

Beatriz Vieira de Paiva

**Implicações da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica na
composição molecular e rugosidade superficial do osso
cortical**

*Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular
composition and surface roughness of cortical bone*

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada

Uberlândia, 2019

Beatriz Vieira de Paiva

**Implicações da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica na
composição molecular e rugosidade superficial do osso
cortical**

*Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular
composition and surface roughness of cortical bone*

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva

Prof Dr Marcelo José Barbosa Silva

Prof Dr. Vinicius Rosa

Uberlândia, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P149i
2019 Paiva, Beatriz Vieira de, 1990
Implicações da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica na composição molecular e rugosidade superficial do osso cortical = Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular composition and surface roughness of cortical bone [recurso eletrônico] / Beatriz Vieira de Paiva. - 2019.

Orientador: Robson Sabino Silva.

Coorientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1353>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Odontologia. 2. Obesidade. 3. Osso cortical. 4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. I. Silva, Robson Sabino, 1981, (Orient.). II. Botelho, Françoise Vasconcelos, 1971, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGO				
Data:	29 de Março de 2019	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:25
Matrícula do Discente:	11712ODO001				
Nome do Discente:	Beatriz Vieira de Paiva				
Título do Trabalho:	Implicações da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica na composição molecular e rugosidade superficial do osso cortical				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Processo de Reparo				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Processo de Reparo				

Reuniu-se no Anfiteatro/sala **23 do Bloco 4L**, Campus **Umuarama**, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em **Janeiro de 2019**, assim composta: Professores Doutores: **Marcelo José Barbosa Silva (UFU)**; **Vinicius Rosa (National University of Singapore)** e **Robinson Sabino da Silva** orientador(a) do(a) candidato(a). O Prof. Dr. Vinicius Rosa participou da defesa de Dissertação por meio de web-conferência desde a cidade de Singapura. e os demais membros da Banca participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Robinson Sabino da Silva**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre**.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2019, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo José Barbosa Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2019, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Rosa, Usuário Externo**, em 29/03/2019, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1105948** e o código CRC **42A92873**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que tanto amo: meus pais Manoel e Maria Helena e minha irmã Yane, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e abençoar meu caminho e amparar-me nos momentos difíceis.

À minha família, por me apoiar sempre e ser a base de sustentação dos meus sonhos.

À minha avó Geralda, que mesmo sem entender o que esse caminho significava, sempre fez suas orações por mim.

Ao meu orientador Robinson Sabino-Silva, por todos os ensinamentos, por e contribuições para meus conhecimentos, pela ajuda no projeto, e principalmente por compreender minhas restrições ao fazer o curso morando em outra cidade. Muito obrigada por tudo.

Aos professores, Dr. Gustavo Rabelo, Dra Paula Dechichi, Dra Françoise Botelho, que, cada um de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos demais professores do programa de Pós-graduação por todos pelos ensinamentos proporcionados nestes dois anos de Mestrado.

Às amigas Léia e Emília, que sempre tiveram boa vontade em ensinar e colaborar em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos do mestrado, em especial Brenda, Eduardo, Cristiane, Luís, Nayara e Fernanda pela convivência ao longo destes dois anos.

Às minhas queridas amigas, Anna Carolina, Edielly, Fernanda Ladico, Jussara, Ludiele, Mirian, Pâmella, Silvana, que apesar da distância são presenças constantes em minha vida.

Ao John, Bruno, Graça, Brenda, Ester, Fabrício e demais funcionários pela colaboração e disposição em ajudar.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, por permitir o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao ICBIM e CPBio, que disponibilizaram sua estrutura física, para que o desenvolvimento da minha pesquisa fosse possível.

A todas as pessoas envolvidas que colaboraram de alguma forma, com o desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

Não importa o que fizeram com você. O
que importa é o que você faz com aquilo
que fizeram com você

Jean Paul Sartre

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução e referencial teórico	9
1.1 Tecido ósseo.....	9
1.2 Obesidade: definição, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos.....	12
1.3 Modelos animais de obesidade.....	14
1.4 Obesidade e o tecido ósseo	15
2. Capítulos	18
Artigo 1: Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular composition and surface roughness of cortical bone.....	19
Abstract.....	20
1. Introduction	21
2. Methods	22
2.1 Experimental design.....	22
2.2 H&E analysis.....	23
2.3 Micro-Computed Tomography Analyses (micro-CT).....	24
2.4 Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM).....	24
2.5 ATR-FTIR spectroscopy.....	24
2.6 Statistical analysis.....	25
3. Results	26
3.1 H&E analysis.....	27
3.2 Micro-Computed Tomography Analyses.....	28
3.3 Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM).....	30
3.4 Analysis by FITR spectroscopy.....	30
4. Discussion	35
5. References	38
Referências	44
Anexo	48

Resumo

O aumento simultâneo da obesidade em todo o mundo parece ser impulsionado principalmente por mudanças no sistema alimentar global. A obesidade tem efeitos complexos no metabolismo ósseo. Ela está associada a um maior conteúdo mineral ósseo que pode proteger contra a fratura. Paradoxalmente, a obesidade está relacionada com propriedades mecânicas reduzidas, como resultado da dieta rica em gordura (HFD). Microtomografia computadorizada (micro-CT), espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica (AFM) foram empregados para caracterizar a microarquitetura, a composição molecular e a rugosidade do osso cortical em um modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura. Para isso, camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente distribuídos para serem alimentados com dieta controle (control) ou HFD por 13 semanas. Camundongos HFD apresentaram maior peso corporal ($P < 0,05$) e índice de obesidade de Lee ($P < 0,05$) em relação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas na análise histomorfométrica e microarquitetura da tíbia cortical em camundongos HFD e control. Além disso, a dieta hiperlipídica promoveu redução ($P < 0,05$) na rugosidade superficial da tíbia cortical em comparação com o controle. A HFD também induziu uma diminuição ($P < 0,05$) nos níveis de amida II, colágeno e carbonato na tíbia cortical. Em resumo, mostramos que a HFD promove a redução da rugosidade da superfície associada à redução de componentes orgânicos/inorgânicos como amida II, colágeno e fosfato, o que sugere que ambas ultra-caracterizações sem precedentes podem fornecer uma nova visão sobre comprometimento ósseo relacionado à obesidade/DH, composição e rugosidade superficial.

Palavras-chave: obesidade, osso, dieta HFD, colágeno, espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise de microscopia de força atômica (AFM), carbonato, amida

Abstract

The simultaneous increases in obesity around the world seem to be driven mainly by changes in the global food system. Obesity has complex effects on bone metabolism. It is associated with greater bone mineral content which can protect against fracture. Paradoxically, the obesity is related with reduced mechanical properties as a result of high-fat diet (HFD). Micro-CT system, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis were employed to characterize the microarchitecture, molecular composition and rugosity of cortical bone in a mouse model of High-fat diet-induced obesity. For this, C57BL/6 mice were randomly assigned for 13 weeks to either a control diet-fed (Control) or HFD-fed. HFD mice showed higher body weight ($P < 0.05$) and Lee obesity index ($P < 0.05$) compared to control. No significant differences in histomorphometric analysis and microarchitecture compartments of the cortical tibia were observed in HFD and control mice. Besides, HFD promoted reduction ($p < 0.05$) in surface roughness of cortical tibia compared with control. HFD also induced a decrease ($p < 0.05$) in levels of amide II, collagen and carbonate in cortical tibia. In summary, we showed that HFD promotes reduction of surface roughness associated with reduction of organic/inorganic components as amide II, collagen and phosphate, which suggests that both unprecedented ultra-characterizations can provide novel insight into the HFD/obesity-related compromised bone molecular composition and surface roughness.

Keywords: obesity, bone, HFD diet, collagen, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis, carbonate, amide.

1. Introdução e referencial teórico

1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que exerce funções importantes no corpo, tais como locomoção, suporte e proteção dos tecidos moles e órgãos, homeostase mineral, hematopoiese e proteção da medula óssea (Florencio-Silva et al., 2015). O osso é um tecido mineralizado altamente dinâmico em constante remodelação (Datta et al., 2008). Desse modo, a massa óssea é reflexo do equilíbrio entre a deposição e a reabsorção tecidual (Cao et al., 2005).

Anatomicamente, o osso longo é subdividido em diáfise, epífise, metáfise, cartilagem articular, periósteo, cavidade medular e endósteo. O osso é um tecido conjuntivo mineralizado composto por uma matriz inorgânica formada por fosfato de cálcio, sob a forma de cristais de hidroxiapatita, agregada a uma matriz orgânica composta majoritariamente por colágeno tipo I e proteínas não colágenas, que juntas formam um arcabouço para a deposição dos cristais de hidroxiapatita, conferindo rigidez e resistência óssea (Boskey et al., 2002). A matriz colágena propicia ao osso a capacidade de suportar forças de tensão, enquanto que os constituintes minerais proporcionam capacidade de suportar cargas compressivas. Isto indica que a composição óssea e as propriedades mecânicas realizam um papel essencial na preservação da integridade do esqueleto (Raghavan et al., 2012).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como trabecular e cortical (Figura 1). O osso trabecular, que representa cerca de 20% da massa esquelética, é encontrado no esqueleto axial e no interior dos ossos longos dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises). O osso cortical, que corresponde a 80% da massa esquelética, prevalece em ossos longos como tíbia e fêmur com papel relevante na resistência óssea. O tecido ósseo, por meio da porção cortical e trabecular, é o principal território de depósito mineral em organismos vertebrados ao longo da vida (Rodan, 2000).



Figura 1: Representação estrutural dos ossos longos

O tecido ósseo é composto de uma porção celular e de uma matriz extracelular. A matriz extracelular possui cerca 65% de componentes inorgânicos e 35% de componentes orgânicos. O componente orgânico é formado por colágeno, proteínas não-colágenas (como osteocalcina e osteonectina), lipídeos e mucopolissacarídeos. As proteínas ósseas apresentam papel relevante na mineralização da matriz óssea, na ligação aos íons, na proliferação e diferenciação celular. A fase inorgânica é constituída principalmente por cálcio e fósforo, que são depositados como sais amorfos sobre a matriz extracelular e durante o processo de mineralização óssea, criam estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. As moléculas de colágeno formam uma estrutura tridimensional criando espaços para acomodar esses cristais (Bolean et al., 2017).

Apesar das células ósseas representarem menos de 2% do tecido ósseo, elas são as responsáveis pelas duas funções metabólicas primordiais do osso: remodelação óssea e manutenção dos níveis circulantes de cálcio e fósforo. Há 3 tipos principais de células no tecido ósseo: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, cada um exercendo uma atividade indispensável no

processo de remodelação óssea contínua, efetuada por reabsorção óssea e formação óssea (Boyle et al., 2003).

Os osteoblastos são células mononucleadas que foram diferenciadas a partir de células mesenquimais multipotentes da medula óssea e apresentam formato cuboide. Os osteoblastos são responsáveis por secretar a matriz orgânica do osso e pela indução do processo de mineralização. Para realizar estas funções os osteoblastos se organizam em uma camada única recobrimdo os sítios ativos de formação óssea (Harada & Rodan, 2003). Esta matriz óssea que teve sua secreção recente e ainda não está adequadamente calcificada recebe o nome de osteóide. Em situação de atividade osteoblástica ativada, os osteoblastos podem ficar encarcerados dentro da matriz óssea que eles mesmo secretaram, isto leva a alterações morfológicas e metabólicas bem evidentes, o que leva a formação de osteócitos. Os osteócitos apresentam prolongamentos citoplasmáticos que permitem interação celular com outros osteócitos e células de revestimentos. Ademais, é bem descrito o papel dos osteócitos na manutenção da integridade da matriz óssea. Essa célula também atua na regulação da atividade osteoblástica e osteoclástica (Bellido, 2014a; Walsh et al., 2006).

Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes que foram derivadas de células progenitoras de monócitos/macrófagos da medula óssea. Os osteoclastos ficam localizados principalmente na superfície óssea em depressões chamadas de lacunas de Howship. Em uma região específica da borda em escova, as células osteoclásticas promovem a secreção de íons hidrogênio devido a ativação de bombas de prótons. Estes íons promovem a acidificação do meio e, conseqüente, dissolução dos cristais de hidroxiapatita e exposição da matriz óssea. O íons hidrogênio em contato com a matriz óssea também podem degradar este componente orgânico e formar novas lacunas de Howship (Boyle et al., 2003).

Um conjunto de células derivadas de osteoblastos que entraram em estado de quiescência é chamado de células de revestimento. Estas células achatadas recobrem superfícies ósseas inativas e apresentam íntimo contato

com osteóides. Sabe-se que estas células desempenham papel relevante para proteger superfícies ósseas de agentes químicos com potencial de degradar a matriz óssea e no processo de regulação da calcemia (Bellido, 2014b)

Em um elegante trabalho (Costa et al., 2013), foi demonstrado que a atividade de osteoblastos e osteoclastos pode ser regulada pela topografia tecidual. A adesão e a diferenciação dos osteoblastos em matrizes rugosas de hidroxiapatita foram maiores do que em superfícies lisas. Por outro lado, a adesão e atividade, dos osteoclastos foi maior em superfícies lisas em comparação as superfícies rugosas.

A resistência final, o suporte e outras propriedades mecânicas fornecidas por um tecido calcificado como o osso dependem, em parte, da estrutura molecular e do arranjo de seus cristais minerais constituintes dentro de sua matriz orgânica (Landis, 1995).

1.2 Obesidade: definição, aspectos patofisiológicos e epidemiológicos

O consumo de alimentos ricos em gordura contribui para a obesidade (Pratchayasakul et al., 2011). A obesidade, que tem sido considerada uma pandemia, está associada a um aumento do risco de morte, morbidade e envelhecimento acelerado (Roth et al., 2004). O sobrepeso (ou excesso de peso) e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura, o que está associado com riscos à saúde (WHO, 2018).

A obesidade é medida pelo índice de massa corporal (IMC), o peso de uma pessoa (em quilogramas) dividido pelo quadrado de sua altura (em metros). Uma pessoa com IMC entre 18.5 – 24.9 é considerada com peso normal, IMC entre 25 - 29.9 está acima do peso/sobrepeso e o IMC ≥ 30 é caracterizada como obesa (WHO, 2018). O IMC é um índice amplamente utilizado pelos serviços públicos para atendimento da população e considerado uma das melhores alternativas clínicas de baixo custo para mensurar a obesidade. Esse excesso de peso e obesidade constituem fatores de risco para

muitas doenças não transmissíveis, tais como diabetes, desordens musculoesqueléticas, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (WHO, 2018).

No Brasil, mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas ao longo do tempo levaram a uma transição nos padrões nutricionais, resultando em uma redução gradual da desnutrição e aumento da prevalência para um estado de sobrepeso e obesidade. Esta situação é semelhante à observada em países desenvolvidos nas décadas anteriores (Monteiro et al., 2004).

Na cidade de São Paulo, a obesidade em adolescentes aumentou de 3,7% em 2003 para 9,3% em 2015. Destaca-se que no gênero feminino esta prevalência aumentou de 2,5% para 11,2% nesse período. Os índices de obesidade duplicaram neste período entre 2003 e 2015. (Pereira et al., 2018).

Coexistindo paradoxalmente com a desnutrição, está ocorrendo um aumento da prevalência e da incidência de sobrepeso e obesidade em muitas partes do mundo. Algumas estimativas da OMS apontam que em 2014 mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, dos quais 600 milhões eram obesos, correspondendo a 13% da população adulta do planeta. A prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016 (Figura 2) (WHO, 2018).

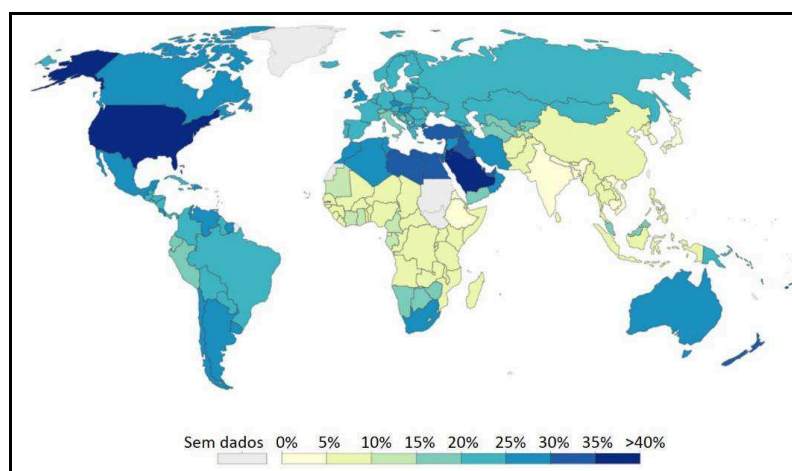


Figura 2: Porcentagem de adultos acima dos 18 anos que são definidos como obesos baseados no índice de massa corporal (IMC \geq 30). Fonte: OMS, 2016

A expansão crescente da obesidade reflete um grave problema de saúde pública com implicações para a sociedade e para os sistemas de saúde (Mazzoccante et al., 2013). A obesidade e doenças associadas tem implicações econômicas que estão associadas a custos médicos diretos e também com custos indiretos ou sociais, tais como redução da qualidade de vida, diminuição da produtividade, incapacidade com aposentadorias precoces e morte (Mazzoccante et al., 2013)

1.3. Modelos animais de obesidade

Modelos animais de obesidade induzida por dieta são alternativas importantes para o estudo desta condição clínica em órgãos e tecidos. Estes modelos também mostram-se eficientes para o estudo da fisiopatologia das complicações associadas à obesidade, visto que é o modelo mais próximo da gênese da obesidade em humanos (Rosini et al., 2012). Entre as vantagens desses modelos animais destaca-se a possibilidade de estudos em período de tempo considerado curto, isso é benéfico tanto financeiramente quanto em relação aos aspectos éticos da utilização de animais de experimentação. Oferece ainda meios para o desenvolvimento de estudos relacionados ao tratamento da obesidade e suas comorbidades que compõem a síndrome metabólica (White et al., 2013).

Entre as várias vantagens em usar os roedores como modelo de pesquisa, o mais importante é a grande semelhança com os humanos em aspectos da anatomia, fisiologia e genética. Destaca-se a presença de similaridade em mais de 95% do genoma humano. Adicionalmente é considerado vantajoso: a disponibilidade de um número de ferramentas genéticas / moleculares eficientes; o pequeno tamanho do animal que propicia uma redução na quantidade de fármacos e tempos experimentais, tornando-o um modelo eficiente em termos de custo, espaço e tempo necessários para realizar a pesquisa (Roth et al., 2004; Vandamme, 2015).

Como muitos dos genes responsáveis por doenças complexas, como câncer, disfunção metabólica, doenças genéticas, asma etc., são compartilhados entre roedores e humanos, pesquisas em roedores e especialmente em camundongos C57BL/6 são cruciais para a identificação de fatores de risco genéticos na população humana (Vandamme, 2015).

1.4 Obesidade e o tecido ósseo

Estudos em roedores demonstraram que a adiposidade em excesso e uma dieta com alto teor de gordura podem ser particularmente prejudiciais para a qualidade da densidade mineral óssea. Estas alterações parecem ter efeitos mais severos quando a dieta é oferecida a animais jovens sem o processo de maturação tecidual óssea consolidado (Cao; Gregoire; Gao, 2009; Patsch et al., 2011).

Uma série de trabalhos aponta que a obesidade está relacionada com alterações no metabolismo ósseo. Apesar de um número considerável de estudos relacionados a este tema, ainda existem uma série de efeitos da obesidade no tecido ósseo que ainda não estão compreendidos (Shapses and Sukumar, 2012). A obesidade parece afetar o metabolismo ósseo de uma forma complexa. Se por um lado algumas pesquisas apontam que o aumento do IMC promove aumento da densidade mineral, outro conjunto de pesquisas indicam que a obesidade pode promover redução a atividade de formação óssea (osteoblastogênese) e aumento da atividade osteoclástica. Considerando que a obesidade está associada com aumento nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias e no estresse oxidativo e que esses fatores também podem regular os processos de regulação da formação óssea, fica evidente uma possível relação sistêmica com efeitos diretos no tecido ósseo. (Cao, 2011).

Está bem estabelecido que o peso corporal ou índice de massa corporal (IMC) está positivamente correlacionado com densidade mineral óssea ou massa óssea (Felson et al., 2009). O baixo peso corporal é um fator de risco

para densidade mineral óssea e aumento da perda óssea em humanos (Ravn et al., 1999). Apesar dos efeitos positivos da carga mecânica, conferida pelo aumento do peso corporal com a obesidade nos ossos, algumas pesquisas sugerem que a obesidade é prejudicial à saúde óssea. Estudos indicam que tais efeitos positivos do peso corporal não compensariam completamente os efeitos prejudiciais da obesidade nos ossos, pelo menos em modelos animais obesos (Cao, 2011).

Além dos efeitos sobre as taxas de formação óssea, osteoporose ou densidade óssea mineral, a obesidade também está associada a fraturas. Destaca-se que a presença destas alterações não ocorre somente em idosos. Pesquisas demonstraram aumento da prevalência de fraturas de antebraço em adultos jovens obesos e também uma redução da massa óssea em crianças obesas (Flynn et al., 2007; Goulding et al., 2005). Vale ressaltar, que a estrutura óssea é prejudicada em adultos com maior adiposidade visceral (Gilsanz et al., 2009; von Muhlen et al., 2007)

Tanto a obesidade quanto a osteoporose apresentam alterações hormonais em comum e estão associadas com aumento de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo. Esses fatores contribuem para a maior aquisição de gordura e a perda de massa óssea (Shapses and Sukumar, 2012). Há indícios de que a maior adiposidade na obesidade está associada a uma menor taxa de formação óssea (Papachristou et al., 2018).

O tipo de dieta também é capaz de perturbar o metabolismo ósseo de forma indireta. Dietas com alto teor de gordura tem a capacidade de interferir desfavoravelmente na absorção intestinal de cálcio, levando à diminuição da biodisponibilidade desse elemento no organismo, cujo suprimento adequado é indispensável à formação óssea (Nelson et al., 1998).

A obesidade também oferece riscos para tecidos diretamente relacionados com a atuação da Odontologia. Foi demonstrado que o consumo prolongado de dieta hiperlipídica (dieta rica em gordura) causou resistência à insulina, obesidade e também promoveu osteoporose nos ossos maxilares (Pramojanee et al., 2013). A obesidade induzida por dietas com alto teor de

gordura durante os estágios de crescimento também promoveu osteoporose no osso mandibular associado com aumento do risco de doença periodontal espontânea (Fujita & Maki, 2015). Alguns estudos epidemiológicos caracterizaram a associação entre doença periodontal e obesidade (Chaffee & Weston, 2010; Suvan et al., 2011) e indicaram que a obesidade perde apenas para o tabagismo como fator de risco para destruição de tecido periodontal inflamatório (Nishida et al., 2005).

Considerando que o efeito da obesidade induzida por dieta rica em gordura na microarquitetura do osso cortical permanece em debate e sua capacidade de modular os parâmetros histomorfométricos, a composição molecular óssea e a topografia da superfície não foram consideradas, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da obesidade induzida por dieta rica em gordura na microarquitetura, parâmetros histomorfométricos, composição molecular e rugosidade superficial do tecido ósseo cortical.

2. CAPÍTULOS

Artigo 1: Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular composition and surface roughness of cortical bone

Artigo a ser enviado para publicação no periódico Calcified Tissue International

Beatriz Vieira de Paiva, Larissa Pereira Caetano, Emília Maria Gomes Aguiar, Léia Cardoso-Sousa; Stephanie Wutke; Pedro Henrique Justino Limirio,, Paula Dechichi; Marcelo Barbosa Silva, Gustavo Davi Rabelo, Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Luiz Ricardo Goulart; Françoise Vasconcellos Botelho, Robinson Sabino-Silva

Implications of obesity induced by high fat diet on the molecular composition and surface roughness of cortical bone

Beatriz Vieira de Paiva¹, Larissa Pereira Caetano², Emília Maria Gomes Aguiar¹, Léia Cardoso-Sousa¹; Stephanie Wutke¹; Pedro Henrique Justino Limirio³, Paula Dechichi³; Marcelo José Barbosa Silva⁴, Gustavo Davi Rabelo⁵, Priscilla Barbosa Ferreira Soares⁶, Luiz Ricardo Goulart^{2,7}; Françoise Vasconcellos Botelho², Robinson Sabino-Silva^{1*}.

1 Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

2 Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

3 Department of Morphology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

4 Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

5 Department of Stomatology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

6 Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlaandia, Minas Gerais, Brazil.

7 Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, California, USA.

*Corresponding author

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

The simultaneous increases in obesity around the world seem to be driven mainly by changes in the global food system. Obesity has complex effects on bone metabolism. It is associated with greater bone mineral content which can protect against fracture. Paradoxically, the obesity is related with reduced mechanical properties as a result of high-fat diet (HFD). Micro-CT system, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis were employed to characterize the microarchitecture, molecular composition and rugosity of cortical bone in a mouse model of High-fat diet-induced obesity. For this, C57BL/6 mice were randomly assigned for 13 weeks to either a control diet-fed (Control) or HFD-fed. HFD mice showed higher body weight ($P < 0.05$) and Lee obesity index ($P < 0.05$) compared to control. No significant differences in histomorphometric analysis and microarchitecture compartments of the cortical tibia were observed in HFD and control mice. Besides, HFD promoted reduction ($P < 0.05$) in surface roughness of cortical tibia compared with control. HFD also induced a decrease ($P < 0.05$) in levels of amide II, collagen and carbonate in cortical tibia. In summary, we showed that HFD promotes reduction of surface roughness associated with reduction of organic/inorganic components as amide II, collagen and phosphate, which suggests that both unprecedented ultra-characterizations can provide novel insight into the HFD/obesity-related compromised bone molecular composition and surface roughness.

Keywords: obesity, bone, HFD diet, collagen, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis, carbonate, amide.

1. Introduction

The rising prevalence of obesity in almost all countries has been described as a global pandemic [1]. It seems to be related mainly by alteration in the global food system, which is producing more processed, low-cost, and effectively marketed food than ever before [1]. The high-fat diet consumption promotes the development of obesity, which are related with implications in several physiological systems [2]. Body mass index frequently correlates positively with bone density in humans [3], mainly because of increasing mechanical loading on weight-bearing bones of obese subjects [4]. Considering that the skeleton adapts most closely to lean body mass, such that subjects with high percent body fat may have lower bone mineral density than expected for their total body mass, other studies have challenged the notion that high body mass is unequivocally beneficial to bone [5], [6], [7].

It has been suggested that HFD initially increases bone deposition followed by impaired bone formation and turnover due to metabolic dysregulation [8]. Some studies indicate that diet-induced obesity in mice may deteriorate trabecular bone volume and architecture without significant impact on the cortical compartment measured by microarchitecture analysis [9], [10], [11]. Furthermore, no significant high-fat diet effects were described on mature cortical bone mechanical properties, geometric structure and mineral content of roosters [12]. On the other hand, diet-induced obesity in mice increases bone size associated with decreasing of mechanical properties in cortical bone [13]. The maximum loads that the bones can sustain, however, remain essentially unchanged with the implication that the quality and quantity of bone act in a compensatory manner to optimize the load-bearing behavior of bone [13].

Considering that the effect of HFD-induced obesity in cortical bone microarchitecture remains in debate and its capacity to modulate histomorphometric parameters, bone molecular composition and surface topography were not considered, the aim of the present study was to evaluate

the effects of HFD diet-induced obesity on bone tissue by microarchitecture, histomorphometric parameters, molecular composition and surface roughness.

2. Methods

2.1. Experimental design

Animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (Proposal #128/2015) and performed according to federal guidelines for the care and use of animals in research. All procedures were carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals.

Ten-week old C57BL/6 male mice were fed a high-fat diet (Research Diets High-Fat Diet 37,5% fat, protein 20%, carbohydrate 42,2%; HFD: n=7); or standard laboratory chow (Nuvilab CR-1 Diet 4% fat, protein 14%, carbohydrate 77%; control: n=9) for a diet duration of 13 weeks. All rats, grouped in cages of four animals each, were maintained under controlled temperature and photoperiod (12 hr light, 12 hr dark) with food provided ad libitum. All mice also allowed free access to water. The animals were individually placed in a container to be weighed once weekly during the protocol. After euthanasia (Ketamine 80 mg/kg and Xilasine 10 mg/kg), were measured the nasoanal lengths, the body weight and calculated the Lee index in both control and HFD mice. This index was calculated by dividing the cube root of body weight (g) by nasoanal length (cm) and multiplying the result by 1000 [14]. After that, tibiae were dissected and removed. Rights tibiae were frozen in PBS in freezer -20°C to be used in micro-CT, ATR-FTIR spectroscopy and AFM analysis. In contrast, the left side were fixed in formalin and underwent histological processing (Figure 1). All efforts were made to minimize animal suffering. The methods were carried out in accordance with approved guidelines.

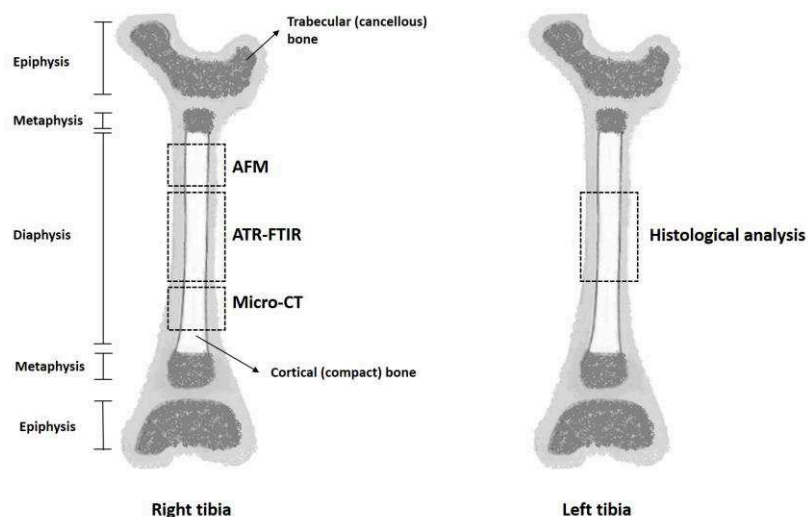


Figure 1: Experimental model of bone analysis in HFD and control mice.

2.2. H&E analysis

The distal mid-diaphysis were decalcified in 4.13% EDTA for 5 weeks, dehydrated with graded ethanol and embedded in paraffin. From each tibia were obtained 4 semi-serial transversal histological sections (5 μ m) that were stain in Hematoxylin-Eosin (H&E) for qualitative and quantitative bone matrix evaluations. The histological images of the cortical bone were scanned, using a digital scanner ScanScope AT Turbo® (Leica Biosystems Nussloch, Shinjuku-ku, Nußloch/Germany) [15]. In qualitative histological analysis, the characteristics of cortical bone matrix were evaluated.

In histomorphometric analysis, the software Aperio ImageScope® (Leica Biosystems Nussloch, Shinjuku-ku, Nußloch/Alemanha) was used to capture 4 images (20x magnification) of cortical bone, to obtain representative fields of osteocyte distribution over the bone matrix in each histological section. The images were evaluated by the point counting method in Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA). A grid was created on image and counted the number of points (intercession between two lines) that touched bone matrix and osteocytes lacuna, empty or with the cells. Thus, there was calculated a percentage of proportion of total number points in image relative to the number of points that touched the assessed structures.

2.3. Micro-Computed Tomography Analyses (micro-CT)

The tibial diaphysis was scanned to obtain high-quality images, and the cortical bone was selected as the region of interest (ROI). All scans were performed using a micro-CT scanner (Sky-Scan 1272, Bruker, Kontich, Belgium), and the images were obtained under the following conditions: 70 kV voltage; 142 μ A tube current; 0.5 mm aluminum filter; 180° rotation; and 5 μ m resolution pixel size. All of the resulting images were reconstructed using NRecon software (v.1.6.9.10, Bruker, Kontich, Belgium). For all reconstructed images, the ROI was defined as tibial diaphysis. The trabecular and cortical bone were distinguished and separated by automatic processes, and only cortical bone was used (CT Analyzer, v. 1.14.4.1+(64-bit), SkyScan, Bruker, Kontich, Belgium). The global threshold used for bone segmentation (68 down and 255 upper) was chosen to differentiate the pores from bone tissue. The following parameters were measured in the cortical ROI: thickness (Ct.Th, mm); porosity (Ct.Po, %); total closed porosity (Po.cl, %); bone surface by bone volume (BS/BV, mm⁻¹); degree of anisotropy (Ct.DA, #); fractal dimension (Ct.FD, #); closed pore number (Po.n(cl), [16, 17].

2.4 Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM)

The surface roughness (μ m) of cortical tibial diaphysis was analyzed with a scanning probe atomic force microscopy (AFM) (SPM-9600; Shimadzu, Tokyo, Japan). The images were recorded in tapping mode with a silicium cantilever (tip curvature radius of < 10nm, Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) at room temperature. Randomly selected sites of samples were scanned with rate of 200 kHz and 3-dimensional images were obtained and analyzed with AFM systemic software (Gwyddion) [24].

2.5 ATR-FTIR spectroscopy

FTIR spectroscopy is used to evaluate chemical fingerprints of samples. For this, the tibial diaphysis were stored – 20 °C and macerated with a sterile mortar and pestle to obtain sample spectra. Chemical profile in bone by FTIR

spectra were recorded in 4000-400 cm^{-1} region using FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) attached to a micro-attenuated total reflectance (ATR) accessory. All spectra were recorded at room temperature (23 ± 1 °C). The crystal material unit of ATR unit was a diamond disc as internal-reflection element. The sample penetration depth ranges between 0.1 and 2 μm and depends on the wavelength, the refractive index of ATR-crystal material and the incidence beam angle. The infrared beam was reflected at interface toward the sample. The air spectrum was considered as a background in FTIR analysis. Samples spectrum were taken with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans were performed to each analysis. FTIR spectra were normalized and baselines were corrected using OPUS 6.5 software (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) [18]. None noise removal techniques were applied. Briefly, in original spectra the vibrational mode ~ 1643 cm^{-1} is identified as νNH (amide I) bending vibrations [18, 19]; δNH (amide II) (bending vibration ~ 1550 cm^{-1}) [18, 20]; Carbonate (vibrational mode ~ 1410 cm^{-1} and ~ 870 cm^{-1}) [19, 21]; νCOO (amide III) (vibrational mode ~ 1242) [20, 21]; Collagen (vibrational mode 1338 cm^{-1}) [19, 22]; Phosphate (vibrational mode ~ 1012 cm^{-1}) [21]; Mineral phase by carbonate substitution parameters (Area of 850–890 cm^{-1} band/area of phosphate band); Mineralization degree (area of 900–1200 cm^{-1} phosphate band/area of amide I band (1585–1720 cm^{-1}); Mineral cristallinity (area of 1030 cm^{-1} subband/area of 1020 cm^{-1} subband); Collagen maturity (area of 1660 cm^{-1} subband/area of 1690 cm^{-1} subband); Collagen integrity (area of 1338 cm^{-1} subband/ area of 1550 cm^{-1} subband) [21, 23, 24]. The second derivative was obtained by applying Savitzky-Golay algorithm with polynomial order 5 and 20 points of the window. The normalization of second derivatives was made by mean, and the peak heights indicated the intensity of each bone component. The vibrational mode ~ 1336 cm^{-1} is identified as collagen and vibrational mode ~ 1404 cm^{-1} as carbonate [19, 22].

2.6 Statistical analysis

The data from all measured parameters were tested for normal distribution (Shapiro-Wilk and D'Agostino-Pearson tests) and the equality of

variances (Levene's test). The data passed in those tests were submitted to Student t-test and values were showed as mean \pm SEM. However, the data no passed in those tests were submitted to Mann-Whitney non-parametric test and values were showed in Median and Quartile (25% - 75%). All tests employed a level of significance of $\alpha=0.05$ and all statistical analyses were carried out with GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

As expected, the body weight, body weight gain, and Lee Index, were increased ($P < 0.05$) in HFD than control mice (Figure 2 a-c), confirming that HFD induced obesity. Glycemia was similar in control and HFD mice (Figure 2d). As expected, the relative weight of adipose tissue by body weight was increased ($P < 0.05$) in HFD than control mice (Figure 2e).

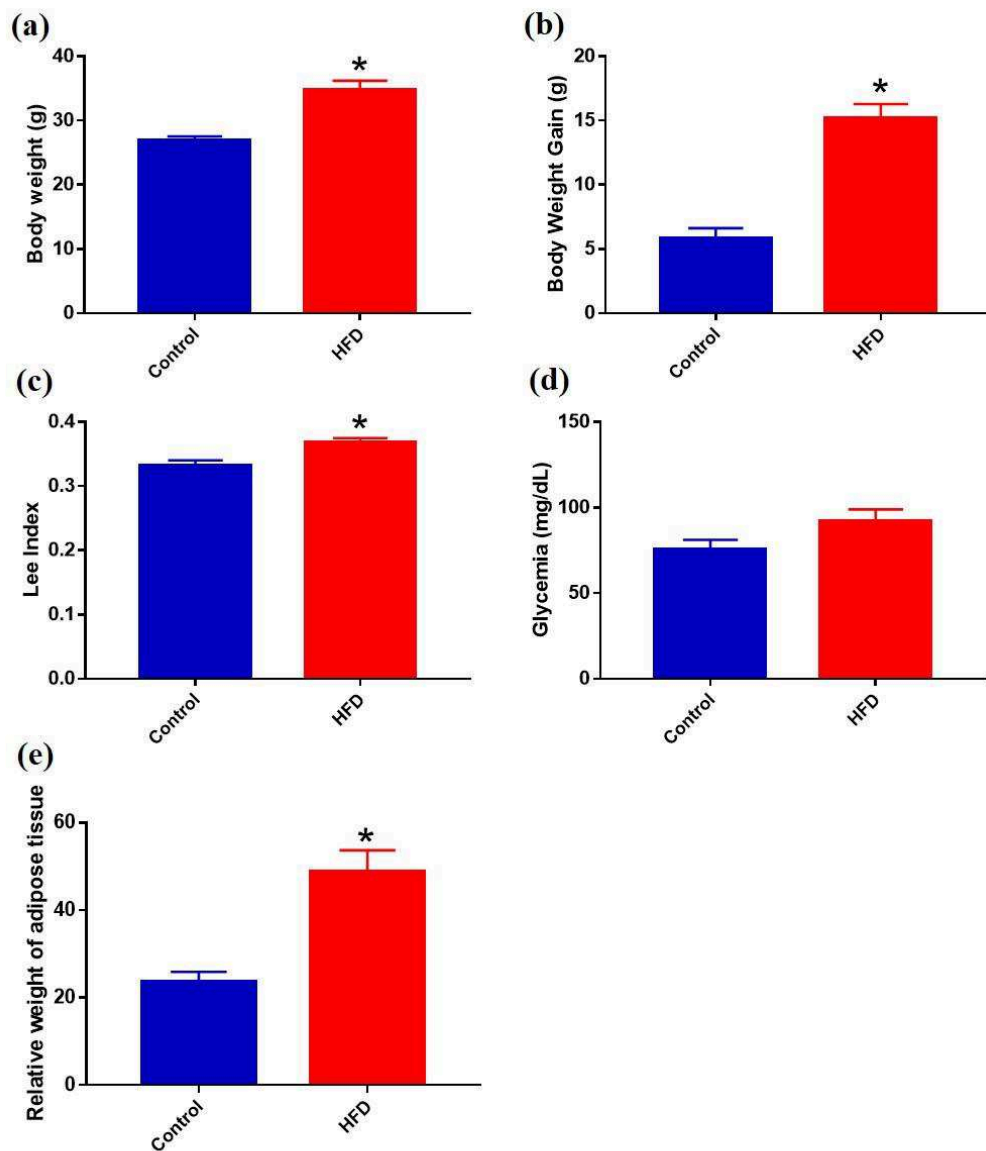


Figure 2 (a) Ultimate body weight (b) Body Weight Gain (c) Lee Index and (d) Glycemia (e) Relative weight of adipose tissue per body weight. Analyzed by t-Student parametric test, results are Mean ± SEM (* P < 0.05).

3.1 H&E analysis

Bone specimens stained with H & E had similar bone tissues in the qualitative analysis of the cortical bone in the HFD and control mice. The histological analysis also showed cortical bone with Haversian channels and osteocytes included in bone matrix in HFD and control mice. Channels containing blood vessels were noted, spatially distributed throughout the entire cortex with similar distribution in HFD and control mice (Figure 3 a-b). The histomorphometric analyses showed similar ($P > 0.05$) number of osteocytes, osteocyte lacunar density and bone matrix area in HFD and control mice (Figure 3 c-e).

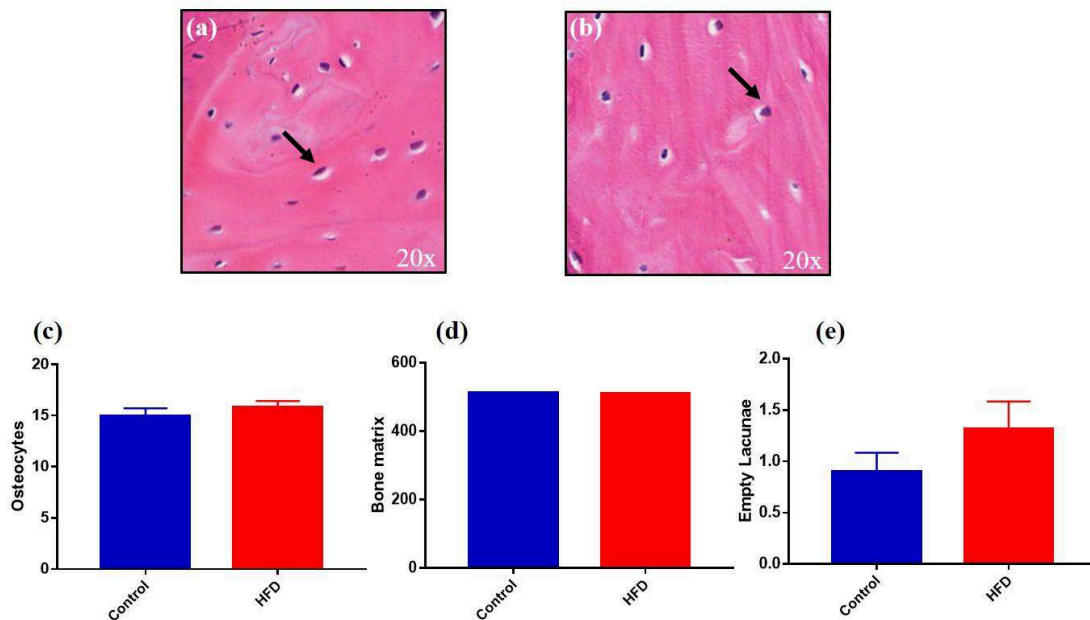


Figure 3 (a-b) Histological images representative of the cortical bone, osteocytes (black arrow) included in the bone matrix observed in the groups. (c) osteocytes, (d) bone matrix (e) empty lacunae. Analyzed by t-Student parametric test, results are Mean \pm SEM ($*P > 0.05$).

3.2 Micro-Computed Tomography Analyses

Furthermore, supplementary figure 1 shows the axial sections reconstructed by the computerized micro-tomography of the cortical tibia evidencing similar porous bone in control and HFD mice. The percent of cortical thickness (Ct.th, mm), cortical porosity (Ct.Po, %), total closed porosity (po.cl, %), bone surface by bone volume (BS/BV, mm^{-1}), degree of anisotropy (Ct.DA, #), fractal dimension (Ct.FD, #) and closed pore number (Po.n #) also remained unaltered ($P > 0.05$) between control and HFD mice (Table 1).

Table 1: The median and quartile (25% - 75%) values of all parameters calculated by micro-CT analysis..

Parameter	Control	HFD	p-value
Ct.Th (mm)	0.07/0.045-0.12	0.05/0.04-0.105	0.67
Ct.Po (%)	5.2/1.61-8.195	5.36/3.05-13.22	0.40
Po.cl (%)	1.22/0.44/2-205	1.39/0.69-2.085	0.87
BS/BV(mm^{-1})	28.55/14.41-38.55	31.81/19.4-51.57	0.44
Ct.DA (#)	0.445/0.3775-0.535	0.4/0.34-/0.575	0.55
Ct.FD (#)	2.44/2.385-2.46	2.46/2.375-2.465	0.89
Po.n(cl) (n)	12357/7126-15256	14733/6528-18158	0.69

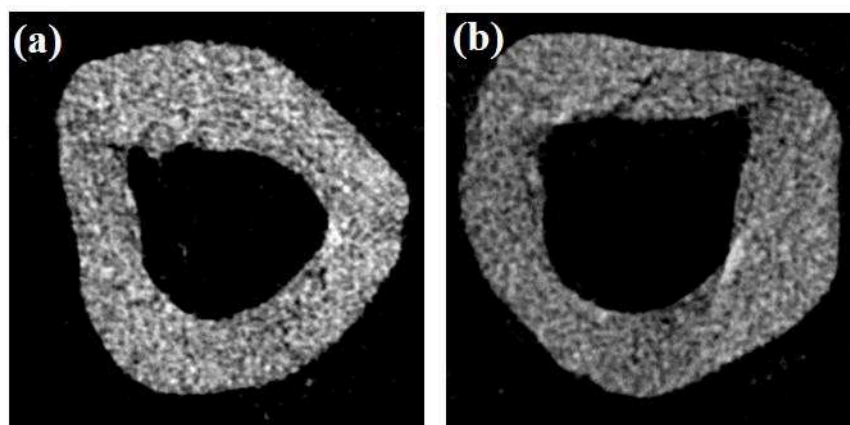


Figure 1 supplementary: micro-CT 3D rendering images. (a) Image of control mice. (b) Images of HFD mice.

3.3 Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM measurement was implemented to examine the difference of surface roughness of cortical bone in control and HFD mice. As shown in Figure 4, the cortical bone of the control mice clearly shows a surface roughness (Figure 4a). On the other hand, cortical bone in HFD rats present smoother surfaces (Figure 4b). The surface roughness was reduced ($\sim 40\%$, $P < 0.05$) in HFD than control mice (Figure 4c).

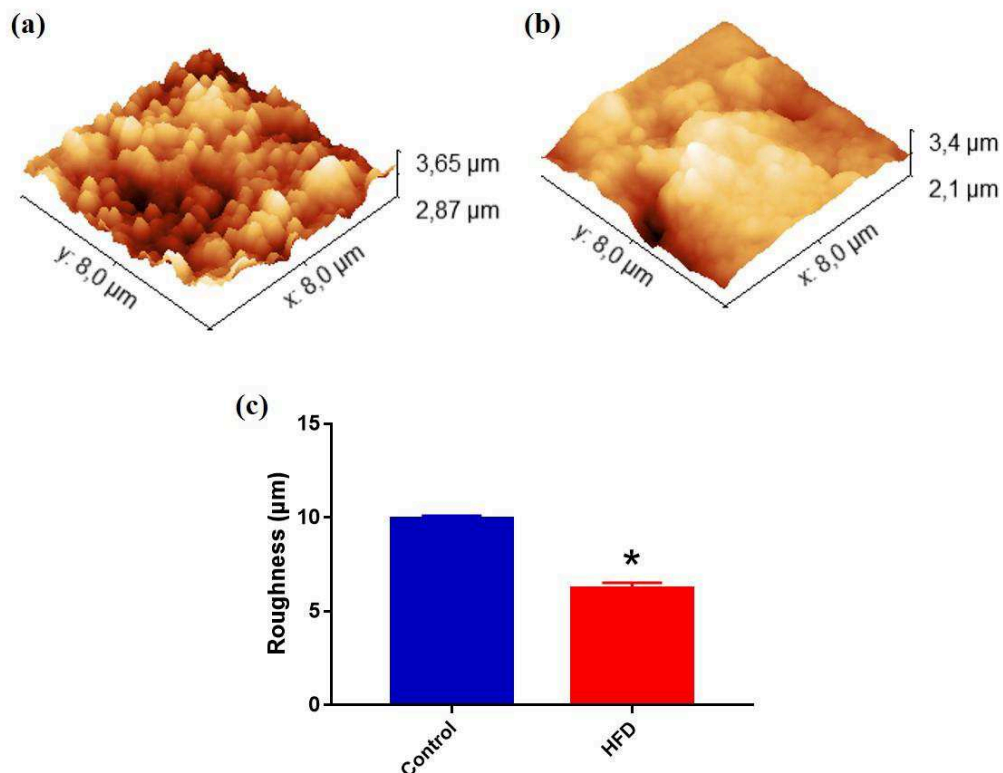


Figure 4 Topographic images of the bone surface by atomic force microscopy (AFM): (a) Represent the surface roughness in Control group. (b) Represent a decrease in surface roughness in HFD mice. (c) Analyzed by t-Student parametric test, results are Mean \pm SEM (* $P < 0,05$)

3.4 Analysis by FITR spectroscopy

The infrared spectrum obtained in tibia of control and HFD mice are represented in Figure 5a. The analysis of bone spectrum showed clearly

changes in amide II (1550 cm^{-1}), and similar spectra to amide I ($\sim 1643\text{ cm}^{-1}$), carbonate ($\sim 1410\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 870\text{ cm}^{-1}$), collagen ($\sim 1338\text{ cm}^{-1}$), amide III ($\sim 1242\text{ cm}^{-1}$) and phosphate ($\sim 1012\text{ cm}^{-1}$) between control and HFD mice. Figure 5b-c emphasize the reduction ($P < 0.05$) of amide II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) in HFD than control mice.

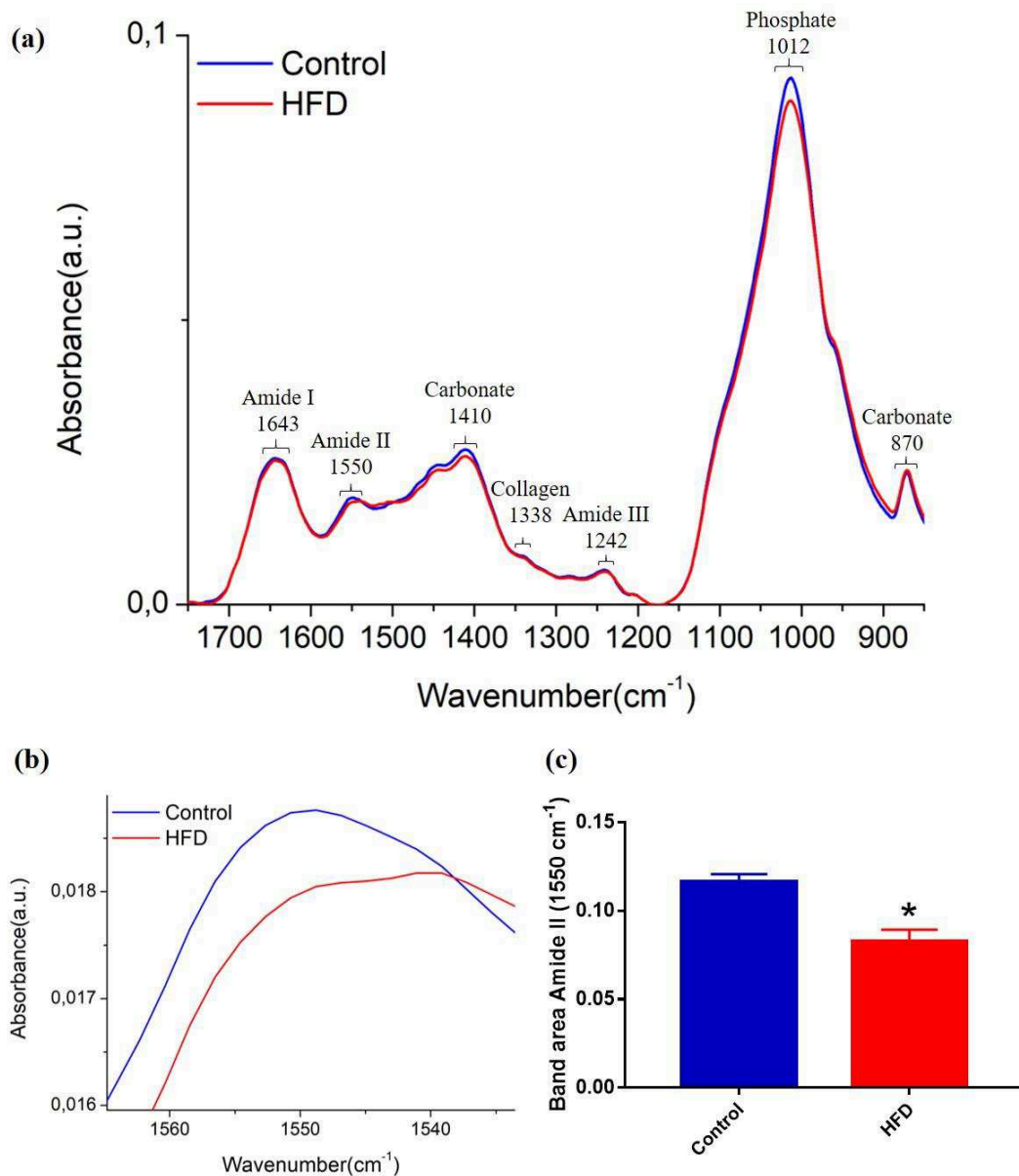


Figure 5 Representative FTIR spectrum of bone. (a) Mean spectrum of bone components obtained by FTIR analysis (b) Approximate image of band area Amide II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) (c) Analyzed by t-Student parametric test, results are Mean \pm SEM (* $P < 0.05$)

Collagen integrity, mineralization degree, collagen maturity, mineral crystallinity and carbonate substitution were unchanged in tibia of control and HFD mice (Figure 6).

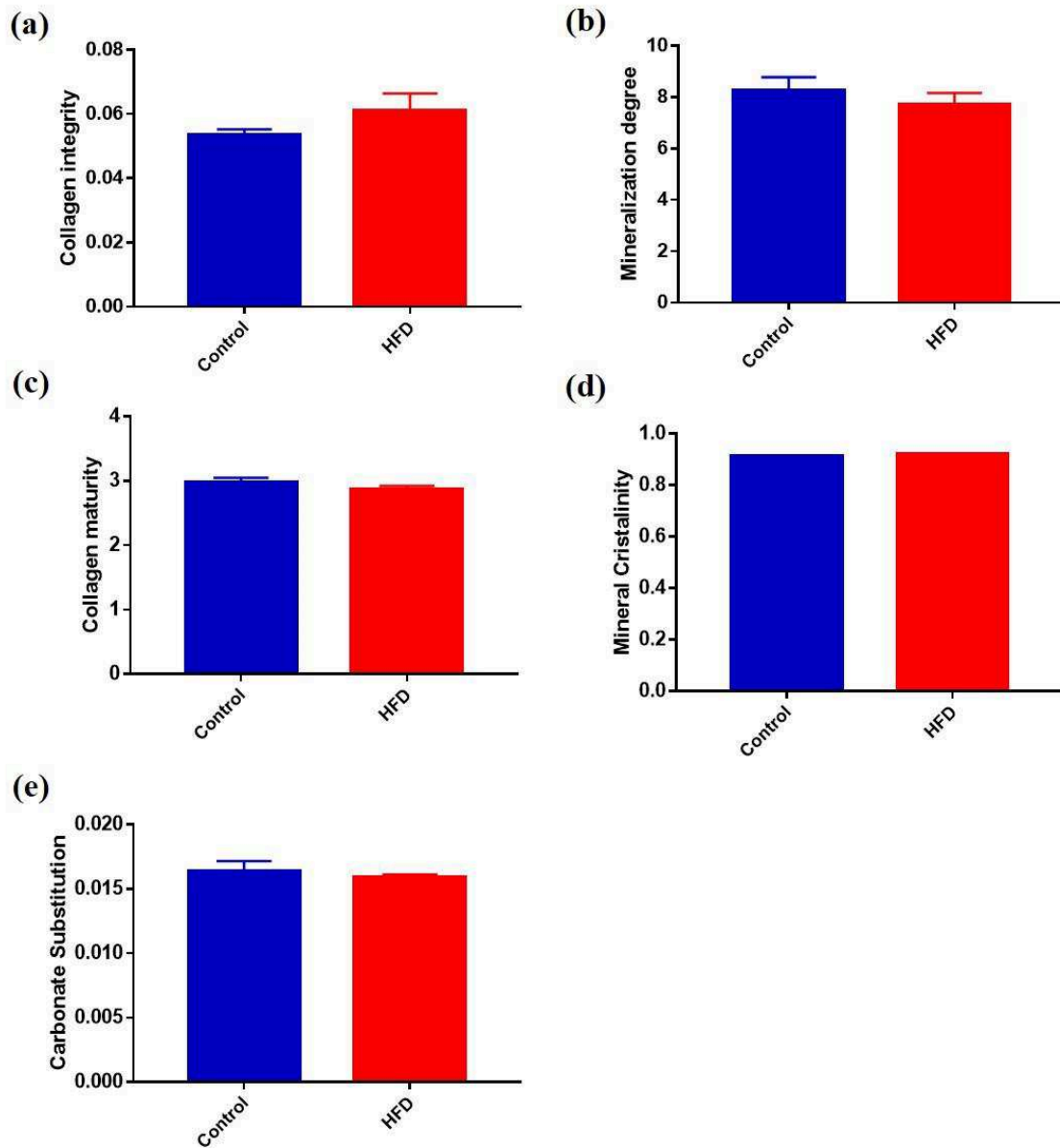


Figure 6 Level of bone parameters measured by FTIR spectroscopy. (a-d) Analyzed by t-Student parametric test, results are Mean \pm SEM ($*P < 0.05$). (e) Analyzed by Mann-Whitney test, results are Median \pm SEM ($*P < 0.05$).

We also carried out the second derivative of ATR-FTIR spectrum to depicts vibrational modes overlapped in the raw spectra of control and HFD mice (Figure 7a). Both control and HFD mice presented similar vibrational modes with subtle differences in amplitude of second derivatives ($P < 0.05$; data not shown), however two vibrational modes identified as collagen at $\sim 1336 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 7b-c) and carbonate at $\sim 1404 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 7d-e) were reduced ($P < 0.05$) in the bone of HFD compared to control mice.

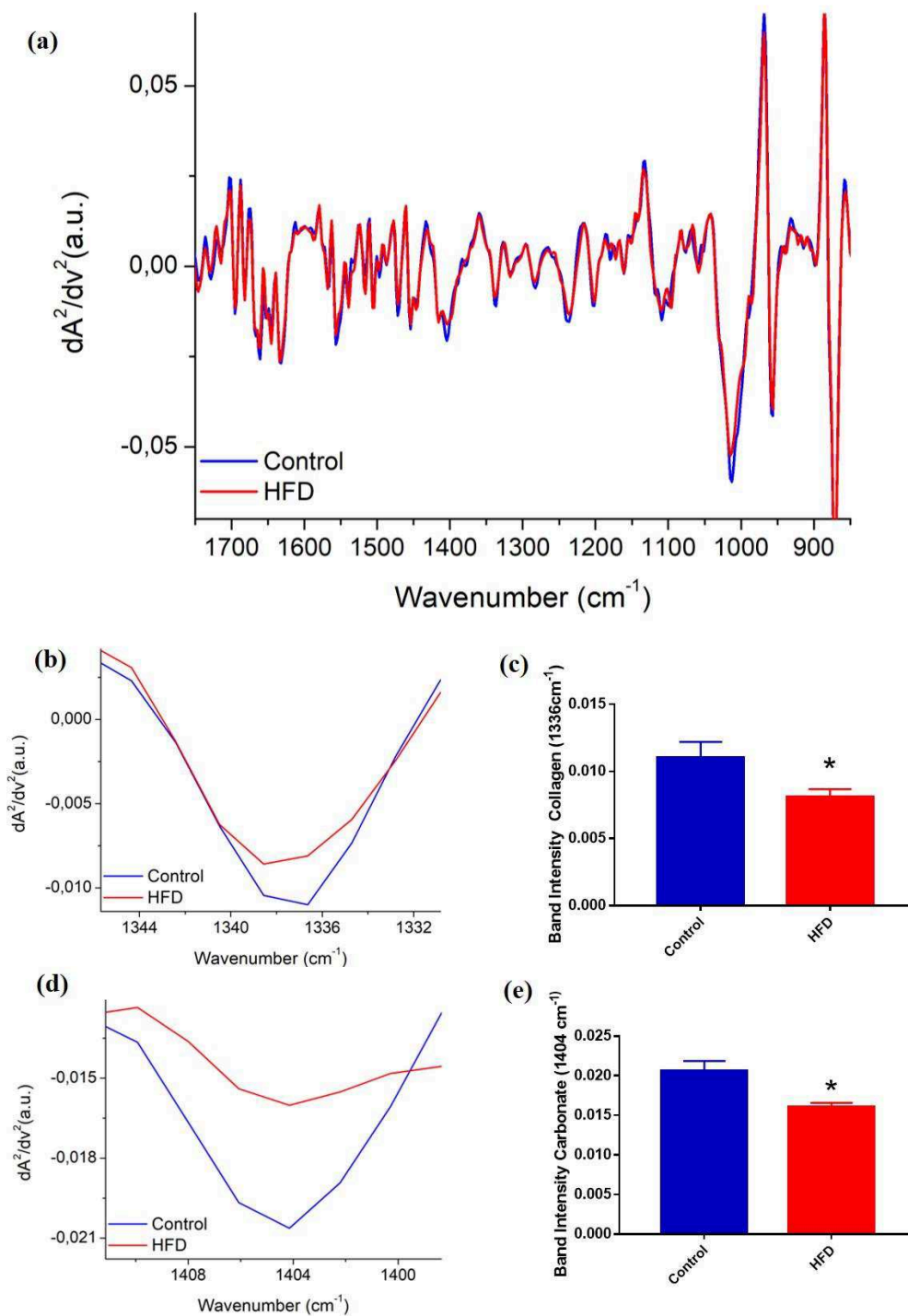


Figure 7 The mean second derivative spectra of bone. (a) Mean spectrum of bone components obtained by second derived FTIR analysis (b) Higher magnification of $\sim 1336\text{ cm}^{-1}$ band (d) Approximate image of band intensity $\sim 1404\text{ cm}^{-1}$ (c) and (e) Analyzed by Mann-Whitney test, results are Median \pm SEM (* $P < 0.05$).

Discussion

Herein, we have investigated microarchitecture, molecular composition and rugosity of cortical bone in tibia of High-fat diet-induced obesity mice using Micro-CT system, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Atomic Force Microscopy (AFM). This study clearly demonstrates that HFD-induced obesity may promote reduction in the organic (amide II and collagen) and inorganic (carbonate) components associated with reduction in surface roughness of in the cortical bone of HFD mice than controls. However, these changes are accompanied by maintenance of bone 3-D microarchitecture and histological properties.

As expected in High-fat diet-induced obesity state, body mass, Lee index, are increased in HFD compared to control mice. These findings are consistent with other studies [25–28]. Development of obesity requires expanding adipose tissue by hyperplasia (cell number increase), hypertrophy (cell size increase) or a combination of the two. A previous study proves that HFD induced adiposity in outbred female CD-1 mice was primarily contributed by adipocyte hypertrophy and to a lesser degree by adipose hyperplasia [25]. Here, the changes in cortical bone composition and surface roughness of cortical bone were unveiled in a classic obesity model.

In analysis with micro-computed tomography, obesity induced by HFD-diet is strongly related with decreases in trabecular bone mass, however, it has no effect on cortical bone of tibia in mice [9]. Besides, it was indicated that immature mice (5 weeks) have a significantly greater reduction in femoral metaphyseal trabecular bone volume than mature (20 weeks) mice when fed a HFD for 12 weeks. The normalized cortical thickness was similar in both immature and mature HFD mice compared to control mice [29, 30]. Calculated total mineral density (TMD) was no different in cortical bone of midshaft tibia between HFD and control mice [8]. In a similar micro-architectural analysis of bones, HFD did not change cortical bone in both gender, although it was demonstrated that HFD aggravates bone loss in trabecular bone in males compared to female C57BL/6 mice [31]. Furthermore, it was indicated that

TNF- α gene knockout retained HFD-induced femoral trabecular bone loss mainly by suppressing osteoclastogenesis, which suggests that TNF- α plays a critical role in the development of HFD-related bone metabolic disorders. The effects of TNF- α was not considered in cortical bone [32]. In the present study, there was no significant difference in 3-D Micro-CT reconstruction analysis in cortical tibial shaft of HFD rats, which corroborate with published data as cited above. On the other hand, cortical bone structure of tibia was increased in HFD than control mice [8]. The tibial cortical bone mass was also increased in HFD mice compared to matched controls, which can be involved with anabolic effect during feeding period [8]. In another study Ct.Th was higher in HFD than control mice. However, the vascular canal system (averaged by average vascular canal porosity) in the cortical bone was no similar in both control and HFD mice [33]. Although the present study and others may suggest that cortical 3-D microarchitecture are maintained by HFD, changes in age, gender, the duration of HFD and intensity of HFD-induced obesity could promote significant changes in these parameters.

The decrease in collagen fibers, amide II and carbonate assessed by FTIR clearly demonstrate that high-fat diet-induced obesity can promote changes in organic and inorganic content of cortical bone. It is important to note that in the present study the mice fed HFD (for 13 weeks) are normoglycemic. Considering that reduction of collagen and carbonate contents can negatively affect mechanical properties of bone and increase the fracture susceptibility, this result indicates that prolonged exposure with HFD may even be key molecular event for damage in bone functions [34]. In other study with Swiss mice, HFD for 21 weeks promoted a type 2 diabetic model with hyperglycemia. This animal model associated with HFD reduced collagen maturity, pentosidine content, mineral/matrix ratio, mineral crystallinity, and carbonate/phosphate ratio were reduced in high-fat-fed Swiss mice [35]. It is important point out that present data can indicate that HFD can promote reduction in collagen and carbonate isolately and independently of blood glucose levels. May it possible that reduction in collagen levels in cortical bone of HFD mice are related with increased levels of the plasma biomarker for type 1 collagen degradation (CTX-

1), an marker for bone resorption increased in HFD animals [36]. Furthermore, Amide II is a mixed C–N stretch associated with N–H in plane bend. Changes in amide II could indicate changes in protein secondary structure [37].

The present study showed decreased of surface texture in cortical bone shaft of HFD mice compared to controls. Bearing in mind that osteoblast attachment and differentiation were higher on micro-rough (Ra ~2 μ m) than on smoother surfaces (Ra ~1 μ m) of hydroxyapatite [38]. On the other side, the osteoclast marker tartrate-resistant acid phosphatase activity was increased on smoother than on micro-rough surfaces [38]. Although, the functions of bone cells on different topographies has already been described in *in vitro* studies [38] and to the best of our knowledge, this is the first *in vivo* study evaluating surface roughness in cortical bone of animal models with HFD-induced obesity.

In summary, we showed that HFD promotes reduction of surface roughness associated with reduction of organic components as amide II and collagen and reduction in carbonate (an inorganic component), which suggests that both unprecedented ultra-characterizations can provide novel insight into the HFD/obesity-related compromised cortical surface roughness and bone molecular composition.

References

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al (2011) The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet* 378:804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
2. Hill JO (1998) Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science* 280:1371–1374. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1371>
3. Reid IR (2010) Fat and bone. *Arch Biochem Biophys* 503:20–27. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.027>
4. Viapiana O, Gatti D, Dalle Grave R, et al (2007) Marked increases in bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with anorexia nervosa gaining weight. *Bone* 40:1073–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.015>
5. Greco EA, Fornari R, Rossi F, et al (2010) Is obesity protective for osteoporosis? Evaluation of bone mineral density in individuals with high body mass index. *Int J Clin Pract* 64:817–820. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2009.02301.x>
6. Wang MC, Bachrach LK, Van Loan M, et al (2005) The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. *Bone* 37:474–481. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.038>
7. Núñez NP, Carpenter CL, Perkins SN, et al (2007) Extreme Obesity Reduces Bone Mineral Density: Complementary Evidence from Mice and Women*. *Obesity* 15:1980–1987. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.236>

8. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Dowling AR (2015) High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol* 410:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.001>
9. Cao JJ, Gregoire BR, Gao H (2009) High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* 44:1097–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.017>
10. Shu L, Beier E, Sheu T, et al (2015) High-Fat Diet Causes Bone Loss in Young Mice by Promoting Osteoclastogenesis Through Alteration of the Bone Marrow Environment. *Calcif Tissue Int* 96:313–323. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9954-z>
11. Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, et al (2011) Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism* 60:243–249. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.11.023>
12. Wohl GR, Loehrke L, Watkins BA, Zernicke RF (1998) Effects of High-Fat Diet on Mature Bone Mineral Content, Structure, and Mechanical Properties. *Calcif Tissue Int* 63:74–79. <https://doi.org/10.1007/s002239900492>
13. Ionova-Martin SS, Do SH, Barth HD, et al (2010) Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. *Bone* 46:217–225. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.10.015>
14. Wang F, Zuo Z, Chen K, et al (2018) Histopathological Changes Caused by Inflammation and Oxidative Stress in Diet-Induced-Obese Mouse following Experimental Lung Injury. *Sci Rep* 8:. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32420-3>

15. Gao F, Lv T-R, Zhou J-C, Qin X-D (2018) Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. *J Orthop Surg* 13:. <https://doi.org/10.1186/s13018-018-0837-7>
16. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
17. Rabelo GD, Coutinho-Camillo C, Kowalski LP, et al (2018) Evaluation of cortical mandibular bone in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig* 22:783–790. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2153-8>
18. Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, et al (2010) Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* 135:3183. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>
19. Rieppo L, Saarakkala S, Närhi T, et al (2012) Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 20:451–459. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.010>
20. Kourkoumelis N, Lani A, Tzaphlidou M (2012) Infrared spectroscopic assessment of the inflammation-mediated osteoporosis (IMO) model applied to rabbit bone. *J Biol Phys* 38:623–635. <https://doi.org/10.1007/s10867-012-9276-6>
21. Figueiredo MM, Gamelas JAF, Martins AG (2012) Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. In: Theophile T (ed) *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*. InTech
22. Andrus PGL, Strickland RD (1998) Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy* 4:37–46.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1998\)4:1<37::AID-BSPY4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:1<37::AID-BSPY4>3.0.CO;2-P)

23. Imbert L, Gourion-Arsiquaud S, Villarreal-Ramirez E, et al (2018) Dynamic structure and composition of bone investigated by nanoscale infrared spectroscopy. *PLOS ONE* 13:e0202833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202833>

24. Mieczkowska A, Mansur SA, Irwin N, et al (2015) Alteration of the bone tissue material properties in type 1 diabetes mellitus: A Fourier transform infrared microspectroscopy study. *Bone* 76:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.010>

25. Gao M, Ma Y, Liu D (2015) High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PloS One* 10:e0119784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119784>

26. Gilani A, Pandey V, Garcia V, et al (2018) High-fat diet-induced obesity and insulin resistance in CYP4a14^{-/-} mice is mediated by 20-HETE. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 315:R934–R944. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00125.2018>

27. de Noronha SR, Campos GV, Abreu AR, et al (2017) High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behav Brain Res* 316:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.042>

28. Walker JM, Dixit S, Saulsberry AC, et al (2017) Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 100:87–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.004>

29. Inzana JA, Kung M, Shu L, et al (2013) Immature mice are more susceptible to the detrimental effects of high fat diet on cancellous

bone in the distal femur. *Bone* 57:174–183.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.003>

30. Malvi P, Piprode V, Chaube B, et al (2014) High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. *Biochem Biophys Res Commun* 455:133–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.131>

31. Gautam J, Choudhary D, Khedgikar V, et al (2014) Micro-architectural changes in cancellous bone differ in female and male C57BL/6 mice with high-fat diet-induced low bone mineral density. *Br J Nutr* 111:1811–1821. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000051>

32. Zhang K, Wang C, Chen Y, et al (2015) Preservation of high-fat diet-induced femoral trabecular bone loss through genetic target of TNF- α . *Endocrine* 50:239–249. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0554-5>

33. Kerckhofs G, Durand M, Vangoitsenhoven R, et al (2016) Changes in bone macro- and microstructure in diabetic obese mice revealed by high resolution microfocus X-ray computed tomography. *Sci Rep* 6:. <https://doi.org/10.1038/srep35517>

34. Roberts HC, Knott L, Avery NC, et al (2007) Altered Collagen in Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP)-Deficient Mice: A Role for TRAP in Bone Collagen Metabolism. *Calcif Tissue Int* 80:400–410. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9032-2>

35. Mansur SA, Mieczkowska A, Flatt PR, et al (2018) Sitagliptin Alters Bone Composition in High-Fat-Fed Mice. *Calcif Tissue Int.* <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0507-0>

36. Rosen CJ, Motyl KJ (2010) No bones about it: insulin modulates skeletal remodeling. *Cell* 142:198–200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.001>

37. Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL (2011) Infrared Assessment of Bone Quality: A Review. *Clin Orthop Relat Res* 469:2170–2178. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1751-4>

38. Costa DO, Prowse PDH, Chrones T, et al (2013) The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 34:7215–7226. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>

Referências

- BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 25–34, jan. 2014a. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 25–34, jan. 2014b. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- BOLEAN, M. et al. Biophysical aspects of biomineralization. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 747–760, out. 2017. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0315-1>
- BOSKEY, A. L. et al. Osteopontin Deficiency Increases Mineral Content and Mineral Crystallinity in Mouse Bone. **Calcified Tissue International**, v. 71, n. 2, p. 145–154, ago. 2002. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1121-z>
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, maio 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- CAO, J. J. et al. Aging Increases Stromal/Osteoblastic Cell-Induced Osteoclastogenesis and Alters the Osteoclast Precursor Pool in the Mouse. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 9, p. 1659–1668, 2 maio 2005. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050503>
- CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. p. 7, 2011. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-6-30>
- CHAFFEE, B. W.; WESTON, S. J. Association Between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 12, p. 1708–1724, dez. 2010. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100321>
- DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 14 mar. 2008. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868>
- FELSON, D. T. et al. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The framingham study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 5, p. 567–573, 3 dez. 2009. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650080507>
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- FLYNN, J.; FOLEY, S.; JONES, G. Can BMD Assessed by DXA at Age 8 Predict Fracture Risk in Boys and Girls During Puberty?: An Eight-Year

Prospective Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 9, p. 1463–1467, 14 maio 2007. <https://doi.org/10.1359/jbmr.070509>

FUJITA, Y.; MAKI, K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. **BMC Obesity**, v. 3, n. 1, dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40608-016-0082-8>

GILSANZ, V. et al. Reciprocal Relations of Subcutaneous and Visceral Fat to Bone Structure and Strength. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3387–3393, set. 2009. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2422>

GOULDING, A.; GRANT, A. M.; WILLIAMS, S. M. Bone and Body Composition of Children and Adolescents With Repeated Forearm Fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 12, p. 2090–2096, 22 ago. 2005. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050820>

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349–355, maio 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01660>

LANDIS, W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. **Bone**, v. 16, n. 5, p. 533–544, maio 1995. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00076-P](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00076-P)

MAZZOCCANTE, R. P.; MORAES, J. F. V. N. DE; CAMPBELL, C. S. G. Gastos públicos diretos com a obesidade e doenças associadas no Brasil. **Revista de Ciências Médicas**, v. 21, n. 1/6, p. 25–34, 11 jun. 2013. <https://doi.org/10.24220/2318-0897v21n1/6a1869>

MONTEIRO, C. A. et al. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 12, p. 940–946, dez. 2004. DOI: 10.1590/S0042-96862004001200011

NELSON, S. E.; FRANTZ, J. A.; ZIEGLER, E. E. Absorption of Fat and Calcium by Infants Fed a Milk-Based Formula Containing Palm Olein. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 327–332, ago. 1998. <https://doi.org/10.1080/07315724.1998.10718770>

NISHIDA, N. et al. Determination of Smoking and Obesity as Periodontitis Risks Using the Classification and Regression Tree Method. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 6, p. 923–928, jun. 2005. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.6.923>

PAPACHRISTOU, N. I. et al. Western-type diet differentially modulates osteoblast, osteoclast, and lipoblast differentiation and activation in a background of APOE deficiency. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 12, p. 1516–1526, dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0107-7>

PEREIRA, J. L. et al. Excess body weight in the city of São Paulo: panorama from 2003 to 2015, associated factors and projection for the next years. **BMC**

Public Health, v. 18, n. 1, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6225-8>

PRAMOJANEE, S. N. et al. Decreased Jaw Bone Density and Osteoblastic Insulin Signaling in a Model of Obesity. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 6, p. 560–565, jun. 2013.

PRATCHAYASAKUL, W. et al. Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. **Life Sciences**, v. 88, n. 13–14, p. 619–627, mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.02.003>

RAGHAVAN, M. et al. Age-specific profiles of tissue-level composition and mechanical properties in murine cortical bone. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 942–953, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.026>

RAVN, P. et al. Low Body Mass Index Is an Important Risk Factor for Low Bone Mass and Increased Bone Loss in Early Postmenopausal Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 9, p. 1622–1627, 1 set. 1999. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.9.1622>

RODAN, G. A. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1508–1514, 1 set. 2000. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1508>

ROSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; MORAES, C. DE. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383–387, maio 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300021>

ROTH, J. et al. The Obesity Pandemic: Where Have We Been and Where Are We Going? **Obesity Research**, v. 12, n. S11, p. 88S-101S, nov. 2004. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.273>

SHAPSES, S. A.; SUKUMAR, D. Bone Metabolism in Obesity and Weight Loss. **Annual Review of Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 287–309, 21 ago. 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104655>

SUVAN, J. et al. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 5, p. e381–e404, maio 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00808.x>

VANDAMME, T. F. Rodent models for human diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 84–89, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.046>

VON MUHLEN, D. et al. Associations between the metabolic syndrome and bone health in older men and women: the Rancho Bernardo Study. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 10, p. 1337–1344, out. 2007. <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0385-1>

WALSH, M. C. et al. OSTEOIMMUNOLOGY: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 33–63, abr. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646>

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339–345, jul. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000500002>



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 011/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 128/15

Projeto Pesquisa: "Efeito da suplementação de nitrato de sódio associada ao exercício físico no balanço redox e perfil inflamatório em modelo de obesidade animal".

Pesquisador Responsável: Profª Drª Françoise Vasconcelos Botelho

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de março de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU