

Obesidade materna associada ao tratamento com Losartan: efeitos sobre o esqueleto da prole de ratas

Maternal obesity associated with treatment with Losartan: effects in skeleton of rats' offspring

Regina Inês Kunz^{1*}, Gustavo Henrique dos Reis², Juliana Souza dos Santos³, Sara Cristina Sagae Schneider⁴, Rose Meire Costa Brancalhão⁴, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁴

¹Mestre em Biociências e Saúde. UNIOESTE; ²Biólogo. UNIOESTE; ³Graduanda em Ciências Biológicas. UNIOESTE; ⁴Docente da UNIOESTE.

Resumo

Introdução: a obesidade, uma pandemia mundial, é uma condição clínica que se relaciona com diversas comorbidades, como a hipertensão arterial, que pode ser farmacologicamente tratada com Losartan. A complexidade da obesidade associada ao uso de medicamentos poderia programar metabolicamente diversos sistemas orgânicos, como o tecido ósseo. **Objetivo:** verificar os potenciais efeitos da obesidade associada ao uso de Losartan como programador metabólico sobre parâmetros histomorfométricos do tecido ósseo da prole. **Metodologia:** Foram utilizadas ratas Wistar, divididas em grupos controle (CTL), que recebeu ração padrão e água; e tratado (CAF+ LOS), que recebeu dieta de cafeteria *ad libitum* e Losartan diariamente por meio de gavagem. Aos 70 dias de vida as ratas foram submetidas ao cruzamento com machos da mesma espécie. A partir dos 21 dias de vida, a prole foi alimentada com ração padrão até os 100 dias de vida, quando 8 fêmeas de cada grupo foram pesadas e eutanasiadas. Foram coletadas e pesadas as gorduras retroperitoneal e perigonadal. Em seguida, as tíbias direitas foram coletadas e submetidas ao processamento histológico de rotina para microscopia de luz, com posterior análise de parâmetros histomorfométricos. **Resultados:** houve um aumento estatisticamente significativo no acúmulo de gordura perigonadal nas ratas do grupo CAF+LOS, bem como menor área do canal medular da tíbia nestas ratas em relação ao grupo CTL. **Conclusão:** a obesidade induzida por dieta de cafeteria associada ao uso de Losartan programou a prole por meio do aumento no acúmulo de gordura perigonadal e redução da área do canal medular da tíbia. **Palavras-chave:** Tecido Adiposo. Hipertensão. Tibia.

Abstract

Introduction: obesity, a global pandemic, is a clinical condition that is associated with several co-morbidities such as hypertension, which can be treated pharmacologically with Losartan. The complexity of obesity associated with drug use could program metabolically different organ systems, such as bone tissue. **Objective:** verify the potential effects of obesity associated with the use of Losartan as metabolic programmer on morphometric parameters of bone tissue of offspring. **Methods:** Wistar rats were used, divided into control group (CTL), which received standard chow and water; and treated (CAF + LOS) receiving cafeteria diet *ad libitum* and Losartan daily by gavage. After 70 days of age, the rats were subject to crossing with males of the same species. From 21 days, the offspring received standard chow until 100 days of life, when eight females in each group were weighed and euthanized. The retroperitoneal and perigonadal fats collected and weighed. Then the right tibias were collected and submitted to routine histological for light microscopy, with subsequent analysis of morphometric parameters. **Results:** There was a statistically significant increase in perigonadal fat accumulation in rats CAF + LOS group, and smaller area of the tibial medullary canal in these rats compared to the CTL group. **Conclusion:** cafeteria diet-induced obesity associated with the use of Losartan programmed offspring by increasing the perigonadal fat accumulation and reduced tibial medullary canal area. **Keywords:** Adipose Tissue. Hypertension. Tibia.

INTRODUÇÃO

Mudanças no estilo de vida, como dieta inadequada e sedentarismo, têm causado um aumento rápido na prevalência da obesidade nos últimos anos representando um problema de saúde pública a nível mundial. Soma-se a isso a predisposição genética, fatores neurais, endócrinos, entre outros, que interagem com o ambiente e levam ao

acúmulo de tecido adiposo, causando o sobrepeso e a obesidade (WILDING, 2011).

Um dos grandes problemas da obesidade são as diversas comorbidades associadas (WILDING, 2011) e, uma das teorias que explica a sua relação com outras condições clínicas é a liberação de moléculas, as adipocinas, pelo tecido adiposo. Estas adipocinas incluem uma variedade de peptídeos pró-inflamatórios envolvidos em diversos processos fisiopatológicos, como inflamação, danos endoteliais, aterosclerose, deficiências na sinalização da insulina, remodelamento ósseo e hipertensão arterial (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005).

Correspondente/Corresponding: Regina Inês Kunz – Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). – End: Rua: Universitária, nº 2069 – CEP 85819-110 – Cascavel – Paraná – Tel: (45) 3220-7405 – E-mail: regina_kunz@hotmail.com

Devido a relação direta entre obesidade e hipertensão arterial, se estima que com o seu crescimento, 29,2% da população estará hipertensa em 2025 (KEARNEY et al., 2005). Além de mudanças nos hábitos diários, os antagonistas do receptor de angiotensina são uma classe de medicamentos indicados no tratamento da hipertensão arterial (BOONBAICHAIYAPRUCK et al., 2015) e, dentre estes, se encontra o Losartan, um antagonista do receptor tipo I da angiotensina II.

O uso do medicamento associado ao já complexo quadro de obesidade na gestação e/ou lactação pode estar relacionado a uma programação, com implicações morfológicas e funcionais em sistemas orgânicos (LUCAS, 1991), como o esquelético. Broulík et al. (2001) propõem sobre a possibilidade de medicamentos anti-hipertensivos afetarem o metabolismo do tecido ósseo. Alguns pesquisadores têm demonstrado que a exposição à fármacos, durante períodos críticos de desenvolvimento, induz alterações na vida adulta (SILVA et al., 2006). Ainda, são amplamente investigadas as relações entre Índice de Massa Corporal (IMC) materno com maior risco de desenvolvimento de síndrome metabólica, doenças cardíacas coronarianas, obesidade e diabetes mellitus na vida adulta da prole (SRINIVASAN et al., 2006). Porém, são escassos na literatura informações sobre os efeitos da obesidade e uso de

medicamentos durante a gestação e lactação sobre a morfologia do tecido ósseo da prole.

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo verificar os potenciais efeitos da obesidade associada ao uso de Losartan como programador metabólico sobre parâmetros histomorfométricos do tecido ósseo da prole.

METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais realizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Ratas da linhagem *Wistar*, obtidas do Biotério Central, foram mantidas em biotério setorial sob condições experimentais adequadas (temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 h) e divididas em dois grupos:

- Controle (CTL): ratas alimentadas com ração padrão (Nutrilab™, 2.95 Kcal/g) e água do desmame até o término do experimento;
- Cafeteria com Losartan (CAF + LOS): ratas alimentadas com dieta de cafeteria (5,42 Kcal/g) do desmame até a idade adulta (tabela 1), tratadas com Losartan diariamente por meio de gavagem (10 mg/kg corporal) dos 70 dias de vida até o término do experimento.

Tabela 1 – Constituição da dieta de cafeteria

	Valor energético kJ/100g	Carboidratos g/100g	Proteínas g/100g	Gorduras g/100g	Sódio mg/100g
Cheetos (Pepsico, Brasil)	1948	72	6,4	17,2	676
Salgadinho de Bacon (Santa Helena, Brasil)	2200	56	8,8	30	1040
Biscoito de maizena (Zadimel, Brasil)	1793	73	8	10,7	300
Bolo de chocolate (Nutrella, Brasil)	1798	55	5	21,7	141,7
Coca – cola (Pepsico, Brasil)	178	11	0	0	5
Guaraná (Antartica, Brasil)	168	10	0	0	5,5
Salame tipo italiano (Sadia, Brasil)	1822	2	22	38	1140
Linguiça (Sadia, Brasil)	1554	1,4	16	34	1342
Bisnaguinha (Nutrella, Brasil)	1328	54	11,2	6,2	300
Waffer de chocolate (Bauducco, Brasil)	2176	63	5	27	113
Mortadela (Frimesa, Brasil)	845	2	12	16	1545
Marshmallow (Fini, Brasil)	1423	80	5	0	46

Fonte: Os autores

Ao atingirem a idade adulta, aos 70 dias de vida, as ratas dos dois grupos foram submetidas ao cruzamento com machos da mesma linhagem por 14 dias. Durante todo o período gestacional e de lactação, as ratas se mantiveram recebendo ração padrão (CTL) ou dieta de cafeteria mais Losartan (CAF + LOS). Aos 21 dias de vida, a prole dos dois grupos foi desmamada e mantida em condições experimentais adequadas, com ração padrão e água à vontade, sem ser submetida a nenhuma intervenção.

Ao término do experimento, aos 100 dias de vida da prole, 8 fêmeas por grupo foram pesadas, anestesiadas

e eutanasiadas. Foram coletadas e pesadas as gorduras retroperitoneal e perigonadal. Em seguida, a tibia direita foi dissecada, fixada em formol 10%, descalcificada em ácido tricloroacético 5% e seguiu o procedimento de rotina para histologia, com cortes transversais de 7 μm de espessura e coloração em hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotomicrografadas e as imagens obtidas analisadas no programa Image Pró-Plus 6.0 (USA) previamente calibrado, onde foram mensuradas a área do canal medular e a espessura do osso cortical, bem como realizada a contagem do número de osteócitos, realizada

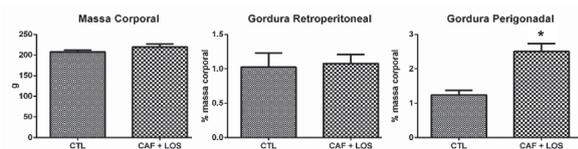
em uma área de interesse pré-determinada, sendo as duas últimas realizadas em três pontos equidistantes na tíbia.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6 e comparados estatisticamente pelo teste t não pareado, expressos em média e desvio padrão da média.

RESULTADOS

Em relação aos parâmetros corporais, não houve diferenças na massa corporal e acúmulo de gordura retroperitoneal da prole. Porém, houve um aumento estatisticamente significativo ($p=0,0002$) na porcentagem (%) de gordura perigonadal/massa corporal (figura 1).

Figura 1 – Parâmetros corporais da prole ($n=8$).



CTL – grupo controle; CAF + LOS – grupo cafeteria tratado com Losartan.

Fonte: Os autores

Quanto aos parâmetros histomorfométricos da tíbia, não houve diferenças entre os grupos em relação ao número de osteócitos e espessura do osso cortical. Houve uma redução de 18% na área do canal medular da tíbia das ratas CAF + LOS em relação ao CTL (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros histomorfométricos da tíbia.

PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS	CTL	CAF + LOS	Valor de p
Número de Osteócitos (unidade)	26,8 ± 1,5	25,7 ± 1,2	0,5603
Espessura do Osso Cortical (µm)	388,6 ± 10,7	385,5 ± 16,3	0,8741
Área do Canal Medular (mm)	3466 ± 290,6	2831 ± 47,3	0,0382*

Legenda: Dados apresentados como média ± desvio padrão da média.

Fonte: Os autores

DISCUSSÃO

A dieta de cafeteria, utilizada no presente estudo, é um modelo experimental de indução da obesidade extremamente eficiente, que permite o estudo da fisiopatologia da obesidade e suas complicações. Os alimentos que a compõe possuem muitos carboidratos, na sua maioria simples, grandes quantidades de gordura, principalmente saturadas e/ou trans e baixo teor de proteínas, fibras alimentares e micronutrientes (BAYOL et al., 2010).

O aumento do número de indivíduos obesos é uma realidade mundial e, segundo Flegal et al. (2010), essa prevalência pode ser maior que 34% nas mulheres em idade reprodutiva. A presença da obesidade durante a

gestação caracteriza um quadro preocupante, devido aos fatores de risco tanto para a mãe quanto para sua prole (CATALANO; EHRENBURG, 2006). Uma série de estudos tanto em animais quanto em humanos demonstram que o meio intrauterino desempenha um papel crítico na programação da composição corporal (SRINIVASAN et al., 2006).

No presente estudo, foi verificado que a obesidade materna durante a gestação e lactação foi responsável pelo aumento na quantidade de gordura perigonadal na prole, sem, contudo, alterar sua massa corporal. Segovia et al. (2014) afirmam que perturbações no período da adipogênese podem alterar as propriedades metabólicas e funcionais do tecido adiposo, e que a obesidade materna pode promover acúmulo de gordura na prole, predispondo-a à obesidade durante a vida adulta. Outros pesquisadores já observaram que a obesidade induzida por dieta afeta o tecido adiposo da prole, causando hipertrofia dos adipócitos e alterando seu papel endócrino, com aumento da liberação de citocinas inflamatórias pelo tecido, caracterizando um fenótipo de síndrome metabólica (SAMUELSSON et al., 2008).

Apesar de amplamente investigados, os efeitos da obesidade sobre o tecido ósseo ainda são controversos. Alguns autores consideram que a densidade óssea pode ser aumentada na obesidade, visto que o desenvolvimento e dinamismo tecidual dos ossos sofre influência direta do aumento do peso, que exige do esqueleto uma tensão maior em determinada região do corpo (SHILLS et al., 2009). Assim, o mecanismo de mecanotransdução levaria ao aumento da proliferação celular, seguida pela diferenciação dos osteoblastos em osteócitos (BONEWALD; JOHNSON, 2008).

Já outros autores verificaram que em animais obesos há uma significativa perda de massa óssea resultante do aumento da atividade osteoclástica, estimulada por fatores pró-inflamatórios secretados pelos adipócitos, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucinas (IL-1β, IL-6) (CAO, 2011). Além de seu baixo teor em cálcio, a dieta de cafeteria é rica em gordura, que pode interferir na absorção desse íon pelo intestino, diminuindo a biodisponibilidade do mesmo para gênese óssea, como já demonstrando em estudos anteriores (NELSON; FRANTZ; ZIEGLER, 1998). Considerando a importância do cálcio em diversas funções orgânicas, aliado ao fato deste não ser sintetizado endogenamente e estar depositado principalmente no tecido ósseo (99%) (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010), a ingestão inadequada de cálcio culmina com a mobilização da forma mineral desse íon a partir dos fluidos ósseos, ou diretamente por meio da atividade osteoclástica (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010), culminando com o aumento da reabsorção óssea.

Ainda que vários pesquisadores venham investigando os efeitos da obesidade sobre o tecido ósseo, poucos são os que verificam o comportamento ósseo da prole de mães obesas. No presente estudo, foi verificado um quadro de osteopenia na tíbia da prole, visto que houve

redução da área do canal medular sem alteração da espessura do osso cortical. Devlin et al. (2013) estudaram os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre a massa óssea e força do fêmur da prole. Os autores verificaram que existe uma resposta sexo-específica na prole quanto à arquitetura trabecular e cortical do fêmur. Com 14 e 26 semanas de idade, as fêmeas não tiveram sua adiposidade alterada, mas apresentaram um menor teor mineral ósseo no corpo inteiro, com aumento da fração trabecular no fêmur.

A dieta hiperlipídica pode induzir uma programação de cunho obesogênico na prole (SAMUELSSON et al., 2008) e, segundo Wren et al. (2011), o acúmulo de gordura poderia estar correlacionado com menor massa óssea. Esse mecanismo pode ter acontecido nos animais do presente estudo, nos quais foi verificado o aumento do depósito de gordura perigonadal e osteopenia da tíbia.

Além da indução da obesidade, no presente estudo as ratas foram tratadas com Losartan, um inibidor do receptor tipo I da angiotensina II, com o intuito de simular uma condição clínica comum, ou seja, a associação entre obesidade e hipertensão arterial. Broulík et al. (2001) administraram Losartan em ratas Wistar e estudaram seus efeitos sobre o fêmur. Os autores não verificaram alterações na densidade e conteúdo mineral ósseos, bem como nos parâmetros histomorfométricos analisados, concluindo que a dose terapêutica deste medicamento não afeta o esqueleto de ratas. A partir disso, cabe considerar que as alterações ósseas observadas no presente estudo provavelmente são consequência da programação advinda da obesidade, sem influência do Losartan. Sugere-se um estudo subsequente em que o Losartan seja administrado em ratas controle, para que seus potenciais efeitos sobre o tecido ósseo possam ser melhor elucidados.

CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta de cafeteria associada ao uso de Losartan programou a prole por meio do aumento no acúmulo de gordura perigonadal e redução da área do canal medular da tíbia.

REFERÊNCIAS

- BAYOL, S. A. et al. A Maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology*, Oxford, v. 151, n. 4, p. 1451-1456, 2010.
- BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, New York, v. 42, n. 4, p. 606-615, 2008.
- BOONBAICHAIPRUCK, S. et al. Efficacy of Blood Pressure reduction

of Losartan in selected thai populations using Home Blood Pressure Monitoring and Office Blood Pressure measurements. *ASEAN Heart J.*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 66-73, 2015.

BROULÍK, P. D. et al. Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. *Physiol. Res.*, Praha, v. 50, n. 4, p. 353-358, 2001.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. *J. Orthop. Surg. Res.*, London, v. 6, n. 30, p. 1-7, 2011.

CATALANO, P. M.; EHRENBERG, H. M. The short – and long term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG*, Oxford, v. 113, n. 10, p. 1126-1133, 2006.

DEVLIN, M. J. et al. Maternal perinatal diet induces developmental programming of bone architecture. *J. Endocrinol.*, London, v. 217, n. 1, p. 69-81, 2013.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *JAMA*, Chicago, v. 303, n. 3, p. 235-241, 2010.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.*, Washington, v. 26, n. 3, p. 439-451, 2005.

KEARNEY, P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, London, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.*, Amsterdam, v. 156, p. 38-50, 1991.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause – alimentos, nutrição e dietoterapia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NELSON, S. E.; FRANTZ, J. A.; ZIEGLER, E. E. Absorption of fat and calcium by infants fed a milk-based formula containing palm olein. *J. Am. Coll. Nutr.*, New York, v. 17, n. 4, p. 327-32, 1998.

SAMUELSSON, A. M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, United States, v. 51, n. 2, p. 383-392, 2008.

SEGOVIA, S. A. et al. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed. Res. Int.*, London, v. 2014, n. 2014, p. 1-14, 2014.

SHILLS, M. E. et al. **Tratado da nutrição moderna na saúde e na doença**. 10 ed. São Paulo: Manole, 2009.

SILVA, J. R.V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.*, London, v. 46, n. 2, p. 157-166, 2006.

SRINIVASAN, M. et al. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, United States, v. 290, p. E129-E134, 2006.

WILDING, J. P. H. Pathophysiology and aetiology of obesity. *Medicine*, Kidlington, v. 34, n. 12, p. 501-505, 2011.

WREN, T. A. et al. Bone marrow fat is inversely related to cortical bone in young and old subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Philadelphia, v. 96, n. 3, p. 782-786, 2011.

Submetido em: 18/04/2016

Aceito em: 27/03/2017