

Bruna Gabriele Biffe

Influência do ganho de massa corporal, induzido por dieta rica em
sacarose, em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos de
ratos Wistar

Araçatuba – SP

2011

Bruna Gabriele Biffe

**Influência do ganho de massa corporal, induzido por dieta rica em
sacarose, em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos de
ratos Wistar**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

Araçatuba – SP

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda a minha gratidão.

Ao prof. **Mário Jefferson Quirino Louzada**, pela orientação, por todas as oportunidades proporcionadas, incentivo, amizade, ensinamentos compartilhados e pela contribuição com minha formação durante todos os anos de convivência.

À profa. **Maria Tereza Nunes**, por toda atenção que sempre nos foi oferecida mesmo sem antes nos conhecer, pela disposição em ajudar e contribuir para com esse estudo e principalmente pela pessoa que é, que a faz estar acima de qualquer título ou departamento.

Ao prof. **Antônio Augusto Ferreira de Carvalho**, pela confiança, amizade, incentivo, integridade, ensinamentos, dedicação e generosidade. Por me “conduzir” com suas sábias palavras e por nas dúvidas me dar a certeza.

À profa. **Ana Cláudia Stevanato de Melo Nakamune**, pela dedicação, incentivo, transmissão de conhecimentos e, especialmente por me “lembrar” que nunca devemos desistir dos nossos sonhos.

À profa. e coordenadora **Rita Cássia Menegati Dornelles**, pelo subsídio na pesquisa, nas viagens e em todas as atividades da pós-graduação e pelo incentivo à pesquisa com o exercício da ética.

À profa **Dóris Hissako Sumida**, pela ajuda sempre oferecida e pela disposição em contribuir com minha formação e com este estudo.

Aos profs. do Departamento de Ciências Básicas da UNESP/Araçatuba, agradeço toda a ajuda e atenção para que este estudo fosse desenvolvido.

Aos **profs. Ismael Freitas Forte Júnior e Lígia Araújo Martini**, por terem aceitado participar de um momento importante para a concretização desse estudo e pela atenção e dedicação com que corrigiram esse trabalho.

Aos **meus pais Olair e Shirley**,

Não há palavras que se aproximem da dimensão do meu carinho e gratidão. Agradeço ao meu **pai** pelos princípios extremamente rígidos, mas que fazem a diferença em minha vida. Pela referência de justiça e dignidade e por me guiar a aprender a “ciência da vida”.

A minha querida e amada **mãe**, que ansiou por este momento, tanto quanto eu. Por viver, sofrer e comemorar comigo todos os momentos. Por me instruir a agradecer cada segundo e vivê-los com sinceridade, alegria e plenitude. Pelo amor incondicional e, por estar perto, mesmo quando longe...a vocês por muito mais!

À minha **irmã Laísa**,

Por nossa afinidade, amizade, presença em todos os momentos, por este amor fraterno tão constante, por todas as ações acima de qualquer tentativa de explicação e pela “âncora” que é em minha vida.

À minha **vovó Maria Fernandes Biffe** (*in memoriam*), que pequenina em sua grandeza e humilde em sua exuberância foi e sempre será meu exemplo de ternura e do querer bem.

Ao meu **vovô Alfredo Biffe** (*in memoriam*), sei que nada se aproxima de suas mansas palavras, seus valiosos gestos e de seu silêncio que sempre “dizia tudo”.

Apesar da ausência material, cada passo da minha vida possui participação viva e marcante de vocês.

À minha **tia Maria Biffe**, por todo auxílio e carinho que sempre foram oferecidos.

A **minha família**, que participou das minhas angústias e anseios e compreendeu minha ausência quando foi preciso e pelos inefáveis momentos compartilhados.

Ao Sr. Pedro Gargione, agradeço por dedicar-se a me ouvir, pelo sorriso franco e harmonizante e pela renovação dos meus sentimentos por cada palavra dita. Sempre, muito obrigada!

À D. Cida e D. Maria, pelas palavras de sabedoria e de conforto.

À Marise, Eliane e Arthur Negrão, por anos e anos de fidelidade à amizade e pela incessante torcida. Muito obrigada!

À família Bértoli (Dri, Li e Tata), por todo carinho e ajuda oferecida.

À amiga Priscila Silvério Meira, pelo apoio em todos os momentos. Pelos compartilhados momentos de preocupação, mas também pelos bons momentos de descontração. Pela amizade verdadeira, amizade que não conta e nem espera por trocas, amizade que não precisa dizer o que é, que já a faz ser.

À amiga Laysa Macedo, pois eu sei que posso contar sempre com você. É um presente de Deus na minha vida. Obrigada!

À amiga Cynara, pelas palavras de conforto e amizade.

À Francine Jelaleti e toda sua família, pois também são minha família. Obrigada por todo o apoio nessa e em qualquer circunstância.

À minha querida amiga Vilma Clemi Colli, por ter a mão sempre estendida. Por me ouvir e aconselhar com muita sabedoria e imparcialidade. Pelo exemplo de dedicação, esforço e ética com que conduz seus ideais. Pelas palavras de conforto, de alegria, de inspiração e de confiança. E, pela torcida, que sei que é grande. Sinto orgulho em ser sua amiga. Muito obrigada!

À amiga Lucilene Andrade, por nossa sincera amizade e pela simplicidade, naturalidade e sinceridade de sentimentos que a faz uma pessoa encantadora. Obrigada!

Aos amigos da pós-graduação, Aline Yamamoto, Camila Stringhetta, Gean Domingos, Wagner Garcez, Felipe Munhoz e Samuel Lourenço, pelos momentos que passamos juntos, em busca dos mesmos objetivos.

Aos queridos amigos da UNESP, Keline Fabretti, Nandressa Mendes, Cristiane Manaia, Kauê Basseto, Eduardo Antonietto, Rafaela Buldrini, Cíntia Helena Monteiro Borges, Andrea Garcia, Lívia Castanhas, Tatiana Barbosa, Maria Carolina, Carol, Mariana, Beatriz, Letícia e D. Lurdes, companheiros de laboratório, experimento, disciplinas e de muitas risadas.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da USP/São Paulo Gilles, Paulinha, Erika, Carol, Fred, Caio, Bruninha, Rafael e Jamile, por terem me acolhido com tanto carinho, em especial a Lhô, Silvânia e Carlos, pela ajuda, dedicação, carinho e preocupação para com meu estudo e comigo.

Às alunas do laboratório de biofísica, Kelly Vendrame, Jamila Baptistella e Juliana Apolinário, e a todos os alunos que passaram pelo laboratório e de alguma forma ou em algum momento participaram desta fase.

À amiga Bárbara Braga (UFV), pela rápida presença, mas permanente amizade em meus dias.

Ao querido amigo Renato Macedo, amigo de tantos caminhos. Obrigada pela cumplicidade e imensa amizade.

Às amigas Natália Arcos, Tânia Mendes, Mônica Antunes, Laila Sígar, Elô Ferracini e Talita Baldo, porque nem a distância e nem o tempo mudam a amizade que foi construída. Obrigada pela amizade!

Ao querido amigo Luís Fernando Ferreira, pelos bons dias e pelo grande amigo que foi, como foi, e que é.

Aos queridos amigos de Ribeirão Preto, **Cris, Fernando, Juju Martins e Luiz Fernando**. Obrigada por terem feito cada instante valer a pena e ser inesquecível. Arcos, Porto Alegre, São Bernardo e Brasília continuam dentro de Araçatuba. Nenhum momento será esquecido!

Aos amigos de Ribeirão Preto, **Amanda, Reinaldo, Lia, Keila, Paulinha, Karina e Saulo**, por todo o carinho, preocupação, descontração, amizade e por terem cortado os meus dias com tantas alegrias... Foi um grande prazer conhecê-los!

Às funcionárias da Casa de Hóspedes, **Shirlene, Lúcia, Ana Lúcia, Célia e Augusta**, pelo carinho, acolhimento e preocupação.

Aos amigos do “Cursão de Fisiologia” que compartilharam as angústias, as alegrias, os seminários e as “singulares” provas da fisiologia.

À profa. e amiga **Carolina Rúbio Vicentini**, por ter sido a aluna que iniciou as atividades de pós-graduação no laboratório de biofísica e superando as dificuldades abriu as portas para novos alunos. Agradeço as oportunidades oferecidas, a ajuda, a confiança e a amizade que sempre foram constantes.

À amiga **Luana Espicalquiz**, pela amizade e por ter a maior de todas as “culpas” por eu estar aqui, onde tudo talvez tenha começado em 23 de março de 2005.

À amiga **Gabriela Miguel**, pela amizade, carinho e presença nas dificuldades e alegrias.

Aos professores, coordenadores e orientadores da graduação, pelo incentivo e torcida.

Ao prof. **Paulo César Ciarlini**, que talvez desconheça minha admiração. Obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos e conselhos que me ajudaram a chegar até aqui.

Ao prof. e amigo **Sérgio Diniz Garcia**, pelo carinho, confiança, amizade, incentivo, conselhos, preocupação e pelas inúmeras alegrias de todos os dias.

Ao prof. e amigo **Wagner André Pedro**, pelas palavras de entendimento, pela tranquilidade que transmite e pelos conselhos sempre positivos.

Ao prof. e amigo **Luiz Eduardo Fonseca**, por todas as palavras de conforto, pela preocupação e carinho para comigo.

Ao prof. e amigo **Carlos Kaneto**, pela simpatia e ajuda sempre oferecida.

Aos profs. **Fernando Garcia**, **Cáris Maroni** e **Guilherme Nogueira**, por, gentilmente permitirem o acesso aos equipamentos e análises de seus laboratórios.

Ao **Pedro Luís Florindo**, pela ajuda durante as fases desse estudo e pela alegria que traz para o laboratório.

À querida amiga **Marta Patto**, pelos conselhos, apoio, preocupação, amizade e pelas palavras otimistas que sempre encheram os meus dias de esperança.

Ao amigo **Alexandre Teixeira**, pelo caráter, amizade, incentivo e alegria transmitida.

À **Universidade Estadual Paulista**, por ter sido o maior instrumento dessa etapa.

Aos funcionários da **Seção de Pós Graduação** (em especial a **Valéria de Queiroz Zagatto** e **Diogo Reatto**), **Secretaria** (em especial a **Iraci Morais Machado**) e da **Biblioteca da UNESP Araçatuba** (em especial a **Isabel Pereira de Matos**) pela contribuição e orientações para com este estudo.

À **FAPESP**, **CNPq** e **CAPES** pelo auxílio financeiro.

“Se soubesse que o mundo se desintegraria amanhã, ainda assim plantaria a minha macieira”.

Martin Luther King

“...Verás que um filho teu não foge à luta.”

Joaquim Osório Duque Estrada

BIFFE, B.G. Influência do ganho de massa corporal, induzido por dieta rica em sacarose, em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos de ratos Wistar. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2011.

RESUMO

Obesidade e osteoporose são doenças crônicas de saúde pública que compartilham características e prevalência cada vez mais relevantes. Com a finalidade de analisar a influência da obesidade induzida por dieta rica em sacarose em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos, ratos Wistar machos com 3 meses de idade, foram divididos em grupo C – Controle (n=10), com livre acesso à ração e água e grupo S – Sacarose (n=10), submetidos às mesmas condições do grupo controle e suplementados com sacarose a 30% (p/v). O período experimental foi de 8 semanas. Foram mensurados também massa corporal, ingestão de líquidos, consumo de ração, glicemia, tecido adiposo abdominal, concentrações de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, leptina e insulina. As tíbias foram desarticuladas e dissecadas para análises biofísicas. A densidade mineral óssea foi avaliada por densitômetro ósseo padrão; a densidade radiográfica por meio do programa computacional de análise de imagens – IMAGE J[®]; a resistência óssea foi determinada por ensaio mecânico destrutivo; a quantidade de material mineral ósseo por meio da calcinação e a conectividade trabecular foi analisada por microtomografia óssea. Durante o período experimental os animais do grupo C consumiram quantidade maior de água e ração, porém a massa corporal final foi menor que a do grupo S. Neste grupo, a sobrecarga calórica oferecida aos animais, durante oito semanas, resultou em aumento no consumo energético, massa corporal, glicemia, concentração plasmática de leptina e de tecido adiposo abdominal. Entretanto, não apresentou diferença significativa na concentração plasmática de insulina. Na análise biofísica do tecido ósseo foi evidenciada menor densidade óssea (DXA) para o grupo S quando realizada a comparação inicial vs final no mesmo grupo. Entretanto, não foi observada diferença significativa na comparação final entre o grupo C e S. A densidade radiográfica evidenciou menor densidade (mmAL) no grupo S. Não foram observadas diferenças significantes nos parâmetros do ensaio mecânico e na concentração plasmática de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Contudo, a quantidade de material mineral ósseo foi significativamente menor nos animais do grupo S. Complementando estes dados, foi evidenciada diferença estatística significativa no grupo S apresentando menor porcentagem de volume ósseo e espessura trabecular associado com aumento na separação entre as trabéculas, mas sem diferença estatística no número trabecular. Diante do modelo experimental e dos resultados observados nesse estudo, conclui-se que houve eficiência em promover ganho de massa e adiposidade corporal culminando em surgimento da obesidade. Esta condição promoveu diminuição na densidade e mineralização, assim como alterações substanciais na microarquitetura óssea, com redução da conectividade trabecular, prejudicando a qualidade óssea. No entanto, não foi suficiente para promover alterações em nenhum dos parâmetros biométricos e biomecânicos, ou ainda em marcadores plasmáticos do metabolismo ósseo.

Palavras-Chave: Dieta. Obesidade. Osso. Ratos. Sacarose.

BIFFE, B.G. Influence of body mass gain induced by sucrose-rich diet in biometric, biochemical and biophysical parameters of Wistar rats. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2011.

ABSTRACT

Obesity and osteoporosis are chronic diseases of public health importance that share characteristics and increasingly and relevant prevalence. In order to analyze the influence of obesity induced by sucrose-rich diet in biometric, biochemical and biophysical parameters Wistar rats at 3 months of age were divided into two groups: C - Control (n = 10), with free access to food and water and S - Sucrose (n = 10) subjected to the same conditions of control group and supplemented with 30% sucrose (p/v), during 8 weeks. Measures of body mass, fluid intake, feed intake, blood glucose, abdominal adipose tissue, concentrations of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, leptin and insulin were taken. The tibias were disarticulated and dissected for biophysical analysis. Bone mineral density was assessed by standard bone densitometer; the radiographic image by the computer program of image analysis – IMAGE J; bone strength was determined by destructive mechanical testing; quantification of bone mineral material by calcination and trabecular connectivity was analyzed by microtomography bone. During the experimental period, animals in the control group (C) consumed higher amounts of food and water, but the body mass was smaller than the group receiving sucrose (S). In this group, the caloric load given to the animals for eight weeks resulted in increased energy consumption, body mass, glycemia, leptin plasmatic and abdominal fat. However, the plasma insulin concentration was not altered. Biophysical analysis of bone tissue revealed lower bone density (DXA) for the group S when compared to the initial density within the same group. However, there was no significant difference in the final comparison between group C and S. Radiographic density showed lower density (mmAL) in the group S. There were no significant differences between mechanical test parameters and calcium, phosphorus or alkaline phosphatase plasmatic concentration. However, the amount of bone mineral material was significantly lower in group S. Besides, statistically significant difference was observed in group S referring to a lower percentage of bone volume and trabecular thickness associated with increased separation between the trabeculae, but with no change in trabecular number. We concluded that the experimental model was effective in promoting weight gain and adiposity culminating in the emergence of obesity. This condition caused a reduction in the density and mineralization, as well as substantial changes in bone microarchitecture, with decreased trabecular connectivity, damaging the bone quality. However, it was not enough to promote changes in any of biometric and biomechanical parameters, or in plasma markers of bone metabolism.

Keywords: Diet. Obesity. Bone. Rats. Sucrose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mensuração da circunferência torácica, abdominal e comprimento (naso-anal) dos animais experimentais.....	33
Figura 2. Imagem do animal posicionado para a realização da análise densitométrica inicial.....	35
Figura 3. Captura da imagem da tíbia (análise inicial) pelo densitômetro ósseo usando software para pequenos animais.....	35
Figura 4. Captura da imagem da tíbia (análise final) pelo densitômetro ósseo usando software para pequenos animais.....	36
Figura 5. Tíbia (análise final) contornada como um todo para obtenção dos parâmetros densitométricos.....	36
Figura 6. Tíbias radiografadas juntamente com uma escada padrão de alumínio para realização da análise de densidade radiográfica.....	37
Figura 7. Ensaio biomecânico de flexão em três pontos. Tíbia apoiada em dois pontos e a força aplicada em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios.....	38
Figura 8. Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico.....	38
Figura 9. Imagem do tecido adiposo abdominal de um animal do grupo C.....	44
Figura 10. Imagem do tecido adiposo abdominal de um animal do grupo S.....	45
Figura 11. Reconstrução tridimensional da microarquitetura óssea de um animal do grupo C..	54
Figura 12. Reconstrução tridimensional da microarquitetura óssea de um animal do grupo S..	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do consumo energético (Kcal/animal/semana) de animais do grupo controle (C) e sacarose (S).	42
Tabela 2. Concentração plasmática de cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL) e fosfatase alcalina (U/l) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).	45
Tabela 3. Concentração plasmática de leptina(mg/dL) e insulina(μ U/mL) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).....	46
Tabela 4. Valores da análise da densidade radiográfica dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).	51
Tabela 5. Valores dos parâmetros do ensaio biomecânico: Fmáx (força máxima), rigidez e tenacidade do terço médio do osso tibia dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).	51
Tabela 6. Valores da quantificação de material ósseo (cinzas ósseas) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- AdipoR1 – Receptor de adiponectina 1
AdipoR2 – Receptor de adiponectina 2
ANOVA - Análise de variância
ATF4 – Fator ativador de transcrição 4
BMP - Proteínas morfogenéticas ósseas
BMU - Unidade básica multicelular
BV/TV - Volume ósseo trabecular
CART – Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
C/EBP- α - Proteína ligadora ao amplificador CCAAT
CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm² - Centímetro quadrado
CMO – Conteúdo mineral ósseo
CO₂ - Gás carbônico
CTx - Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I
DMO - Densidade mineral óssea
DPIs - Pontos por polegadas
DXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry
ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligada à enzima
Fmáx - Força máxima
Fox01 – Forkhead Box 01
g – Grama
g/cm² - Grama por centímetro quadrado
GLUT - Sódium glucose cotransporters
H⁺ - Hidrogênio
HCO₃⁻ - Bicarbonato
Htr1a –Receptor de serotonina 1a
Htr2b –Receptor de serotonina 2b
Htr2c –Receptor de serotonina 2c
IL-1 - Interleucina-1

IL-6 - Interleucina-6
IMC - Índice de massa corporal
IR - Receptor de insulina
Kcal - Quilocalorias
Kg – Quilogramas
MCSF - Fator de estimulação da colônia de macrófagos
mg/Dl - Miligrama por decilitro
mg/kg - Miligramas por quilo
mL – Mililitro
mmAl – Milímetro de alumínio
mm/min - Milímetro por minuto
N - Newton
N.m - Newton metro
N/m - Newton por metro
ObRb – Receptor de leptina de forma longa
OPG - Osteoprotegerina
PPAR- γ – Receptor ativado por proliferadores de peroxisomos
PTH - Paratormônio
p/v – Peso por volume
RANK - Receptor ativador do fator-kappa B nuclear
RANK-L - Ligante do receptor ativador do fator-kappa B nuclear
RIE - Radioimunoensaio
rpm – Rotações por minuto
Runx2 – Fator de transcrição relacionado ao Runt2
SGLT - Sodium glucose cotransporters
SNC – Sistema nervoso central
SNS – Sistema nervoso simpático
TAB - Tecido adiposo branco
TAM - Tecido adiposo marrom
Tb. N - Número de trabéculas

Tb. Sp - Separação trabecular

Tb.Th - Espessura trabecular

Tc1rg – T-cell, immune regulator 1

TG - Triacilglicerol

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador β

TIFF - Tagged Image File Format

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Twist2 – Twis-related protein 2

U-NTX - Telopectídeo aminoterminal do procolágeno I

U-CTX - Porção carboxiterminal do procolágeno I

vs - Versus

Wnt – Wingless

μ L – Microlitro

μ IU/mL – Microunidades internacionais por mililitro

μ m - Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Tecido Ósseo	19
3.2 Remodelamento Ósseo.....	21
3.3 Biomecânica Óssea.....	22
3.4 Osteoporose.....	23
3.5 Avaliação do Tecido Ósseo.....	24
3.6 Tecido Adiposo.....	25
3.7 Obesidade	26
3.8 Obesidade e Tecido Ósseo	27
3.9 Leptina e Tecido Ósseo.....	28
3.10 Insulina e Tecido Ósseo	29
4 MATERIAL E MÉTODO.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Grupos Experimentais.....	31
4.3 Massa Corporal.....	32
4.4 Consumo de Ração e Ingestão de Líquidos.....	32
4.5 Glicemia	32
4.6 Biometria.....	32
4.7 Tecido Adiposo Abdominal.....	33
4.8 Componentes Plasmáticos.....	33

4.8.1 Cálcio.....	33
4.8.2 Fósforo.....	33
4.8.3 Fosfatase Alcalina.....	34
4.8.4 Leptina.....	34
4.8.5 Insulina.....	34
4.9 Densitometria Óssea.....	34
4.10 Densidade Radiográfica.....	36
4.11 Ensaio Biomecânico.....	37
4.12 Quantificação de Material Mineral Ósseo (Cinzas Ósseas).....	38
4.13 Microtomografia Óssea.....	39
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6 RESULTADOS.....	39
6.1 Massa Corporal.....	39
6.2 Consumo de Ração e Ingestão de Líquidos.....	41
6.3 Consumo Energético.....	42
6.4 Glicemia.....	42
6.5 Biometria.....	43
6.6 Tecido Adiposo Abdominal.....	44
6.7 Componentes Plasmáticos.....	45
6.7.1 Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina.....	45
6.7.2 Leptina e Insulina.....	45
6.8 Densitometria Óssea.....	46
6.8.1 Densitometria Óssea Inicial.....	46
6.8.2 Densitometria Óssea Final.....	47
6.8.3 Densitometria Inicial vs Final.....	49

6.9 Densidade Radiográfica.....	50
6.10 Ensaio Biomecânico.....	51
6.11 Material Mineral Ósseo (Cinzas Ósseas).....	51
6.12 Microtomografia Óssea	52
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO - CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA.....	73

1 INTRODUÇÃO

Obesidade e osteoporose são doenças crônicas de saúde pública que compartilham características e prevalência cada vez mais relevantes (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). A obesidade destaca-se como epidemia mundial que tende a aumentar uma vez que, mais de um bilhão de pessoas apresentam sobrepeso e conseqüentemente propensão à obesidade (WHO, 2003). Segundo dados do IBGE (2008-2009), no Brasil, 1 em cada 3 crianças entre 5 a 9 anos apresenta massa corporal acima da recomendada pela Organização Mundial de Saúde e entre as faixas etárias dos 10 aos 19 anos, considerando os últimos 34 anos, o sobrepeso aumentou 6 vezes para homens e 3 para mulheres.

Caracterizada por índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m², a obesidade apresenta etiologia multifatorial (WHO, 2000) e é dependente de fatores genéticos, metabólicos, nutricionais e comportamentais que oferecem substancial contribuição para o incremento da massa corporal (ZHAO et al., 2007). Dentre os fatores que levam à obesidade, a combinação de hábitos alimentares inadequados e sedentarismo são apontados como as maiores responsáveis pelo aumento da obesidade (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Esta combinação é também comumente associada com a osteoporose (ÅKESSON, 2003).

A osteoporose é uma doença marcada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), deterioração da microarquitetura óssea e aumento da predisposição a fraturas (ÅKESSON, 2003). Em países desenvolvidos as doenças osteo-metabólicas, como a osteoporose são conseqüências da idade avançada e do uso de medicamentos. Já em países em desenvolvimento são conseqüência principalmente de fatores nutricionais (RAUBENHEIMER, 2004). Embora estudos anteriores tenham atribuído efeito positivo da obesidade no tecido ósseo (COBAYASHI et al., 2005; REID, 2002), estudos mais recentes indicaram o contrário e correlacionaram obesidade com osteoporose (CAO et al., 2009; ZHAO et al., 2007).

O tecido ósseo é considerado órgão endócrino responsório a distintas influências e sujeito à regulação tanto periférica como central (FUKUMOTO; MARTIN, 2009). Assim como o tecido ósseo, o tecido adiposo deixou de ser visto como um simples e passivo reservatório de energia e passou a ser observado como órgão endócrino responsável por diversas circunstâncias metabólicas diretamente relacionadas com o balanço energético, por meio da interação de diferentes sinais (MOHAMED-ALI et al., 1998).

Interações complexas entre tecido adiposo, tecido ósseo, pâncreas e sistema nervoso central orquestram a regulação do metabolismo ósseo e do metabolismo energético (NG, 2011). A regulação do metabolismo ósseo por meio da leptina e insulina sugere que direta ou indiretamente o osso pode ser regulado pela homeostase energética. Ao mesmo tempo, a regulação do metabolismo energético por meio da osteocalcina, uma proteína secretada pela célula óssea osteoblástica sugere que a homeostase energética pode ser regulada pela dinâmica do metabolismo ósseo (KARSENTY; OURY, 2010; NG, 2011).

A nutrição exerce papel fundamental para integridade da massa óssea. Hábitos alimentares inadequados como a ingestão excessiva de carboidratos podem não contribuir para a manutenção da massa óssea e ainda participar de sua perda (HAMRICK et al., 2009). Uma alimentação rica em açúcares tem sido relacionada com o aumento da massa corporal devido à alta densidade energética (VAN DAM; SEIDELL, 2007) estando ainda associada com doenças que incluem obesidade, osteoporose, diabetes mellitus, doença cardiovascular, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e alguns tipos de câncer (WHO, 2003).

A sacarose, um carboidrato simples, que apresenta sabor adocicado, contém 4 kcal de energia por grama (SCHAEFER et al., 2009), quando consumida excessivamente, em solução ou adicionada à dieta sólida, ocasiona acréscimo da massa corporal e aumenta a deposição de gordura (JURDAK; KANAREK, 2009; KANAREK; ORTHEN-GAMBILL, 1982; SCLAFANI; XENAKIS, 1984). Em função desta propriedade, a obesidade induzida por meio da dieta rica em sacarose foi utilizada como modelo experimental em diferentes estudos (BRITO et al., 2007; DINIZ et al. 2008; NOVELLI et al., 2007), estando ainda relacionada a reduções nos parâmetros que refletem a qualidade óssea (TJÄDERHANE; LARMAS, 1998).

A massa corporal está intimamente correlacionada com diferentes propriedades do osso (REID, 2002; REID, 2008). As respostas adaptativas às cargas mecânicas promovem liberação de fatores locais e/ou sistêmicos que regulam a diferenciação das células do tecido ósseo e de outros tecidos envolvidos no controle da massa corporal (REID, 2002; ZHAO et al., 2007).

O real conceito da relação entre obesidade e tecido ósseo permanece obscuro uma vez que os relatos da literatura são conflitantes e os mecanismos envolvidos pouco compreendidos. Desta forma é de suma importância avaliar os efeitos da obesidade, induzida por meio de dieta rica em sacarose, no tecido ósseo de ratos Wistar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a influência da obesidade induzida por dieta rica em sacarose, em parâmetros biométricos, bioquímicos e biofísicos de ratos Wistar adultos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a massa corporal, parâmetros biométricos e glicemia dos animais;
- Verificar por meio da densidade, mineralização, resistência, porosidade e conectividade do tecido ósseo possíveis alterações promovidas diante do protocolo experimental;
- Determinar a concentração plasmática de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, insulina e leptina nos animais experimentais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Tecido Ósseo*

O tecido ósseo constitui um sistema vivo, em constante atividade cuja principal função é a formação e manutenção do esqueleto, proporcionando locomoção, proteção e reserva mineral (CIVITELLI, 2008).

Histologicamente, o osso é disposto em osso lamelar e não lamelar. O tecido ósseo não lamelar ou também denominado como osso primário é encontrado em metáfises em crescimento, calos ósseos e em algumas doenças ósseas. Em função de sua baixa mineralização é considerado osso imaturo. O tecido ósseo lamelar ou secundário é altamente organizado, maduro e corresponde à substituição do osso não lamelar (FRANKEL; NARDIN, 2001).

Sob o aspecto morfológico o osso pode ser dividido em osso cortical, representando 85% de tecido ósseo, e osso trabecular, representando os demais 15% do tecido ósseo. O osso cortical é predominante nas diáfises dos ossos longos e em menor proporção recobrando a superfície do esqueleto axial. Sua distribuição é concêntrica, formada por vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (DOBLARÉ et al., 2004). O osso trabecular compreende a microarquitetura interna do tecido ósseo, marcada por inúmeras espículas ósseas orientadas de acordo com a tensão em que o osso é submetido. É predominante em corpos vertebrais e pelve, mas também pode ser encontrado nas epífises dos ossos longos (MARTIN; BOARDMAN, 1993). Metabolicamente o osso trabecular é mais ativo que o osso cortical (KEAVENY et al, 2001).

A superfície externa do osso, denominada perióstio, é revestida por densa camada de fibras colágenas e de fibroblastos. Internamente, o endóstio constitui uma fina camada fibrosa. Perióstio e endóstio possuem células osteogênicas responsáveis pelo remodelamento e reparo ósseo (YOUNG; HEATH, 2000).

A matriz orgânica corresponde a 25% da massa óssea seca sendo esta constituída por 94% de fibras de colágeno tipo I, 5% de substâncias não colágenas e 1% de citrato, constituintes que atribuem ao osso flexibilidade, elasticidade e resistência à tração (MOTTA, 2003). Sais minerais inorgânicos correspondem a 75% da massa óssea seca (MOTTA, 2003). Estes são compostos por fosfato e carbonato de cálcio responsabilizando-se pela resistência à força de compressão e rigidez (DOBLARÉ et al., 2004). O tecido ósseo possui matriz extracelular calcificada formada pela

precipitação de fosfato de cálcio ligados a uma base de colágeno. A forma mais comum de fosfato de cálcio é a hidroxiapatita (VICENTE-RODRIGUEZ et al., 2008).

O tecido ósseo é constituído por células denominadas, osteoblasto, osteócito e osteoclasto (ROBLING et al., 2006). Osteoblastos são células cubóides e alongadas, originadas de células mesenquimais situadas nas lacunas ósseas e na região subperiosteal entre o osso cortical e o periosteio (YOUNG; HEATH, 2000). São células de intensa capacidade secretora, responsáveis pela produção de cadeias protéicas diversas e precursores de colágeno. Adicionalmente, secretam fatores de crescimento e para a mineralização óssea (MOTTA, 2003). Possuem receptores para paratormônio (PTH), estrogênio, vitamina D, prostaglandinas e citocinas (LIAN; STEIN, 2006). Conforme a matriz óssea vai sendo sintetizada, os osteoblastos ficam retidos por ela assumindo uma forma mais delgada e neste momento tornam-se células maduras denominadas osteócitos nas quais há redução de atividade com supressão da síntese de matriz óssea. Os osteócitos são também conhecidos como os mecatransdutores das células ósseas por possuírem cílios sensíveis capazes de detectar oscilações e conseqüentes alterações do fluído intracanalicular (MANN et al., 2006). Os osteócitos mantêm extensa rede de contato com células adjacentes por meio de ramificações citoplasmáticas que instituem vias de transporte de metabólitos e nutrientes. Este contato com outras células relaciona-se com as atividades de absorção e reabsorção óssea, características do tecido ósseo. Osteoclastos correspondem a células gigantes, com múltiplos núcleos, formadas a partir da fusão de células precursoras mononucleadas situadas na medula óssea. São responsáveis pela reabsorção óssea por meio da liberação de enzimas proteolíticas e ácidos orgânicos que digerem e solubilizam a matriz óssea calcificada. Os osteoclastos desenvolvem na superfície, quando em contato com o osso, borda em escova. A cavidade desenvolvida inferiormente a esta borda devido à reabsorção é chamada de lacuna de Howship (CIVITELLI, 2008).

A osteocalcina, um peptídeo secretado pelos osteoblastos maduros, é considerada uma das proteínas não colágenas mais abundantes da matriz óssea. A osteocalcina sofre uma modificação pós-tradução tendo como cofator a vitamina K. Nesse processo ocorre a carboxilação de resíduos de ácido glutamato, formando γ -carboxiglutamato, fundamental para a reação de carboxilação da osteocalcina (DÔRES et al., 2001). A carboxilação confere à osteocalcina capacidade de ligação com o cálcio que será incorporado aos cristais de hidroxiapatita. No entanto, nem todos os resíduos de osteocalcina são carboxilados e uma pequena porção permanece na forma

descarboxilada (LEE et al., 2007). Quando descarboxilada a osteocalcina reduz sua afinidade pela hidroxipatita o que ocasiona a liberação desta para a circulação sistêmica. Desta forma possui ação hormonal atuando como um potente secretagogo da insulina, regulando o metabolismo energético e ósseo (FERRON et al., 2008).

3.2 Remodelamento Ósseo

O osso é um tecido dinâmico submetido à constante renovação, por meio do mecanismo denominado de remodelação óssea caracterizado por formação e reabsorção. Este processo é cíclico e ocorre em uma unidade formada por células e denominada unidade básica multicelular (BMU), situadas na superfície óssea e estimuladas por fatores sistêmicos e locais (OTT, 2004). Enquanto a fase de reabsorção óssea é curta, para a formação é exigido um maior tempo de atividade celular. Desta maneira, qualquer aumento na remodelação pode resultar em déficit ósseo (RAISZ, 2005).

A regulação da diferenciação osteoblástica é realizada por diferentes genes, que codificam fatores de transcrição como Runx2 (fator de transcrição relacionado ao Runt2) e o ATF4 (fator ativador de transcrição 4). Runx2 é um membro da família Runx, que compreende fatores de transcrição específicos de células mesenquimais, e está envolvido na diferenciação osteoblástica e inibição da diferenciação de adipócitos (DUCY, 1997). Já ATF4 regula a fase terminal da diferenciação óssea e praticamente todas as funções que promovem a regulação da massa óssea. Além disso, ATF4 possui atuação na expressão de RANKL (ligante do receptor ativador do fator-kappa B nuclear), uma citocina necessária para a diferenciação osteoclástica, e desta forma também participa da reabsorção óssea (ELEFTERIOU et al., 2005). A expressão de ATF4 é também responsável pela regulação do gene *ESP*, encontrado nos osteoblastos e nas células de Sertoli nos testículos, que codifica uma proteína tirosina fosfatase intracelular (OST-PTP), implicada de maneira indireta nas funções endócrinas da osteocalcina, favorecendo sua carboxilação (LEE et al., 2007).

Para a diferenciação de macrófago em osteoclasto (osteoclastogênese) é necessária a presença e ativação dos osteoblastos, modulada pelo fator de estimulação da colônia de macrófagos (M-CSF) e pelo RANKL. A osteoprotegerina (OPG) e o receptor ativador do fator kappa B nuclear [NF- κ B (RANK)], são conhecidos como fatores inibidores de osteoclastogênese.

A interação de RANKL com RANK, resulta na inibição da apoptose dos osteoclastos. Efeitos opostos resultam da ligação RANKL e OPG. Enquanto a liberação de compostos com atividade hormonal, tais como PTH, vitamina D, e citocinas como IL1 (interleucina 1), IL6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral α) induzem o aumento da produção de RANKL tornando o osteoclasto ativo, substâncias que inibem a reabsorção, tais como estrogênio, TGF- β (fator de crescimento transformador β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de OPG, induzindo apoptose dos osteoclastos (ROBLING et al., 2006).

Em resposta aos estímulos de reabsorção, as células da superfície óssea são retraídas e na superfície celular há diferenciação, ativação e migração dos osteoclastos. Por sua vez, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam matriz extracelular que posteriormente será mineralizada (MUNDY, 1999). Para que este mecanismo de remodelação óssea se inicie é necessário que haja acidificação da lacuna de Howship. Para alcançar esta acidificação a anidrase carbônica gera íons H^+ e bicarbonato (HCO_3^-) do ácido carbônico, formado a partir de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O). Na membrana plasmática há uma bomba de prótons responsável pelo transporte de H^+ para a lacuna de Howship. A hidrólise de proteínas, como o colágeno tipo I, ocorre por ação das catepsinas, uma família de proteínas cisteínas que atuam sob condições ácidas (FERRON et al., 2010).

3.3 Biomecânica Óssea

O tecido ósseo possui sistema mecanosensorial ou mecatransdutor que promove adaptação do esqueleto à imposição de diferentes cargas mecânicas. Deste modo, a arquitetura estrutural do tecido ósseo é instituída pelo constante estresse ao qual é submetido e por adaptação há atrofia e hipertrofia estrutural. Para tanto, os ossos apresentam modulação de suas propriedades mecânicas (DOBLARÉ et al., 2004).

O estímulo mecânico proporciona alterações na proliferação e diferenciação celular, por acionar sensores que irão disparar sinais intracelulares. Quando interpretado, o sinal mecânico é transduzido em sinais bioquímicos que são transmitidos para células efectoras, as quais aumentam a atividade osteogênica (LOPEZ et al., 2008).

O tecido ósseo apresenta capacidade dinâmica de responder à presença ou ausência de forças promovendo mudanças em seu tamanho, forma e densidade, isto é, realiza alterações em

suas dimensões lineares, quando submetido à força de compressão ou de tração. Com típica resistência e dureza, o tecido ósseo é plástico e capaz de remodelar-se em resposta aos estímulos a que está submetido (OKUNO et al., 1986).

O osso possui duas fases que compreendem a fase elástica e a plástica. Na fase elástica o osso absorve a energia imposta a ele, mas o tecido retorna ao seu formato original. Contudo, se a carga imposta ultrapassa a capacidade de deformação e se torna constante, é quando surge a denominada deformação plástica (SEEMAN et al., 2008).

A capacidade máxima de suportar a carga é denominada de força máxima. Quando alcançada, há deformação e no momento que incide a falha, o tecido rompe-se integralmente. Já a rigidez implica na capacidade de absorção de energia sem promover falha óssea (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

Para manter a resistência o osso sofre influência de diferentes determinantes, tais como massa e microarquitetura, tamanho e geometria, além de ser influenciada por propriedades intrínsecas, responsáveis pela mineralização do tecido ósseo e orientação de fibras colágenas (CURREY, 1975).

3.4 Osteoporose

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico que resulta em falha estrutural do esqueleto apresentando predisposição a fraturas mesmo em condições de baixa energia (ÅKESSON, 2003). De origem silenciosa, sua progressão pode acontecer por décadas sem detecção. Deste modo, é considerada problema global de saúde, com impacto comparável ao de doenças cardiovasculares e câncer (FROES et al., 2002). É estimado que para cada 2 mulheres e 4 homens com mais de 50 anos, 1 mulher e 1 homem serão vítimas de fratura por osteoporose (NIH, 2007).

Fraturas osteoporóticas estão estreitamente relacionadas com a massa óssea e são dependentes da aquisição máxima deste parâmetro, atingida até o início da vida adulta. Desta maneira, se o ganho de massa óssea for otimizado durante as três primeiras décadas de vida o indivíduo apresentará menor suscetibilidade para a osteoporose, suas complicações e consequências (BRANDÃO; VIEIRA, 1999).

A suscetibilidade às fraturas pode ser determinada por meio do T-Score, parâmetro calculado pelo exame de densitometria óssea. De acordo com a classificação do T-score desvio

padrão igual ou maior que -1 classifica o osso como normal e sem risco de fraturas; T-score entre -1 e -2,5 é classificado como osteopenia e o risco para fratura é considerado 4 vezes maior que em osso sem comprometimento ósseo; T-score igual ou menor que -2,5 classifica-se como osteoporose, aumentando em 8 vezes o risco de fratura óssea. Em casos onde já há fratura independente do T-score o risco de uma nova fratura será 20 vezes maior do que em osso classificado como normal (KANIS et al., 2008).

3.5 Avaliação do Tecido Ósseo

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são disponíveis para a detecção de alterações ósseas e estes são diferenciados por marcadores de formação e reabsorção óssea. Os marcadores para a formação óssea são principalmente a fosfatase alcalina e a osteocalcina. Para a determinação da reabsorção óssea são realizadas as análises de deoxipiridinolina (catabolismo ósseo) e hidroxiprolina (produto da degradação do colágeno), ambas expressas em razão da creatinina urinária; fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP); telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) e telopeptídeo aminoterminal do procolágeno I (U-NTX), além da porção carboxiterminal do procolágeno I (U-CTX), representando os produtos da reabsorção do colágeno no tecido ósseo (GARNERO; DELMAS, 2004).

A quantidade de material mineral pode ser avaliada por meio da calcinação, processo térmico que utiliza altas temperaturas a fim de obter a decomposição química (WEINAND, 2009). Desta forma, discretas alterações na mineralização, não detectadas nos marcadores plasmáticos, podem ser evidenciadas na quantificação das cinzas ósseas (MOTTA, 2003).

As propriedades mecânicas do osso também podem ser avaliadas por meio de ensaios biomecânicos, tais como ensaios de compressão e flexão, analisando a força máxima admitida, rigidez e tenacidade óssea (TURNER; BURR, 1993).

A DMO, importante parâmetro da qualidade óssea, pode ser avaliada por meio da densitometria óssea, técnica de dupla emissão de raios-X (DXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry) considerada metodologia padrão ouro em função de sua precisão para avaliação óssea (COSTA et al., 2002). Outro meio para análise da DMO é a densitometria radiográfica onde a DMO é mensurada com praticidade. Esta metodologia utiliza como padrão de referência uma escada de alumínio, radiografada concomitantemente com o material de estudo e assim se

houver variações devidas à técnica radiográfica a escada utilizada como referência servirá como elemento de correção (LOUZADA, 2009). Já a microarquitetura óssea pode ser avaliada por meio da microtomografia computadorizada que possibilita a reprodução de imagens do tecido ósseo utilizando softwares específicos que permitem mensurações e cálculos em três dimensões por meio da investigação de seu remodelamento (SEMI, 2008).

3.6 Tecido Adiposo

Há dois tipos de tecido adiposo: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), exibindo propriedades funcionais distintas. O TAB é responsável pelo armazenamento de energia na forma de triacilglicerol (TG) e também pela secreção de diversos compostos com atividade biológica. Este tecido possui conteúdo celular variado. Quanto à origem, os adipócitos provêm de células-tronco que podem também diferenciar-se em osteoblasto, condrócito e miócito. Fatores de transcrição como C/EBP- α (Proteína ligadora ao amplificador CCAAT) e PPAR- γ (Receptor ativado por proliferadores de peroxisomos) estão diretamente relacionados à adipogênese e, desta forma inibem a diferenciação de outro tipo celular (GÖKE; GÖKE, 2004). Já o TAM é direcionado para dissipar a energia na forma de calor durante a termogênese, mas ambos tecidos estão envolvidos no balanço energético (QUEIROZ et al., 2009).

A manutenção das funções normais de um organismo é dependente da energia química, obtida a partir de substratos diversos. Sendo assim, o consumo energético é regulado de tal maneira que a ingestão de calorias num dado momento é maior do que o consumo, possibilitando assim o armazenamento. Os estoques serão mobilizados em situações nas quais não ocorrem a ingestão de substrato energético. Uma maior ingestão calórica resulta assim em maior lipogênese possibilitando o acúmulo de TG no tecido adiposo. No período de escassez, a mobilização de TG é realizada por meio da lipólise. Desta maneira, o armazenamento de TG reflete o saldo entre deposição e mobilização de gordura, reguladas em função do gasto energético (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo secreta diversas adipocinas que modulam distintas funções biológicas (JANICKA et al., 2007) de forma sistêmica ou local (MOHAMED-ALI et al., 1998). As principais moléculas secretadas pelo tecido adiposo compreendem leptina, adiponectina, grelina, resistina e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (MOHAMED-ALI et al., 1998).

Além da leptina que será abordada abaixo, a adiponectina também apresenta destaque no metabolismo. Liga-se a 2 receptores, AdipoR1 no músculo e AdipoR2 no fígado. Expressa unicamente em adipócitos diferenciados e de maneira inversa ao que ocorre com outros fatores secretados por estas células, a adiponectina tem sua síntese reduzida à medida que o tecido adiposo aumenta. A adiponectina promove aumento da sensibilidade dos tecidos à insulina, ocasionando maior oxidação de ácidos graxos e captação de glicose pelo músculo. Já no fígado, promove aumento da sensibilidade da insulina, da oxidação de ácidos graxos e redução da saída de glicose. Desta forma, há forte associação inversa entre adiponectina e resistência à insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

3.7 Obesidade

A obesidade se desenvolve por meio da hiperplasia e hipertrofia das células do tecido adiposo. A quantidade de adipócitos é dependente da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Já o volume de adipócitos é determinado pela interação entre lipólise, lipogênese e oxidação lipídica (ZUK et al., 2002). A obesidade não é somente uma doença crônica com disfunções graves para a saúde e sim uma das principais causas da morbidade e mortalidade em todo o mundo (PANDE, CHESKIN, 2003).

A obesidade pode ser classificada em função da distribuição dos depósitos da gordura, em andróide (com preferência no sexo masculino) e ginóide (com preferência no sexo feminino). Na obesidade andróide os depósitos de gordura ocorrem mais na região abdominal, na ginóide na região glúteo-femoral (BLOUIN et al., 2008). A localização e distribuição da adiposidade corporal é preditora de muitas das complicações resultantes da obesidade. Assim, a adiposidade visceral abdominal está associada a uma variedade de disfunções metabólicas, tais como resistência à insulina, hipertensão arterial, diabetes tipo-2 e dislipidemias (DEEB; CHESKIN, 2003).

O IMC caracteriza a massa corporal normal de indivíduos humanos quando entre 18,5-25,9 kg/m²; sobrepeso entre 25,0-29,9 kg/m² e obesidade quando o valor do IMC está acima de 30,0 kg/m². Embora o IMC seja uma caracterização de fácil obtenção, não há distinção entre os constituintes da massa corporal, como massa adiposa e massa magra. Paralelamente às determinações do IMC, medidas antropométricas têm sido utilizadas como indicadores de distribuição de adiposidade. A circunferência abdominal é fortemente relacionada com a

adiposidade visceral e está associada com alto risco para surgimento da síndrome metabólica (JOSEPH; RYAN, 2004), caracterizada por um conjunto de fatores que incluem: obesidade visceral, dislipidemias, hiperglicemia e hipertensão arterial (MACFARLANE, 2001).

3.8 Obesidade e Tecido Ósseo

Adipócitos e osteoblastos se originam de células mesenquimais cuja diferenciação é regulada tanto por meio da sinalização do PPAR- γ que promove adipogênese e inibe a osteogênese, quanto pela sinalização da Wnt (Wingless) que promove osteogênese e inibe adipogênese (HOLECKI; WIĘCEK, 2010). Justesen e colaboradores (2001) examinaram em autópsia de humanos de diferentes idades o osso normal e em estado de osteoporose, evidenciando que a adipogênese foi acentuada quando a osteogênese era diminuída. Ao mesmo tempo, os resultados indicaram que a adipogênese está associada com o fenótipo da osteoporose independente da idade (MULHOLLAND et al., 2005).

A relação entre obesidade e osteoporose foi documentada em estudo epidemiológico em humanos sendo a obesidade associada com força, massa e densidade óssea (LEONARD et al., 2004). A massa gorda e a massa magra têm demonstrado influência na densidade óssea, porque resultam em efeitos diversos. Estes incluem o efeito da massa gorda associada com massa magra sobre o carregamento esquelético, mas também indicam que a secreção de hormônios da célula pancreática β , como insulina, são associados com a secreção de hormônios adipocitários (REID, 2002). A variação da massa corporal sobre o osso induz a alteração na arquitetura interna e conformação externa que resulta em mudanças do processo de remodelação óssea (REID, 2002; REID, 2010). Embora todos componentes da massa corporal apresentem ações sobre a massa óssea, o osso responde mecanicamente às cargas externas dinâmicas e não às estáticas (FROST, 1983). Deste modo, quando a carga mecânica exercida pela massa magra é retirada a massa gorda torna-se negativamente relacionada com a massa (ZHAO et al., 2007) e o tamanho ósseo (TAES et al., 2009). Isto é evidente em indivíduos submetidos à imobilização ou ambiente de microgravidade onde há diminuição acentuada da massa óssea pela diminuição do estresse exercido pela massa magra (VICENTINI et al., 2007).

3.9 Leptina e Tecido Ósseo

A leptina é uma pequena proteína com 167 resíduos de aminoácidos sintetizada no tecido adiposo branco e está diretamente relacionada ao metabolismo energético. Assim, as concentrações de leptina são maiores em indivíduos obesos e aumentam com a superalimentação (AHIMA; FLIER, 2000). A relação leptina-gordura foi observada desde o período de desenvolvimento fetal no estudo de Clapp e Kiess (1998) no qual a concentração de leptina foi condicionada pelo desenvolvimento do tecido adiposo e acúmulo da massa adiposa. Adicionalmente, também há relação leptina-osso. Ogueh e colaboradores (1997) evidenciaram em amostras obtidas por cordocentese, associação inversa entre concentrações de leptina e marcador de reabsorção óssea. Esta relação também foi constatada em estudo *in vitro*, em que a leptina influenciou diretamente células mesenquimais favorecendo a diferenciação de osteoblastos (THOMAS et al., 1999).

As ações da leptina sobre o metabolismo energético e massa óssea são decorrentes da ação direta em osteoblastos ou adipócitos, e indireta através da ação de mediadores liberados por ativação de receptores hipotalâmicos (ELEFTERIOU et al., 2005). A ação indireta da leptina foi observada em estudo de Yadav e colaboradores (2009) que ao inibirem os receptores da serotonina no SNC, encontraram um quadro de anorexia e osteopenia. A serotonina, sintetizada no núcleo dorsal da rafe do tronco cerebral, ao se ligar a receptores Htr1a e Htr2b de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo foi responsável pela regulação do apetite e quando em ligação com receptores Htr2c em neurônios do núcleo ventromedial favoreceu o acúmulo de massa óssea. A leptina ao promover a redução de serotonina por meio da ligação ao seu receptor ObRb, localizado no núcleo da rafe, induz a diminuição do apetite e da massa óssea (YADAV et al., 2009).

A leptina regula o metabolismo ósseo por meio do sistema nervoso simpático (SNS) e CART (Transcrito regulado por cocaína e anfetamina) (TAKEDA et al., 2002). Quando liberada pelos adipócitos, a leptina aciona SNS e induz a liberação de noradrenalina, promovendo inibição da atividade osteoblástica, por aumentar a expressão de RANKL (COHEN, 2006). A expressão de RANKL é regulada por fosforilação, mediada pela proteína quinase A, de ATF4 (ELEFTERIOU et al., 2005). Por outro lado, a leptina inibe a reabsorção óssea via CART, um neuropeptídeo hipotalâmico codificado pelo gene *CARTPT* cuja expressão aumenta com o

aumento da leptina. CART inibe a atividade osteoclástica por inibição da expressão de RANKL, mas não apresenta ação sobre a formação óssea (ELEFTERIOU et al., 2005).

A ação da leptina sobre o osso é bimodal, assim, quando em baixas concentrações promove aumento da massa óssea e em altas concentrações há supressão da formação (THOMAS; BURGUERA, 2002, HAMRICK et al., 2009). Corroborando, Martin e colaboradores (2007), em seu estudo com ratos suspensos pela cauda, tratados com baixa concentração de leptina, não observaram a perda óssea esperada, diante do modelo experimental. Por outro lado, a concentração elevada de leptina suprimiu totalmente o ganho de densidade óssea associado com efeitos negativos na microarquitetura óssea, marcado pela menor conectividade trabecular.

3.10 Insulina e Tecido Ósseo

Fundamental para a homeostase da glicose, crescimento e diferenciação celular, a insulina é um hormônio protéico secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas. São funções da insulina reduzir a produção hepática de glicose (por meio da redução da gliconeogênese e glicogenólise) e especialmente nos tecido muscular e adiposo, estimular a captação de glicose periférica. Além disso, no fígado e nos adipócitos a insulina estimula a lipogênese e reduz a lipólise (CARVALHEIRA et al., 2002).

A ação da insulina é iniciada por meio da ligação ao receptor específico de uma glicoproteína localizada na superfície da membrana celular. O receptor de insulina é formado por duas subunidades alfa e duas subunidades beta. A subunidade alfa se liga ao hormônio. Na subunidade β estão os resíduos de tirosina que se autofosforilam em resposta a ligação do hormônio ao receptor. A fosforilação dos resíduos de tirosina resultará em sinais que atuarão sobre diferentes vias metabólicas (KAHN, 1995).

A captação de glicose é intermediada por transportadores SGLT (Sodium glucose cotransporters) e por diferentes GLUT's (Sodium glucose cotransporters). Uma das ações da insulina nos tecidos adiposo e muscular é promover a translocação do GLUT-4 do meio intracelular para a membrana plasmática. Alterações deste mecanismo podem resultar em resistência à ação da insulina (MACHADO et al., 2006).

No tecido ósseo, a insulina tem ação anabólica em condrócitos, pré-osteoblastos e osteoblastos, promovendo síntese de colágeno e proliferação de osteoblasto (DUARTE et al.,

2005). Adicionalmente, de acordo com Fulzele e colaboradores (2010), em experimento com camundongos, a sinalização insulínica é fundamental para a função osteoblástica considerando que a massa óssea reduzida é consequência da atenuada diferenciação e proliferação de osteoblastos em camundongos deficientes de IR (receptor de insulina). Ao se ligar ao seu receptor, a insulina estimula a diferenciação dos osteoblastos. Este mecanismo é realizado através da supressão de Twist2 (Twis-related protein 2) e FoxO1 (Forkhead Box O1), inibidores do Runx2, e também pela supressão da OST-PTP, que modula negativamente a ação da insulina nos osteoblastos (BIALEK et al., 2004).

A insulina também regula a reabsorção óssea. Esta regulação é devido a redução da relação OPG/RANKL e ao aumento da expressão de 2 genes expressos nos osteoclastos, relacionados com a reabsorção óssea, *Catepsina K* e o *Tcirg1* (T-cell, immune regulator 1). O *Tcirg1* codifica uma subunidade da bomba de próton, essencial para a acidificação da lacuna de reabsorção (BIALEK et al., 2004). Esta atividade de reabsorção óssea realizada pelo osteoclasto é a determinante para o início da carboxilação da osteocalcina. Paralelamente, a osteocalcina plasmática que permanece descarboxilada aumentará a sensibilidade dos tecidos à insulina e a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, além de aumentar a produção de adiponectina. Neste mecanismo cíclico a estimulação da diferenciação osteoblástica pela insulina estimula a produção de osteocalcina, que por sua vez será responsável por regular a secreção de insulina (LEE et al., 2007; HINOI et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 20 ratos, machos, com 3 meses de idade, da raça *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, escolhidos aleatoriamente, que foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Araçatuba. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no Laboratório de Biofísica da UNESP/Araçatuba.

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) - Protocolo 2008-002809.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais:

C - Grupo Controle - contendo 10 animais, mantidos em caixas próprias para animais experimentais (5 animais por caixa) com livre acesso à ração Purina- Labina[®] e água;

S - Grupo Sacarose - contendo 10 animais, mantidos similarmente ao grupo controle e suplementados com livre acesso à sacarose 30% (p/v).

A solução de sacarose foi preparada diariamente, utilizando-se água destilada. O período experimental foi de 8 semanas.

Componentes nutricionais ração Purina- Labina[®]:

- Magnésio – 0,006 mg; Ferro – 180 mg; Cobre – 30 mg; Zinco – 110 mg; Manganês – 110 mg; Iodo – 1 mg; Selênio – 0,2 mg; Cobalto – 2 mg; Vitamina A – 25.577 UI; Vitamina D3 – 4.000 UI; Vitamina E – 82 mg; Vitamina K – 6,40 mg; Ácido Fólico – 13 mg; Biotina – 0.16 mg; Colina – 2.800 mg; Niacina – 220 mg; Pantotenato de cálcio – 90 mg; Tiamina – 11 mg; Riboflavina – 12 mg; Piridoxina – vit. B6 HCl – 11 mg; Antioxidante – 200 mg; Ácido propiônico 1.486 mg; Umidade máxima – 13%; Proteína bruta (min.) – 23%; Extrato etéreo (min.) – 4%; Matéria fibrosa (max.) – 7%; Matéria mineral (max.) – 10%; Cálcio (máx.) – 1,30%; Fósforo (min.) – 0,85%.

4.3 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana utilizando-se balança digital de precisão 'Toledo' sendo a primeira determinação no início do experimento e a última mensuração no dia do sacrifício dos animais.

4.4 Consumo de Ração e Ingestão de Líquidos

Para o grupo C foram ofertados dois bebedouros contendo água. Para o grupo S foi ofertado um bebedouro contendo água e outro contendo solução de sacarose. Durante o período experimental, a ingestão de líquidos e o consumo de ração foram mensurados diariamente, no mesmo horário (9h). O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre o colocado inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle da ingestão de água e sacarose. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água, da solução de sacarose e da ração. Após 8 semanas todos os valores de consumo foram analisados e em equivalente em Kcal, obteve-se a média semanal do consumo energético por animal.

4.5 Glicemia

A glicemia dos animais foi avaliada por meio de glicofitas que foram lidas em glicosímetro Optium®, por meio de corte em região distal da cauda dos animais, realizada em jejum de 12 horas no dia do sacrifício dos animais.

4.6 Biometria

Após as oito semanas de tratamento, os animais em jejum de 12 horas foram anestesiados com ketamina (30mg/kg) e xilazina (3mg/kg) via intramuscular e a biometria foi realizada por meio de fita biométrica. Foram mensuradas a circunferência torácica, abdominal e comprimento do animal (naso-anal) (**Figura 1**).



Figura 1. Mensuração da circunferência torácica, abdominal e comprimento (naso-anal) dos animais experimentais. Fonte: BIFFE, B.G., 2011.

4.7 Tecido Adiposo Abdominal

O tecido adiposo abdominal dos animais dos grupos C e S foram retirados imediatamente após o sacrifício, colocados em papel alumínio para mensuração da massa em balança analítica (0,0001g).

4.8 Componentes Plasmáticos

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção na aorta abdominal resultando em sacrifício por exsanguinação. Foi utilizada heparina como anticoagulante.

O sangue foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada (2°C). O plasma foi fracionado e armazenado a -80°C para posterior determinação da concentração de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, leptina e insulina. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8.1 Cálcio

As determinações de cálcio foram realizadas por espectrofotometria (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reagiu com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta, que teve a absorbância determinada em 570 nm.

4.8.2 Fósforo

As determinações de fósforo foram realizadas por meio do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) modificado, utilizando kits comerciais, marca Labtest (Cat. 12). O fósforo inorgânico reagiu com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de um complexo fosfomolibdato não reduzido, que foi determinado em 340 nm.

4.8.3 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina foi determinada por meio de espectrofotometria, pelo método de Roy (1970) modificado, com o emprego de Kits da marca Labtest (Cat. 40), com reação de ponto final. O substrato utilizado foi tímoltaleína monofosfato.

4.8.4 Leptina

A leptina foi determinada por meio de ELISA, utilizando kit da empresa Millipore, Rat Leptin (Cat EZRL-83K). O protocolo seguiu as especificações do fabricante.

4.8.5 Insulina

A insulina foi quantificada por radioimunoensaio (RIE) por meio de kit (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) segundo as recomendações do fabricante.

4.9 Densitometria Óssea

A avaliação densitométrica foi realizada no início do experimento, na ocasião da separação dos grupos e após o sacrifício dos animais. Para a avaliação densitométrica inicial os animais foram anestesiados com administração de anestésico ketamina (30mg/kg) e xilazina (3mg/kg) via intramuscular. Posteriormente os animais foram posicionados craniocaudalmente e a tíbia alinhada com o feixe de luz do laser do aparelho (**Figura 2**) para início da captura da imagem (**Figura 3**). As tíbias foram submetidas à análise densitométrica por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR, com software especial para pequenos animais com alta resolução, sendo a estrutura óssea (tíbia) scaneada como um todo. Para a avaliação densitométrica final as tíbias foram desarticuladas e dissecadas. Os ossos foram submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida scaneados como um todo, capturando sua imagem (**Figura 4**). Posteriormente, as imagens iniciais e finais foram manualmente contornadas (**Figura 5**) para obtenção dos valores de área (cm²), conteúdo mineral ósseo – CMO (g) e densidade mineral óssea – DMO (g/cm²).

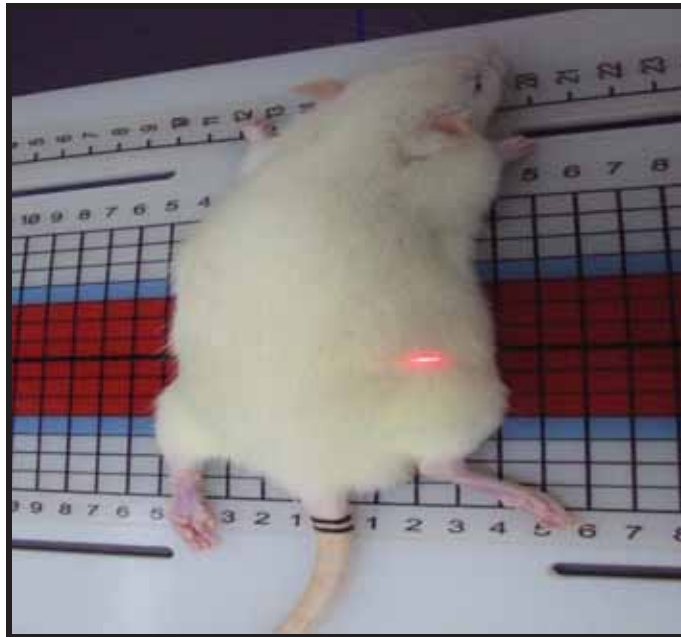


Figura 2. Imagem do animal posicionado para a realização da análise densitométrica inicial. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.



Figura 3. Captura da imagem da tíbia (análise inicial) pelo densitômetro ósseo usando software para pequenos animais. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.



Figura 4. Captura da imagem da tíbia (análise final) pelo densitometro ósseo usando software para pequenos animais. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

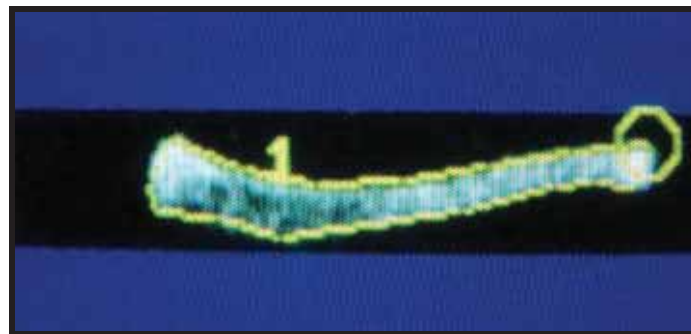


Figura 5. Tíbia (análise final) contornada como um todo para obtenção dos parâmetros densitométricos. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

4.10 Densidade Radiográfica

Os ossos foram radiografados com técnica de rotina para análise radiográfica em que em todas as tomadas radiográficas, uma escada de alumínio constituída por 9 degraus e utilizada como referencial densitométrico estava presente. Realizadas as tomadas radiográficas, os filmes foram levados a um scanner acoplado a um adaptador para transparência para a digitalização das imagens. As imagens foram digitalizadas com 200 DPIs (pontos por polegada) de resolução e armazenadas com extensão TIFF (tagged image file format) (Figura 6). Após, foram analisadas por meio do programa computacional Image J versão 1.43u (domínio público – <http://rbs.info.nih.gov/ij>). O programa computacional Image J foi utilizado para avaliar em tons

de cinza as imagens radiográficas das tíbias e dos degraus da escada de alumínio (LOUZADA, 2009).

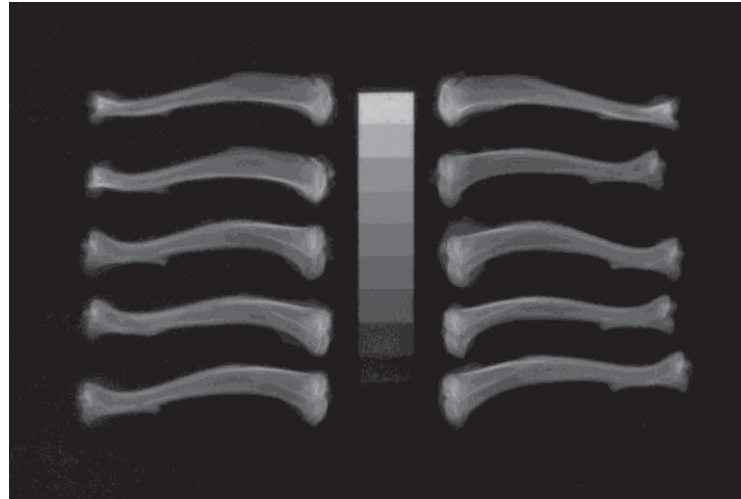


Figura 6. Tíbias radiografadas juntamente com uma escada padrão de alumínio para realização da análise de densidade radiográfica. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

4.11 Ensaio Biomecânico

As tíbias foram submetidas ao ensaio biomecânico destrutivo de flexão em três pontos (**Figura 7**) em máquina universal EMIC[®], modelo DL 3000 (pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA /UNESP-Araçatuba). A carga foi aplicada à velocidade de 5 mm/min e aplicação da força de 2000N. O osso foi apoiado em dois suportes (dois pontos) e a força aplicada em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (terço médio da tibia). Foi registrada a força máxima admitida. Com a curva força x deslocamento (**Figura 8**) calculou-se a rigidez (inclinação da curva na fase elástica) e a tenacidade (área sob a curva força x deslocamento). Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento.



Figura 7. Ensaio biomecânico de flexão em três pontos. Tibia apoiada em dois pontos e a força aplicada em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

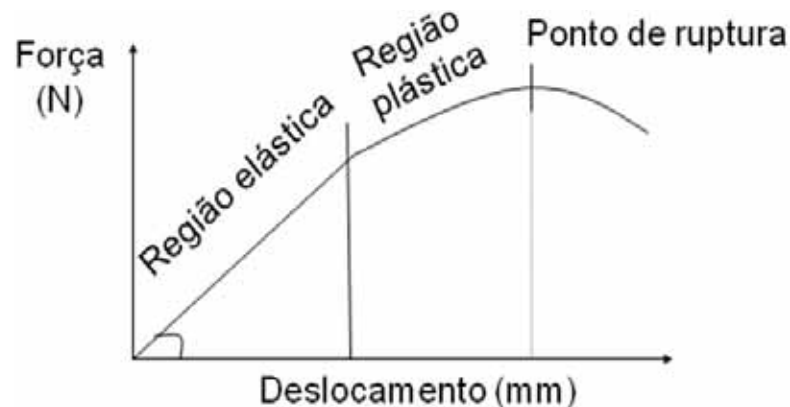


Figura 8. Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico.

4.12 Quantificação de Material Mineral Ósseo (Cinzas Ósseas)

A determinação da quantidade de material mineral foi realizada colocando-se os ossos em estufa durante 24 horas a uma temperatura de 100° C para a remoção da umidade. Em seguida, os ossos foram levados em mufla a 600°C, durante 6 horas, para a obtenção das cinzas. Após resfriamento em dessecador, as massas das cinzas foram obtidas utilizando-se balança de precisão (0,0001g).

4.13 *Microtomografia Óssea*

A microtomografia óssea foi realizada na EMBRAPA/São Carlos por meio de microtomógrafo computadorizado Skyscan 1172 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea. A região de interesse de osso trabecular foi manualmente interpolada; foram realizadas 100 slices (fatias) abaixo da placa de crescimento, com resolução de 12x12x12 μm (de acordo com TATSUMI et al., 2008). A tíbia foi posicionada craniocaudalmente para a análise. Os parâmetros analisados foram: BV/TV (%) - volume ósseo trabecular como porcentagem do volume tecidual; Tb.Th (μm) - espessura trabecular; Tb. N (1/mm) - número de trabéculas por milímetro de tecido e Tb. Sp (μm) - separação trabecular.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram apresentados como média e erro padrão da média. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 3.0. Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 *Massa Corporal*

A análise da massa corporal dos animais do grupo C revelou aumento gradual da massa corporal no decorrer de 8 semanas experimentais. Já o grupo S apresentou acentuado crescimento e significativa diferença estatística da massa corporal a partir da 5ª semana experimental ($p = 0,0460$) e após as 8 semanas de tratamento a diferença estatística foi mais expressiva ($p = 0,0021$) como pode ser observado no **Gráfico 1**. Os valores iniciais (1ª semana) da massa corporal foram $379,60 \pm 5,64\text{g}$ para grupo C e $385,20 \pm 8,52\text{g}$ para grupo S, não diferindo significativamente ($p = 0,5906$). Os valores finais da massa corporal (8ª semana) foram $417,60 \pm 8,01\text{g}$ para grupo C e $464,00 \pm 10,15\text{g}$ ($p = 0,0021$) para grupo S. Em relação à taxa de variação na massa corporal (massa da 8ª semana em relação à da 1ª semana), o grupo C apresentou menor variação, 9,98%, enquanto o grupo S apresentou 20,53% ($p < 0,0001$) (**Gráfico 2**). Esses dados são complementados com as médias dos valores do ganho de massa corporal por animal onde se

verifica que os animais do grupo C ganharam $38,00 \pm 3,94\text{g}$ e os animais do grupo S ganharam $78,80 \pm 5,04\text{g}$ ($p < 0,0001$) no decorrer das 8 semanas experimentais (Gráfico 3).

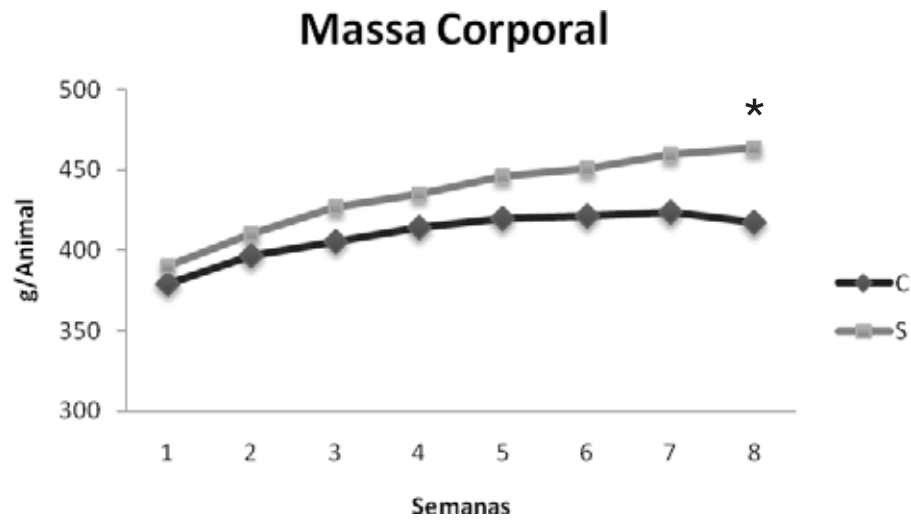


Gráfico 1. Massa corporal dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S) no decorrer de 08 semanas experimentais. *Anova seguido de teste de Tukey.

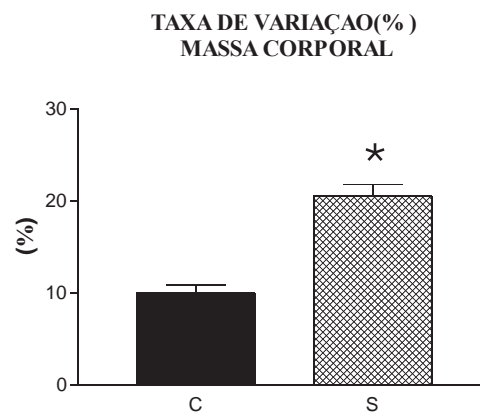


Gráfico 2. Média e erro padrão da média da taxa de variação da massa corporal dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S) em 08 semanas experimentais. *Teste t de Student ($p < 0,0001$).

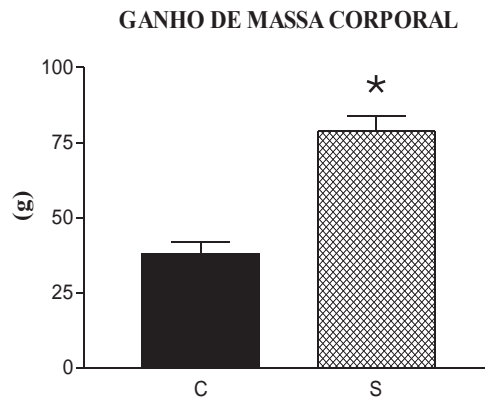


Gráfico 3. Média e erro padrão da média do ganho de massa corporal dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S) em 08 semanas experimentais ($p < 0,0001$).

6.2 Consumo de Ração e Ingestão de Líquidos

O consumo de ração por animal (semanal) (**Gráfico 4**) foi de $135,16 \pm 4,38$ g para C e $58,89 \pm 2,15$ g para S. A ingestão de água por animal (semanal) (**Gráfico 5**) foi de $305,29 \pm 6,88$ mL para C e $92,39 \pm 3,65$ mL para S. A ingestão de sacarose referente ao grupo S não foi somada ao consumo de água. A ingestão de sacarose por animal (semanal) foi $259,18 \pm 4,08$ mL (**Gráfico 5**). Para o teste estatístico somente foram considerados os valores de água dos grupos C e S.

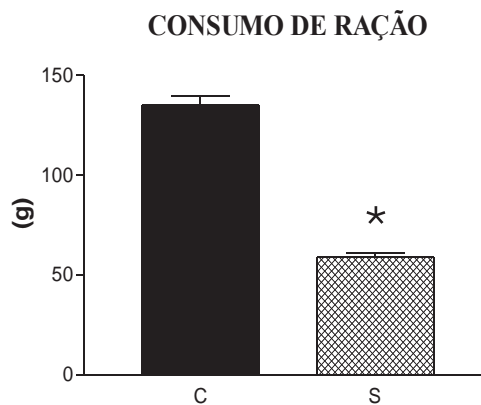


Gráfico 4. Média e erro padrão da média do consumo de ração (g) semanal por animal do grupo controle (C) e sacarose (S). *Teste t de Student ($p < 0,0001$).

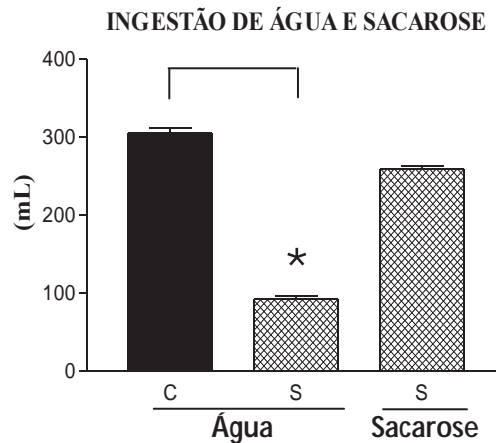


Gráfico 5. Média e erro padrão da média da ingestão de água (mL) semanal por animal do grupo controle (C) e grupo sacarose (S) - *Teste t de Student ($p < 0,0001$). Média e erro padrão da média da ingestão de sacarose (mL) semanal por animal do grupo S.

6.3 Consumo Energético

O grupo S apresentou maior consumo energético por animal (semanal) em relação ao grupo C apresentando diferença estatisticamente significativa ($P=0,0177$) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores do consumo energético semanal (Kcal) por animal do grupo controle (C) e sacarose (S).

Consumo Energético(Kcal)	
C	S
473,07±15,35	517,15±5,77*

Valores expressos em média e erro padrão da média.
*Teste t de Student ($p=0,0177$).

6.4 Glicemia

A média da glicemia obtida no dia do sacrifício apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0228$). A glicemia para o grupo C foi de $80,20 \pm 3,64$ mg/dL e $99,30 \pm 3,22$ mg/dL para o grupo S (Gráfico 6).

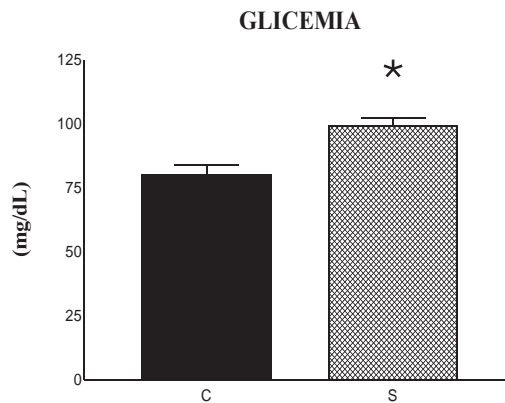


Gráfico 6. Média e erro padrão da média da determinação da glicemia realizada nos animais do grupo controle (C) e sacarose (S) no dia do sacrifício. *Teste t de Student ($p=0,0228$).

6.5 Biometria

O grupo C e S apresentaram $17,66 \pm 0,269$ cm e $17,12 \pm 0,174$ cm no parâmetro circunferência torácica, respectivamente. Para os valores de circunferência abdominal o grupo C apresentou $18,92 \pm 0,271$ cm e o grupo S $19,51 \pm 0,340$ cm. O valor do comprimento (naso-anal) do grupo C foi $24,26 \pm 0,035$ cm e $23,07 \pm 0,020$ para o grupo S. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos quando comparados os valores de circunferência torácica ($p=0,1774$), abdominal ($p=0,1922$) e comprimento ($p=0,1197$) dos animais (**Gráfico 7**).

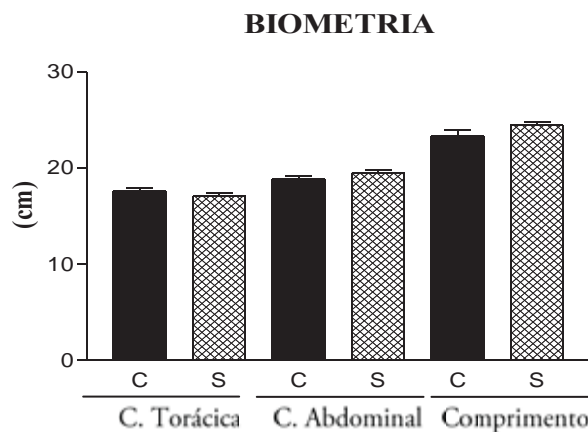


Gráfico 7. Média e erro padrão da média das variáveis da biometria: circunferência torácica, abdominal e comprimento dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

6.6 Tecido Adiposo Abdominal

A ingestão de sacarose promoveu aumento significativo na massa do tecido adiposo abdominal sendo verificado massa de $5,76 \pm 0,792\text{g}$, para grupo C (Figura 9), e $11,08 \pm 1,25\text{g}$, para grupo S (Figura 10) (Gráfico 8) ($p=0,0021$).

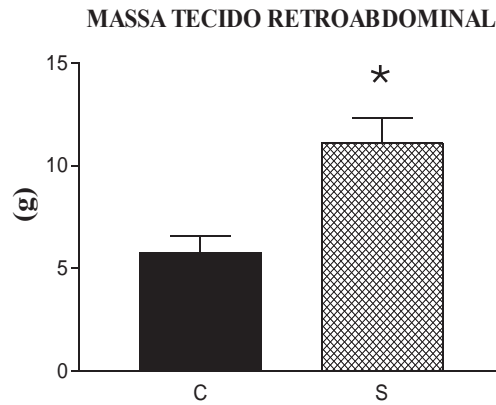


Gráfico 8. Massa do tecido adiposo abdominal dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S) depois de 08 semanas experimentais. Valores expressos em média e erro padrão da média *Teste t de Student ($p= 0,0021$).

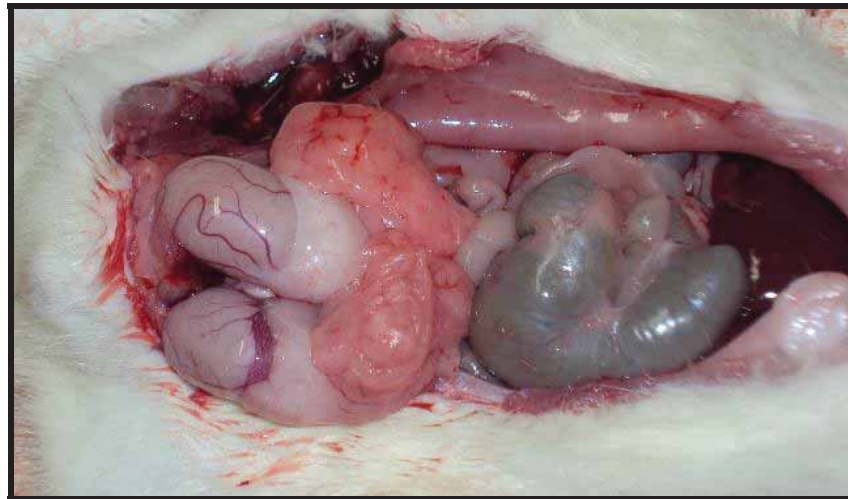


Figura 9. Imagem do tecido adiposo abdominal de um animal do grupo C. Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

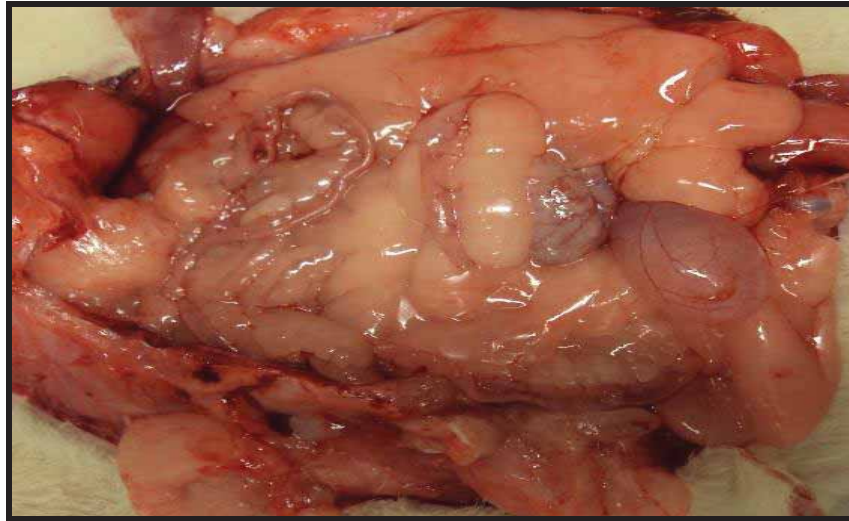


Figura 10. Imagem do tecido adiposo abdominal de um animal do grupo S.
Fonte: BIFFE, B.G.,2011.

6.7 Componentes Plasmáticos

6.7.1 Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina

As concentrações plasmáticas de cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL) e fosfatase alcalina (U/l) não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Cálcio ($p=0,4479$), fósforo ($p=0,6194$) e fosfatase alcalina($p=0,8541$) (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração plasmática de cálcio (mg/dL), fósforo (mg/dL) e fosfatase alcalina (U/l) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).

	Concentração Plasmática		
	Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	Fosfatase Alcalina (U/l)
C	9,90±0,27	5,82±0,17	67,33±4,75
S	9,59±0,27	5,65±0,26	68,67±5,05

Valores expressos em média e erro padrão da média.

6.7.2 Leptina e Insulina

A média das concentrações plasmáticas de leptina foi maior no grupo S apresentando diferença estatística ($p=0,0022$). A média das concentrações de insulina não apresentou diferença estatística ($p=0,3059$) entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração plasmática de leptina(mg/dL) e insulina(μ U/mL) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).

	Concentração Hormonal	
	Leptina (mg/dL)	Insulina (μ U/mL)
C	9,56 \pm 0,98	3,04 \pm 0,73
S	24,70 \pm 3,40*	3,87 \pm 0,79

Valores expressos em média e erro padrão da média. * Teste t de student (p=0,0022).

6.8 Densitometria Óssea

6.8.1 Densitometria Óssea Inicial

A análise de densitometria óssea inicial realizada no primeiro dia experimental não apresentou diferença significativa nos parâmetros CMO (p=0,8819), área (p=0,3488) e DMO (p=0,5678) entre os grupos. Os valores densitométricos iniciais de CMO foram 0,246 \pm 0,007g para o grupo C e 0,245 \pm 0,008g para o grupo S (Gráfico 9). O grupo C apresentou área de 1,416 \pm 0,032cm² e o grupo S área de 1,370 \pm 0,035cm² (Gráfico 10). A DMO para o grupo C foi de 0,176 \pm 0,001g/cm² e 0,179 \pm 0,005g/cm² para grupo S (Gráfico 11).

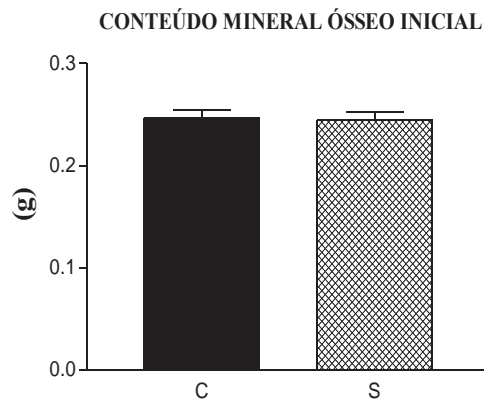


Gráfico 9. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea inicial, variável conteúdo mineral ósseo, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

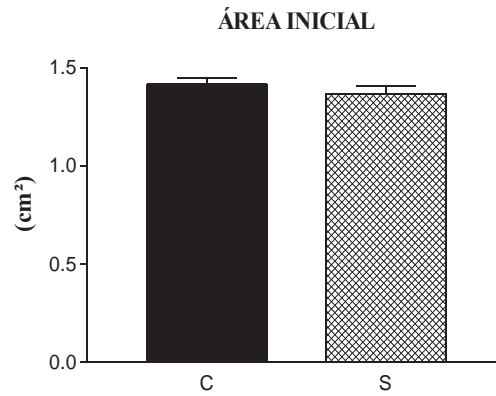


Gráfico 10. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea inicial, variável área, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

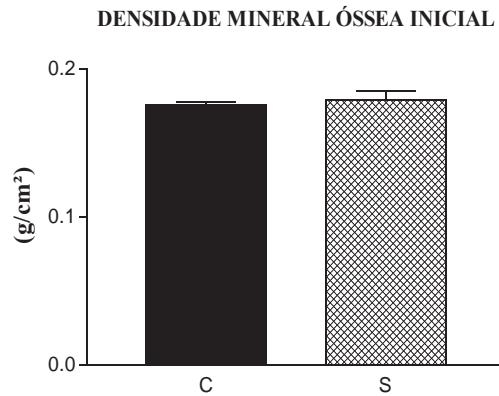


Gráfico 11. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea inicial, variável densidade mineral óssea, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

6.8.2 Densitometria Óssea Final

A análise de densitometria óssea final realizada após o sacrifício dos animais não acusou diferença significativa nas variáveis CMO ($p=0,7917$), área ($p=0,1265$) e DMO ($p=0,1696$) entre os grupos. Os valores densitométricos finais de CMO foram $0,309\pm 0,004\text{g}$ para o grupo C e $0,311\pm 0,006\text{g}$ para o grupo S (**Gráfico 12**). O grupo C apresentou área de $1,575\pm 0,003\text{cm}^2$ e o grupo S área de $1,647\pm 0,031\text{cm}^2$ (**Gráfico 13**). A DMO para o grupo C foi de $0,197\pm 0,004\text{g/cm}^2$ e $0,189\pm 0,003\text{g/cm}^2$ para grupo S (**Gráfico 14**).

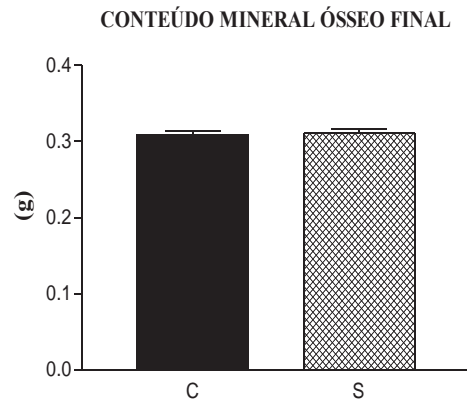


Gráfico 12. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea final, variável conteúdo mineral ósseo, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

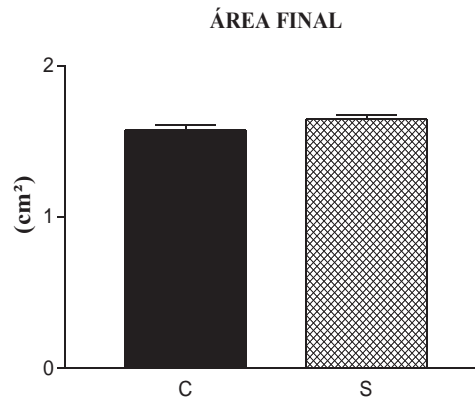


Gráfico 13. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea final, variável área, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

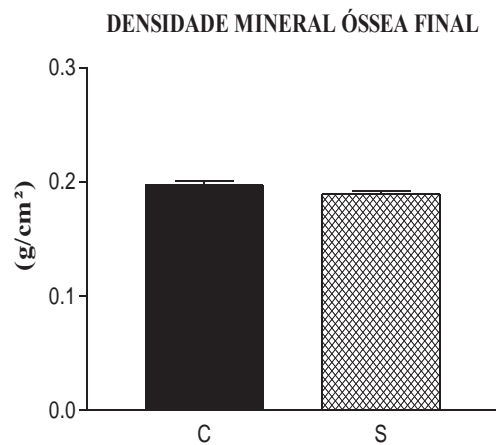


Gráfico 14. Média e erro padrão da média da análise de densitometria óssea final, variável densidade mineral óssea, dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

6.8.3 Densitometria Inicial vs Final

O grupo C apresentou diferença significativa das variáveis CMO ($p < 0,0001$) (**Gráfico 15**), área ($p = 0,0026$) (**Gráfico 16**) e DMO ($p = 0,0002$) (**Gráfico 17**) na comparação inicial vs final. Os valores iniciais e finais de CMO foram $0,246 \pm 0,007g$ e $0,309 \pm 0,004g$, respectivamente. A área inicial e final foram $1,416 \pm 0,032cm^2$ e $1,575 \pm 0,003cm^2$, respectivamente. A DMO inicial e final foram $0,176 \pm 0,001g/cm^2$ e $0,197 \pm 0,004g/cm^2$, respectivamente.

O grupo S apresentou diferença significativa das variáveis CMO ($p < 0,0001$) (**Gráfico 15**), área ($p < 0,0001$) (**Gráfico 16**) e não apresentou diferença significativa da variável DMO ($p = 0,1397$) (**Gráfico 17**) na comparação inicial vs final. Os valores iniciais e finais de CMO foram $0,245 \pm 0,008g$ e $0,311 \pm 0,006g$, respectivamente. A área inicial e final apresentada foi $1,370 \pm 0,035cm^2$ e $1,647 \pm 0,031cm^2$, respectivamente. A DMO inicial e final foram $0,179 \pm 0,005g/cm^2$ e $0,189 \pm 0,003g/cm^2$, respectivamente.

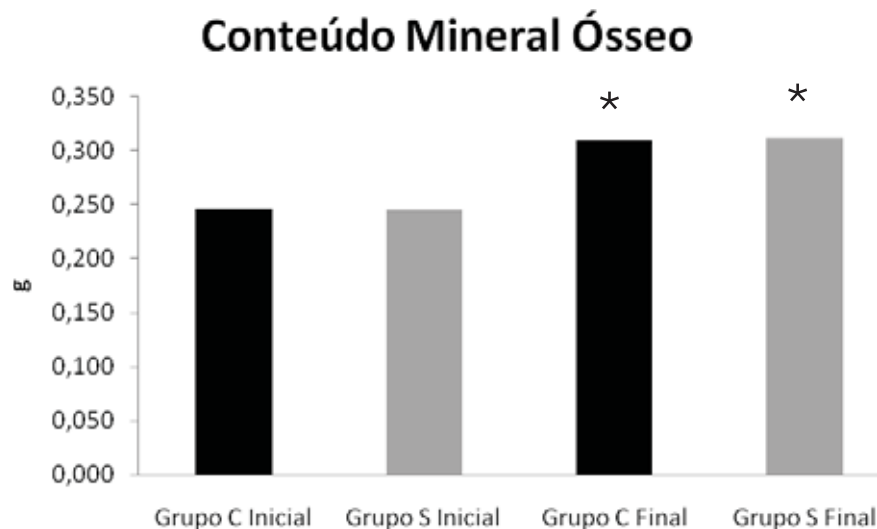


Gráfico 15. Média da análise de densitometria óssea inicial vs final, variável conteúdo mineral ósseo (CMO), dos animais do grupo controle e sacarose.

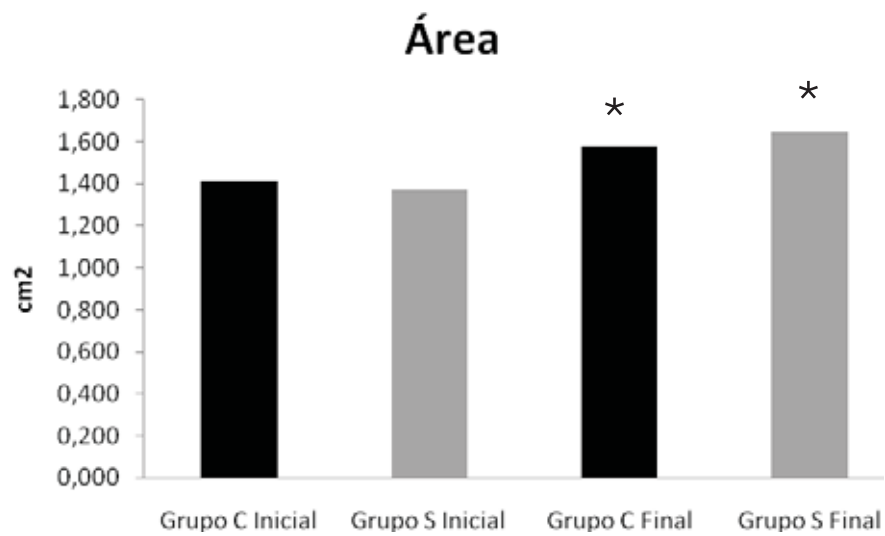


Gráfico 16. Média da análise de densitometria óssea inicial vs final, variável área, dos animais do grupo controle e sacarose.

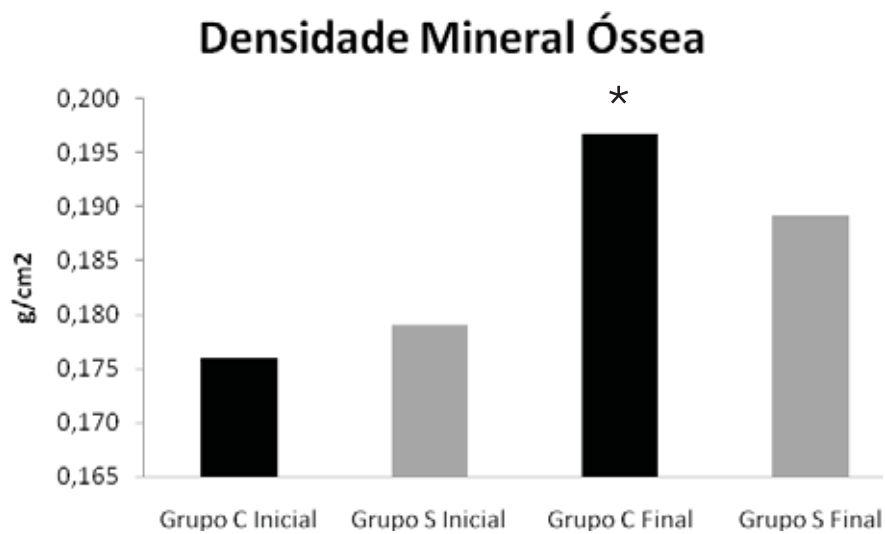


Gráfico 17. Média da análise de densitometria óssea inicial vs final, variável densidade mineral óssea (DMO), dos animais do grupo controle e sacarose.

6.9 Densidade Radiográfica

O valor da análise da densidade radiográfica (mmAl) no osso tíbia apresentou-se maior no grupo C em relação ao grupo S acusando diferença estatisticamente significativa ($p=0,0084$) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da análise da densidade radiográfica dos animais do grupo controle (C) e sacarose (S).

Densidade Radiográfica (mmAl)	
C	S
2,426±0,11	2,307±0,07*

Valores apresentados em média e erro padrão da média. *
Teste t de student (p=0,0084).

6.10 Ensaio Biomecânico

As variáveis do ensaio biomecânico (força máxima (N), rigidez (10^3N/m) e tenacidade (10^{-3}N.m) da tíbia, avaliada por meio do ensaio de flexão em 3 pontos, não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Força máxima (p=0,5477), rigidez (p=0,6354) e tenacidade (p=0,8919) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores dos parâmetros do ensaio biomecânico: Fmáx (força máxima), rigidez e tenacidade do terço médio do osso tíbia dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).

Parâmetros	C	S
Fmáx (N)	94,94±3,41	97,57±2,58
Rigidez (10^3 N/m)	197,49±10,30	203,13±5,53
Tenacidade (10^{-3} N.m)	91,13±6,31	89,91±6,23

Valores apresentados em média e erro padrão da média.

6.11 Material Mineral Ósseo (Cinzas Ósseas)

A quantidade de material mineral ósseo da tíbia apresentou-se menor no grupo S em relação ao grupo C apresentando diferença estatisticamente significante (p=0,0034) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de material mineral ósseo (cinzas ósseas) dos animais do grupo controle (C) e grupo sacarose (S).

Cinzas Ósseas (g)	
C	S
0,182±0,004	0,151±0,008*

Valores apresentados em média e erro padrão da média.
* Teste t de student (p=0,0034).

6.12 Microtomografia Óssea

A média de BV/TV (volume ósseo trabecular como porcentagem do volume tecidual) para o grupo C foi $79,42 \pm 1,97\%$ e $71,12 \pm 2,16\%$ para S, acusando significativa diferença estatística ($p= 0,0149$) (**Gráfico 18**). Para a variável Tb.Th (espessura trabecular), o grupo C apresentou $443,18 \pm 44,71 \mu\text{m}$ e o grupo S $285,61 \pm 28,96 \mu\text{m}$, acusando diferença estatística ($p= 0,0120$) (**Gráfico 19**). A variável Tb.N (número de trabéculas) não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p= 0,0645$) (**Gráfico 20**). O valor de Tb.N para o grupo C foi $1,93 \pm 0,16(1/\text{mm})$ e $2,53 \pm 0,24(1/\text{mm})$ para S. Para a variável Tb.Sp (separação trabecular), o grupo C apresentou $104,77 \pm 2,67 \mu\text{m}$ e grupo S $116,99 \pm 1,69 \mu\text{m}$ com significância estatística ($p=0,0023$) (**Gráfico 21**). Estes resultados podem ser evidenciados na reconstrução tridimensional da microarquitetura óssea em que se observa maior conectividade trabecular no grupo C (**Figura 11**), enquanto o grupo S apresentou maior porosidade trabecular (**Figura 12**).

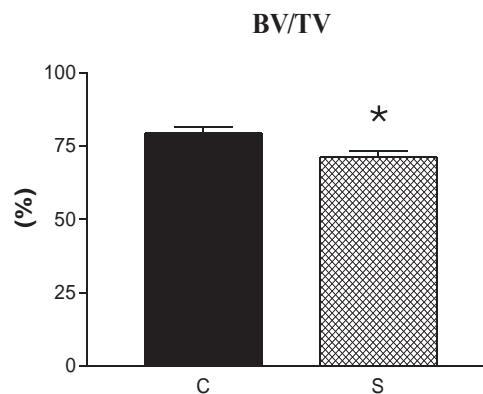


Gráfico 18. Análise de microtomografia óssea, variável BV/TV% (volume ósseo trabecular) dos animais do grupo Controle (C) e sacarose (S). Valores apresentados em média e erro padrão da média. *Teste t de Student ($p=0,0149$).

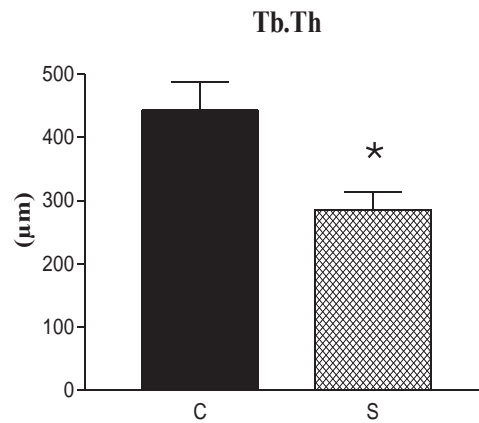


Gráfico 19. Análise de microtomografia óssea, variável Tb.Th (μm) – (espessura trabecular) dos animais do grupo Controle (C) e sacarose (S). Valores apresentados em média e erro padrão da média *Teste t de Student ($p=0,0120$).

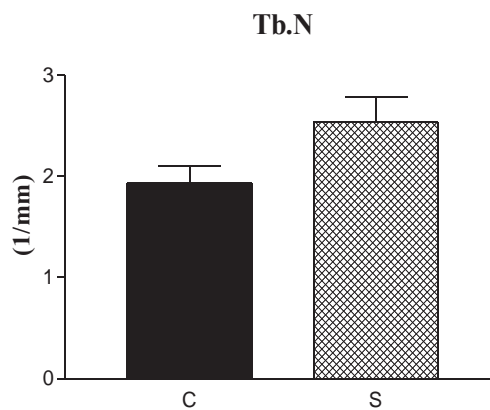


Gráfico 20. Análise de microtomografia óssea, variável Tb.N (1/mm) – (número trabecular) dos animais do grupo Controle (C) e sacarose (S). Valores apresentados em média e erro padrão da média *Teste t de Student ($p=0,0645$).

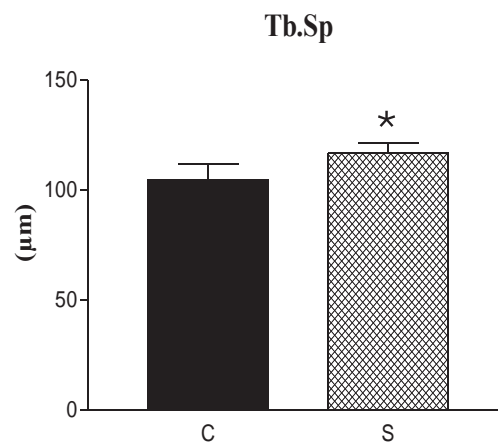


Gráfico 21. Análise de microtomografia óssea, variável Tb.Sp (μm) – (separação trabecular) dos animais do grupo Controle (C) e sacarose (S). Valores apresentados em média e erro padrão da média *Teste t de Student ($p=0,0023$).

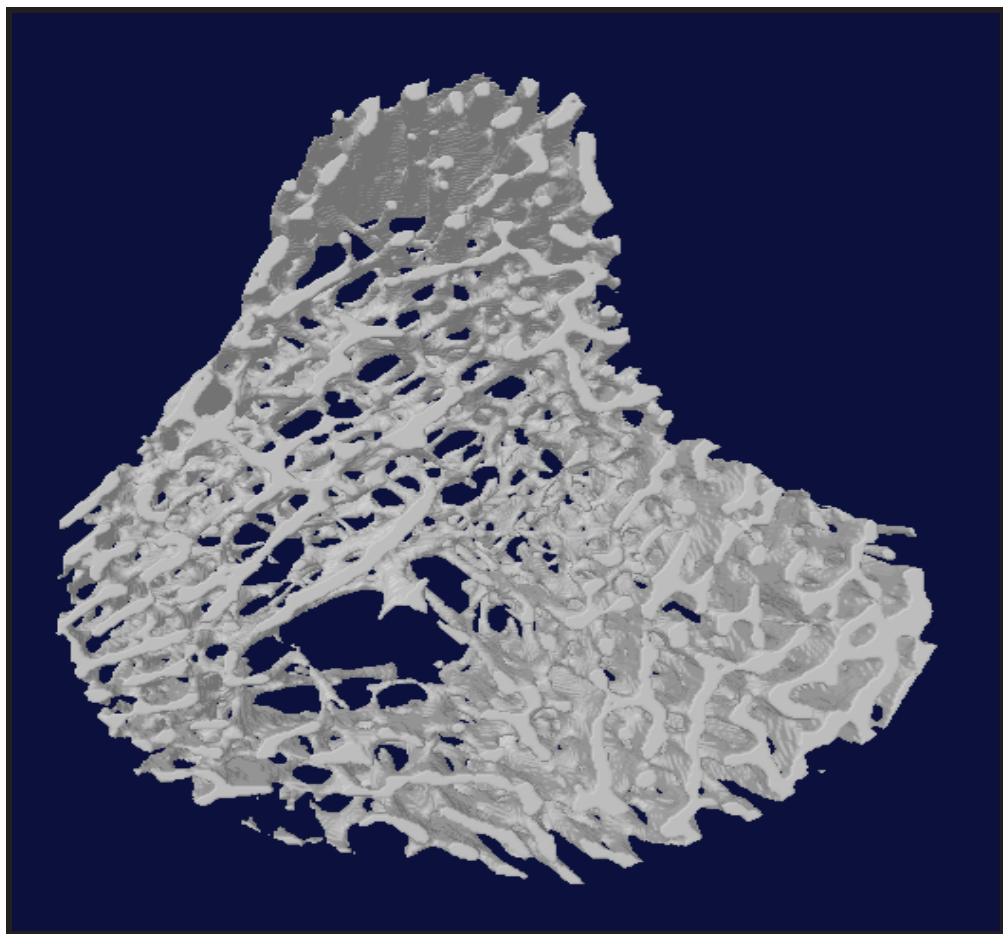


Figura 11. Reconstrução tridimensional da microarquitetura óssea de um animal do grupo C.

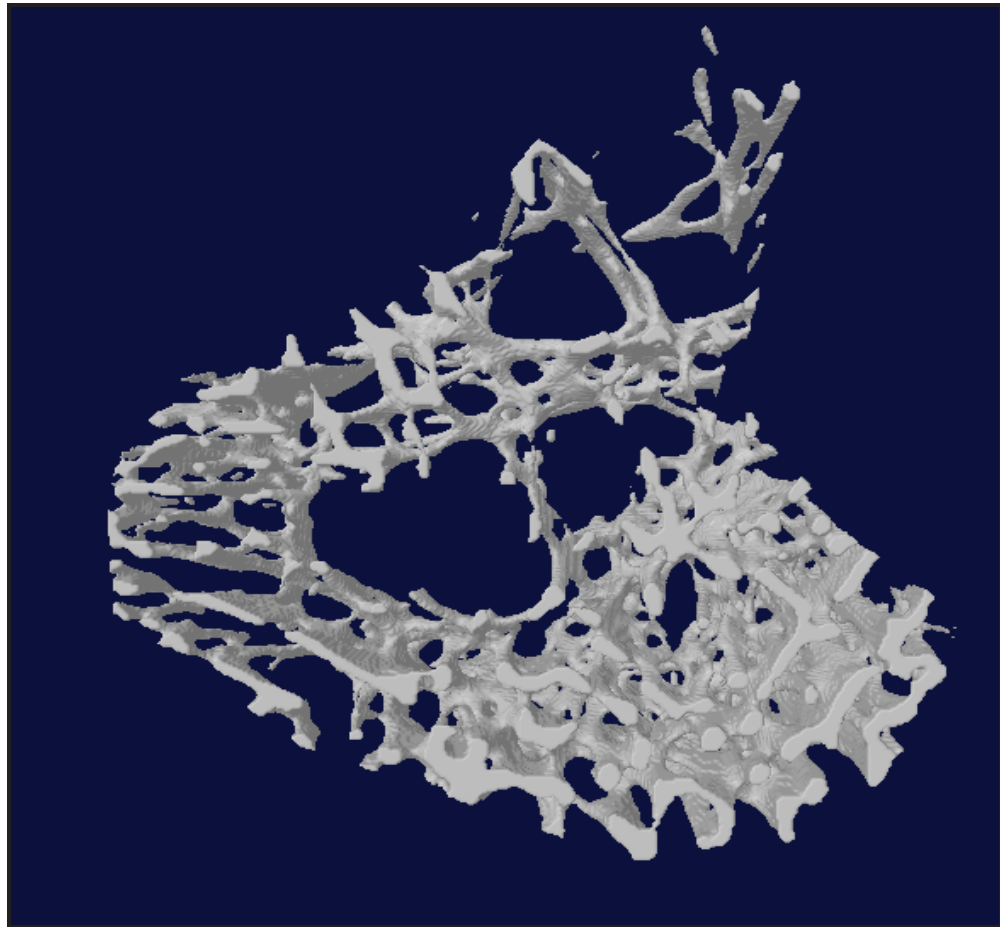


Figura 12. Reconstrução tridimensional da microarquitetura óssea de um animal do grupo S.

7 DISCUSSÃO

Nesse estudo, análises ósseas de ratos Wistar submetidos à dieta rica em sacarose (S) foram comparados aos de animais controle (C) sendo evidenciadas alterações em parâmetros distintos, que influenciaram diretamente o metabolismo ósseo. Possivelmente uma complexa e interativa via endócrina esteja regulando a remodelação óssea por meio do metabolismo energético sendo sugerida para explicar em grande parte os resultados encontrados nesse estudo.

A obesidade por meio de dieta rica em sacarose foi alcançada conforme pode ser observada pela diferença estatística no ganho e variação da massa corporal nos animais do grupo S e corroborando diversos achados da literatura (KANAREK; ORTHEN-GAMBILL, 1982; NOVELLI et al., 2007; MA et al., 2011; SCLAFANI; XENAKIS, 1984; SORIA et al., 2001).

Em associação com o aumento da massa corporal foi evidenciada mudança no comportamento alimentar nos animais do grupo S que reduziram o consumo de ração e passaram

a ingerir sacarose, o que de acordo com Sclafani e Xenakis (1984) e Novelli e colaboradores (2007) pode ser explicado pela elevada palatabilidade da sacarose, pois sabe-se que este fator tem grande relevância para explicar o aumento da ingestão desse carboidrato. A ingestão de sacarose associada ao consumo de ração potencializou o ganho de massa corporal e está de acordo com os achados de Sclafani e Xenakis (1984). Além disso, a menor eficiência dos líquidos em promover a saciedade quando comparados com alimentos sólidos (MATTEI, 1996), contribuiu para o maior consumo de calorias, que resultou na obesidade.

O aumento significativo da massa adiposa abdominal foi evidenciado nos animais tratados com sacarose, como já era esperado em função da idade dos animais deste trabalho. Como já sabido ratos mais velhos são mais suscetíveis ao aumento da massa corporal (NOVELLI et al., 2007; SCLAFANI; XENAKIS, 1984). Por outro lado, o tempo de tratamento também desempenha um papel importante na indução da obesidade (SORIA, 2001). Os resultados desse estudo demonstraram que o tratamento por 8 semanas com sacarose a 30% foi adequado para a indução desta condição.

O aumento da massa adiposa possivelmente poderia ser explicado através da interrelação metabólica que envolve tecido adiposo, pâncreas e osso. Como já elucidado a osteocalcina descarboxilada, produzida pelo osso, é considerada uma importante reguladora da deposição de gordura (FERRON et al., 2008; FULZELE et al., 2010, LEE et al., 2007, NG, 2011), como comprovado em animais modificados geneticamente com ausência do receptor de osteocalcina. Nesses animais evidenciou-se acúmulo de gordura, intolerância à glicose e resistência à insulina (LEE et al., 2007). Por sua vez, a concentração plasmática de osteocalcina descarboxilada é dependente da secreção de insulina e, desta forma, reduzida ação da insulina afetará o metabolismo da osteocalcina, promovendo menor liberação desta para a circulação. Como resultado, ocorre aumento do acúmulo de gordura e redução do gasto energético (NG, 2011).

O aumento significativo da massa adiposa abdominal encontrado no grupo S não foi acompanhado de elevações nos valores de circunferência abdominal uma vez que essa apresentou-se com valor similar ao do grupo C, contrastando com os achados de Novelli e colaboradores (2007) nos quais a circunferência abdominal apresentou significativo aumento no grupo tratado. Também foi observado por esses autores, aumento significativo da circunferência torácica o que contrasta com os resultados desse estudo. As divergências com os resultados deste estudo podem

ser atribuídas à diferença na idade e no tempo de tratamento dos animais. Apesar da discrepância com relação a circunferência abdominal e torácica, quando analisado o comprimento do animal o resultado está de acordo com Novelli e colaboradores (2007), não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos.

No presente estudo, houve diferença significativa da concentração sanguínea de leptina no grupo S, que pode ser relacionado ao aumento da massa corporal, em concordância com diversos achados da literatura (HOLEMANS et al., 2004; KIM et al., 1999; MA et al., 2011). Embora a produção da leptina possa ser evidenciada em diferentes órgãos (TRAYHURN, 2005) sua produção e secreção são predominantes no tecido adiposo (LEE et al., 2007, FERRON et al., 2008). Em concordância com diversos estudos (HOLEMANS et al., 2004; KIM et al., 1999; MA et al., 2011) e como evidenciado nos animais do grupo S deste estudo, o aumento de massa corporal foi acompanhado pelo aumento do tecido adiposo, que ocasionou diferença estatística da concentração da leptina.

A elevação da leptina plasmática pode, em partes, explicar a redução da ingestão de alimento sólido, uma vez que resulta em inibição da serotonina. Esse polipeptídeo regula positivamente o apetite ao se ligar aos receptores Htr1a e Htr2b do núcleo arqueado do hipotálamo, e sua inibição associada à elevação da leptina resultariam em menor apetite (KARSENTY; OURY, 2010; YADAV et al., 2009). Nos animais do grupo S desse estudo o consumo da alimentação sólida (ração) foi reduzido o que sugere mediação da leptina, embora tenha havido grande consumo energético devido à elevada ingestão de sacarose, explicável pela palatabilidade.

Como já visto a resposta óssea à leptina parece ser dependente da concentração (MARTIN et al, 2007; THOMAS; BURGUERA, 2002) e alterações na concentração de leptina podem estar relacionadas ao aumento da remodelação óssea evidenciado por outros autores (DUCY et al., 2000; KONTOGIANNI et al., 2004) e também nesse trabalho, nos animais que consumiram sacarose. A leptina, por meio da redução da serotonina, realiza essa mediação (YADAV et al., 2009) reduzindo o acúmulo de massa óssea por favorecer a expressão de RANKL (ELEFTERIOU et al., 2005).

No presente trabalho, a concentração de insulina apresentou discreto aumento no grupo S. Com o aumento do tecido adiposo, evidenciado neste grupo, era esperado aumento significativo

da concentração de insulina (MORIOKA et al., 2007). No entanto, a elevada concentração de leptina pode ter sido responsável pela regulação da secreção de insulina, o que minimizou sua atividade. Esse resultado está de acordo com o estudo de HINOI e colaboradores (2008), que sugerem três mecanismos intermediados pelo aumento da concentração da leptina para essa regulação, aumento da atividade simpática, aumento da expressão do gene *ESP* e diminuição da bioatividade da osteocalcina (HINOI et al., 2008).

A leptina modula positivamente o SNS, via receptores β_2 adrenérgicos, através da fosforilação de ATF4, por meio da proteína quinase A (ELEFTERIOU et al., 2005). ATF, além de favorecer a expressão de RANKL (ELEFTERIOU et al., 2005) também modula a sinalização da insulina via *ESP*, aumentando a expressão de OST-PTP (HINOI et al., 2008) o que ocasionará em redução da ação da insulina (YOSHIZAWA et al., 2009)

Insulina atua na osteogênese e alterações na produção e na secreção desse hormônio resultam em alterações ósseas (FULZELE et al., 2010; LEE et al., 2007). A redução na atividade da insulina resultará em maior expressão de Twist2, diminuindo diretamente a atividade de Runx2 (NG, 2011). Adicionalmente, há expressão de FoxO1, que potencializa a redução da atividade da insulina uma vez que é associado com a repressão da ação da insulina em tecidos alvos (ACCILI; ARDEN, 2004). Embora algumas análises citadas acima não tenham sido realizadas nesse estudo, ambas as ações referenciadas poderiam justificar a redução de massa óssea obtida neste trabalho, acompanhada por aumento da concentração de leptina e ausência do esperado aumento significativo da insulinemia.

Alterações na concentração de insulina, mesmo que discretas, foram relacionadas com prejudicada reabsorção de cálcio (HOLL; ALLEN, 1987). Esse mecanismo também foi sugerido por Tjäderhane e Larmas (1998) para explicar o desequilíbrio de minerais observado nos animais submetidos à dieta rica em sacarose de seu estudo. Embora entre os grupos C e S deste estudo não tenham sido evidenciadas diferenças significantes nas concentrações de cálcio e fósforo plasmático, foi constatada diferença na quantidade de cinzas, após a calcinação dos ossos, o que evidenciaria menor mineralização óssea no grupo S.

Outro mecanismo intermediado pela leptina é a diminuição da bioatividade da osteocalcina. Essa ação ocorre por atenuação da expressão de *Catepsina K* e *Tcirg1* (FERRON et al., 2010). Por consequência há menor liberação de osteocalcina descarboxilada para a circulação

sistêmica resultando em diminuição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas e adiponectina pelos adipócitos, afetando o metabolismo energético e ósseo (NG, 2011). Essas alterações podem explicar os resultados observados nos animais do grupo S deste estudo, uma vez que a concentração de insulina observada neste grupo foi menor que a esperada. Esse achado associa-se ao expressivo acúmulo de massa adiposa abdominal nos animais do referido grupo, que resultaria da redução do gasto energético. Ao mesmo tempo, os valores evidenciados para as variáveis da microtomografia sugerem que o metabolismo ósseo foi possivelmente afetado por essa regulação.

Os animais do grupo S apresentaram diferença estatística significativa da glicemia quando comparados com animais do grupo C. Isso se deve a reduzida atividade da insulina culminando em menor capacidade de absorção de glicose pelos tecidos alvos (FULZELE, ET AL., 2010). Apesar do aumento da glicemia em resposta ao tratamento com sacarose não foi configurado um estado hiperglicêmico, pelo menos no estado de jejum, como descrito por outros autores (DANTAS et al., 2006). Na literatura, a alta concentração de glicose foi associada com inibição da diferenciação osteogênica e ativação da diferenciação adipogênica (HAMRICK, et al., 2009; TERADA et al., 1998). Nesse estudo, apesar de não ter sido caracterizada hiperglicemia o tecido ósseo e o tecido adiposo tiveram seu metabolismo modificado, sugerindo que essas alterações podem estar relacionadas com o aumento observado na glicemia.

No presente trabalho, foi realizada a densitometria óssea do osso inteiro no início e ao final do experimento. Na avaliação inicial, com animais sedados, não foram evidenciadas diferenças significantes para as variáveis CMO, área e DMO entre os grupos. Semelhantemente, após o período experimental a densitometria também não acusou diferença em nenhuma das variáveis. Contudo, quando foram comparados os valores de CMO, área e DMO iniciais aos valores obtidos ao final do tratamento, em um mesmo grupo experimental, foram observadas diferenças em todas as variáveis do grupo C, mas não para a variável DMO do grupo S. Na literatura é encontrado que o tecido ósseo apresenta contínuo crescimento (FROST, 1983) ajustando sua massa óssea para suportar a tensão, estabelecida principalmente pela massa corporal (REID, 2002; ZHAO et al., 2007). Portanto, a ausência de alteração na DMO durante o experimento indica que a dieta rica em sacarose ocasionou em maior CMO, com acentuado ganho de área de tal maneira que a DMO se manteve constante.

Deve-se destacar a relevância da avaliação realizada no início do experimento, com os animais vivos, que possibilitou o acompanhamento da variação de CMO, área e DMO durante o período experimental. Se fossem realizadas as análises somente ao final do experimento, os dados da densitometria poderiam ter sido mascarados, uma vez que a análise final entre os grupos não apresentou diferença no osso inteiro, que só pôde ser constatada quando realizada a comparação inicial vs final, no mesmo grupo. Adicionalmente, a densidade radiográfica, técnica utilizada para avaliação da variação da massa óssea (LOUZADA, 2009) realizada no osso inteiro evidenciou menor densidade (em milímetros de alumínio) no grupo S, sugerindo que a dieta rica em sacarose promove redução da densidade óssea e que a qualidade do tecido está diminuída.

Alguns estudos apontam que o aumento da DMO é proporcional ao aumento da massa corporal, acusando efeito positivo da obesidade na densidade óssea (COBAYASHI et al., 2005; LEWIN et al., 1997) e no tamanho dos ossos (BLAIN et al., 2002). Lewin e colaboradores (1997) evidenciaram que mulheres mais magras atingem a DMO máxima mais tardiamente, comparadas com mulheres da mesma idade, mas com maior massa corporal. Resultado semelhante foi encontrado em adolescentes obesos em que a prevalência de densidade óssea acima da mediana foi acentuada, admitindo influência positiva da obesidade na massa óssea (COBAYASHI et al., 2005). Todavia, em concordância com nosso trabalho, um estudo realizado em longo prazo (2 anos) envolvendo ratas induzidas à obesidade com dieta rica em sacarose, evidenciou negativa influência da dieta em diferentes parâmetros ósseos (ZERNICKE et al., 1995).

Embora todos os componentes da massa corporal apresentem ações sobre a massa óssea, as cargas dinâmicas são as responsáveis por promover respostas adaptativas no osso. Desta maneira, a resposta isolada da massa adiposa é referida como influência mecânica negativa sobre o tecido ósseo (JANICKA, 2007; TAES, et al., 2009; ZHAO et al., 2007) enquanto a massa magra institui relação positiva (TAES, et al., 2009). Há ainda correlação positiva entre perda de massa corporal e aumento da DMO, consolidando a ausência de benefícios da massa adiposa sobre o tecido ósseo (STETTLER et al., 2008). Por outro lado, a massa adiposa libera diversas moléculas biologicamente ativas (REID, 2002) que apresentam uma complexa relação com o tecido ósseo. Essa interação também resulta em respostas positivas (OSHIMA et al., 2005; THOMMESEN et al., 2006) e negativas (OH et al., 2005) sobre a massa óssea.

O ensaio mecânico realizado pelo teste de flexão da tíbia não apresentou diferenças entre os grupos desse estudo. As variáveis do ensaio mecânico (força máxima, rigidez e tenacidade) fornecem informações sobre as propriedades do osso cortical (TURNER; BURR, 1993). Uma vez que este tipo de tecido ósseo é metabolicamente menos ativo que o tecido trabecular (KEAVENY et al, 2001) é esperado que respostas significantes aconteçam somente após acentuada atividade de remodelação óssea.

A concentração de fosfatase alcalina não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando que a formação óssea não está alterada. Embora a determinação de marcadores de reabsorção não tenha sido realizada neste estudo, outras análises, como a microtomografia permitem a investigação da remodelação óssea (SEMI, 2008).

Os resultados obtidos pela microtomografia evidenciaram que a obesidade promovida pela dieta rica em sacarose exerceu negativa influência sobre a microarquitetura óssea e confirmou a resposta da interação entre metabolismo energético e metabolismo ósseo. Embora o número de trabéculas não tenha apresentado diferenças significantes entre os grupos, houve menor porcentagem de volume ósseo e espessura trabecular, associado com aumento na separação entre as trabéculas para o grupo S. Esses dados são similares aos achados de Cao e colaboradores (2009), que evidenciaram menor número de trabéculas com aumento da separação trabecular apresentando 5% a menos de osso no grupo obeso. Esses autores relatam que a obesidade promove mudança na dinâmica da remodelação óssea, favorecendo a reabsorção.

A integridade do tecido trabecular é determinada pela quantidade de material que o compõe e pela distribuição desses materiais (KEAVENY et al, 2001). Deste modo, trabéculas desorganizadas, menos espessas e com menor conectividade indicam ossos menos resistentes (SEEMAN, 2008). Portanto, a microtomografia foi fundamental para caracterizar a microarquitetura trabecular da tíbia indicando que a obesidade induzida por dieta rica em sacarose é prejudicial para a saúde óssea.

8 CONCLUSÃO

Diante do modelo experimental de dieta rica em sacarose e dos resultados observados nesse estudo, conclui-se que:

- O padrão alimentar dos animais do grupo S foi modificado quando comparado com o grupo C e assim o consumo de ração foi em parte substituído pela ingestão de sacarose culminando em alteração do metabolismo energético, apresentando eficiência para promover significativo ganho de massa e adiposidade corporal, acompanhado pelo expressivo aumento da concentração de leptina, alteração na glicemia, mas sem diferença significativa na insulina. Essas alterações possivelmente foram responsáveis por regular grande parte do metabolismo energético e ósseo. No entanto, o tratamento por 8 semanas com dieta rica em sacarose não foi suficiente para promover alterações em nenhum dos parâmetros biométricos;
- Não foram encontradas alterações na concentração plasmática de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e nas propriedades mecânicas ósseas. Apesar disso, a dieta rica em sacarose promoveu diminuição na densidade e mineralização óssea, assim como a microarquitetura óssea foi substancialmente afetada promovendo baixa conectividade trabecular e prejudicando a qualidade óssea.

REFERÊNCIAS

- ACCILI, D.; ARDEN, K.C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, v.117, p.421–426, 2004.
- AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.8, n.11, p.327-332, 2000.
- ÅKESSON, K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. *Bull. World Health Organ.*, v.81, n.9, p.657-664, 2003.
- BIALEK, P.; KERN, B.; YANG, X.; SCHROCK, M.; SOSIC, D.; HONG, N.; WU, H.; YU, K.; ORNITZ, D.M.; OLSON, E.N.; JUSTICE, M.J.; KARSENTY, G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell*, v.6, p.423-435, 2004.
- BLAIN, H.; VUILLEMIN, A.; GUILLEMIN, F.; DURANT, R.; HANESSE, B.; DE TALANCE, N.; DOUCET, B.; JEANDEL, C. Serum Leptin Level Is a Predictor of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, n.3, p.1030–1035, 2002.
- BLOUIN, K.; BOIVIN, A.; TCHERNOF, A. Androgens and body fat distribution. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.108, n.3-5, p.272–280, 2008.
- BRANDÃO, C.M.A.; VIEIRA, J.G.H. Fatores envolvidos no pico de massa óssea. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.43, n.6, p.401-408, 1999.
- BRITO, V.B.; FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; SILVEIRA, I.D.; ROCHA, J.B.T. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ -aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutr.*, v.23, n.11-12, p.818–826, 2007.
- 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.1097-104, 2009.
- CARVALHEIRA, J.B.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.46, n.4, p.419-425, 2002.
- CIVITELLI, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 473, n.21, p.188-192. 2008.
- CLAPP, J.F.; KIESS, W. Cord Blood Leptin Reflects Fetal Fat Mass. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, v.5, n.6, p.300-303, 1998.
- COBAYASHI, F.; LOPES, L.A.; TADDEI, J.A.A.C. Bone mineral density in overweight and obese adolescents. *J. Pediatr.*, v.81, n.4, p.337-342, 2005.

COHEN, M.M.JR. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *Am. J. Med. Genet. A.*, v.1, n.140, p.515-524, 2006.

COSTA, A.M.G.; LEMOS-MARINI, S.H.V.; BAPTISTA, M.T.M.; SANTOS, A.O.; MORCILLO, A.M.; MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JUNIOR, G. Densidade mineral óssea: Estudo transversal em pacientes com síndrome de turner. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.46, n.2, p.143-149, 2002.

CURREY, J.D. The effects of strain rate, reconstruction and mineral content on some mechanical properties of bovine bone. *J. Biomech.*, v.8, n.1, p.81-86, 1975.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. *Acta. Sci. Health Sci.*, v.28, n.2, p.165-170, 2006.

DEEB, F.; CHESKIN, L.J. Obesity: Fat Distribution. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. p.4227-4232, 2003.

DINIZ, Y.S.; SANTOS, P.P.; ASSALIN, H.B.; SOUZA, G.A.; ROCHA, K.K.H.R.; EBAID, G.M.X; SEIVA, F.R.F.; AMAUCHI, J.F.; NOVELLI-FILHO, J.L.V.B.; NOVELLI, E.L.B. Conjugated linoleic acid and cardiac health: Oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets. *Eur. J. Pharmacol.*, v.579, n.13, p. 318–325, 2008.

DOBLARÉ, M.; GARCIA, J.M.; GÓMEZ, M. J. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng. Fracture Mechanics*, v. 71, n.13-14, p. 1809– 1840, 2004.

DÔRES, S.M.C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, A.O. Vitamina k: metabolismo e nutrição. *Rev. Nutr.*, v. 14, n.3, p.207-218, 2001.

DUARTE, V.M.G.; RAMOS, A.M.O.; REZENDE, L.A.; MACEDO, U.B.O.; BRANDÃO NETO, J.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J. Bone Miner. Metab.*, v.23, n.1, p.58-68, 2005.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.L.; KARSENTY, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. v.89, n.5, p.747-54, 1997.

DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, A.F.; BEIL, F.T.; SHEN, J.; VINSON, C.; RUEGER, J.M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, v.100, n.2, p.197-207, 2000.

ELEFTERIOU, F.; AHN, J.D.; TAKEDA, S.; STARBUCK, M.; YANG, X.; LIU, X.; KONDO, H.; RICHARDS. W,G.; BANNON, T.W.; NODA, M.; CLEMENT, K.; VAISSE, C.; KARSENTY, G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, v.434, p.514–520, 2005.

FERRON, M.; HINOI, E.; KARSENTY, G.; DUCY, P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* n.105, p.5266–5270, 2008.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIKAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R.A.; TETI, A.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*, v.142, p. 296-308, 2010.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n.2, p. 216-229, 2006.

FRANKEL, V.H.; NARDIN, M. Biomecânica do osso. In: NARDIN, M.; FRANKEL, V.H. *Biomecânica básica do sistema músculo esquelético*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FROES, N.D.T.C.; PEREIRA, E.S.; NEGRELLI, W.F. Fatores de risco da osteoporose: prevenção e detecção através do monitoramento clínico e genético. *Acta. Ortop. Bras.*, v.10, n.1, p.52-57, 2002.

FROST H. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n. 175, p.286-92, 1983.

FUKUMOTO, S.; MARTIN, T.J. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.20, n.5, p.230-236, 2009.

FULZELE, K.; RIDDLE, R.C.; DIGIROLAMO, D.J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D.; FAUGERE, M.C.; AJA, S.; HUSSAIN, M.A.; BRUNING, J.C.; CLEMENS, T.L. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*, v.142, p.309-319, 2010.

GARNERO, P.; DELMAS, P.D.; Bone turnover markers. *Encyclopedia Endocrine Diseases*, v. 1, p.401-413, 2004.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, J.A.L. Exercise and bone mass in adults. *Sports Med.*, v.39, n.6, p.439-68. 2009.

GÖKE, B.; GÖKE, R. Obesity regulation. *Encyclopedia Endocrine Diseases*, v.1, p. 408-413, 2004.

HAMRICK, M.W.; DELLA-FERA, M.A.; BAILE, C.A.; POLLOCK, N.K.; LEWIS, R.D. Body Fat as a regulator of bone mass: experimental evidence from animal models. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.*, v. 7, n. 3, p. 224-229, 2009.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, n.6, p.803-811, 2004.

HINOI, E.; GAO, N.; JUNG, D.Y.; YADAV, V.; YOSHIZAWA, T.; MYERS, M.G.; Jr., CHUA, S.C.; KIM, J.K.; KAESTNER, K.H.; KARSENTY, G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J. Cell. Biol.*, v.183, p.1235–1242, 2008.

HOLECKI, M.; WIECEK, A. Relationship between body fat mass and bone metabolism. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, v.120, n.9, p.361-367, 2010.

HOLEMANS, K.; CALUWAERTS, S.; POSTON, L.; VAN ASSCHE, F.A. Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.190, n.3, p.858-865, 2004.

HOLL, M.G.; ALLEN, L.H. Sucrose Ingestion, Insulin Response and Mineral Metabolism in Humans. *Nutr.*, v.117, n.7, p.1229-1233, 1987.

IBGE. **Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1> Acesso em: 16 ago 2011.

JANICKA, A.; WREN, T.A.; SANCHEZ, M.M.; DOREY, F.; KIM, P.S.; MITTELMAN, S.D.; GILSANZ, V. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.92, n.1, p.143-147, 2007.

JOSEPH, L. J. O.; RYAN, A.S. Body Weight, Body Composition, and Aging. *Encyclopedia Endocrine Diseases*, v.1, 2004.

JURDAK, N.; KANAREK, R.B. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav.*, v. 96, n.1, p.1-5, 2009.

JUSTESEN, J.; STENDERUP, K.; EBBESEN, E.N.; MOSEKILDE, L.; STEINICHE, T.; KASSEM, M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*, v.2, n.15, p.165–171, 2001.

KAHN, C.R. The molecular mechanism of insulin action. *Annu. Rev. Med.*, v.36, p.429-451, 1985.

KANAREK, R.B.; ORTHEN-GAMBILL, N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr.*, v.112, n.8, p.1546-1554, 1982.

KANIS, J. A.; MCCLOSKEY, E. V.; JOHANSSON, H.; ODEN, A.; MELTON, L. J.; KHALTAEV, N. A reference standard for the description of osteoporosis. **Bone**, v.42, n.3, p.467-475, 2008.

KARSENTY, G.; OURY, F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.95, p.4795-4801, 2010.

KEAVENY, T.M.; MORGAN, E.F.; NIEBUR, G.L.; YEH, O.C. Biomechanics of trabecular bone. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.3, p.307-333, 2001.

KIM, J.Y.; NOLTE, L.A.; HANSEN, P.A.; HAN, D.H.; KAWANAKA, K.; HOLLOSZY, J.O. Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n.3, p.665-672, 1999.

KONTOGIANNI, M.D.; DAFNI, U.G.; ROUTSIAS, J.G.; SKOPOULI, F.N. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. **J. Bone Miner. Res.**, v.19, n.4, p.546-551, 2004.

LEE, N.K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J.D.; CONFAYREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P.J.; MCKEE, M.D.; JUNG, D.Y.; ZHANG, Z.; KIM, J.K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v.130, p.456-469, 2007.

LEONARD, M.B.; SHULTS, J.; WILSON, B.A.; TERSHAKOVEC, A.M.; ZEMEL, B.S. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, n.2, p.514-523, 2004.

LEWIN, S.; GOUVEIA, C.H.A.; MARONE, M.M.S.; WEHBA, S.; MALVESTITI, L.F.; BIANCO, A.C. Densidade mineral óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n.2, p.127-136, 1997.

LIAN, J.B.; STEIN, G.R. The Cells of Bone. In: SEIBEL, M.J.; ROBBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego, Calif: Academic Press, 2006. p. 243-264.

LOPEZ, J. C. R. R.; FREIRE, F. M.; DALAPICULA, S.S.; CONZ, M. B.; VIDIGAL JR, G. M. Respostas do tecido ósseo à carga mecânica. **Implant. News.**, v.5, n.6, p.633-636, 2008.

LOUZADA, M. J. Q. **Densitometria radiográfica**. 2009. Tese (Livre Docência) Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

MA, H.; TURPEINEN, T.; SILVENNOINEN, M.; TORVINEN, S.; RINNANKOSKI-TUIKKA, R.; KAINULAINEN, H.; TIMONEN, J.; KUJALA, U.M.; RAHKILA, P.; SUOMINEN, H. Effects of diet-induced obesity and voluntary wheel running on the microstructure of the murine distal femur. **Nutr. Metab.**, v. 8, n.1, p.1, 2011.

MACFARLANE, S.I.; BANERJI, M.; SOWERS, J.R. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 86, n.2, p. 713-718, 2001.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n.2, p. 177-189, 2006.

MANN, V.; HUBER, C.; KOGIANE, G.; JONES, D.; NOBLE, B. The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J. Musculoskeletal Neuron. Int.*, v. 6, n.4, p.408-417, 2006.

MARTIN, A.; DAVID, V.; MALAVAL, L.; LAFAGE-PROUST, M.H.; VICO, L.; THOMAS, T. Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. *Endocrinology*. v.148, n.7, p.3419-3425, 2007.

MARTIN, R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *J. Biomech.*, v.26, n.9, p. 1047-1054, 1993.

MATTES, R.D. Dietary Compensation by Humans for Supplemental Energy Provided as Ethanol or Carbohydrate in Fluids. *Physiol. Behav.*, v.59, n.1, p.179-87,1996.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ International. *J. Obesity*, v. 22, n.12, p.1145 -1158, 1998.

MORIOKA, T.; ASILMAZ, E.; HU, J.; DISHINGER, J.F.; KURPAD, A.J.; ELIAS, C.F.; LI, H.; ELMQUIST, J.K.; KENNEDY, R.T.; KULKARNI, R.N. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects cell growth and function in mic. *J. Clin. Invest.*, v.117, n.10, p.2860-8, 2007.

MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações*. 4.ed. Porto Alegre:Médica Missau, 2003.

MULHOLLAND, D.J.; DEDHAR, S.; COETZEE, G.A.; NELSON, C,C. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr. Rev.*, v.26, n.7, p.898-915, 2005.

MUNDY, G. R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. *Bone*, v. 24, n. 5, p. 35-38, 1999.

NHI. **Osteoporosis**: handout on health retrieved. 2007. Disponível em:<http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteoporosis/osteoporosis_hoh.pdf>. Acesso em 12 Ago 2009.

- NG, K.W. Regulation of glucose metabolism and the skeleton. *Clin. Endocrinol.*, v.75, n.2, p.147-55, 2011.
- NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.X.; RODRIGUES, H.G.; MANI, F.; FERNANDES, A.A.H.; CICOGNA, A.C.; NOVELLI FILHO, J.L.V.B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.*, v.41, n.1, p.111-119, 2007.
- OGUEH, O.; SOORANNA, S.; NICOLAIDES, K.H.; JOHNSON, M.R. The Relationship between Leptin Concentration and Bone Metabolism in the Human Fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, n.5, p.1997-1999, 2000.
- OH, K. W.; LEE, W. Y.; RHEE, E. J.; BAEK, K. H.; YOON, K. H.; KANG, M. I, et al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. *Clin. Endocrinol.*, v.63, n.2, p.131-8, 2005.
- OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. *Física para ciências biológicas e biomédicas*. São Paulo: Harbra, 1986.
- OSHIMA, K.; NAMPEI, A.; MATSUDA, M.; IWAKI, M.; FUKUHARA, A.; HASHIMOTO, J.; YOSHIKAWA, H.; SHIMOMURA, I. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.331, n.2, p.520-6, 2005.
- OTT, S.M. Bone remodeling, dynamics of. *Encyclopedia Endocrine Diseases*, v. 1, 2004.
- PANDE, H.; CHESKIN, L.J. Obesity: etiology and diagnosis. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2003.
- QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.53, n.5, p.582-594, 2009.
- RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, v.115, n.12, p.3318-3325, 2005.
- RAUBENHEIMER, E.J. Histopathologic changes in metabolic bone disease. *Adv. Anat. Pathol.*, v.11, n.1, p.38-48, 2004.
- REID, I.R. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone*. v.31, n.5, p. 547-55, 2002.
- REID, I.R. Relationships between fat and bone. *Osteoporos. Int.*, v.19, n.5, p.595-606, 2008.
- REID, I.R. Fat and bone. *Bone*. v.503, n.1, p. 20-27, 2010.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, A. B.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v.8, p.455-98, 2006.

ROSEN, C.J.; BOUXSEIN, M.L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, v.2, n.1, p. 35-43,2006.

SCHAEFER, E.J.; GLEASON, J.A.; DANSINGER, M.L. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. *J. Nutr.* v.139, n.6, p.1257–1262, 2009.

SCLAFANI, A.; XENAKIS, S. Sucrose and Polysaccharide Induced Obesity in the Rat. *Physiol. Behav.*, v. 32, n.2, p.169-174,1984.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J. Bone Miner. Metab.*, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

SEMI. **Protocolos osteoporosis.** Disponível em: <www.fesemi.org/grupos/osteoporosis/publicaciones/index.php> Acesso em: 12 Dez 2008.

SORIA, A.; D'ALESSANDRO, M.E.; LOMBARDO, Y.B. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol.*, v.91, n.5, p.2109–2116, 2001.

STETTLER, N.; BERKOWTIZ, R.I.; CRONQUIST, J.L.; SHULTS, J.; WADDEN, T.A.; ZEME, B.S.;LEONARD, M.B. Observational Study of Bone Accretion During Successful Weight Loss in Obese Adolescents. *Obesity*, v.16, p.96–101, 2008.

TAES, Y.E.; LAPAUW, B.; VANBILLEMONT, G.; BOGAERT, V.; DE BACQUER, D.; ZMIERCZAK, H.; GOEMAERE, S.; KAUFMAN, J.M. Fat Mass Is Negatively Associated with Cortical Bone Size in Young Healthy Male Siblings. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.94, n.7, p.2325–2331, 2009.

TAKEDA, S.; ELEFTERIOU, F.; LEVASSEUR, R.; LIU, X.; ZHAO, L.; PARKER, K.L.; ARMSTRONG, D.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, v.111, p.305–317, 2002.

TATSUMI, S.; ITO, M.; ASABA, Y.; TSUTUMI, K.; IKEDA, K. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinol.*, v.149, n.2, p.634-641, 2008.

TERADA, M.; INABA, M.; YANO, Y.; HASUMA, T.; NISHIZAWA, Y.; MORII, H.; OTANI, S. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone*, v.22, n.1, p.17-23, 1998.

THOMAS, T.; GORI, F.; KHOSLA, S.; JENSEN, M.D.; BURGUERA, B.; RIGGS, B.L. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinol.*, v.140, p.1630–1638, 1999.

THOMAS, T.; BURGUERA, B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J. Bone Miner. Res.*, v.17, n.9, p.1563-9, 2002.

THOMMESEN, L.; STUNES, A.K.; MONJO, M.; GROSVIK, K.; TAMBURSTUEN, M.V.; KJIBLI, E.; LYNGSTADAAS, S.P.; RESELAND, J.E.; SYVERSEN, U. Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. *J. Cell. Bioche.* v.99, n.3, p.824-834, 2006.

TJÄDERHANE, L.; LARMAS, M. A High Sucrose Diet Decreases the Mechanical Strength of Bones in Growing Rats. *J. Nutr.*, v.128, n.10, p.1807–1810, 1998.

TRAYHURN P: Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta. Physiol. Scand.*, v.184, p.285-293, 2005.

TURNER, CH.; BURR, D.B. Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial. *Bone.*, n.14, n.4, p.595-608, 1993.

VAN DAM, R.M.; SEIDELL, J.C. Carbohydrate intake and obesity. *European J. Clin. Nutr.*, suppl.1, n. 61, p.575–599, 2007.

VICENTE-RODRIGUEZ, G.; EZQUERRA, J.; MESANA, M. I.; FERNANDEZ-ALVIRA, J. M.; REY-LOPEZ, J. P.; CASAJUS, J. A.; MORENO, L. A. Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. *J. Bone Miner. Metab.*, v.26, n.5, p.416-24. 2008.

VICENTINI, C.R.; ROSA, R.A.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; SANTOS, P.H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. *Vet. Zootec.*, v.14, n.1, p. 62-71, 2007.

WEINAND, W.R. Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis. 2009. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Technical Report Series 916, 2003.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Technical Report Series 894. Geneva; p. 101-151, 2000.

YADAV, V.K.; OURY, F.; SUDA, N.; LIU, Z.W.; GAO, X.B.; CONFAVREUX, C.; KLEMENHAGEN, K.C.; TANAKA, K.F.; GINGRICH, J.A.; GUO, X.E.; TECOTT, L.H.;

MANN, J.J.; HEN, R.; HORVATH, T.L.; KARSENTY, G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*, v.138, p.976–989, 2009.

YOSHIZAWA, T.; HINOI, E.; JUNG, D. Y.; KAJIMURA, D.; FERRON, M.; SEO, J.; GRAFF, J. M.; KIM, J. K.; KARSENTY, G. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *J. Clin. Invest.*, v.119, p. 2807-2817, 2009.

YOUNG, B.; HEATH J.H. Tecidos esqueléticos. In:_____. *Histologia funcional*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ZERNICKE, R.F.; SALEM, G.J.; BARNARD, R.J.; SCHRAMM, E. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone*, v.16, n.1, p.25-31,1995.

ZHAO, L.J.; LIU, Y.J.; LIU, P.Y.; HAMILTON, J.; RECKER, R.R.; DENG, H.W. Relationship of obesity with osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 92, p.1640–1646, 2007.

ZUK, P.A.; ZHU,M.; ASHJIAN,P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.F.; BENHAIM,P.; HEDRICK, M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell.*, v.13, n.12, p.4279-4295, 2002.

ANEXO - CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA SOBRE A ESTRUTURA ÓSSEA DE FÊMURES DE RATOS JOVENS" sob responsabilidade de Prof Dr ANTONIO AUGUSTO FERREIRA CARVALHO e colaboração de Prof Dr MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA e BRUNA BIFFE está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 30 de maio de 2008, de acordo com o protocolo no. 2008- 002809.

Araçatuba, 10 de julho de 2008.

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP