

MECANISMOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DO METABOLISMO ÓSSEO EM RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM INULINA E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO

Ono, N.; Netto, C. C.¹; Miyasaka, C. K.

Laboratório de Nutrição e Metabolismo LANUM - Departamento de Alimento e Nutrição DEPAN-
Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA- Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP.
Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Cx.Postal 6121. CEP:13081-970 - Campinas/SP.



Palavras-chaves: Frutooligossacarídeo, Inulina, Osteoporose, ovariectomia, prebióticos

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. É singular porque é um dos poucos tecidos que se mineralizam. A hidroxiapatita de cálcio é o mineral que confere força e resistência aos ossos, sendo o armazém de 99% do cálcio corporal. Durante o crescimento e maturação esquelética ocorre um acúmulo ósseo de cálcio. A partir dos 50 anos ou nas mulheres após a menopausa, o processo de remodelação óssea se torna negativo, causando a perda óssea e conseqüentemente a osteoporose, que se caracteriza por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, causando fragilidade óssea e aumento do risco de fraturas. Em mulheres esse desequilíbrio ocorre devido ao hipostrogenismo e a idade. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos moleculares e características fenotípicas do metabolismo ósseo de ratas adultas ovariectomizadas tratadas com inulina e/ou frutooligossacarídeo (FOS).

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio biológico: Ratas da linhagem Wistar foram obtidas com 45 dias de idade até completarem 60 dias quando foi realizada a ovariectomia. Passados 30 dias, as ratas foram divididas em 5 grupo de dez animais cada e receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 (sem tratamento), Grupo 2(FOS), Grupo 3(Inulina), Grupo 4(FOS + Inulina).

Dieta: A dieta fornecida durante a fase de maturação foi do tipo comercial. Durante a fase de experimentação foi oferecida dieta formulada do tipo AIN-93M, sendo modificada a fonte de fibra conforme o tratamento.

Percentual de cinzas na tibia direita dos animais: A tibia direita dos animais foi calcinada em mufla a 550°C por 6h. Posteriormente, as cinzas foram pesadas e feito o cálculo de percentual.

Propriedades biomecânicas da mandíbula dos animais: Nos ensaios mecânicos de flexão (hydraulic serv equipment; 810 TestStar II MTS model- USA), a mandíbula foi colocada sobre dois suportes e a velocidade de aplicação da carga de 2mm/min e utilizada célula de carga de 100kN.

Fosfatase alcalina sérica total: Realizada por método colorimétrico cinético com kit disponível comercialmente. Foram utilizados: solução tampão de dietanolamina 1,25mmol/L, reativo substrato de p-nitrofenilfosfato de sódio 50mmol/L e o reativo de trabalho foi obtido através da mistura de 4 partes do reativo tampão para 1 parte do reativo substrato. A análise foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 405nm, e foi zerado com água deionizada. Posteriormente, em uma cubeta foram adicionados 1mL do reativo de trabalho, 20µL do soro analisado e, após 1 minuto de incubação, foi determinada a absorvância inicial (ponto zero) e após exatos 2, 3 e 4 minutos também foram anotadas as respectivas absorvâncias. O cálculo de atividade da fosfatase alcalina sérica total em U/L foi feito subtraindo cada leitura anotada do valor anterior e feita a média dos valores obtidos, sendo a média multiplicada por 2750.

Cálcio sérico: O cálcio sérico foi dosado por método colorimétrico de ponto final com kit disponível comercialmente. Os reagentes utilizados para tal análise foram os seguintes: reagente tampão de 2-Amino-2-Metil-1-Propanol (3,5mmol/L), reagente de cor de O-cresolftaleína (0,5mmol/L), 8-Hidroxiquinoleína (0,7mmol/L) e um padrão de cálcio contendo 10 mg/dL. Para realização da análise, foram preparadas 3 cubetas, sendo elas: branco, amostra e padrão. Após a homogeneização foram lidas as absorvâncias do padrão e da amostra em 570nm, acertando o zero com o branco. O cálculo para determinação da quantidade de cálcio em mg/dL de soro é feito pela divisão da absorvância da amostra pela absorvância do padrão multiplicado por 10.

Microscopia eletrônica de varredura: Os ossos foram descalcificados em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico e congelados em nitrogênio líquido para realizar fratura manual da epífise. Posteriormente, as epífises foram desidratadas em sucessivas soluções de etanol e no equipamento de ponto crítico com utilização de dióxido de carbono (CO₂) líquido, montados em stubs e cobertos com ouro usando-se um sputter. Posteriormente, a análises de microscopia eletrônica de varredura deste material, foi realizada utilizando-se Scanning Microscope JSM-5800LV/Jeol Serving Advanced Technology

Tratamento estatístico: Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo utilizado o teste de Tukey para o confronto das médias. O software utilizado foi STATISTICA 6.0 for windows STATSOFT, 2000), considerando p<0,05 como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias eletrônicas de varredura

RESULTADOS

•Consumo de ração e ganho de peso dos animais durante a fase de experimentação:

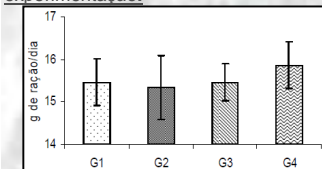


Figura 1. Consumo de ração durante a fase experimental (g de ração/dia). *Ausência de letras representa que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05).

•Percentual de cinzas na tibia direita dos animais:

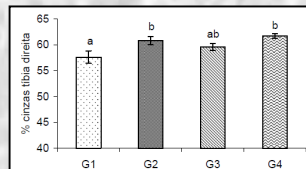


Figura 2. Percentual de cinzas no fêmur direito dos animais. *Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p<0,05).

•Propriedades biomecânicas da mandíbula dos animais:

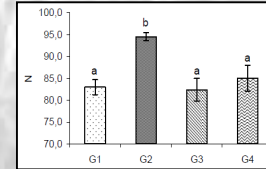


Figura 3. Força de ruptura da mandíbula dos animais. *Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p<0,05).

•Fosfatase alcalina sérica total:

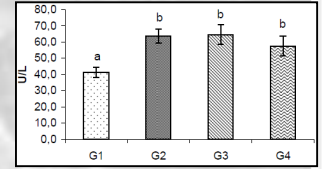


Figura 4. Fosfatase alcalina sérica total (U/L). *Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p<0,05).

•Cálcio sérico dos animais:

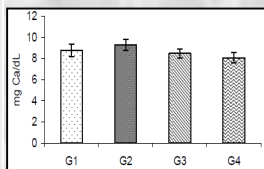


Figura 5. Dosagem de cálcio sérico (mg/dL). *Ausência de letras representa que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05).

•Microscopia eletrônica de varredura:

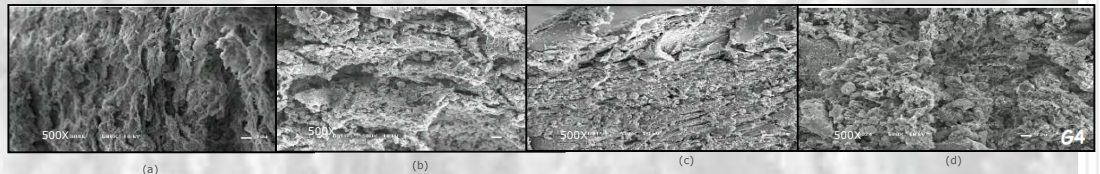


Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da epífise do fêmur dos animais ampliada 500X. (a) Grupo 1: OVT sem tratamento; (b) Grupo 2: OVT + Tratamento com FOS; (c) Grupo 3: OVT + Tratamento com Inulina; (d) Grupo 4: OVT + Tratamento com FOS + Inulina.

Grupo 1: OVT sem tratamento; Grupo 2: OVT + Tratamento com FOS; Grupo 3: OVT + Tratamento com Inulina; Grupo 4: OVT + Tratamento com FOS + Inulina.

CONCLUSÕES

Os animais do grupo G2 e G4 apresentaram a força de ruptura da mandíbula significativamente maior que os animais do grupo G1. Tal resultado sugere que ambos os tratamentos propostos foram eficazes no processo de mineralização óssea, com destaque para o FOS, uma vez que os animais do grupo G3 apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos animais do grupo G1. Os animais do grupo G2 apresentaram a força de ruptura da mandíbula significativamente maior que os demais grupos, houve um aumento no processo de mineralização óssea e, possivelmente, um aumento na concentração de cálcio, visto que este mineral confere resistência a esses tecidos. A atividade da fosfatase alcalina sérica total (U/L) dos animais dos grupos G2, G3 e G4 aumentou significativamente quando comparados aos animais do grupo G1, podemos sugerir que os tratamentos com FOS e inulina reduziram a deterioração do tecido ósseo associado à castração. A concentração sérica de cálcio se manteve constante. Os resultados da análise qualitativa do tecido ósseo desses animais, microscopia eletrônica de varredura, confirmam o efeito positivo do tratamento de fêmeas ovariectomizadas com FOS e/ou inulina. Portanto, os resultados apresentados sugerem que a suplementação dietética com prebióticos (FOS e inulina) anulou os efeitos negativos que castração promove no tecido ósseo e que esses nutrientes podem ser utilizados em protocolos de prevenção e/ou tratamento da osteopenia e/ou osteoporose.