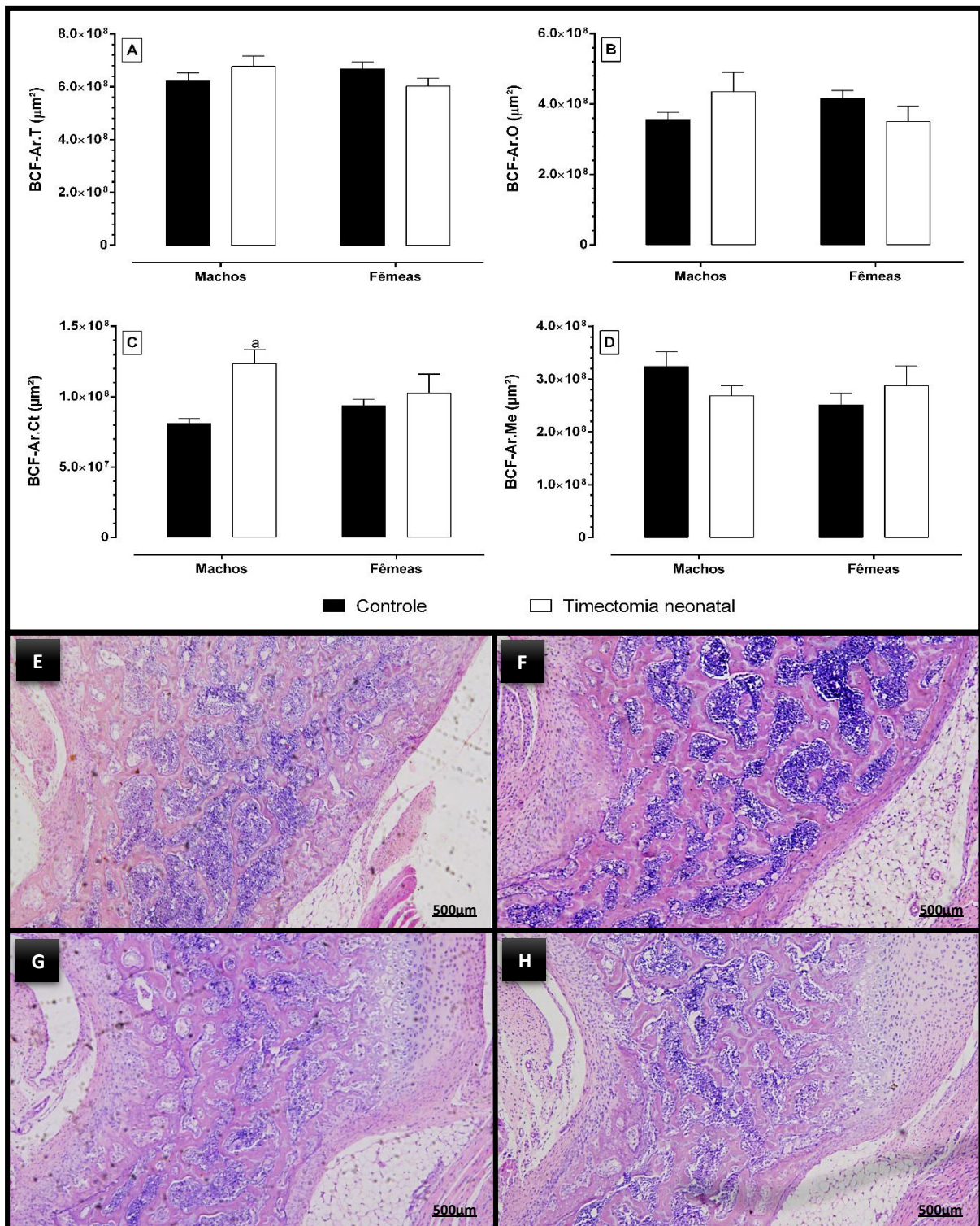


Figura 8. Fotomicrografia das análises histométricas da base do colo femoral (Adultos-jovem -20 dias) – Painel (A): BCF-Ar.T - Área total (μm^2), Painel (B): BCF-Ar.O - Área óssea (μm^2), Painel (C): BCF-Ar.Ct - Área cortical (μm^2) e Painel (D): BCF-Ar.Me - Área medular (μm^2), Painel (E): BCF - Machos controle, Painel (F): BCF - Machos timectomizados, Painel (G): BCF - Fêmeas controle, Painel (H): BCF - Fêmeas timectomizadas. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média \pm EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: ^a $p < 0.05$ VS. Machos controle; ^b $p < 0.05$ VS. Machos timectomizados; ^c $p < 0.05$ VS. Fêmeas controle e ^d $p < 0.05$ VS. Fêmeas timectomizadas. (HE X50).

Histometria da base do Colo Femoral (Adultos-jovem – 40 dias)

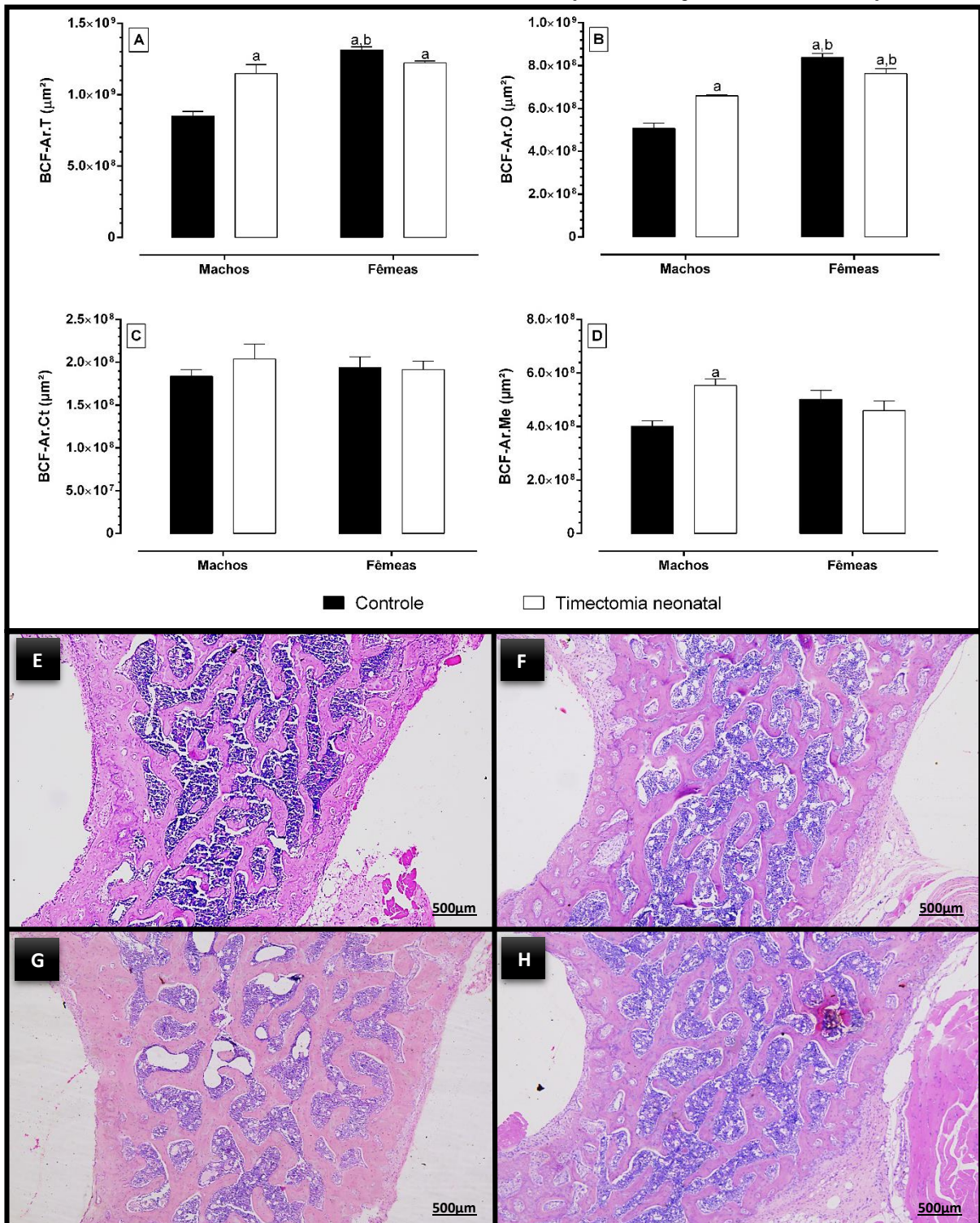


Figura 9. Fotomicrografia das análises histométricas da base do colo femoral (Adultos-jovem -120 dias) – Painel (A): BCF-Ar.T - Área total (µm²), Painel (B): BCF-Ar.O - Área óssea (µm²), Painel (C): BCF-Ar.Ct – Área cortical (µm²) e Painel (D): BCF-Ar.Me - Área medular (µm²), Painel (E): BCF – Machos controle, Painel (F): BCF – Machos timectomizados, Painel (G): BCF - Fêmeas controle, Painel (H): BCF – Fêmeas timectomizadas. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ^ap<0.05 VS. Machos controle; ^bp<0.05 VS. Machos timectomizados; ^cp<0.05 VS. Fêmeas controle e ^dp<0.05 VS. Fêmeas timectomizadas. (HE X50).

Histometria da base do Colo Femoral (Adultos-jovem – 120 dias)

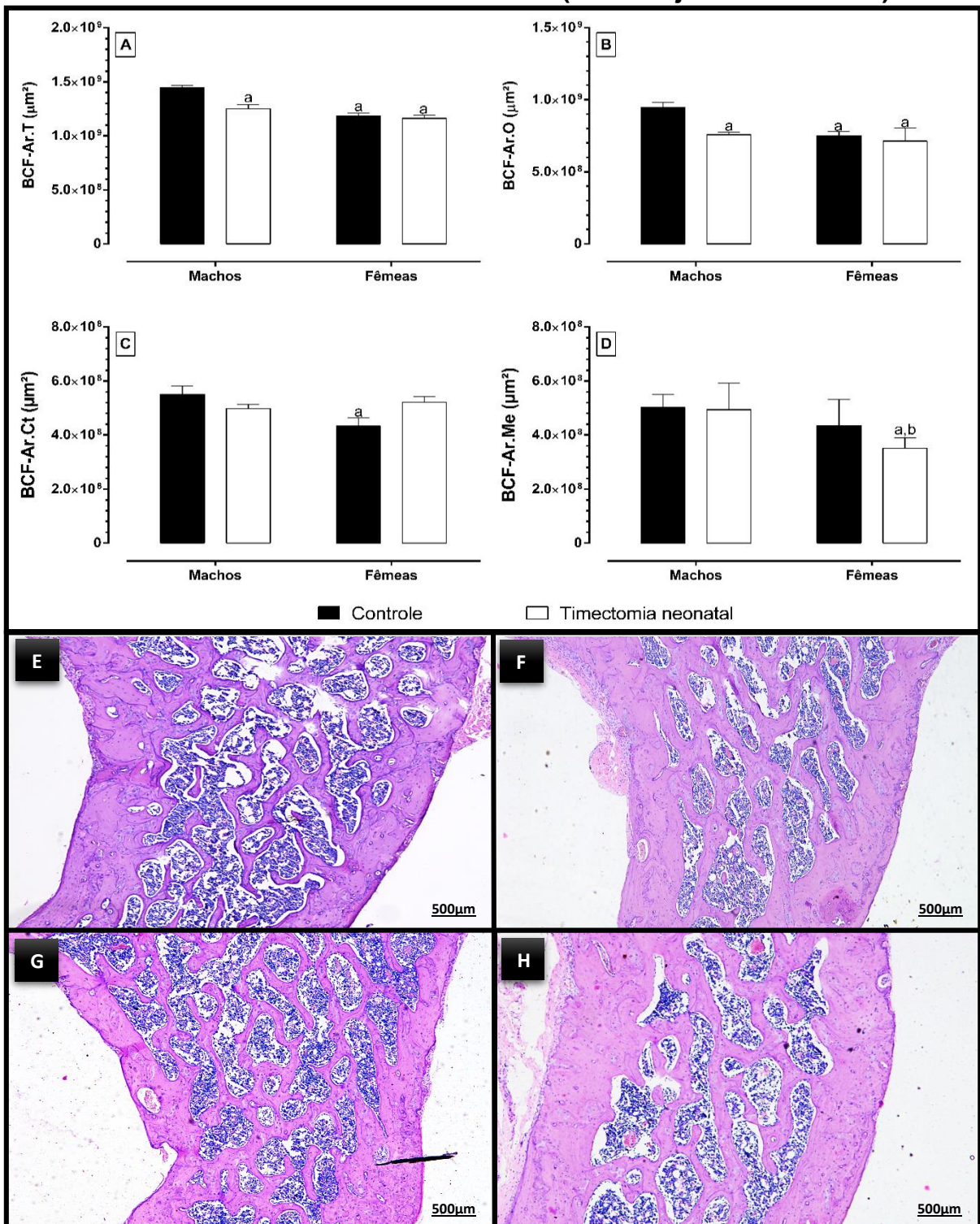


Figura 10. Fotomicrografia das análises histométricas da base do colo femoral (Adultos-jovem -120 dias) – Painel (A): BCF-Ar.T - Área total (µm²), Painel (B): BCF-Ar.O - Área óssea (µm²), Painel (C): BCF-Ar.Ct - Área cortical (µm²) e Painel (D): BCF-Ar.Me - Área medular (µm²), Painel (E): BCF - Machos controle, Painel (F): BCF - Machos timectomizados, Painel (G): BCF - Fêmeas controle, Painel (H): BCF - Fêmeas timectomizadas. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com comparação de Tukey, (n= 6-8 por grupo). Significância estatística adotada p< 0.05. Símbolos: ^ap<0.05 VS. Machos controle; ^bp<0.05 VS. Machos timectomizados; ^pp<0.05 VS. Fêmeas controle e ^pp<0.05 VS. Fêmeas timectomizadas. (HE X50).

5.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou os efeitos da timectomia neonatal sobre o desenvolvimento corporal, dimorfismo sexual esquelético e concentrações plasmáticas de leptina em ratos pré-púberes, púberes e adultos-jovens. Em 2001, o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências emitiu um relatório em que destacou a importância de explorar as diferenças sexuais na investigação biomédica e na prática médica. Segundo o relatório, fica difícil imaginar como a investigação biomédica pode ser precisa ignorando as diferenças entre os sexos (SIECK, 2015).

Em animais controle, as diferenças sexualmente dimórficas existem durante o período pré-púbere, mas são consolidadas apenas após a puberdade.

O dimorfismo sexual existe em pequeno grau no momento do nascimento, mas diferenças marcantes desenvolvem-se durante a puberdade. O desenvolvimento deste dimorfismo na composição corporal é amplamente regulado por fatores endócrinos, que atuam durante períodos críticos de diferenciação e organização de diversas funções fisiológicas (DE MELLO et al., 2012; KILL; BEDRAN DE CASTRO, 2015; WELLS, 2007).

Durante o período pré-púbere, a massa de tecido adiposo visceral e a concentração plasmática de leptina, foram semelhantes em ambos os sexos, porém, a massa corporal e o comprimento do fêmur foram maiores em fêmeas quando comparadas aos machos. Em humanos, o sexo tem efeito significativo sobre o acúmulo diferencial de gordura e músculo em crianças saudáveis, mesmo antes do início do desenvolvimento sexual. As meninas apresentam 28% e 32% mais gordura total e subcutânea no abdômen (ARFAI et al., 2002). Os fatores que influenciam dimorfismo sexual na pré-puberdade não são completamente conhecidos, porém o período pré-púbere apresenta um ambiente hormonal relativamente semelhante entre os sexos, com quiescência do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e atividade do eixo GH/IGF-1, sendo este o fator determinante no desenvolvimento corporal neste período (ROEMMICH et al., 2003; TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). Esses hormônios explicam algumas das variações nas medidas de composição corporal, distribuição de gordura e densidade óssea, o que sugere que outros fatores

são importantes preditores de dimorfismo sexual em pré-púberes (GARNETT et al., 2004).

As mudanças físicas que ocorrem durante a puberdade, incluindo o crescimento acelerado e as alterações na massa de gordura, músculo e massa óssea, são mediados, pelo menos em parte, por esteroides sexuais, GH/IGF-1 e leptina (DANNIES, 2001; SAGGESE; BERTELLONI, 2002). No presente trabalho, as fêmeas entraram na puberdade mais cedo (33 ± 3 dias), que os machos (40 ± 1 dias), nessa fase, o comprimento do fêmur, usado aqui como medida de crescimento dos animais, foi semelhante entre os grupos, entretanto, as fêmeas tiveram maior massa de tecido adiposo, enquanto que os machos apresentaram maior massas corporal e concentração plasmática de leptina. Já na fase adulta, as diferenças sexualmente dimórficas ficam bem estabelecidas, machos apresentaram maior massa corporal, comprimento do fêmur e concentração plasmática de leptina, apesar de fêmeas terem maior massa de tecido adiposo.

Esses resultados são corroborados por trabalhos prévios de nosso laboratório (DE MELLO et al., 2012; KILL; BEDRAN DE CASTRO, 2015) que evidenciaram alterações sexo- e tempo-dependentes no desenvolvimento corporal e esquelético. Durante a puberdade, o estrogênio circulante favorece o acúmulo de gordura, particularmente em tecido adiposo periférico, já a testosterona favorece o aumento da massa muscular e a redução do tecido adiposo (ROEMMICH et al., 2002; ROSENBAUM et al., 1999). Os achados em relação a concentração plasmática de leptina são apoiados por outros estudos em ratos, onde, apenas na fase adulta, a concentração de leptina é maior em machos do que em fêmeas, independentemente da massa de tecido adiposo (HORMONES et al., 1997; LANDT et al., 1998; ROSENBAUM et al., 2001).

O desenvolvimento esquelético, avaliado por meio de análises biofísicas e histométricas, também evidencia a influência do sexo e do tempo sobre o tecido ósseo. Aos 20 dias de idade, machos e fêmeas tinham área óssea total semelhantes, mas fêmeas tinham o conteúdo mineral ósseo e conseqüentemente a densidade mineral óssea areal maiores que os machos. A análise histométrica da base do colo femoral não evidenciou diferenças na microarquitetura óssea entre machos e fêmeas. O teste compressão da cabeça do fêmur demonstrou que nesse período, as fêmeas também tiveram a capacidade de absorção de energia e força máxima maiores que

os machos, sem, entretanto, alterações na rigidez extrínseca. As diferenças encontradas podem ser relacionadas a massa corporal maior em fêmeas, o que favorece a aquisição de material mineral independentemente das concentração plasmática de leptina (IWANIEC et al., 2009).

Confirmando resultados previamente publicados por nosso grupo (DE MELLO et al., 2012), durante a puberdade, as diferenças sexualmente dimórficas relacionadas as propriedades biofísicas dos fêmures, existentes durante a fase pré-púbere, desaparecem, machos e fêmeas não apresentam alterações estatisticamente significantes em nenhuma das variáveis testadas. Entretanto, a análise do colo femoral demonstrou área total e óssea superior em fêmeas, mas a área cortical e trabecular foram semelhantes entre os sexos.

Na fase adulta, o dimorfismo se confirma e machos apresentam área óssea total, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea areal maiores que fêmeas controle. Esse resultado é confirmado nas análises histométricas, pois, machos tiveram área total, área óssea e área da cortical maiores que fêmeas. O comportamento biomecânico dos fêmures também foi diferente entre os sexos, os machos apresentaram menor rigidez e maior capacidade de absorção de energia, determinando também aumento da força máxima suportada no teste. Estes resultados demonstram que a qualidade óssea aumenta significativamente com o desenvolvimento em ambos os sexos, entretanto, machos tem um esqueleto maior e mais resistente a fraturas em relação as fêmeas, e sugere ainda, que as diferenças encontradas na força óssea, seriam determinadas por uma geometria óssea diferenciada. Esse perfil biomecânico pode estar relacionado ainda, com a concentração maior de Leptina encontrada em machos, estudos sugerem que, atuando periféricamente, esse hormônio exerce efeitos anabólicos no tecido ósseo, estimulando a atividade osteoblástica e a mineralização (GORDELADZE; RESELAND, 2003; SOLOMON et al., 2014; TURNER et al., 2013).

A timectomia neonatal causa alterações sexo- e tempo-dependentes no desenvolvimento corporal, propriedades estruturais do tecido ósseo e concentração de leptina.

A influência do Timo no estabelecimento do dimorfismo sexual é evidenciada em animais timectomizados durante o período neonatal, sendo que, seus efeitos são

opostos em machos e fêmeas. No período pré-púbere, machos timectomizados apresentaram massa corporal, comprimento dos fêmures e área da região cortical, maiores que seus respectivos controles, os órgãos da reprodução não apresentaram alterações no desenvolvimento normal, mas as glândulas suprarrenais eram menores, a massa de tecido adiposo foi semelhante, embora a concentração plasmática de Leptina tenha sido significativamente menor em animais timectomizados. Já em fêmeas, a timectomia resultou em diminuição da massa corporal, sem alterações no comprimento do fêmur, massa dos órgãos da reprodução e glândulas suprarrenais, houve ainda, aumento do tecido adiposo visceral e da concentração plasmática de Leptina quando comparadas as fêmeas controle. Isso sugere uma modulação sexo-dependente do Timo no desenvolvimento corporal e secreção de Leptina durante esse período.

Contrariando os resultados demonstrados por Besedovsky e Sorkin (1974), em que fêmeas timectomizadas durante o período neonatal, apresentavam puberdade tardia, e, a implantação de um Timo restabelecia o início normal da puberdade nesses animais. Em nosso trabalho, o início da puberdade não foi influenciado pela ausência do Timo, já que não foram observadas alterações entre os grupos controle e timectomizados de ambos os sexos. Aos 40 dias, machos timectomizados apresentaram massa corporal menor que seus controles, a área óssea total, avaliada por meio de histometria da base do colo femoral foi maior em animais timectomizados, mas sem alterações no comprimento dos fêmures, na massa dos órgãos da reprodução, das suprarrenais e do tecido adiposo visceral, porém a concentração de Leptina manteve-se menor quando compara aos machos controle. Fêmeas timectomizadas, mantiveram massa corporal e massa de tecido adiposo visceral menores que o grupo controle, mas o crescimento do fêmur e concentração de Leptina foi semelhante em ambos os grupos. A massas dos órgãos da reprodução e das glândulas suprarrenais também foram semelhantes entre os grupos e o ciclo estral não apresentou alterações em ambos os grupos.

Em adultos-jovens, os efeitos da timectomia em relação ao desenvolvimento corporal desaparecem, e apenas as diferenças relacionadas ao sexo permanecem evidentes, ambos os grupos de machos apresentam massa corporal e comprimento dos fêmures, maiores que ambos os grupos de fêmeas. Porém, a concentração de Leptina em machos timectomizados é menor do que em machos controle, tendo

concentrações semelhantes a ambos os grupos de fêmeas, isso sugere que na fase adulta, o Timo influencia o padrão sexualmente dimórfico de secreção desse hormônio, apenas em machos, e que esse padrão não está relacionado diretamente à massa de tecido adiposo. É sabido que a Leptina modula o sistema imune e a atividade tímica (VELLOSO; SAVINO; MANSOUR, 2009), entretanto, a capacidade do sistema imunológico exercer algum controle na produção de leptina ainda não é clara na literatura. A imunodeficiência primária ou em hospedeiros infectados pelo HIV, causam atrofia severa do Timo (SAVINO et al., 1986), nesses casos, as concentrações plasmáticas de leptina são baixas, sugerindo uma comunicação bidirecional. Até onde temos conhecimento, nosso trabalho foi o primeiro a mostrar que o Timo modula a secreção de Leptina de maneira sexo- e tempo-dependente.

É oportuno que se ressalvem as dificuldades concernentes à comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com aqueles existentes na literatura, uma vez que não se encontrou, na bibliografia atual, nenhuma pesquisa relacionando os efeitos da timentomia neonatal com o desenvolvimento esquelético. Campbell Gunther; Lipscomb; Sharp, (1980) avaliou os efeitos da timentomia neonatal sobre o crescimento ósseo em ambos os sexos. Os animais foram avaliados aos 90 dias de idade, os resultados demonstram que o comprimento do fêmur foi significativamente reduzido em fêmeas timentomizadas e as placas proximal e distal de crescimento, foram uniformemente reduzidas em ratos timentomizados de ambos os sexos.

Em nosso trabalho, os resultados sugerem que o desenvolvimento esquelético é influenciado pelo Timo de maneira sexualmente dimórfica. Em animais pré-púberes, a área óssea total foi semelhante em todos os grupos, o conteúdo mineral ósseo foi maior em machos timentomizados quando comparados com seus controles, sem, entretanto, determinar alterações na densidade mineral óssea areal. A rigidez extrínseca e a força máxima suportada durante o teste mecânico foram maiores nos animais timentomizados. Nesse período, o processo de mineralização em fêmeas parece ser mais sensível a influência do Timo, já que fêmeas timentomizadas tiveram densidade mineral óssea menor que fêmeas controle. Porém essas alterações não refletiram no comportamento biomecânico do tecido, já que os grupos de fêmeas apresentaram resposta semelhantes de força máxima e capacidade de absorção de energia, resultados esses, maiores que ambos os grupos de machos, destacando a influência do sexo nas respostas biomecânicas durante a infância.

Ao redor da puberdade, o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea areal foram menores apenas em fêmeas timectomizadas quando comparadas aos seus respectivos controles, em machos, a timectomia neonatal não alterou essas variáveis em relação aos machos do grupo controle. A timectomia influenciou diretamente o comportamento biomecânico nesse período, já que não foram observadas diferenças entre os sexos, mas ambos os grupos timectomizados tiveram os valores de força máxima e rigidez reduzidos em comparação aos grupos controle.

Aos 120 dias, apenas o sexo influenciou as respostas relacionadas a área óssea total e conteúdo mineral ósseo, medidos pelo ensaio de densitometria, os grupos de machos tiveram valores maiores que os de fêmeas em ambas as variáveis. Estes resultados sugerem que o aumento de massa corporal apresenta um efeito positivo sobre a massa óssea do fêmur que é independente de sinalização da leptina (IWANIEC et al., 2009). Já a densidade mineral óssea foi menor em machos timectomizados em comparação ao grupo controle; em fêmeas, a timectomia não alterou as propriedades materiais do tecido ósseo. Apenas machos timectomizados apresentaram alterações histométricas na região do colo do fêmur, a área total e área óssea foram menores que seu respectivo grupo controle, porém essas alterações teciduais não influenciaram de maneira direta a resposta biomecânica do fêmur, pois ensaio de compressão evidenciou alterações na rigidez extrínseca e na força máxima apenas em fêmeas, onde a rigidez foi maior no grupo controle, enquanto a força máxima foi maior no grupo timectomizado.

Estes resultados confirmam que o período perinatal e neonatal é crítico para a plasticidade do desenvolvimento, durante o qual fatores endógenos e/ou exógenos podem alterar significativamente a programação normal do crescimento e secreções hormonais.

6.0 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados do presente trabalho evidenciam que em animais controle, as diferenças sexualmente dimórficas em relação ao desenvolvimento corporal e esquelético, bem como na secreção de leptina, existem durante o período pré-púbere, mas são consolidadas após a puberdade. Demonstram ainda, que a timectomia neonatal causa alterações sexo- e tempo-dependentes no desenvolvimento corporal, propriedades estruturais e biomecânicas do tecido ósseo, além de modular a secreção plasmática de leptina, sugerindo uma comunicação bidirecional entre o Timo e adipócitos que secretam esse hormônio.

Estes resultados fornecem uma nova visão sobre a complexidade dinâmica da homeostase da massa óssea, sugerindo que a presença do Timo durante o período perinatal é importante para o desenvolvimento esquelético normal e que um contribuinte fisiopatológico ao risco de doenças osteometabólicas poderia, em parte, encontrar-se na programação anormal de desenvolvimento de padrões de secreção hormonal durante os períodos neonatal e perinatal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, A. et al. Best evidence topic - Congenital For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences ? v. 11, p. 287–291, 2010.

ANDERSON, G. et al. Cellular interactions in thymocyte development. **Annual review of immunology**, v. 14, p. 73–99, jan. 1996.

ARFAI, K. et al. Bone, muscle, and fat: sex-related differences in prepubertal children. **Radiology**, v. 224, p. 338–344, 2002.

ARKACHAISRI, T.; BALLOW, M. DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY OF THE NEWBORN. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 253–279, maio 1999.

BECU-VILLALOBOS, D. et al. Brain Sexual Differentiation and Gonadotropins Secretion in the Rat. v. 17, n. 6, p. 699–715, 1997.

BERREBI, A. S. et al. Corpus callosum: region-specific effects of sex, early experience and age. **Brain research**, v. 438, n. 1-2, p. 216–24, 12 jan. 1988.

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E. Thymus involvement in female sexual maturation. **Nature**, v. 249, n. 5455, p. 356–358, 24 maio 1974.

BIERING-SORENSEN, F.; BOHR, H.; SCHAADT, O. Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. **Paraplegia**, v. 26, n. 5, p. 293–301, out. 1988.

BREARLEY, S. et al. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 70, p. 322–327, 1987.

CAMPBELL GUNTHER, C.; LIPSCOMB, H. L.; SHARP, J. G. Effects of thymectomy on bone growth in the rat. **Journal of anatomy**, v. 131, n. Pt 4, p. 693–704, 1 dez. 1980.

CUNHA, F. M. B.; SCOLA, R. H.; WERNECK, L. C. Miastenia grave: avaliação clínica de 153 pacientes. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 2B, p. 457–464, jun. 1999.

DANNIES, P. S. Leptin and puberty. Pituitary. 2001 Jan-Apr;4(1-2):79-86.

DARDENNE, M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology *. v. 21, n. 4, p. 412–443, 2000.

DE MELLO, W. G. et al. Effects of neonatal castration and androgenization on sexual dimorphism in bone, leptin and corticosterone secretion. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 893–900, 2012.

DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C. F. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Bioscience reports**, v. 25, n. 3-4, p. 251–69, jan. .

DEMIREL, G. et al. Osteoporosis after spinal cord injury. **Spinal cord**, v. 36, n. 12, p. 822–825, dez. 1998.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized Nomenclature , Symbols , and Units for Bone Histomorphometry : A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. v. 28, n. 1, p. 1–16, 2013.

DOMÍNGUEZ-GERPE, L.; REY-MÉNDEZ, M. Evolution of the thymus size in response to physiological and random events throughout life. **Microscopy Research and Technique**, v. 62, n. 6, p. 464–476, 15 dez. 2003.

GARNETT, S. P. et al. Relation between hormones and body composition, including bone, in prepubertal children. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 966–972, 2004.

GORDELADZE, J. O.; RESELAND, J. E. A Unified Model for the Action of Leptin on Bone Turnover. v. 712, n. September 2002, p. 706–712, 2003.

GORSKI, R. O. G. E. R. A. Sexual Differentiation of the Brain. v. 12, p. 1–23, [s.d.].

HARD, C. Thymectomy in the neonatal rat. p. 105–110, 1975.

HORMONES, P. et al. Serum Leptin Levels in Normal Children : Relationship to. p. 2849–2855, 1997.

HOWARD, J. K. et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 8, p. 1051–9, out. 1999.

IWANIEC, U. T. et al. Body mass influences cortical bone mass independent of leptin signaling. **Bone**, v. 44, n. 3, p. 404–412, 2009.

KIILL, Noélie Egídia Watanabe. Efeito da inibição dos receptores canabinóides CB₁ ou CB₂ durante o período neonatal sobre o dimorfismo sexual esquelético ao longo do desenvolvimento. 2015. 46 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/134199>>

LANDT, M. et al. Radioimmunoassay of rat leptin : sexual dimorphism reversed from humans. v. 570, p. 565–570, 1998.

MCCARTHY, M. M. Hormones and the developing brain. v. 34, p. 259–279, 2004.

MCCORMICK, C. M. et al. Neonatal sex hormones have “ organizational ” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. 1998.

MCEWEN, S. Gonadal Steroids and Brain Development '. p. 43–48, 1980.

NISHIZUKA, Y.; SAKAKURA, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 166, n. 3906, p. 753–5, 7 nov. 1969.

PALMER, G. et al. Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 5, p. 2899–907, 1 set. 2006.

PARHAM, P. O **Sistema Imune**. Disponível em: <http://www.amazon.co.uk/Sistema-Imune-Em-Portuguese-Brasil/dp/853632614X/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1453921514&sr=8-1&keywords=9788536326146>. Acesso em: 27 jan. 2016.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 58 Suppl 2, p. 18–28, 2011.

PIERPAOLI, W.; BESEDOVSKY, H. O. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. **Clinical and experimental immunology**, v. 20, n. 2, p. 323–38, maio 1975.

RITTER, M. A.; PALMER, D. B. The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. **Seminars in immunology**, v. 11, n. 1, p. 13–21, fev. 1999.

ROEMMICH, J. N. et al. Pubertal alterations in growth and body composition. VI. Pubertal insulin resistance: relation to adiposity, body fat distribution and hormone release. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 26, n. 5, p. 701–9, maio 2002.

ROEMMICH, J. N. et al. Relationship of Leptin to Bone Mineralization in Children and Adolescents. v. 88, n. 2, p. 599–604, 2003.

ROSENBAUM, M. et al. CLINICAL REVIEW 107 Role of Gonadal Steroids in the Sexual Dimorphisms in of Leptin **J Clin Endocrinol Metab**. 1999 Jun;84(6):1784-9.

ROSENBAUM, M. et al. Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 2001 Sep;25(9):1365-71.

RUITENBERG, E. J.; BERKVEN, J. M. The morphology of the endocrine system in congenitally athymic (nude) mice. **The Journal of pathology**, v. 121, n. 4, p. 225–31, abr. 1977.

SAGGESE, G.; BERTELLONI, S. Puberty and bone development. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2002 Mar;16(1):53-64.

SAVINO, W. et al. Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study. **The American journal of pathology**, v. 122, n. 2, p. 302–7, fev. 1986.

SIECK, G. C. Physiology in Perspective: Why Do We Continue to Ignore Sex Differences? **Physiology**, v. 30, n. 6, p. 406–407, 2 nov. 2015.

SOLOMON, G. et al. Effect of peripherally administered leptin antagonist on whole body metabolism and bone microarchitecture and biomechanical properties in the mouse. n. 85, p. 14–27, 2014.

TANNER, J. M. et al. Relative importance of growth hormone and sex steroids for the growth at puberty of trunk length, limb length, and muscle width in growth hormone-deficient children. **The Journal of pediatrics**, v. 89, n. 6, p. 1000–8, dez. 1976.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of

puberty in primates. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 1, p. 111–51, fev. 2001.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

TURNER, R. T. et al. Peripheral leptin regulates bone formation. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 22–34, jan. 2013.

VELLOSO, A.; SAVINO, W.; MANSOUR, E. Leptin Action in the Thymus. v. 34, p. 29–34, 2009.

WELLS, J. C. K. Sexual dimorphism of body composition. v. 21, n. 3, p. 415–430, 2007.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeitos da timectomia neonatal sobre o dimorfismo sexual, desenvolvimento esquelético e concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona em ratos" sob responsabilidade do Pesquisador JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO e colaboração de Wagner Garcez de Mello e José Antunes Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo 2012-01081.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effects of neonatal thymectomy on sexual dimorphism, bone development, leptin and corticosterone secretion", protocol number 2012-01081, under responsibility of JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO and with collaboration of Wagner Garcez de Mello and José Antunes Rodrigues agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e
Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br

ANEXO B

RAT LEPTIN ELISA KIT - 96-Well Plate (Cat. #EZRL-83K) ASSAY PROCEDURE

Pre-warm all reagents to room temperature immediately before setting up the assay.

1. Dilute the 10X concentrated HRP Wash Buffer 10 fold by mixing the entire contents of both buffer bottles with 900 mL de-ionized or distilled water.

2. Remove the required number of strips from the Microtiter Assay Plate. Unused strips should be resealed in the foil pouch and stored at 2-8°C. Assemble strips in an empty plate holder and wash each well 3 times with 300 µl of diluted Wash Buffer per wash. Decant Wash Buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times. Do not let wells dry before proceeding to the next step. If automated machine is used for assay, follow the manufacturer's instructions for all washing steps described in this protocol.

3. Add 30 µL Assay Buffer to Background wells, Standard wells, and QC1 and QC2 wells. Add 40 µL Assay Buffer to sample wells.

4. If samples to be assayed are serum or plasma, add 10 µL Matrix Solution to the Background wells, Standard wells, and QC1 and QC2 wells. If samples are free of significant serum matrix components, add 10 µL Assay Buffer instead.

5. Add 10 µL Assay Buffer to the Background wells and add in duplicates 10 µl Rat Leptin Standards in the order of ascending concentration to the appropriate wells.

6. Add 10 µL QC1 and 10 µL QC2 to the appropriate wells.

7. Add sequentially 10 µL of the unknown samples in duplicate to the remaining wells.

8. Transfer Antiserum Solution to a reagent reservoir and add 50 µL of this solution to each well with a multi-channel pipette. Cover the plate with plate sealer and incubate at room temperature for 2 hours on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, about 400 to 500 rpm.

9. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.

10. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300 µl per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.

11. Add 100 µl Detection Antibody to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 1 hour on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, approximately 400-500 rpm.

12. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.

13. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300 µl per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.

14. Add 100 µl Enzyme Solution to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 30 minutes on the micro-titer plate shaker.

15. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.

16. Wash wells 6 times with diluted Wash Buffer, 300 µl per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.

17. Add 100 µl of Substrate solution to each well, cover plate with sealer and shake in the plate shaker for approximately 10 to 15 minutes. Blue color should be formed in wells of Leptin standards with intensity proportional to increasing concentrations of Leptin.

NOTE: Please be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Please visually monitor the color development to optimize the incubation time. One can monitor color development using 370 nm filter, if available on the spectrophotometer. When the absorbance is between 1.2 and 1.8 at 370 nm, the stop solution can be added to terminate the color development.

18. Remove sealer and add 100 µl Stop Solution [CAUTION: CORROSIVE SOLUTION] and shake plate by hand to ensure complete mixing of solution in all wells. The blue color should turn into yellow after acidification. Read absorbance at 450 nm and 590 nm in a plate reader within 5 minutes and ensure that there is no air bubbles in any well. Record the difference of absorbance units.