

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ALAIS FERREIRA DA ROCHA DE OLIVEIRA

ESTUDO DO EFEITO DO ACASALAMENTO CONSANGUÍNEO E DA
REDUÇÃO DO NÚMERO DE FILHOTES SOBRE O FENÓTIPO DE
OBESIDADE EM RATOS *WISTAR*

PONTA GROSSA

2018

ALAIS FERREIRA DA ROCHA DE OLIVEIRA

ESTUDO DO EFEITO DO ACASALAMENTO CONSANGUÍNEO E DA
REDUÇÃO DO NÚMERO DE FILHOTES SOBRE O FENÓTIPO DE
OBESIDADE EM RATOS *WISTAR*

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Biomédicas como parte dos
requisitos para obtenção do título de
mestre, área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa
Gomes

PONTA GROSSA

2018

O48 Oliveira, Alais Ferreira da Rocha
Estudo do efeito do acasalamento consanguíneo e da redução do número de filhotes sobre o fenótipo de obesidade em ratos Wistar/
Alais Ferreira da Rocha Oliveira. Ponta Grossa, 2018.
64 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas – Área de concentração – Biologia Celular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

1. Obesidade. 2. Programação metabólica. 3. Redução de ninhada. 4. Cruzamento consanguíneo. I. Gomes, José Rosa. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD : 574.87

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA ___/2018, DA MESTRANDA ALAÍS FERREIRA ROCHA DE OLIVEIRA REALIZADA NO DIA 20 DE AGOSTO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito, às 10h00min na sala 105 do bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professor Dr. José Rosa Gomes** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Alaís Ferreira da Rocha de Oliveira** na linha de pesquisa; Biologia celular e dos processos patológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Ailton Vicente Pereira (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos (UFPR/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **Estudo do efeito do acasalamento consanguíneo e da redução do número de filhotes sobre o fenótipo de obesidade em ratos Wistar**. Encerrado os procedimentos de análise, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADA**, considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

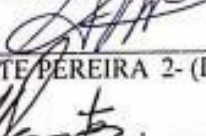
Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☒

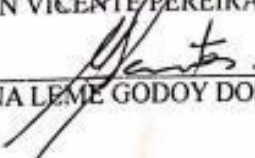
Novo título



JOSE ROSA GOMES 1- (DEBIOGEM - UEPG)- Presidente



AIRTON VICENTE PEREIRA 2- (DEFAR - UEPG) – Titular



MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS 3- (DEBIO - UFPR) – Titular

Dedico essa dissertação aos meus pais como resposta a tudo que fizeram por mim sem economizar esforços e principalmente, ao meu companheiro Carlos, por sempre me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, porque se não fosse dEle a força e perseverança, eu jamais teria conseguido.

Aos meus pais, Valacir e Eloil pelo esforço em formar meu caráter e pelos sacrifícios para que eu pudesse estudar.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Rosa Gomes que não só me apresentou ao mundo da pesquisa, mas foi um professor e também um amigo. Agradeço pela confiança, paciência e exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos amigos, Rubens G. Junior, Camila A. dos Reis, Cleyson M. Moraes Delvos e Elisandra A. Duarte por me ensinarem as técnicas, tirarem minhas dúvidas, por tornarem os vários dias de experimentos mais divertidos e menos cansativos. Pelos ensinamentos a cerca desta área, pelas ótimas discussões sobre temas pertinentes ao meu estudo e pela excelente convivência.

Aos companheiros do “Lab”, Bruno Hartman, Yasmin Fidler, Matheus Santin e Poliana Martinello pela ajuda e companheirismo em todo o desenvolvimento do trabalho, pelos dias e horas de lazer trocados em prol da ciência e do conhecimento.

Aos meus amigos de fora do meio acadêmico que tanto me apoiaram nos momentos de dificuldades e compreenderam a minha ausência, sem me julgar ou cobrar.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, em especial, Tina, Nádia, Michele e Iriane por me ajudar a não me perder em meios às dificuldades e fazer do mestrado uma oportunidade de seguir minha vocação. Obrigada pelos conselhos, auxílios e por acreditarem em mim.

À UEPG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas por permitirem a realização deste trabalho.

Ao biotério central da UEPG, pelo fornecimento dos animais, sem os quais esse trabalho não teria sido viável.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso pelo grande auxílio na realização de todas as análises bioquímicas realizadas, sua cooperação com este experimento foi essencial.

A todos o meu sincero obrigada!

RESUMO

A obesidade tem sido considerada uma epidemia mundial descrita como “globesidade”, tornando-se um grave problema de saúde pública atualmente. Sabe-se que o risco de desenvolver obesidade na idade adulta pode ser influenciado por uma nutrição inadequada na fase lactacional do recém-nascido. “Programação metabólica” é como chamamos o processo pelo qual os fatores iniciais da vida podem influenciar a saúde da prole na idade adulta. Estudos com modelos animais favorecendo o excesso de consumo alimentar ou a redução do número de filhotes na ninhada, sugerem que a obesidade pode ser transmitida através de múltiplas gerações através de mecanismos epigenéticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo propôr um novo modelo de estudo onde avaliamos qual o efeito da associação da redução do número de filhotes e o acasalamento consanguíneo sobre a obesidade em ratos Wistar por 5 gerações. O desenho experimental deste estudo pretende desenvolver e avaliar 20 gerações. Se mantidas as características fenotípicas de obesidade adquiridas até a última geração, esta poderia ser uma alternativa disponível aos pesquisadores, trazendo inúmeros benefícios para a pesquisa como redução de tempo, custo e animais sacrificados em experimentos. Para este estudo, o grupo experimental foi formado por ratos provenientes de cruzamento não consanguíneo, que quando adultos acasalaram e tiveram suas ninhadas reduzidas para 2 machos e 2 fêmeas. Estes animais que sofreram a primeira manipulação da ninhada foram chamados de Geração formadora e a partir desta geração acasalaram-se os irmãos para dar origem a G1. A partir de G1, foram então realizados os dois procedimentos de redução da ninhada e cruzamento dos irmãos, consecutivamente, até a G5. Os resultados obtidos destas gerações foram comparados aos resultados de um grupo controle, onde os animais acasalaram por cruzamento não consanguíneo e as ninhadas resultantes não sofreram redução. Neste trabalho, serão apresentados os resultados das gerações 1, 3, 5 e do grupo controle uma vez que foram considerados representativos também das gerações 2 e 4. Em cada geração todos os machos foram sacrificados para coleta das amostras de sangue onde se avaliou os seguintes parâmetros: bioquímicos (lipoproteínas, triglicerídeos, colesterol total e glicose) e histomorfométricos (massa corporal, Índice de Lee, consumo alimentar, adiposidade retroperitoneal, morfometria da hemimandíbula, número de células caliciformes e comprimento do intestino). Os parâmetros foram analisados pelo método ANOVA, com pós teste de Tukey e teste t de Student. Comparativamente com o grupo controle, os animais consanguíneos apresentaram aumento no consumo de ração, na massa corporal, na gordura retroperitoneal, no índice de Lee, no LDL e redução do HDL, VLDL, colesterol total, triglicerídeos e glicemia. Na avaliação do intestino houve redução no número de células caliciformes e aumento no comprimento intestinal. A morfometria das hemimandíbulas foram usadas como marcadores de possíveis alterações epigenéticas e os resultados mostraram uma redução da massa mandibular em G3 e G5 e alterações morfométricas que indicam a redução do tamanho. Conclui-se, neste trabalho, que a redução do número de ratos com o cruzamento consanguíneo mantém as características fenotípicas de obesidade nas gerações estudadas.

Palavras-chave: obesidade, programação metabólica, redução de ninhada, cruzamento consanguíneo

ABSTRACT

Obesity has been considered a worldwide epidemic described as "globesity", becoming a serious public health problem today. It is known that the risk of developing obesity in adulthood may be influenced by inadequate nutrition in the lactational phase of the newborn. "Metabolic programming" is what we call the process by which early life factors can influence offspring health in adulthood. Studies with animal models favoring the excess of food consumption or the reduction of the number of pups in the litter, suggest that the obesity can be transmitted through multiple generations through epigenetic mechanisms. In this context, the present work aimed to propose a new model of study where we evaluated the effect of the association of reduction of pups number and consanguine mating on obesity in Wistar rats for 5 generations. The experimental design of this study intends to develop and evaluate 20 generations. If the phenotypic characteristics of obesity acquired until the last generation were maintained, this could be an alternative available to researchers, bringing innumerable benefits to the research as a reduction of time, cost and animals sacrificed in experiments. For this study, the experimental group was formed by rats coming from non-consanguineous breeding, which when adults mated and had their litters reduced to 2 males and 2 females. These animals that underwent the first manipulation of the litter were called Generator formation and from this generation the breeds were mated to give origin to G1. From G1, the two procedures of litter reduction and sibling crossing were then performed, consecutively, up to G5. The results obtained from these generations were compared to the results of a control group, where the animals mated by non - blood crossbreeding and the resulting litters were not reduced. In this work, the results of generations 1, 3, 5 and of the control group will be presented since they were considered representative of generations 2 and 4. In each generation all the males were sacrificed to collect the blood samples where the following were evaluated (body mass, Lee's index, dietary intake, retroperitoneal adiposity, hemimandibular morphometry, number of goblet cells, and bowel length). The parameters were analyzed by the ANOVA method, with Tukey test powders and Student t test. Compared with the control group, inbred animals showed an increase in feed intake, body mass, retroperitoneal fat, Lee index, LDL and reduction of HDL, VLDL, total cholesterol, triglycerides and glycemia. In the evaluation of the intestine there was a reduction in the number of goblet cells and an increase in intestinal length. The morphometrics of the hemimandibula were used as markers of possible epigenetic alterations and the results showed a reduction of the mandibular mass in G3 and G5 and morphometric alterations that indicate the reduction of the size. It is concluded, in this study, that the reduction of the number of rats with the inbreeding keeps the phenotypic characteristics of obesity in the studied generations.

Key words: obesity, metabolic *Imprinting*, litter reduction, inbreeding

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pontos morfométricos da hemimandíbula de roedores	29
Figura 2 – Representação esquemática da obtenção das ninhadas controles.....	32
Figura 3 – Representação esquemática do sistema de acasalamento consanguíneo e de ninhadas reduzidas de ratos <i>Wistar</i>	34
Figura 4 – Avaliação do consumo de ração, massa corporal, Índice de Lee e gordura retroperitoneal de ratos <i>Wistar</i> após a redução da ninhada e acasalamento consanguíneo.....	38
Figura 5 – Parâmetros bioquímicos (LDL, HDL, VLDL, colesterol total, triglicerídeos e glicoes) avaliados em ratos <i>Wistar</i> provenientes de ninhadas reduzidas e acasalamento consanguíneo	39
Figura 6 - Análise dos parâmetros morfológicos do intestino (nº de células caliciformes) de ratos <i>Wistar</i> consanguíneos submetidos a redução de ninhada.....	40
Figura 7 – Fotomicrografia da mucosa do jejuno para visualização das células caliciformes nas colorações de Alcian Blue e PAS.....	40
Figura 8 – Comprimento dos intestinos de ratos <i>Wistar</i> obtidos após a redução da ninhada	41
Figura 9 – Massa e morfometria das hemimandíbulas dos ratos <i>Wistar</i> consanguíneo após a redução da ninhada.....	42

LISTA DE SIGLAS

AB	Alcian blue
AGS	Acilgliceróis
ARQ	Núcleo arqueado
CETP	Proteína transportadora de éster de colesterol
CEUA	Comissão de ética do uso de animais
CO	Condílio
CR	Coronóide
G1-5	Gerações 1 a 5
GMS	Glutamato monossódico
GO	Gônio
GOT	Tangente goníaca
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Eixo hipotálamo hipófise adrenal
IC	Incisura coronóide
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Índice de Lee
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Ponto mandibular alveolar
ME	Mentoniano
PAS	Ácido periódico de Schiff
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio

PB	Profundidade da base
PCR	Proteína-C reativa
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PR	Profundidade do Ramo
RCM	Risco cardiometabólico
RI	Resistência periféria à insulina
SNC	Sistema nervoso central
TAAV	Tecido adiposo abdominal visceral
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TG	Triglicerídeos
TGF β	Fator transformador de crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VMH	Hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 OBESIDADE	15
2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS.....	21
2.2.1 Hipernutrição por Redução do Número de Filhotes.....	22
2.2.2 Acasalamento Consanguíneo entre Ratos	24
2.3 PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DA OBESIDADE.....	25
2.3.1 Parâmetros Biométricos.....	25
2.3.1.1 Índice de Lee (IL)	25
2.3.2 Parâmetros Bioquímicos.....	27
2.3.2.1 Perfil lipídico.....	27
2.3.3 Parâmetros Morfométricos.....	29
2.3.3.1 Parâmetros morfométricos da hemimandíbula como marcadores de alterações epigenéticas	29
2.3.3.2 Parâmetros morfológicos e morfométricos do intestino delgado.....	30
3 OBJETIVO	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 ANIMAIS E AMBIENTE	34
4.2 OBTENÇÃO DO GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL	34
4.2.1 GRUPO CONTROLE	34
4.2.2 Grupo Experimental	35
4.2.2.1 Obtenção da geração formadora, das ninhadas/gerações reduzidas e consanguíneas.....	35
4.3 PARÂMETROS AVALIADOS	37
4.3.1 Massa Corporal, Índice de Lee e Consumo Alimentar	37
4.3.2 Dosagem do Perfil Lipídico e Gl.....	37
4.3.3 Medidas Morfométricas das Hemimandíbulas	38

4.3.4 Coleta e Análise Morfométrica da Quantidade de Células Caliciformes e Adiposidade Retroperitoneal.....	38
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 ÍNDICES BIOMÉTRICOS E DO CONSUMO DE RAÇÃO	41
6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	42
6.3 PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO INTESTINO	43
6.4 ANÁLISE DA MASSA E DA MORFOMETRIA DAS HEMIMANÍBUHAS.....	45
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	53
9 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença inflamatória crônico-degenerativa e fator de risco para o desenvolvimento de várias outras doenças como diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, dislipidemias e alguns tipos de câncer. (GALIC et al., 2010; POIRIER et al., 2006; WHO, 2017).

Evidências mostram que a origem de doenças metabólicas como a obesidade está nas fases precoces do desenvolvimento, sendo a gestação e a lactação as fases mais críticas. Nestas fases, mudanças nutricionais da gestante ou dos lactantes, induzem na vida adulta, a obesidade e doenças associadas (REILLY; KELLY, 2011; WATERLAND; JIRTLE, 2004). A obesidade pode ocorrer por um mecanismo denominado de programação metabólica (imprinting metabólico), o qual é um fenômeno orgânico que está diretamente envolvido com as denominadas “origens fetais das doenças” (GUILLOTEAU et al., 2009; HARDER et al., 1999; WATERLAND; GARZA, 1999) ou seja, qualquer modificação nos fatores nutricionais, hormonais ou metabólicos em fases críticas do desenvolvimento do feto ou lactante poderão acarretar em alterações genéticas que podem se manter na vida adulta.

Estudos indicam que estas alterações podem acontecer através de mecanismos epigenéticos (OSMOND et al., 1993). Tais mecanismos resultam de metilações e/ou desmetilações que ocorrem na molécula de DNA (metilações) sem alterar a sua sequência, nas histonas que alteram a organização da cromatina, e nos RNAs e RNAm. Essas modificações, quando ocorrem em determinados genes, especialmente os relacionados com o controle do metabolismo energético, podem alterar sua expressão, resultando em fenótipos de distúrbios metabólicos como a obesidade (HANLEY et al., 2010; SYMONDS; BUDGE; FRAZIER-WOOD, 2013).

Alterações epigenéticas são transmitidas nos tecidos por divisão mitótica e, geralmente, são induzidas por estímulos ambientais, nutricionais, hormonais ou psicológicos, que acontecem em períodos críticos do desenvolvimento (BORENGASSER et al., 2013; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000). Alterações nutricionais, tanto materna quanto dos descendentes, nos estágios iniciais do desenvolvimento podem gerar alterações epigenéticas em neurônios das vias hipotalâmicas, uma vez que esses neurônios que controlam o balanço metabólico e o equilíbrio energético, tais alterações epigenéticas podem significar um aumento na

susceptibilidade ao desenvolvimento de patologias em longo prazo, como a obesidade e suas co-morbidades (RINALDI et al., 2012; WATERLAND; GARZA, 1999).

O entendimento da dinâmica de alterações epigenéticas na obesidade teve grande avanço com o uso de modelos animais que visam determinar de maneira controlada e por diferentes metodologias os seus efeitos, porém, já existem estudos que discutem a relação entre os mecanismos epigenéticos como causa de obesidade em humanos (SLOMKO; HEO; EINSTEIN, 2012; SULLIVAN; GROVE, 2010). Entretanto, estudos em animais apresentam vantagens importantes como menor tempo de experimentos e melhor controle de critérios e fatores associados que podem ser melhor efetuados quando comparado com estudos em humanos.

Por outro lado, em humanos e animais, recentes estudos são descritos mostrando que as alterações epigenéticas (visíveis em células somáticas), incluindo as relacionadas à obesidade, podem ser incorporadas de forma permanente na linhagem de células germinativas (em especial as espermatogênicas) e, portanto, podem ser transmitidas através das gerações.

Uma estratégia para se obter características genéticas estáveis, em novas linhagens animais e que expressem fenótipos metabólicos é o cruzamento consanguíneo. Dessa forma, considerando que ainda não existem relatos utilizando o modelo de programação metabólica para indução de obesidade por redução de filhotes associada ao cruzamento consanguíneo, este estudo se propôs a avaliar os efeitos dessa associação nas primeiras gerações produzidas, utilizando parâmetros morfológicos, perfil bioquímico e morfometria da hemimandíbula.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OBESIDADE

Atualmente, a obesidade tomou proporções epidêmicas no mundo e por associar-se a importante morbimortalidade representa um ônus para a sociedade e para o sistema público de saúde (HUANG et al., 2016). É definida como uma doença crônica associada ao excesso de gordura corporal (acúmulo de tecido adiposo localizado ou generalizado), com etiologia complexa e multifatorial, resultando da interação de estilo de vida, genes e fatores emocionais (WHO, 2017).

O desenvolvimento da obesidade ocorre devido a um desajuste nos processos fisiológicos que regulam o balanço energético. Se houver alguma alteração no controle do apetite, diminuição no metabolismo das calorias ingeridas e aumento no armazenamento destas se estabelece um distúrbio de caráter fisiopatológico e alimentar que pode desencadear a um quadro de obesidade. (LEITE; NETO, 2009).

A definição de obesidade mais utilizada nos dias de hoje é baseada no índice de massa corporal (IMC), que retrata o grau de corpulência, ou seja, a proporção da massa corporal em relação a altura do indivíduo. Porém, esse parâmetro é limitado ao definir exatamente o conteúdo corporal de gordura ou de massa magra. Mais importante, o IMC não caracteriza o aspecto da epidemiologia metabólica e cardiovascular moderna: a distribuição da adiposidade corporal. A adiposidade localizada na região central do corpo, mais especificamente a abdominal, está associada a um maior risco cardiometabólico (RCM), enquanto a adiposidade periférica (membros inferiores) parecem não ser tão prejudicial. Dessa maneira, é de extrema importância que além do IMC seja avaliado outras medidas antropométricas, como a altura, massa, além das circunferências de cintura e quadril para concluir se uma pessoa está ou não acima da massa corporal ideal (DIAS et al., 2017).

O IMC indica o grau de obesidade através do cálculo que leva em consideração a massa corporal (Kg) dividido pela altura (m^2). Indivíduos normais apresentam o IMC entre 18,5 - 24,9, resultados de IMC entre 25 a 29,9 indicam excesso de massa, sendo considerados obesos aqueles que têm o $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ (WAJCHENBERG, 2000).

Indivíduos obesos possuem maior probabilidade de desenvolvimento de doenças crônicas devido às anormalidades metabólicas derivadas da instalação da obesidade, dentre estas doenças estão o diabetes, doenças cardíacas e maior incidência de alguns tipos de câncer (GUILHERME et al., 2008; WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007). De acordo com o Departamento de Saúde dos Estados Unidos da América, indivíduos obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) têm um risco de morte prematura entre 50% a 100% maior que indivíduos com IMC entre 20 a 25 kg/m^2 .

Embora seja muito complexo identificar o que levou o grande crescimento da obesidade nos últimos anos, o respaldo evolutivo que justifica este processo baseia-se na necessidade que o homem primitivo tinha de armazenar a energia consumida para que pudesse enfrentar longos períodos de escassez de alimento. Muito provavelmente, esses eventos levaram ao desenvolvimento em excesso do tecido adiposo. Todavia, o que há milhões de anos representava uma vantagem evolutiva, nas sociedades modernas, industrializadas e sedentárias tornou-se um problema (LAFLAMME, 2012; SUZUKI; JAYSENA; BLOOM, 2012).

Da mesma forma que a industrialização facilitou a produção e o acesso aos alimentos processados, ocorreu também aumento do sedentarismo, mudanças nas formas de locomoção e aumento da urbanização (HENI et al., 2014). Todo esse contexto proporciona a instalação do quadro de obesidade, como de outras comorbidades associadas, tais como a resistência periférica à insulina (RI), diabetes tipo II, hipertensão arterial, intolerância à glicose, dislipidemias e doenças cardiovasculares (ANJOS, 2006; TARTIDO; FALCÃO 2006).

A obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo devido ao aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou pelo aumento do número de adipócitos (hiperplasia). Quando os adipócitos estão hipertróficos passam então a armazenar mais triacilgliceróis em seu interior até atingir sua capacidade máxima (YANG; SMITH, 2007). Neste estágio, entram em disfunção e passam a produzir de maneira desequilibrada moléculas denominadas de citocinas características de processos inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interleucina 6 (IL-6), fatores de crescimento (fator transformador de crescimento b-TGFb) e proteínas da via complemento alternativa (adipsina). Outras adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio), homeostase vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1, PAI-1), homeostase glicêmica

(adiponectina) e angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular VEGF). Dentre as adipocinas mais estudadas e de maior relevância em pesquisas, citam-se o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), adiponectina, leptina e resistina (FONSECA-ALANIZ, 2007; PRADO, 2009; WAJCHENBERG, 2000).

Portanto, a obesidade é considerada um processo inflamatório sistêmico onde as citocinas interferem na atividade de diferentes hormônios que regulam o metabolismo energético. Existem evidências demonstrando que o estado inflamatório pode ser devido à resistência à ação da insulina e outras desordens associadas à obesidade, como hiperlipidemia e síndrome metabólica. Acredita-se que a inflamação seja uma consequência da obesidade; porém, Das (2001) sugeriu que a obesidade é de fato o resultado de uma doença inflamatória. Por sua vez, o tecido adiposo é considerado também um órgão endócrino que mantém comunicação com regiões específicas do sistema nervoso central que controlam a manutenção da homeostase energética (LEITE; NETO, 2009).

A obesidade pode ser determinada durante fases iniciais do desenvolvimento, definidas como período crítico, produzindo um efeito de programação metabólica duradouro e persistente ao longo da vida do indivíduo (BALABAN; SILVA, 2004; COTTRELL; OZANNE, 2007; HANLEY et al., 2010).

Estudos mostram que fatores hormonais, nutricionais e metabólicos, atuando em fases iniciais do desenvolvimento humano e animal, têm efeito, em longo prazo, na programação metabólica, promovendo alterações e adaptações a nível celular, tecidual e sistêmico com repercussões para o estado de saúde na vida adulta (BALABAN; SILVA, 2004; JARAMILLO, 2009). Portanto a programação metabólica pode resultar na vida adulta em doenças crônicas, tais como obesidade, hipertensão, doença cardiovascular e diabetes tipo 2.

A programação metabólica pode ocorrer em fases críticas do desenvolvimento uterino e no pós natal, dentro das denominadas “janelas de programação”.

Após o nascimento, é necessário uma série de adaptações ao novo ambiente. A transição entre a disponibilidade e a forma de alimentação é uma delas, senão a mais importante. A fase de lactação representa uma das experiências nutricionais mais precoces do recém-nascido, dando sequência ao processo de nutrição iniciada

na vida intra-uterina (BARKER, 2004; GODFREY; BARKER, 2000). A composição do leite materno em termos de nutrientes difere qualitativa e quantitativamente das fórmulas infantis. Além disso, várias substâncias estão presentes no leite humano, entre eles hormônios e fatores de crescimento que vão atuar sobre o crescimento, a diferenciação e a maturação funcional de órgãos específicos, afetando vários aspectos do desenvolvimento (CAMPOS, 2007; MOLINA, 2004; WHO, 2017).

O leite materno é característico pela sua bioatividade. Segundo estudo realizado por Hirai et al. (2002) demonstram que determinados fatores de crescimento presentes no leite materno são cruciais para o processo de adaptação gastrointestinal perinatal, sugerindo que a composição diferenciada do leite materno poderia, portanto, estar implicada no processo da programação metabólica, influenciando, por exemplo, no número e/ou tamanho dos adipócitos ou induzindo o fenômeno de diferenciação metabólica.

A complexidade da comunicação neuroendócrina que controla o balanço energético, com seus múltiplos componentes e fatores bioativos (insulina, esteróides adrenais, T3 e T4, por exemplo) presentes no leite humano, sugere uma infinidade de potenciais mecanismos de atuação do leite materno nesse processo. Casabiell et al. (1997) identificaram a presença da leptina no leite humano, a qual poderia desempenhar um papel regulador no lactente, visto que esse hormônio tem ação de inibir o apetite e as vias anabólicas e estimular as vias catabólicas. Lucas e colaboradores (1980) relataram diferentes respostas endócrinas no que diz respeito à liberação de hormônios pancreáticos e intestinais entre recém-nascidos alimentados com leite materno e com fórmula infantil.

Dentre os estudos genéticos a cerca da programação metabólica observou-se que um genótipo pode manifestar diferentes condições fisiológicas e morfológicas em relação a diferentes ambientes durante o período de desenvolvimento, tendo seus efeitos permanentes no sistema fisiológico ou ainda em estruturas somáticas (GUILLOTEAU et al., 2009).

Apesar da infinidade de estudos fisiológicos que abordam o tema obesidade, estudos sobre a origem dos mecanismos biológicos da programação metabólica são recentes e ainda precisam de mais investigações.

Entretanto, os estudos existentes apontam que a origem da programação metabólica encontra respaldo nos mecanismos epigenéticos. O objeto de estudo da epigenética são as alterações que ocorrem nas expressões gênicas sem que ocorram alterações na sequência do DNA, ou seja, as alterações que não resultam de mutações. Eventos epigenéticos incluem metilação das regiões promotoras de determinados genes, modificações como acetilação e fosforilação de histonas, as quais levam à remodelação da cromatina e metilações ou desmetilações de moléculas de RNAs. Todas estas modificações epigenéticas já foram observadas em diversos modelos de programação metabólica (GOTTLIE et al., 2007; HANLEY et al., 2010).

Tais alterações epigenéticas ocorrem nas determinadas "janelas de programação" e dependem de fatores ambientais. No caso da obesidade, são os fatores nutricionais, sejam na vida uterina pela dieta materna ou após o nascimento na fase de lactação e puberdade (GOTTLIE et al., 2007; HANLEY et al., 2010).

Estudos em animais mostram que na fase de lactação, uma disponibilidade maior de leite materno predispõe os filhotes, na vida adulta, a desenvolver obesidade e doenças associadas. É sabido também, que alterações epigenéticas que ocorrem nos genes envolvidos com o controle do metabolismo energético são tecido-específicas, ou seja, ocorrem em células somáticas como as adiposas, musculares e hepáticas, e que são transferidas, nestes tecidos, para as células filhas por divisão mitótica (CONSTÂNCIA et al., 1998; STEWART; VESELOVSKA; KELSEY, 2016).

Apesar de existirem, há alguns anos, estudos que apontam e discutem a dinâmica da transmissão de genes alterados por epigenética através das células somáticas, e que nas células gaméticas ocorre um "reparo" de tais alterações antes do gameta ser formado (CONSTÂNCIA et al., 1998; STEWART; VESELOVSKA; KELSEY, 2016), estudos mostram que em alguns casos esse reparo não ocorre, sendo a alteração então transmitida ao novo gameta e conseqüentemente ao indivíduo.

Nas células germinativas maternas, durante o crescimento do ovócito ocorre um aumento global de metilação do DNA (KAGEYAMA et al., 2007). Após a fecundação, o zigoto passa por extensa desmetilação e apaga praticamente todo o padrão de metilação parental herdado, porém o que não ocorre com os genes imprinted, os genes que sofreram imprinting (MANN; BARTOLOMEI, 2002).

Alguns marcos epigenéticos durante a espermatogênese, por exemplo, podem continuar durante o desenvolvimento embrionário. As exposições ambientais (dieta e estilo de vida, por exemplo) que ocorrem na gametogênese masculina podem causar alterações epigenéticas irreversíveis e consequências fenotípicas expressas na prole (SOUBRY, 2015).

As modificações epigenéticas preparam o indivíduo para o ambiente extrauterino e podem potencializar uma vantagem de sobrevivência, regulando os genes diferenciais que codificam proteínas envolvidas no metabolismo energético e na adipogênese (GAO et al., 2014). No entanto, diante de uma condição metabólica deletéria como a obesidade e alterações metabólicas relacionadas, essas modificações podem ser exacerbadas ou silenciadas, especialmente a programação das células germinativas, que constituem a perpetuação e a transmissão fenotípica da espécie (GUERRERO-BOSNAGA; SKINNER, 2014).

Hipóteses recentes consideram que alguns padrões alimentares paternos residem em espermatozóides carregando informações epigenéticas (SCHAGDARURENGIN; STEGER, 2016). O “epigenoma” do esperma era tradicionalmente considerado insignificante, pois postulava-se que seu perfil de metilação do DNA era apagado imediatamente após a fertilização. No entanto, nos últimos anos, houve um aumento no número de casos relatados de aparente herança epigenética através da linha germinal masculina, sugerindo que este epigenoma pode transmitir informações entre gerações (SOUBRY et al., 2014 e 2015). O desenvolvimento de embriões de rã derivados de espermatozóides e espermátides permite observar que o esperma, além da transferência do DNA, também contribui para a informação epigenética necessária para a expressão adequada do gene embrionário, representando a chave para a informação epigenética (TEREPEK et al., 2016).

Mudanças na expressão de genes, além de determinar alterações fisiológicas que comprometem o funcionamento geral do organismo, também causam alterações morfológicas na estrutura corporal, portanto, o estudo das alterações morfológicas permitem avaliar a expressão gênica. O aumento da massa corporal e da adiposidade são exemplos de mudanças morfológicas ou fenotípicas produzidas que podem ser alterações gênicas. Além dessas alterações morfológicas, que são mais comumente mostradas em estudos de fisiologia da obesidade, existe a possibilidade de avaliar

tais mudanças também no tamanho e na morfologia das estruturas mineralizadas, como dentes e mandíbulas, ao longo de várias gerações. Alterações na morfologia dessas estruturas também são consideradas marcadores de alterações produzidas em nível de expressão gênica (LOVELL; ERICKSON, 1986; KLINGENBERG; LEANY; CHEVERUD, 2004).

Portanto, estudos em modelos animais mostram que é possível avaliar a expressão do padrão de genes através de medidas morfométricas obtidas a partir das mandíbulas (ANDERSON; RENAUD; RAYFIELD, 2014; BURGIO, 2012; MARTINEZ, 2014), entretanto, em relação ao processo de obesidade ainda não há registros referentes a esse tipo de avaliação de mandíbulas, o que torna nossa presente investigação original dentro da área de estudos morfológicos. Nesse sentido, é interessante que novos modelos de estudo, como o que está sendo proposto nesse trabalho, sejam criados e testados, oferecendo uma opção importante para a pesquisa epigenética. Neste contexto, sabe-se que a criação de novos modelos de estudo ou linhagens animais é um processo longo e que depende da produção de várias gerações de cruzamento consanguíneo. Durante o estabelecimento dessas linhagens, os animais precisam ser monitorados, tanto por métodos fisiológicos, morfológicos e genéticos que confirmem a característica e permanência do fenótipo explorado ao longo das gerações.

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

É essencial que os pesquisadores disponham de modelos confiáveis para o estudo dos mecanismos e dos efeitos da obesidade no organismo. Para as pesquisas que demandam a utilização de animais, como ratos e camundongos, por exemplo, é bastante comum induzir o aumento de peso, possibilitando que os pesquisadores observem, no ambiente controlado do laboratório, as diversas variáveis relacionadas à obesidade (BORTOLIN, 2017). A obesidade pode ser induzida em roedores por estratégias que envolvem alterações neuroendócrinas, pelo glutamato monossódico que lesiona os centros de controle da saciedade; alterações genéticas, pelo silenciamento ou nocaute de diferentes genes ou por programação metabólica. A programação metabólica pode ocorrer durante a gestação pela manipulação dietética da mãe durante a gestação, durante a lactação pela maior disponibilidade de leite através da redução do número de filhotes ou após os desmame, ofertando alimentos altamente calóricos aos animais por dietas hipercalóricas e hiperlipídicas

(CESARETTI; KOHLMANN, 2006; MALAFAIA et al., 2013; PLAGEMANN et al., 1999; SOARES, 2012).

2.2.1 Hipernutrição por Redução do Número de Filhotes

O modelo de obesidade baseado na hipernutrição pela redução do número de filhotes foi proposto em 1957 por Kennedy e consiste em proporcionar maior aporte de leite à prole através da redução do tamanho da ninhada. Vários estudos demonstram que a hiperalimentação, em ratos, durante o período de lactação resulta no aumento de massa corporal e modificação do crescimento durante toda a vida pós-natal (VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005).

Este modelo experimental de obesidade fundamenta-se no princípio de que a maior oferta de leite disponibilizada pela redução do tamanho da prole (por diminuir o número de animais competindo pelo alimento) em um período crítico do desenvolvimento do sistema neuro-endócrino (período pós-natal imediato em roedores) promove alterações estruturais e funcionais permanentes no sistema nervoso central, provavelmente no hipotálamo (PLAGEMANN et al., 1999a) e em outros eixos neuroendócrinos e metabólicos (BOULLU-CIOCCA et al., 2008; PORTELLA et al., 2015).

Boullu-Ciocca e colaboradores em 2008, mostraram que a superalimentação no período pós-natal acelerou a maturação do eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) e resultou no excesso de massa corporal, distúrbios metabólicos comparáveis aos descritos na síndrome metabólica e aumento de receptores de glicocorticóides no tecido adiposo visceral na fase adulta.

Normalmente, as ratas parem em torno de 12 filhotes. A redução do número de filhotes acontece no terceiro dia de vida. Essa redução promove uma programação metabólica que leva os filhotes à hiperalimentação. Após o desmame, aos 21 dias, mesmo sendo alimentados com ração balanceada com 18%-24% de proteína (ração comercial para roedores), eles têm maior consumo alimentar e ganham mais massa quando comparados aos filhotes oriundos de ninhadas normais. Esses animais na vida adulta apresentam hiperfagia, hiperinsulinemia, resistência periférica à insulina e

obesidade (BEI et al., 2015). Foi observado ainda que a redução da ninhada provoca alterações na estrutura e função de áreas hipotalâmicas, como, por exemplo, baixa resposta a estímulos anorexígenos no Hipotálamo Ventromedial (VMH) (BEI et al., 2015; PORTELLA et al., 2015).

Os modelos utilizados atualmente para compreensão do estabelecimento do quadro de obesidade e suas comorbidades preconizam mimetizar as condições ambientais como sedentarismo ou o aumento do aporte energético, provocando ganho de massa e alterações séricas relacionadas ao metabolismo de lipídios, porém muitos destes modelos, apesar de importantes, apresentam desvantagens relacionadas ao número excessivo de animais utilizados ou a características próprias do modelo. Como exemplo destes modelos podemos citar o de animais geneticamente modificados estão muito distantes da gênese da obesidade em humanos, visto que são raros os casos de indivíduos obesos com alguma mutação genética (ROSINI, 2012). Modelos animais em que se utiliza a oferta de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas além do tempo necessário para a indução da obesidade que é relativamente longo, podem apresentar baixa aceitação da dieta pelos animais, ausência de obesidade abdominal e variações significativas e discrepantes no metabolismo da glicose e dos lipídeos (SOARES, 2013; CHU, 2014; SOARES, 2012). Outro modelo é o procedimento experimental baseado na lesão de neurônios relacionados à saciedade provocados pelo glutamato monossódico que leva ao desenvolvimento das manifestações clínicas da síndrome metabólica, também chamada de obesidade neuroendócrina, que apesar de importante, não mimetizam algumas características encontradas normalmente na obesidade como a hiperfagia (DJAZAYERY; MILLER; STOCK, 1979).

Dessa forma, entre os vários modelos animais, o modelo de programação metabólica por redução de ninhada se destaca devido ao fato que o aumento do aporte energético pela maior oferta de leite promove alterações comportamentais como a hiperfagia e metabólicas pré-dispondo o organismo ao desenvolvimento de comorbidades na vida adulta, entre elas a obesidade (THOLE et al., 2012), dislipidemias e resistência à insulina (BOULLU-CIOCCA et al., 2008). Outra característica que esse modelo difere dos demais é que o alimento disponibilizado aos animais, tanto para a mãe quanto para os filhotes, possui padrão balanceado de nutrientes.

Neste contexto, roedores criados em ninhadas pequenas têm demonstrado ser um modelo experimental adequado para o estudo das consequências da supernutrição precoce (HABBOUT et al., 2013; LOPES, 2004; PLAGEMANN, 1999; WATERLAND; GARZA, 1999).

2.2.2 Acasalamento Consanguíneo entre Ratos

O sistema de acasalamento de irmãos da mesma ninhada é o mais adequado quando se deseja a manutenção das características da linhagem consanguínea (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Esse modelo de estudo teve seu início no começo do século XX, com os estudos de herança de cor em camundongos, realizados por Clarence C. Little (1909).

Animais com características individuais, por exemplo obesidade, podem ser selecionados para acasalamento, a fim de fixar essas características na linhagem. Parte-se de um único casal, representante da linhagem escolhida, acasalam-se todos os irmãos, de todas as ninhadas. À medida que a colônia cresce, selecionam-se os casais com as melhores características de obesidade e se passam a só acasalar irmãos de ninhadas provenientes desses casais. A colônia cresce até o máximo de 20 casais e, a partir daí, só se faz a reposição de casais quando ocorre descarte zootécnico ou morte (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Dessa forma, o animal consanguíneo é o produto de 20 gerações consecutivas do acasalamento entre irmãos. Para cada 50 mil ou mais genes que um camundongo possui, 99% apresentam o mesmo alelo em dose dupla. Isso significa que cada linhagem consanguínea apresenta um conjunto único de características que as diferencia entre si. Esse conjunto de características, que constitui cada linhagem, é composto de genes que sofrem menor ou maior grau de influências ambientais através de mecanismos epigenéticos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Logo, a manutenção dessa linhagem de obesidade deve ser feita de uma forma rigorosa, de modo que as variações, através das gerações, sejam mínimas. Para que se consiga propagar as características dessa nova linhagem com êxito deve-se diminuir ao máximo a divergência genética, assim pode-se garantir que todos os animais mantidos em um biotério de criação estejam ligados a um ancestral comum por um intervalo mínimo de gerações (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Apesar de já existirem linhagens de animais obesos produzidos por transgenia, estas são relativamente caras para serem obtidas, além do fato de que toda linhagem geneticamente manipulada apresenta um tempo de vida relativamente curto. Porque ao mesmo tempo que os genes são selecionados para uma determinada característica de interesse, outras alterações podem ser introduzidas levando a uma redução do tempo de vida desses animais.

Por outro lado, apesar de trabalhosa a tentativa de se obter, após várias gerações, essas linhagens fenotipicamente obesas podem ser uma nova alternativa para os pesquisadores da obesidade.

É importante destacar que não existem registros do uso da associação dessas duas estratégias para a produção de fenótipos de obesidade em animais experimentais. O que justifica a execução e análise do trabalho através dos marcadores bioquímicos e morfológicos já descritos na literatura, como o perfil lipídico, Índice de Lee, adiposidade e morfometria das hemimandíbulas e do intestino.

2.3 PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DA OBESIDADE

2.3.1 Parâmetros Biométricos

2.3.1.1 Índice de Lee (IL)

Em estudos com animais, a determinação da obesidade em roedores, pode ser realizada pelo IL, o qual consiste na divisão da raiz cúbica da massa corporal em gramas pelo comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). O resultado configura o índice nutritivo de Lee, que pode ser usado como forma exata e rápida de medir obesidade em experimento submetido a um método de ganho de massa. Segundo Lemes (2008), o Índice de Lee, para o rato equivale ao índice de massa corporal (IMC) para humanos. Pela bioimpedância observou-se que parâmetros antropométricos (índice de massa corporal, Índice de Lee e circunferência do abdômen) podem ser utilizados para estimar a composição corporal em ratos (ANGELOCO, 2012).

O Índice de Lee deve ser associado a outros dados antropométricos, como a circunferência abdominal e dados metabólicos. Entretanto, é importante ressaltar que o Índice de Lee não é sensível para determinar alterações na composição corporal de

gordura central em animais com mesma idade e submetidos ao mesmo histórico nutricional (BERNADIS; PATTERSON, 1968; STEPHENS, 1980). Já está bem estabelecido que a adiposidade corporal é um importante fator de risco para diversas doenças, porém, é o tecido adiposo visceral que possui maior correlação com o desenvolvimento de alterações metabólicas (CHAN et al., 2004; ROSA, et al., 2005).

Em 1956, foi evidenciado por Vague, a existência de diferentes padrões de distribuição da adiposidade corporal, relatando que o padrão andróide, com deposição acentuada de gordura na parte superior do corpo, estaria relacionado com distúrbios metabólicos como hiperuricemia, dislipidemia e alterações do metabolismo da glicose. Em indivíduos obesos, os depósitos de tecido adiposo visceral e subcutâneo encontram-se distribuídos desproporcionalmente pelo organismo, havendo, dessa forma, prevalência dos depósitos de gordura visceral, os quais se localizam, principalmente, na região abdominal.

A deposição da gordura abdominal pode situar-se subcutaneamente ou ainda intra-abdominal, ou seja, em contato direto com as vísceras, sendo esta a gordura mais prejudicial (MOURA VI; RI, 2010; WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007). Em ratos, a gordura visceral é composta principalmente pelos depósitos epididimal, retroperitoneal, enquanto o subcutâneo, pelo depósito inguinal (MAUER; HARRIS; BARTNESS, 2001).

Em função dos distúrbios ocasionados pelo aumento da adiposidade visceral, muito se tem feito para investigar quais os mecanismos responsáveis por tais alterações. Há evidências de que o tecido adiposo não é apenas especializado no armazenamento e mobilização de lipídios, mas também funciona como um órgão endócrino. Libera numerosas citocinas e moléculas pró-inflamatórias como a interleucina 6 e o fator de necrose tumoral alfa. A proteína C reativa, uma proteína hepática de fase aguda associada ao risco cardiovascular, apresenta-se em níveis elevados em indivíduos com acúmulo de tecido adiposo abdominal visceral (YUDKIN, 1999). Este último apresenta um sistema de drenagem venosa direto para o fígado, pela veia porta, enquanto que o tecido retroperitoneal drena para a circulação sistêmica (GARG, 2004). Os adipócitos intraperitoneais, quando hipertrofiados, são resistentes ao efeito antilipolítico da insulina. A lipólise acentuada leva a um fluxo maior de ácidos graxos não-esterificados para o fígado, prejudicando seu

funcionamento e aumentando a produção hepática de glicose (DESPRES, 2006). Por outro lado, em indivíduos sem estes fatores de risco, essa energia extra é canalizada para o tecido adiposo subcutâneo, o qual é sensível à insulina e, portanto, protege o indivíduo contra o desenvolvimento de alterações metabólicas.

Há controvérsias na literatura quanto à influência do tecido adiposo abdominal subcutâneo (TAAS) sobre o risco de doenças, em humanos. Em populações não-caucasianas, esse compartimento mostrou-se um preditor importante de alterações metabólicas adversas (GOODPASTER; THAETE; KELLEY, 2000; LIU et al., 2010). Em oposição, estudos recentes mostraram efeito protetor para a resistência à insulina ou mesmo ausência de associação entre indivíduos obesos (MCLAUGHLIN et al., 2011; PORTER et al., 2009).

A diferença entre a localização dos dois depósitos de gordura também reflete diferenças funcionais, a níveis de mobilização lipídica, maturação, produção de adipocinas e a nível morfológico. Conforme demonstrado pela primeira vez pelo médico francês Jean Vague, a disposição da massa adiposa no organismo está diretamente associada à predisposição de determinadas doenças (VAGUE, 1956). Além de influenciar no decréscimo da sensibilidade à insulina, a gordura abdominal está relacionada à alterações lipídicas, tais como: aumento nos níveis dos triglicérides e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007).

2.3.2 Parâmetros Bioquímicos

2.3.2.1 Perfil lipídico

A etiologia da obesidade está intimamente relacionada à dislipidemia. A dislipidemia caracteriza-se pela condição na qual há concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue e é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica (ROMALDINI et al., 2004).

Os lipídios do organismo podem ser provenientes da síntese interna ou da alimentação. Quando ingeridos são degradados e posteriormente absorvidos (LEITE; OLIVEIRA; PELUZIO, 2003; SCHIAVO; LUNARDELLI; OLIVEIRA, 2003). Essas moléculas lipídicas não podem ser transportados livremente no sangue, pois

apresentam natureza hidrofóbica. Para tornar esse transporte possível, elas são transportadas por estruturas micelares complexas, denominadas lipoproteínas, que consistem em uma camada externa que contém proteína (apolipoproteína), lipídios polares (fosfolipídios e colesterol não esterificado) e um núcleo mais interno de lipídios neutros (triglicerídeos, ésteres de colesterol e vitaminas lipossolúveis). O excesso de uma ou mais classes dessas lipoproteínas, em virtude da menor remoção do plasma e/ou maior produção, caracteriza o quadro dislipidêmico (LEITE; OLIVEIRA; PELUZIO, 2003).

As dislipidemias podem manifestar-se como hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia. A classificação de consenso das lipoproteínas é feita em função de sua densidade via ultracentrifugação (MAGALHÃES, 2002). As VLDL são lipoproteínas de densidade muito baixa, as LDL possuem baixa densidade e as HDL são lipoproteínas de alta densidade (LEITE; OLIVEIRA; PELUZIO, 2003; MAGALHÃES, 2002). Laboratorialmente, conforme Bray (2004), Rique e colaboradores (2002), Souza e colaboradores (2016) as dislipidemias podem ser classificadas em:

- A) hipercolesterolemia isolada (aumento do colesterol total e ou LDL);
- B) hipertrigliceridemia isolada (aumento dos TG);
- C) hiperlipidemia mista (aumento do colesterol total e dos TG); e diminuição isolada do HDL-colesterol (HDL) ou associada a aumento dos TG ou LDL-colesterol (LDL).

Há uma associação positiva entre excesso de massa corporal e dislipidemias, de forma que o sobrepeso reflete em alterações lipídicas (NETO et al., 2012). Nas dislipidemias relacionadas à obesidade, há aumento dos níveis plasmáticos de acilgliceróis (AGs) livres e triglicerídeos, diminuição de HDL e composição anormal de LDL. Tais alterações ocorrem por causa de uma liberação incontrollada de acilgliceróis do tecido adiposo (especialmente tecido adiposo visceral) através da lipólise, o que causa aumento dos AGs no fígado e aumento na produção de VLDL. Essa elevação nos níveis de AGs pode diminuir a expressão do RNAm ou a atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo e no músculo esquelético, enquanto o aumento na produção de VLDL pode inibir a lipólise dos quilomícrons (partículas que armazenam grande

quantidade de triglicerídeos), o que causa hipertrigliceridemia (JUNG; CHOI, 2014). A alta na concentração de TG ativa a proteína de transferência CETP, promovendo a diminuição de HDL e a formação de pequenas e densas partículas de LDL, que estão associadas a um maior risco de doença cardiovascular (JUNG; CHOI, 2014).

2.3.3 Parâmetros Morfométricos

2.3.3.1 Parâmetros morfométricos da hemimandíbula como marcadores de alterações epigenéticas

A mandíbula de ratos tem sido útil como modelo de estudo do desenvolvimento e da evolução das estruturas morfológicas. Além disso, as pesquisas com mandíbulas de roedores têm contribuído para evidenciar as complexas redes multigênicas e as vias de desenvolvimento que estão relacionados aos padrões de variância fenotípica (ATCHLEY; HALL, 1991; CHEVERUD, 2004). Estudos de base genética da morfologia da mandíbula revelaram que a modularidade genética também ocorre nesta estrutura (BURGIO et al., 2012; EHRICH, 2003).

Muitas mutações afetam uma dada característica fenotípica de maneiras muito mais sutis, e isso traduz o fato de que o mapeamento dos efeitos genotípicos em fenotípicos é muito mais complexo, envolvendo mais do que apenas alguns genes com efeitos importantes. Além disso, nem todas as alterações fenotípicas estão relacionadas a uma mudança na sequência genética, e os vários mecanismos envolvidos em tais mudanças não genéticas que ocorrem através de vários processos de desenvolvimento são referidos como epigenéticos. Os quais podem descrever qualquer aspecto, além da sequência do DNA, que possa influenciar no desenvolvimento de um organismo (RENAUD; AUFFRAY; PORTE, 2010; WADDINGTON, 1942).

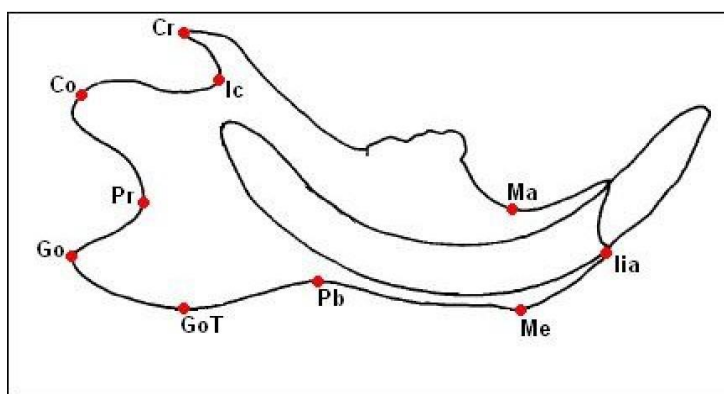
Neste contexto, o estudo de dados morfométricos de hemimandíbulas de ratos é uma ferramenta que agrega informações sobre possíveis alterações epigenéticas (BURGIO et al., 2012; MARTINEZ et al., 2014; NAVARRO; MAGA, 2016; RENAUD; AUFFRAY; PORTE, 2010) que podem estar ocorrendo ao longo de várias gerações.

Os roedores possuem a mandíbula formada por dois ossos denominadas de hemimandíbulas, direita e esquerda. Em cada hemimandíbula se pode determinar

duas regiões morfológicas: a região anterior formada pelo osso alveolar dos molares (que nos ratos são em número de 3) e o osso alveolar do incisivo (em ratos possui sua origem na porção posterior da mandíbula e se prolonga até a parte anterior do osso mandibular onde erupciona); a região posterior localizada após o terceiro molar e que é denominada de ramo ascendente formado pelos processos condilar e coronóide na parte superior e pelo processo angular na parte inferior (KLINGENBERG; NAVARRO, 2012).

Assim, a análise morfométrica de diferentes pontos tanto da região anterior quanto posterior da mandíbula fornece informações de possíveis alterações epigenéticas introduzidas ao longo do desenvolvimento e das gerações.

Figura 1- Pontos morfométricos da hemimandíbula de roedores



(Co) condílio; (lia) ponto alveolar do incisivo inferior; (Go) gônio; (Cr) coronóide; (Pr) profundidade do ramo; (Ic) incisura coronóide; (Pb) profundidade da base; (GoT) tangente goníaca; (Ma) ponto mandibular alveolar; (Me) mentoniano. E partir deles, as medidas de comprimento determinadas foram: comprimento mandibular I (Co-lia); comprimento do corpo (Go-lia); comprimento ma II (Cr-lia); profundidade da concavidade do ramo [Pr- (Co-Go)]; tamanho da cabeça da mandíbula [Co-(Pr-Ic)]; profundidade da concavidade da base [Pb-(GoT-Me)]; altura do ramo I (Co-GoT); altura do ramo II (Cr-GoT); altura do corpo (Me-Ma).

Fonte: Adaptado de BRIN; MICHAELY; STEIGMAN, 1990; STEIGMAN, 1989.

2.3.3.2 Parâmetros morfológicos e morfométricos do intestino delgado

O intestino está constantemente sendo exposto a partículas potencialmente patogênicas, tais como antígenos dietéticos e microrganismos. O epitélio intestinal funciona como a barreira física que restringe à entrada de moléculas antigênicas, ao mesmo tempo em que convive em equilíbrio com a exposição a uma quantidade enorme de componentes dietéticos e microbianos (RAMIRO-PUIG et al., 2008). A capacidade de contenção da barreira intestinal é considerada dinâmica, pois pode ser

afetada por diversos fatores como doenças, medicamentos, hormônios, citocinas e toxinas exógenas (CRESCI; BAWDEN, 2015). Várias células compõem o sistema de defesa intestinal, que apresenta como característica uma alta taxa de renovação epitelial. Tal processo ocorre através de células-tronco epiteliais que residem na região basal das criptas com características próprias reguladas pelos nichos de células locais (CAMILLERI et al., 2012).

As células tronco dão origem a quatro tipos de células epiteliais: enterócitos com função absorptiva que compõem mais de 80% das células epiteliais do intestino delgado, as células enteroendócrinas capazes de exportar hormônios peptídeos, as células de Paneth, secretoras de defensinas antimicrobianas, enzimas digestivas e fatores de crescimento e as células caliciformes, as quais têm a função de produzir mucinas e peptídeos necessários para processos de crescimento epitelial e reparação da mucosa (PETERSON; ARTIS, 2014).

As mucinas produzidas pelas células caliciformes constituem também, a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos patogênicos intestinais. Os produtos derivados destas células contribuem para regulação de uma barreira física no intestino através da regulação de proteínas que fornecem integridade estrutural ao muco e atuam como sinalizadoras para promover a reparação epitelial, migração de células do sistema imune e resistência à apoptose. Essas funções podem sofrer alterações fisiológicas por diferentes processos metabólicos provenientes da alimentação, estresse e/ou exercício físico (CLATWORTHY; SUBRAMANIAN, 2001; PETERSON; ARTIS, 2014).

Em condições de inflamação da mucosa, o que pode ocorrer em casos de obesidade é a perda das células caliciformes do epitélio intestinal a partir das vilosidades. A diminuição excede a produção de novas células caliciformes a partir das criptas, porém o mecanismo molecular envolvido nesse processo permanece incerto (WANG et al., 2016). Além disso, tal condição de perda celular pode apresentar consequências como o aumento de permeabilidade intestinal, desenvolvimento de doenças como a colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e até mesmo encurtamento das vilosidades ou atrofia do vilo (KIESSLICH; GOETZ; ANGUS, 2007).

Durante o processo de perda fisiológica das células, há um rearranjo das junções de oclusão necessárias para permitir a liberação de células epiteliais intestinais e garantir a manutenção da função barreira (WILLIAMS et al., 2013). Devido ao aumento do número de estudos sobre a obesidade e suas conseqüências para a saúde, nova atenção foi dada às funções de proteção dos componentes do sistema gastrointestinal em especial a produção de mucinas que possuem a função de interceptar toxinas bacterianas presentes no lúmen intestinal.

É descrito que a microbiota intestinal na condição de obesidade é diversa daquela encontrada em condição normal, de baixa massa corporal ou ambas e também que determinadas toxinas bacterianas podem atravessar a barreira epitelial exarcebando a condição inflamatória em processo de obesidade contribuindo para a resistência à insulina em processos graves de obesidade. Portanto, o tipo de mucinas produzidas pelas células caliciformes pode contribuir para predição durante a instalação do processo de obesidade. Em alguns modelos experimentais de obesidade, como o modelo estudado por Hamaoka & Kusunoki (1986) foi relatado que vários órgãos como pâncreas e coração sofrem um retardo no tamanho, ao contrário do intestino que aumenta o seu tamanho sendo portanto uma medida que pode predizer informações do estado de obesidade.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar qual o efeito de associar o cruzamento consanguíneo e a programação metabólica por redução do número de filhotes para a obtenção de ratos *Wistar* com características de obesidade e investigar se essas características, uma vez adquiridas, são transmitidas entre as gerações desses animais por mecanismos epigenéticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a massa corporal, o índice de Lee, o consumo alimentar e a gordura retroperitoneal.

B) Traçar o perfil sérico de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas LDL, HDL, VLDL e glicemia.

C) Definir o comprimento do intestino e realizar a contagem de células caliciformes na região do jejuno no intestino.

D) Determinar as medidas morfométricas nas hemimandíbulas para inferir sobre os mecanismos epigenéticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E AMBIENTE

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar outbreed, com massa corporal de 250 gramas em média, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) mediante aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da instituição (Processo CEUA 003/2015- UEPG 19741/2014). Os ratos foram mantidos no Biotério Central da Universidade de Estadual de Ponta Grossa, em caixas para roedores, com cama de maravalha, alimentados com ração comercial balanceada (Nuvilab CR-1®) e água potável ad libitum. A temperatura foi mantida entre 22 e 26°C. Com luminosidade em ciclos de claro e escuro com duração, aproximadamente, de 12 horas cada.

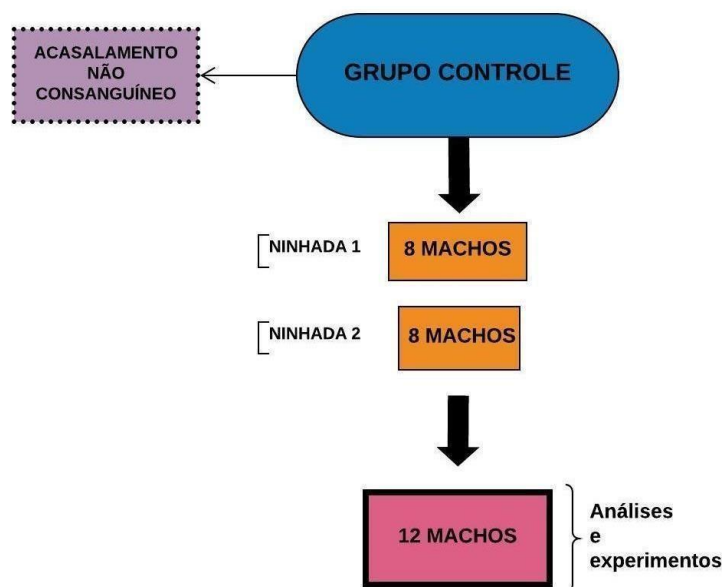
4.2 OBTENÇÃO DO GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL

4.2.1 Grupo Controle

Foram utilizados animais adultos, com 90 dias e com massa corporal de 250 gramas em média, provenientes do acasalamento não consanguíneo. As ninhadas continham 8 animais machos. Para os experimentos e análises desse trabalho foram utilizados apenas 12 machos.

As ninhadas controles foram monitoradas desde o nascimento até o desmame, quando os machos foram separados e mantidos em caixas contendo 4 animais. Os animais controles foram submetidos a todas as análises iguais às realizadas com animais de ninhadas reduzidas originadas de cruzamentos consanguíneos conforme a descrição a seguir:

Figura 2- Representação esquemática da obtenção das ninhadas controles



Fonte: Da autora.

4.2.2 Grupo Experimental

4.2.2.1 Obtenção da geração formadora, das ninhadas/gerações reduzidas e consanguíneas

Para a obtenção da colônia formadora do grupo experimental foram utilizados animais adultos, sendo 2 machos e 6 fêmeas sem parentesco consanguíneo (outbreed). As fêmeas foram acasaladas no sistema de harém, na proporção 1:3 (de um macho para três fêmeas) e monitorada a prenhez e o nascimento dos filhotes. Foram geradas 6 ninhadas desse acasalamento. Em cada ninhada os animais foram reduzidos, ao acaso, para 2 machos e 2 fêmeas no terceiro dia de vida, resultando no total 12 fêmeas e 12 machos; sendo essas ninhadas denominadas de Geração Formadora. Neste projeto tanto os filhotes da geração formadora quanto de cada geração posterior a essa, foram reduzidos ao acaso no terceiro dia após o nascimento, uma vez que nessa idade o peso dos animais tanto machos como fêmeas não possuem diferenças significativas, sendo que a estratégia da indução da obesidade é feita ao longo do tempo de lactação pela maior disponibilidade na oferta do leite da mãe.

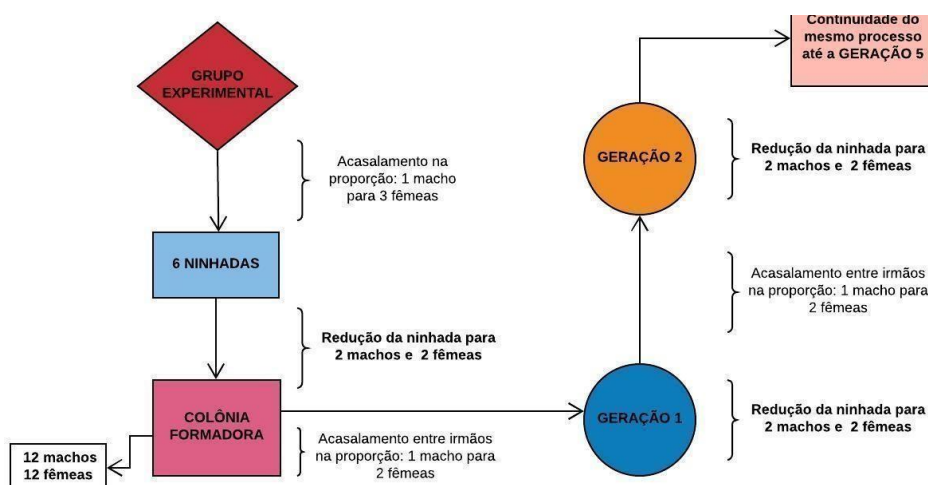
Ao atingir a idade do desmame (21 dias) machos e fêmeas irmãos da colônia formadora foram marcados com sinais nas orelhas para identificação da consanguinidade e na sequência foram separados em caixas contendo 4 animais. Ao

atingirem 3 meses machos e fêmeas irmãos foram acasalados na proporção de 1 macho para 2 fêmeas. As fêmeas foram monitoradas quanto a prenhez e nascimento dos filhotes que foram reduzidos, novamente e ao acaso, no terceiro dia de vida para 2 machos e 2 fêmeas dando origem a primeira geração experimental denominada de G1, cujos animais, ao atingirem a idade adulta foram submetidos aos mesmos procedimentos para a obtenção das gerações 2,3, 4 e 5. A redução das ninhadas foi realizada “ao acaso” devido a grande semelhança física entre os filhotes obesos e não obesos, no entanto, todos os valores das massas corporais foram registrados.

Em cada geração, a partir da G1 todos os machos, após terem sido acasalados com suas irmãs, foram submetidos a eutanásia para a realização dos procedimentos de coleta das amostras para avaliação do perfil lipídico, glicêmico e histomorfométricos.

Nesta pesquisa são descritos somente os resultados obtidos dos ratos machos do grupo Controle e das gerações 1, 3 e 5 cujos resultados foram considerados representativos do período das 5 primeiras gerações após ter sido feita uma análise dos parâmetros obtidos também para as gerações 2 e 4 que apresentam uma relação crescente ao longo das gerações obtidas.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema de acasalamento consanguíneo e de ninhadas reduzidas de ratos Wistar



Fonte: Da autora.

4.3 PARÂMETROS AVALIADOS

4.3.1 Massa Corporal, Índice de Lee e Consumo Alimentar

O monitoramento da massa corporal dos animais tanto controle quanto das diferentes gerações produzidas foi obtido aos 90 dias de vida, antes do sacrifício. Nesse momento, sob anestesia, a distância nasoanal foi registrada juntamente com a massa corporal para serem utilizadas na obtenção do Índice de Lee que estima a composição corporal (BERNARDIS E PATTERSON, 1968).

O monitoramento do consumo alimentar foi realizado duas vezes por semana com oferecimento de no mínimo 300 gramas de ração padrão, ao longo das semanas a partir do desmame, com aumento progressivo para 400 gramas chegando até 650 gramas de acordo com a necessidade de consumo observada até a semana na qual os machos foram colocados para acasalamento.

O consumo alimentar total (monitorado do nascimento até o desmame) foi expresso em média e desvio padrão das gramas consumida por animal. A média foi calculada da seguinte forma: soma do valor total em gramas do alimento oferecido menos o valor consumido dividido por 4 (número de animais em cada caixa).

4.3.2 Dosagem do Perfil Lipídico e Glicêmico

Com 90 dias de vida e após terem acasalados, ratos machos foram anestesiados, de acordo com a massa corporal, com solução de cetamina (50 mg/kg IM) e cloridrato de xilasina (15 mg/kg IM). Logo após a completa sedação dos animais, foi realizada a coleta de sangue total pelo método de punção cardíaca obtendo-se no mínimo 4 mL por animal. As amostras sanguíneas foram armazenadas em tubo sem anticoagulante, o qual foi mantido por 20 minutos a 37°C, centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O soro foi então coletado, armazenado em tubo sem aditivo e estéril e mantido congelado a – 20°C até o momento das avaliações bioquímicas.

As análises bioquímicas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e HDL (lipoproteína de densidade alta) e nas amostras de soro sanguíneo (300 microlitros) por rato foram realizadas por espectrofotometria em analisador automatizado no laboratório escola da UEPG. O

LDL-C foi estimado pela fórmula de Friedewald: $LDL-C = \text{Colesterol Total} - HDL-C - (\text{Triglicerídeos}/5)$. Foram utilizados reagentes para determinação quantitativa da marca Wiener Lab® (Rosario, Argentina) seguindo as instruções do fabricante. As médias e desvio padrão para cada grupo/geração foram expressas em mg/dL.

4.3.3 Medidas Morfométricas das Hemimandíbulas

Após o sacrifício foram coletadas as hemimandíbulas direita e esquerda, do grupo controle e das gerações 1, 3 e 5. As hemimandíbulas foram limpas e mergulhadas em solução de formaldeído 4% por 72 horas para a fixação. Após a fixação foram lavadas em água corrente e secas em estufa a 32°C. Após isso, foram pesadas, fotografadas e com o auxílio de uma régua endodôntica a medida de 10 mm foi convertida em pixels pelo programa imageJ (10 mm correspondiam a 556,752 pixels). Após calibrar o programa com esta medida os pontos morfométricos, previamente estabelecido por Brin; Michaely e Steigman (1990) e Steigman e colaboradores (1989) foram medidos para cada hemimandíbula. Os pontos morfométricos avaliados estão representados na Figura 2. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão em mm.

4.3.4 Coleta e Análise Morfométrica da Quantidade de Células Caliciformes e Adiposidade Retroperitoneal

A cavidade abdominal foi laparotomizada para a retirada do intestino, que foi esticado e medido utilizando uma régua milimetrada. Partes do jejuno destinados à análises histológicas, foram posteriormente transferidos para solução de paraformol 4% por 24 horas e depois para álcool etílico 70% até a realização da técnica histológica. Posteriormente, os fragmentos submetidos ao processamento histológico de rotina com inclusão em parafina e obtenção de cortes semi seriados de 5 micrômetros que foram submetidos a coloração para evidenciar mucinas neutras e ácidas pelas colorações de PAS e AB pH 2,5; respectivamente (os cortes corados para mucinas ácidas foram submetidos apenas a coloração pelo AB omitindo-se a coloração dos núcleos para que o AB não fosse perdido ao se passar pela hematoxilina).

Para avaliar a produção de mucinas foi realizado a contagem das células caliciformes em 20 vilosidades de cada animal avaliado, sendo expressa como

número de células caliciformes por vilosidade. Para fins de comparação foram utilizadas apenas os intestinos dos grupos controle e Geração 5.

Para a análise da adiposidade visceral, após a coleta do intestino, o tecido retroperitoneal de ambos os lados do corpo de cada animal foi coletado e pesado (expresso em gramas).

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

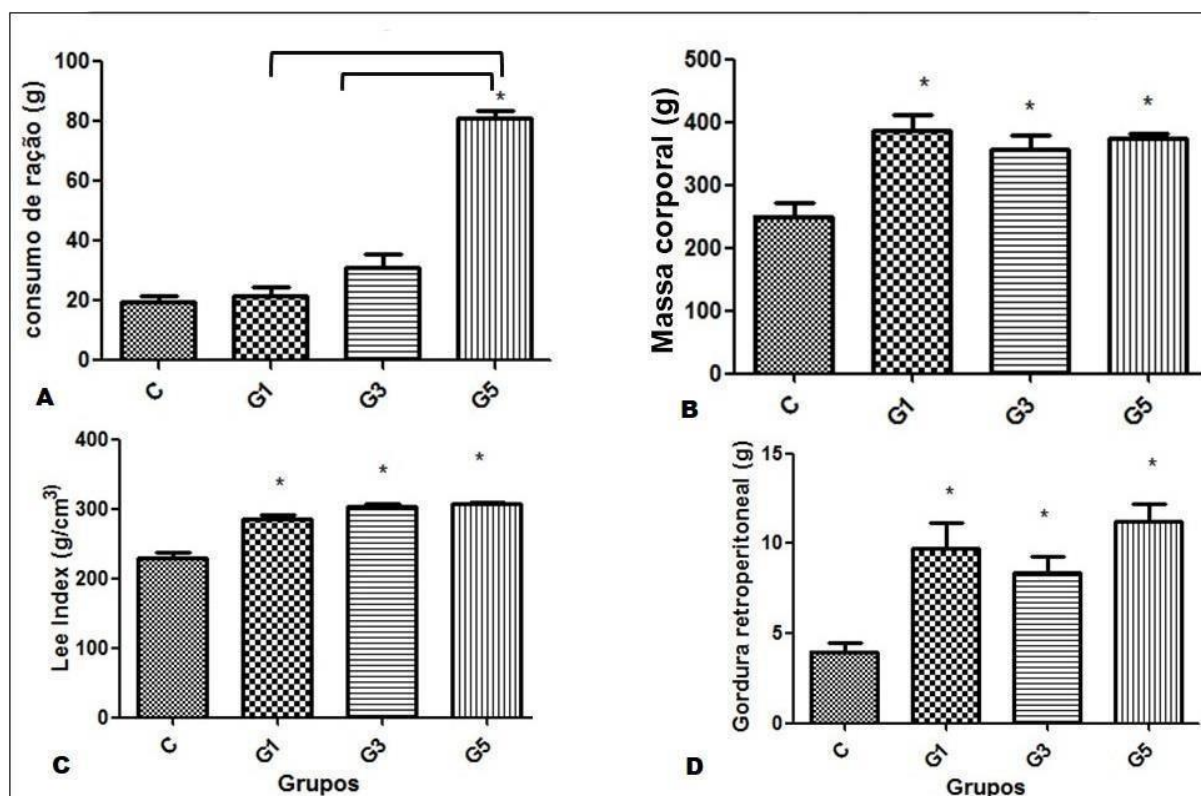
Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e avaliados com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.01. As análises estatísticas dos parâmetros avaliados entre o grupo controle e as diferentes gerações (G1, G3 e G5) foram feitas pelo método de Análise de Variância Simples (One Way ANOVA), com pós teste de Tukey e a análise dos parâmetros avaliados apenas entre os grupos controle e a geração 5 foram realizadas pelo teste t de Student. Para a verificação de diferenças estatísticas dos parâmetros avaliados foi adotado como critério de significância no nível de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ÍNDICES BIOMÉTRICOS E DO CONSUMO DE RAÇÃO

Os resultados referentes ao consumo de ração (Gráfico A), massa corporal (Gráfico B), depósito de gordura retroperitoneal (Gráfico C) e Índice de Lee (Gráfico D) estão representados na Figura 3. Observamos no Gráfico A que os animais da geração (G5) demonstraram um aumento significativo no consumo de ração quando comparados com o grupo controle. Entre as gerações, o consumo alimentar foi significativamente maior na geração 5 quando comparado com G1 e G3. Em relação a massa corporal (B), gordura retroperitoneal (C) e Índice de Lee (D) a análise estatística mostrou que todas as gerações apresentavam esses parâmetros aumentados quando comparados com o grupo controle.

Figura 4 - Avaliação do consumo de ração, massa corporal, Índice de Lee e gordura retroperitoneal de ratos Wistar após a redução da ninhada e acasalamento consanguíneo



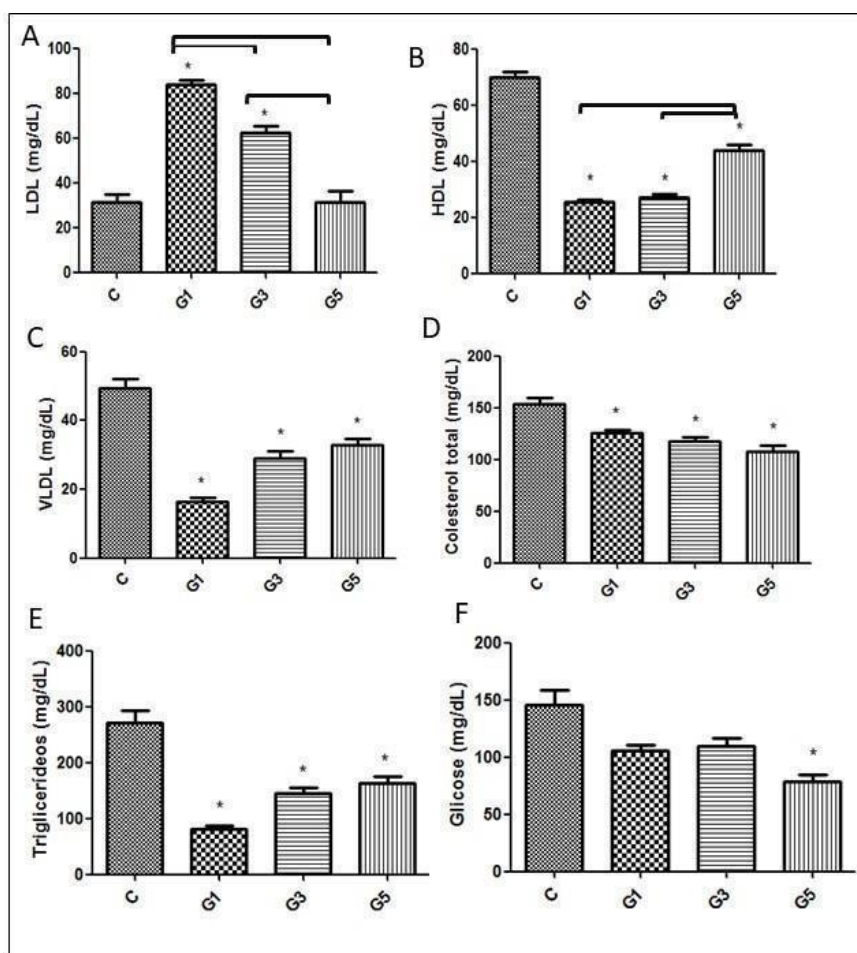
Média $\pm$ desvio padrão do consumo de ração (A), massa corporal (B), Índice de Lee (C) e massa da gordura retroperitoneal (D). (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle e as linhas acima das barras indicam diferença significativa quando comparado entre as gerações.

Fonte: Da autora.

6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A Figura 5 (Gráfico A) mostra que os índices séricos de LDL foram maiores ($p<0,05$) para as gerações 1 e 3 (G1 e G3), quando comparadas aos animais controles. Para os níveis de HDL (Gráfico B) há um decréscimo relevante para todas as gerações (G1, G3 e G5) comparadas aos animais controles e, entre as gerações, o HDL foi maior na G5 comparada com G1 e G3. Nos Gráficos C, D e E pode-se observar que os índices lipídicos de VLDL, colesterol total e triglicerídeos, reduziram, com significância estatística, nas gerações 1, 3 e 5 em comparação aos animais do grupo controle. Para os valores glicêmicos, (Gráfico F) a análise estatística mostrou redução significativa em G5 quando comparado com o grupo controle ($p<0,05$).

Figura 5- Parâmetros bioquímicos (LDL, HDL, VLDL, colesterol total, triglicerídeos e glicose) avaliados em ratos Wistar provenientes de ninhadas reduzidas e acasalamento consanguíneo



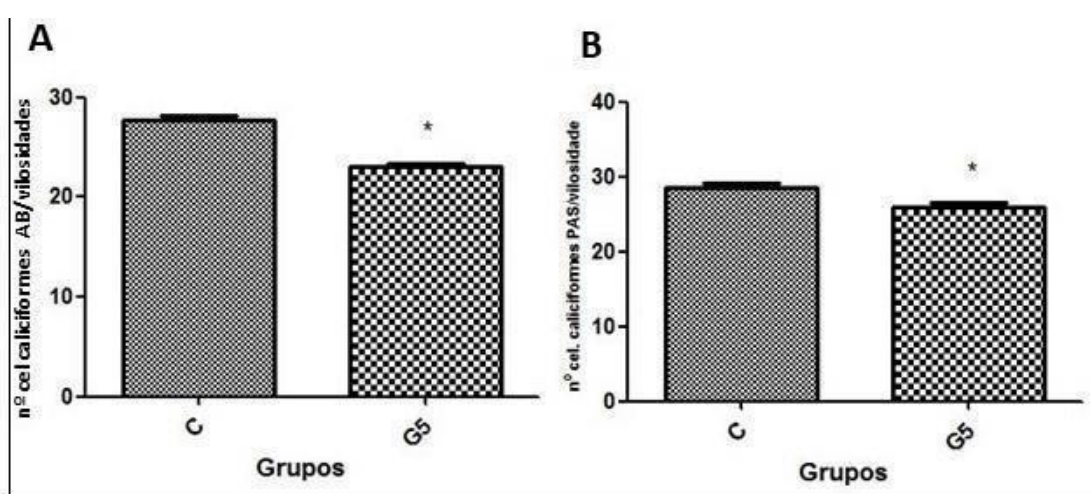
Média $\pm$ desvio padrão dos valores de LDL (A), HDL (B), VLDL (C) Colesterol total (D), Triglicerídeos (E) e Glicose (F). (*) indica diferença significativa ($p<0,05$) comparado com o controle e as linhas acima das barras a diferença significativa quando comparado entre as gerações.

Fonte: Da autora.

6.3 PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO INTESTINO (JEJUNO)

Na Figura 6 encontram-se os resultados dos parâmetros obtidos do intestino dos animais. Para as avaliações das células caliciformes foram utilizados os resultados do grupo controle e da geração 5, somente. Nos gráficos A e B pode ser observado que o número de células caliciformes, tanto nas colorações de AB) como de PAS, sofreram redução significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos valores dos animais controles.

Figura 6 - Análise dos parâmetros morfológicos do intestino (nº de células caliciformes) de ratos Wistar consanguíneos submetidos a redução de ninhada

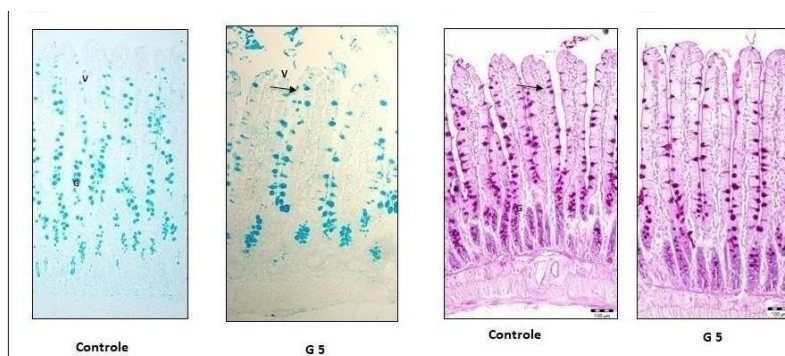


Média $\pm$ desvio padrão do número de células caliciformes na coloração Alcian Blue (A), número de células caliciformes na coloração de Ácido Periódico de Schiff (B) (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle. Linhas acima das barras diferença significativa quando comparado entre as gerações.

Fonte: A autora.

Na Figura 7, são mostradas as fotomicrografias da mucosa do jejuno evidenciando as células caliciformes com mucinas ácidas coradas em verde, com AB e neutras, coradas em púrpura pelo PAS, tanto nas vilosidades (v) como nas glândulas mucosas (g), respectivamente. A coloração dos núcleos em C e D foram omitidos para se evitar a descoloração das mucinas ácidas.

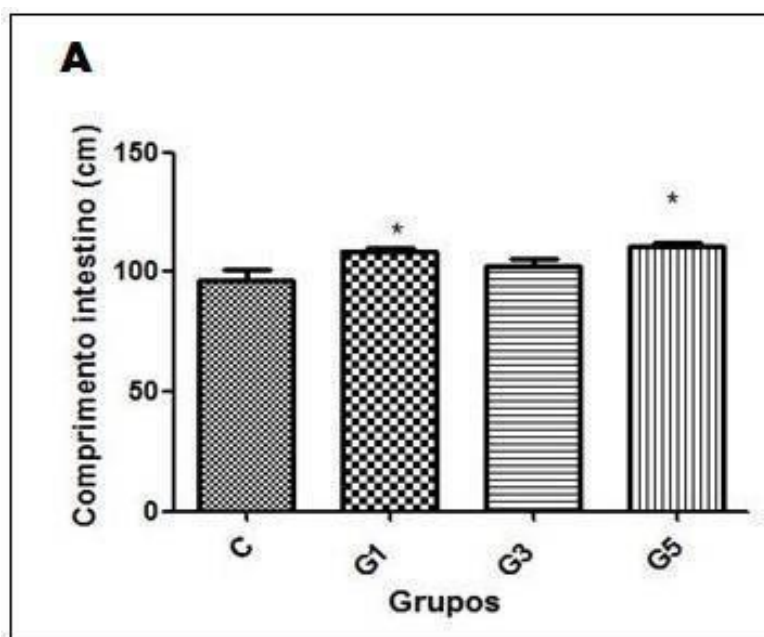
Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa do jejuno para visualização das células caliciformes nas colorações de Alcian Blue e PAS



Células caliciformes em Alcian Blue do grupo controle (A) e G5 (B); e células caliciformes em PAS do Grupo controle (C) e G5 (D)

A figura 8 mostra o valor do comprimento dos intestinos onde se observa um aumento significativo do mesmo nas gerações 1 e 5 quando comparado com o grupo controle.

Figura 8 - Comprimento dos intestinos de ratos Wistar obtidos após a redução da ninhada



Média $\pm$ desvio padrão do comprimento dos intestinos, (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle.

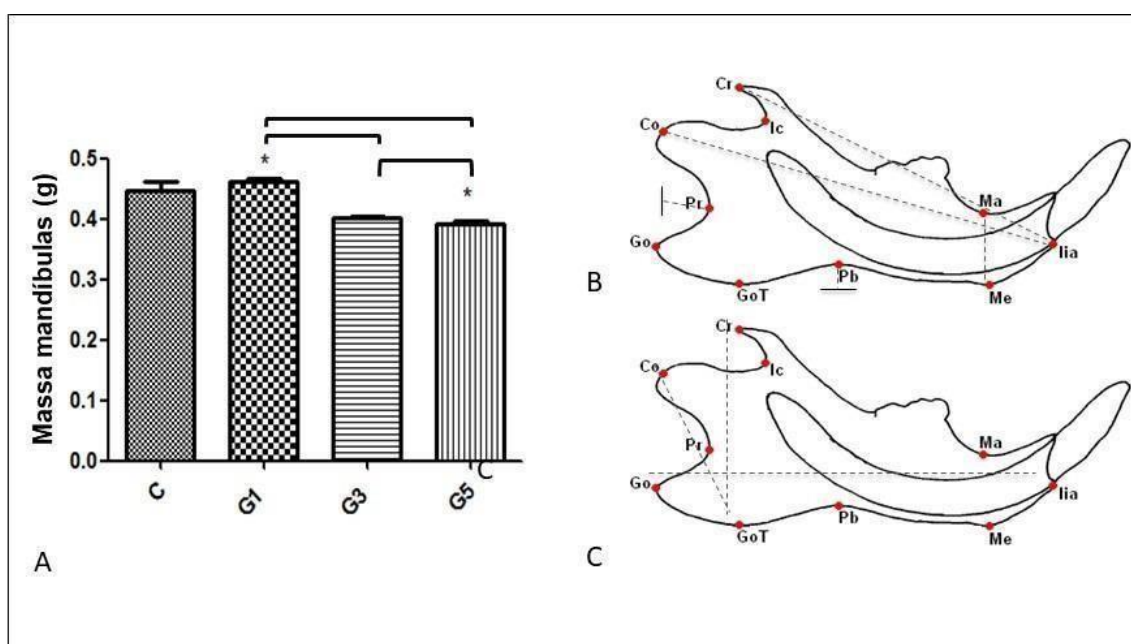
Fonte: A autora.

6.4 ANÁLISE DA MASSA E DA MORFOMETRIA DAS HEMIMANDÍBULAS

Na Figura 9 A são apresentados os resultados para a massa e em B e C as medidas morfométricas, respectivamente. O gráfico A mostra aumento significativo da massa das hemimandíbulas na G1 comparado com o grupo controle, entretanto houve redução significativa na massa das hemimandíbulas na G5 em relação ao controle. Entre as gerações, ocorreu redução no peso das hemimandíbulas na G3 e G5 quando comparado com a G1.

Em B são mostradas as medidas morfométricas que sofreram redução significativa nas G1, 3 e 5 quando comparadas com o grupo controle e em C, as medidas morfométricas que apresentaram um aumento na G3 quando comparada com o grupo controle.

Figura 9 - Massa e morfometria das hemimandíbulas dos ratos Wistar consanguíneos após a redução da ninhada



Média $\pm$ desvio padrão da massa das hemimandíbulas (A) e das medidas morfométricas (B e C). Para a figura 9 A: (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle e, as linhas acima das barras a diferença significativa quando comparado entre as gerações. Em B e C as linhas tracejadas indicam diferenças significativas conforme já descrito no texto.

Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

Já é conhecido que a hiperalimentação causada pela redução do número de filhotes induz a obesidade e que tal estratégia é chamada de programação metabólica. Neste modelo, a obesidade é desenvolvida pelo maior aporte de leite aos filhotes durante a lactação, representando o alto consumo energético semelhante ao que ocorre nos humanos. São reportados na literatura vários trabalhos que reproduzem o quadro de instalação de obesidade em ratos por redução da ninhada (CAI et al., 2016; FISCHER et al., 2015; HABBOUT et al., 2013; HAMDY; PORRAMATIKUL; AL-OZAIRI, 2006; PLAGEMANN et al., 1992; RODRIGUES et al., 2007; SRINIVASAN, 2003; THOLE et al., 2012).

Semelhantemente aos resultados obtidos por Hamdy e colaboradores (2006), nas ninhadas reduzidas de nosso trabalho, observamos características que confirmam a obtenção do fenótipo de obesidade, ou seja, um aumento significativo da massa corporal, da gordura retroperitoneal, do Índice de Lee (índice de obesidade) e do consumo de ração na G5.

Entretanto, diferentemente dos demais trabalhos já descritos, em nosso estudo tais parâmetros foram mantidos significativamente altos nas demais gerações produzidas a partir do cruzamento consanguíneo, indicando a permanência, ao longo das gerações, das características fenotípicas de obesidade encontradas na primeira geração (G1) quando comparadas com o grupo proveniente de cruzamento não consanguíneo e sem redução de ninhada.

É sugerido que o maior depósito de gordura, que os animais provenientes de ninhadas reduzidas apresentaram, esteja relacionado ao aumento na atividade de enzimas lipogênicas nos adipócitos (MOZES et al., 2004). Velkoska e colaboradores (2005) demonstraram que animais com 120 dias superalimentados após o nascimento, apresentam aumento no RNAm da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 1 (11 β -HSD1) nas células adiposas. Esta enzima converte corticosterona em cortisol, que aumenta a lipogênese, principalmente, em adipócitos abdominais (LIVINGSTONE; KENYON; WALKER, 2000).

Os perfis elevados da massa corporal, do IL e da adiposidade retroperitoneal permaneceram presentes ao longo das cinco gerações em estudo, demonstrando que as influências no período pós-natal, principalmente da disponibilidade aumentada do

alimento no período de lactação, parecem estar ligadas a alterações permanentes no organismo observado no animal adulto, e entram em concordância com observações já realizadas em outros trabalhos em relação ao aumento na massa corporal, alterações no metabolismo e nas funções endócrinas (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; FAUST; JOHNSON; HIRSCH, 1980; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; PLAGEMANN et al., 1992; RODRIGUES et al., 2009).

Entretanto, além de serem mantidos na vida adulta podemos acrescentar, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, que podem ser perpetuados por gerações futuras, possivelmente por mecanismos epigenéticos, os quais foram inferidos a partir das análises morfométricas da hemimandíbulas.

Já está bem descrito na literatura que animais supernutridos, por redução de ninhada durante a lactação, sofrem mudanças metabólicas as quais acarretam alterações na homeostase lipídica (PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN et al., 1992). Em nossos resultados, os animais consanguíneos oriundos de ninhadas reduzidas apresentaram aumento dos níveis de LDL na primeira geração, com redução gradativa, sendo que na terceira geração ainda apresentou aumento significativo e na 5ª geração semelhantes ao grupo controle (sem diferença significativa).

Contrariamente aos níveis de LDL, uma redução dos níveis de HDL foram detectados em todas as gerações estudadas em relação ao controle, ocorrendo um aumento na geração 5 em relação as demais gerações estudadas. Portanto, os resultados a partir da primeira geração são concordantes com os já descritos na literatura para LDL e HDL. A diminuição nos níveis de HDL indicam que ocorreram alterações significativas do metabolismo lipídico de forma permanentes e crescentes ao longo das gerações consanguíneas.

As alterações encontradas nos níveis das lipoproteínas LDL e HDL sugerem um quadro de dislipidemia (HDL reduzido isoladamente ou acompanhado do aumento de LDL), sendo esta uma das quatro mais relevantes classificações das alterações do perfil lipídico conforme as Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias de 2017. O acúmulo de ácido graxo livre, na forma de LDL, leva a uma série de alterações em tecidos não lipídicos (músculo esquelético, fígado e pâncreas) e promove

modificações na ação e na dinâmica da insulina (FONTES, 2003; MANCO; CALVANI; MINGRONE, 2004), que culminam com um quadro dislipidêmico.

Em relação ao colesterol total, triglicerídeos e VLDL, nossos resultados mostraram uma redução para esses parâmetros nas gerações estudadas, quando comparadas com o grupo controle. Conforme reportado por Boullu-Ciocca e colaboradores (2008), em estudos animais, a hiperalimentação por redução da ninhada induziu a obesidade precoce e acelerou a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), juntamente com uma regulação positiva do RNAm do receptor de glicocorticóide do tecido adiposo, o que nos permite sugerir que o fato de não observarmos o aumento de níveis de triglicérides e colesterol pode estar relacionada ao processo de lipogênese, ou seja, os ácidos graxos livres na circulação são direcionados ao processo de armazenamento na forma de triacilgliceróis no tecido adiposo. Nossos resultados, são similares aos descritos por Rodrigues e colaboradores (2007), que demonstrou uma redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos entre animais supernutridos comparado com o grupo controle.

Entre as várias alterações metabólicas que ocorrem no estado de obesidade severa está a variação nos níveis de glicose, cuja regulação envolve, em uma condição normal de homeostase, isto é, sem considerar uma condição de obesidade, a sensibilidade a insulina. Em condição de obesidade os níveis de glicose é um dos vários fatores que predizem a instalação da condição de obesidade ou obesidade severa resultando em síndrome metabólica. Entretanto, além da insulina outros fatores neuroendócrinos podem estar envolvidos na regulação dos níveis de glicose e ainda precisam ser completamente entendidos.

Resultados mostram que os níveis de glicose em jejum, de animais provenientes de ninhadas reduzidas sofrem aumento glicêmico sendo acompanhado de hiperinsulinemia (AALINKEEL et al., 1999; PATEL; SRINIVASAN, 2011; RINALDI et al., 2012), o que mostra alterações na regulação tanto do sequestro da glicose para o fígado e músculo mas também uma possível relação com a regulação do metabolismo lipídico.

Em nosso trabalho, os níveis de glicose, não foram obtidos em estado de jejum e se mostraram reduzidos ao longo das gerações obtidas 1, 3 e 5, quando comparados com o controle, e apenas a geração 5 teve uma redução significativa da

glicose quando comparada com o grupo controle. Entretanto, em uma condição de obesidade e síndrome metabólica severa seria de se esperar que ocorresse um aumento da glicose refletindo alguma insensibilidade à insulina.

Nos nossos resultados, onde os animais não foram submetidos a um jejum prévio, a redução dos níveis de glicose pode refletir um funcionamento normal da insulina, e apesar dos demais parâmetros avaliados estarem de acordo com uma condição de obesidade. Outra observação importante é a de que ao se olhar os níveis de glicose dos animais controles essa se apresenta alta e por si só poderia indicar que os animais controles já poderiam estar em uma condição de obesidade, entretanto, é preciso considerar que os animais gerados por acasalamento e redução de ninhada não apresentam glicose aumentada como os controles, o que indica que alguma alteração na regulação pode estar ocorrendo nos animais de cada geração sendo necessário que essa observação seja melhor investigada em gerações futuras.

Por outro lado, em outros modelos de indução de obesidade por dietas de cafeteria ou hiperlipídicas os resultados para a glicemia de jejum se mostram diversificados. Usando dieta de cafeteria, no final de 8 semanas (COATMELLECTAGLIONI et al., 2000), 12 semanas (NADERALI et al., 2001) ou 15 semanas e ainda, 48 semanas de dieta hiperlipídica (DUARTE et al., 2006) as taxas de glicose sanguínea em jejum não foram alteradas.

É descrito também que na obesidade, dependendo do modelo experimental utilizado, há uma alteração do tipo de microbiota encontrado no intestino e que o epitélio intestinal fornece uma proteção para a exacerbação da obesidade e suas comorbidades associadas. Tal proteção advém da produção de mucinas pelas células caliciformes presentes no epitélio intestinal. Dessa forma, em nosso experimento, fizemos a avaliação da quantidade de células caliciformes além da medida do comprimento do intestino. Um aumento no tamanho do intestino já foi descrito por Hamaoka (1986). O autor verificou um aumento proliferativo do epitélio intestinal em camundongos obesos tratados com glutamato monossódico. Em nossos resultados também foi demonstrado um aumento do comprimento do intestino ao longo das gerações comparado com o controle, indicando uma concordância com os resultados de Hamaoka.

Já é descrito que as mucinas produzidas pelas células caliciformes tem um importante papel na proteção do epitélio intestinal contra à entrada de toxinas da microbiota que podem exacerbar o processo inflamatório induzido pela obesidade, sendo sua avaliação um preditor na funcionalidade do intestino no processo de obesidade. Em nossos resultados, a diminuição do número de células caliciformes, detectadas pelo uso das colorações de Alcian blue (AB) e Ácido periódico de Schiff, (PAS) respectivamente, interferem na produção de mucinas ácidas e neutras e nas suas respectivas funções de proteção na condição de obesidade.

Assim, nossos resultados mostraram uma diminuição significativa das células caliciformes na geração 5 comparada com o grupo controle, indicando que a obesidade interfere significativamente na produção de mucinas no epitélio intestinal em uma condição de obesidade. Nossos resultados, apesar de preliminares, podem indicar que o cruzamento consanguíneo associado à redução da ninhada, influencia nos processos de proliferação e diferenciação do epitélio intestinal, reduzindo o número de células caliciformes e portanto, a proteção, em uma condição de obesidade ao longo das gerações.

Adicionalmente, estudos sobre a associação entre obesidade e massa óssea são relativamente comuns na literatura especialmente com foco em fêmeas e relacionando obesidade e osteoporose, porém, apresentam resultados controversos e de conclusões relativas. Além disso, poucos estudos existem sobre o impacto da obesidade experimental no desenvolvimento e formação dos tecidos mineralizados. No experimento realizado por Chen e colaboradores (2010), onde a obesidade foi induzida por dietas hiperlipídicas, em ratos, houve uma diminuição da massa óssea da tíbia. Os autores sugerem que essa redução da estrutura óssea observada pode ser uma ação da relação entre obesidade e fatores pró inflamatórios produzidos pelos macrófagos e osteoclastos que induzem uma reabsorção ossea.

Nos nossos resultados, a massa das mandíbulas mostrou-se maior na G1 em relação ao controle porém sofreu redução em G3 e G5 comparada com G1, o que indica uma possível ação do cruzamento consanguíneo associado a redução das ninhadas, com interferência direta no processo de formação e remodelação da matriz óssea da mandíbula ao longo das gerações. A deposição e remodelação da matriz ossea parece se apresentar como uma característica com algum grau de flutuação ao longo das gerações, possivelmente refletindo função da atividade tanto de osteoblastos

quanto de osteoclastos. Um estudo mais detalhado do processo de formação óssea é necessário para se avaliar melhor o processo de remodelação ao longo das gerações.

Os resultados da massa mandibular reduzidos em G3 e G5 se refletem na redução significativa das medidas de comprimento Cr-lia e Co-lia e de altura da região anterior das hemimandíbulas, observadas quando se compara as gerações estudadas com o grupo controle. Da mesma forma, a análise dos aumentos observados nas medidas Cr-Got, Co-Got e Go-lia em G3 e G5, comparado com o grupo controle, embora com algumas variações, sugerem que o cruzamento consanguíneo associado a redução de ninhadas, alterou as dimensões e o tamanho das hemimandíbulas.

A avaliação da morfologia e morfometria da mandíbula é descrita na literatura, (ANDERSON; RENAUD; RAYFIELD, 2014; BURGIO et al., 2012; MARTINEZ, 2014; NAVARRO; MAGA, 2016) como marcadores de possíveis alterações epigenéticas. A mandíbula é dividida em duas regiões, uma anterior e uma posterior e podemos sugerir, a partir de nossos resultados, que ocorreu uma redução das dimensões que determinam a região anterior e um aumento nas dimensões que determinam a região posterior das hemimandíbulas, ao longo das gerações estudadas.

Uma possível explicação para a alteração das dimensões das mandíbulas, especialmente na região posterior, é que além das influências exercidas pelas alterações epigenéticas, possivelmente o aumento do processo mastigatório promovido pela musculatura associado ao processo angular, o qual é justificado pelo maior consumo de alimentos nos animais obesos. Entretanto, nas próximas gerações uma melhor avaliação da estrutura muscular associada as mandíbulas serão realizadas para confirmar essa sugestão.

Além disso, conforme Burgio (2012) as alterações morfológicas da mandíbula ocorrem com uma possível modularidade genética devido a fatores epigenéticos o que pode ser aplicado neste experimento indicando que a obesidade induzida pela redução da ninhada associada ao cruzamento consanguíneo possa ter influenciado epigeneticamente as alterações morfométricas encontradas nas hemimandíbulas dos ratos desse estudos.

Os resultados preliminares obtidos nessas 5 gerações estudadas, como o aumento nos valores do consumo alimentar, dos índices biométricos e bioquímicos, os quais são indicadores do estado de obesidade e as alterações morfométricas do

intestino e das hemimandíbulas, nos sugerem uma associação positiva entre o cruzamento consanguíneo com a redução do número de filhotes; a partir da G6, outras análises e controles serão introduzidas na busca da consolidação de uma nova linhagem de ratos obesos (fruto de 20 gerações) que possam ser disponibilizados para os pesquisadores do tema obesidade, trazendo inúmeros benefícios para a pesquisa, como a redução do número de animais e consequentemente de recursos utilizados para o estudo desta doença.

8 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A associação da redução do número de filhotes com o acasalamento consanguíneo promoveu:

- 1) Aumento nos valores dos índices biométricos e gordura retroperitoneal.
- 2) Alterações no perfil sérico lipídios e glicemia.
- 3) Aumento no comprimento do intestino e redução na produção de mucinas na região do jejuno.
- 4) Alterações nas medidas morfométricos das hemimandíbulas.

9 CONCLUSÃO

Conclui-se, pelos resultados obtidos neste trabalho, que a estratégia de acasalamento consanguíneo a partir da redução do número de filhotes pode gerar uma linhagem com características fenotípicas de obesidade.

REFERÊNCIAS

- AALINKEEL, R. et al. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 6, p. 1061-1069, 1999.
- ANDERSON, P.S.L.; RENAUD, S.; RAYFIELD, E.J. Adaptive plasticity in the mouse mandible. **BMC Evolutionary Biology**, v.14, p.85, 2014.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.
- ANGELOCO, L.R.N.et al. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets. **Rev. Nutr**, v. 25, n. 3, p.331-339, 2012.
- ANJOS, L. A. **Obesidade e saúde pública**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006.
- ATCHLEY, W. R; HALL, B.K. A model for development and evolution of complex morphological structures. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc**, v. 66, p. 101–157, 1991.
- BALABAN, G.; SILVA, G. A. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **Journal of Pediatrics (Rio J)**, v. 80, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BARKER, D. J. The developmental origins of adult disease. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 6, p. 588S-595S, 2004.
- BEI, F. et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. **Lipids in Health and Disease**, v.14, p. 1-3, 2015.
- BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.
- BORENGASSER, S. J. et al. Maternal Obesity Enhances White Adipose Tissue Differentiation and Alters Genome-Scale DNA Methylation in Male Rat Offspring **Endocrinology**, v.154, n.11, p.4113–4125, 2013.
- BORTOLIN, R. C. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **International Journal of Obesity**, Sep, 2017.
- BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 669-677, 2008.
- BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **JCEM**, v. 89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.
- BRIN, I; MICHAELY Y; STEIGMAN, S. Long-term Effects of Orthodontic Forces on the Morphology of the Rat-incisor Socket and its Location in the Mandible. **J Dent Res**, v.69, p.1834-38, 1990.
- BURGIO, G. et al. Exploration of the Genetic Organization of Morphological Modularity on the Mouse Mandible Using a Set of Interspecific Recombinant Congenic Strains

Between C57BL/6 and Mice of the *Mus spretus* Species. **G3- Genes Genomes Genetics**, v. 2, n.10, p. 1257–1268, 2012.

BRIN, I; MICHAELY Y; STEIGMAN, S. Long-term Effects of Orthodontic Forces on the Morphology of the Rat-incisor Socket and its Location in the Mandible. **J Dent Res**, v.69, p.1834-38, 1990.

BURGIO, G. et al. Exploration of the Genetic Organization of Morphological Modularity on the Mouse Mandible Using a Set of Interspecific Recombinant Congenic Strains Between C57BL/6 and Mice of the *Mus spretus* Species. **G3- Genes Genomes Genetics**, v. 2, n.10, p. 1257–1268, 2012.

CAI, G. et al. Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: A role for adrenal melanocortin 2 receptors. **Scientific Reports**, v.6, p. 21097, 2016.

CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease.

Neurogastroenterol Motil, v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012. CAMPOS, I. **Aleitamento materno**. Matosinhos: QuidNovi, 2007.

CASABIEL, X. et al. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 4270-4273, 1997.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas; Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

CHAN, D.C et al. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. **Diabetes Res Clin Pract**, v.63, n.2, p. 77-85, fevereiro, 2004.

CHEN, H.Q. et al. *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2010.

CHEVERUD, J.M. et al. Pleiotropic effects on mandibular morphology II: Differential epistasis and genetic variation in morphological integration. **Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)**, v. 302B, p.424-435, 2004.

CHU, H. F. et al. Variations in the Efficacy of Resistant Maltodextrin on Body Fat Reduction in Rats Fed Different High-Fat Models. **J Agric Food Chem**. v.62, n. 1, p.192-7, 2014.

CLATWORTHY, J.P.; SUBRAMANIAN, V. Stem cells and the regulation of proliferation and patterning in the intestinal epithelium: Emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. **Mechanisms of Development**, v. 101, n. 1-2, p. 3-9, 2001.

COATMELLECC-TAGLIONI. et al. Hypertension in cafeteria-fed rats: alterations in renal α 2-adrenoceptor subtypes. **Am j Hypertens**, v. 13, p. 529-534, 2000.

CONSTANCIA, M. et al. Imprinting Mechanisms. **Genome Res**. v.8, p. 881-900, 1998.

COTTRELL, E. C.; OZANNE, S. E. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. **Proceedings Of The Nutrition Society**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2007.

CRESCI, GA, BAWDEN, E. Gut microbiome: what we do and don't know. **Nutr Clin Pract**, v. 30, n. 6, p. 734-46, 2015.

DAS, U.N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v.17, p. 953-966, 2001.

DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C.F. Neonatal programming of neuroimmunomodulation – Role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, v.15, n. 3, p.176-188, 2008.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The surgeon general's call to action to prevent and decrease overweight and obesity**. [Rockville, MD]: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General, 2001.

DESPRES, J.P. LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006.

DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 33, p.7, 2017.

DJAZAYERY, A.; MILLER, D.S.; STOCK, M.J. Energy balances in obesity mice. **Nutr Metabo**, v. 23, n. 5, p. 357-67, 1979.

DUARTE, A. C. G. O. et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev Nutr.**, Campinas, v. 12, n.3, jun.2006.

EHRICH, T.H. et al. Pleiotropic effects on mandibular morphology I. Developmental morphological integration and differential dominance. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 296, p.58 -79, 2003.

FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; HIRSCH, J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 110, n. 10, p. 2027-2034, 1980.

FISCHER, S. V.; et al. Swimming training prevents metabolic *imprinting* induced by hypernutrition during lactation. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 10, p. 13-20, 2015.

FONTES, C. F. L. Diabetes. In.: POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P.C. **Hormônios e Metabolismo – Integração e Correlações Clínicas**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, p. 215-268, 2003.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n.5 (Supl), p. 192-203, 2007.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**. v.316, n.2, p.129-39, 2010.

GAO, Q. et al. Epigenetic code and potential epigenetic-based therapies against chronic diseases in developmental origins. **Drug Discov Today**, v. 19, p.1744-50.44, 2014

GARG, A. Regional adiposity and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 9, p. 4206-4210, 2004. GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5, p.1344S-1352S, 2000.

GOODPASTER, B. H.; THAETE F.L.; KELLEY, D.E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr**, v.71, n.4, p. 885-892, 2000.

GOTTLIE, M. G. V. et al. Aspectos genéticos do envelhecimento e doenças associadas: uma complexa rede de interações entre genes e ambiente. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 10, n. 3, 2007.

GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M. K. Environmentally induced epi-genetic transgenerational inheritance of male infertility. **Curr Opin Genet Dev**, v.26, p.79-88.45, 2014.

GUERREIRO, F. S. **Efeitos da Consistência da dieta sobre o crescimento mandibular em ratos: Análise Histomorfométrica**. Dissertação (Mestrado), Universidade Cidade de São Paulo, 2009.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, 2008.

GUILLOTEAU, P. et al. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, n.3, p.17-35, 2009.

HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **J Nutr**, v. 143, p. 553–562, 2013.

HAMDY, O.; PORRAMATIKUL, S.; AL-OZAI, E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. **Curr Diabetes Rev**, v. 2, n. 4, p. 367-73, 2006.

HAMAOKA, K.; KUSUNOKI, T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate- treated obese mice. **J Nutr Sci Vitaminol**, Tokyo, v. 32, p. 395–411, 1986.

HANLEY, B. et al. Metabolic *imprinting*, programming and epigenetics-a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S1, p. S1-S25, 2010.

HARDER, T. et al. Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats. **Endocrine Regulations**, v.33, n.1, p.25-31, 1999.

HENI, M. et al. Variation in the obesity risk gene FTO determines the postprandial cerebral processing of food stimuli in the prefrontal cortex. **Mol Metab**. v.3, p.109–13, 2014.

HIRAI, C. et al. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, n.34, p.524-528, 2002.

HUANG, C. et al. The impact of acute aerobic exercise on chitinase 3-like protein 1 and intelectin-1 expression in obesity. **Exp Biol Med** (Maywood), v. 241, n. 2, p. 216–221, 2016.

JARAMILLO, P.L. Cardiometabolic Disease in Latin America: The role of fetal programming in response to maternal malnutrition. **Rev. Esp. Cardiol.**, .v. 6, p. 670-676, 2009.

JUNG, U. J.; CHOI, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–223, 2014.

KAGEYAMA, S. et al. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction**, v.133, p.85-94, 2007.

KENNEDY, G. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 9-17, 1957.

KIESSLICH, R.; GOETZ, M.; ANGUS, E.M. et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. **Gastroenterology**. v.133, p. 1769–78, 2007.

KLINGENBERG, C.P.; NAVARRO, N. Development of the mouse mandible: a model system for complex morphological structures. **In Evolution of the house mouse**. Edited by MACHOLÁN, M. et al. Cambridge: Cambridge University Press. p.135– 149, 2012.

KLINGENBERG, C. P.; LEANY, L. J.; CHEVERUD, J. M. Integration and Modularity of Quantitative Trait Locus Effects on Geometric Shape in the Mouse Mandible. **Genetic Society of America**, v.166, p.1909–1921, abril, 2004.

LAFLAMME, D. P. Companion animals symposium: Obesity in dogs and cats:What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1653-1662, 2012.

LEITE, L.; NETO, J. Integração Neuroendócrina na Regulação da Ingestão Alimentar. **Neurobiologia**, v. 72, n. 2, 2009.

LEITE, J. I. A.; OLIVEIRA, D. R. de; PELUZIO, M. C. G. Dislipidemias. In: NETO, F. T. **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

LEMES, A.C.A et al. Efeitos do exercício físico e do tratamento com metformina sobre aspectos endócrinos-metabólicos de ratos obesos de ambos os sexos. **Educación Física y Deportes, Revista Digital**. Buenos Aires, v.13, n. 121, junho, 2008.

LIVINGSTONE, D. E.; KENYON, C. J.; WALKER, B. R. Mechanisms of dysregulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. **J Endocrinol**, v. 167, n. 3, p. 533-539, 2000.

LIU, J. et al. Impact of abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue on Cardiometabolic Risk Factors: The Jackson Heart Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, p.5419-5426, 2010.

LOPES, M. I. et al. Genetics of obesity. **Rev Nutr**, Campinas, v.17, n. 3,p. 327-338, jul./set., 2004.

LOVELL, D. P.; ERICKSON, R. P. Genetic variation in the shape of the mouse induced cleft palate analyzed by using recombinant inbred lines. **Genetic Society of America**, v.113, p. 755-764, Julho, 1986.

- LUCAS, T. E.; ADRIAN, T. E.; BLOOM, S.R. Breast vs bottle: endocrine responses are different with formula feeding. **The Lancet**, v. 14, p.1267-9, 1980.
- MAGALHÃES, L. B. N. C. **Drogas para uso em dislipidemias**. In: SILVA, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- MALAFIA, A. B. et al. Obesity induction with high fat sucrose in rats. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v.26, p.17-21, 2013.
- MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, p. 402-413, 2004.
- MANN, M.R.;BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biol**, v.3, n.2, n.1003, 2002.
- MARTINEZ, J.M. et al. Effect of chromosomal reorganizations on morphological covariation of the mouse mandible: insights from a Robertsonian system of *Mus musculus domesticus*. **Frontiers in Zoology**, v.11, p.51, 2014.
- MARTÍNEZ, J.A. et al. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. **J Nutr**, v.133, n. 8, p.2549-2554, 2003.
- MAUER, M.M.; HARRIS, R.B.; BARTNESS, T.J. The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2001.
- MCLAUGHLIN, T. et al. Preferential Fat Deposition in Subcutaneous Versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, p. E1756-E1760, 2011.
- MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MÜHLHÄUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 9-17, 2005.
- MOLINA, M. **Composicion de la leche humana**. In Lactancia materna: Guia para profesionales. Madrid: Comité de Lactancia Materna de la Associassión Espanhola de Pediatria, p. 59-79, 2004.
- MOREIRA, A.S. **Dietas ricas em gordura, frutose e sacarose: alterações no fígado** (Doutorado). Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 2014.
- MOURA VI; RI, M. Papel do Tecido Adiposo na Inflamação e Metabolismo do doente obeso. **Revista da Sociedade Portuguesa de ciências da Nutrição e alimentação**, v. 16, n. 1, p. 15-22, 2010.
- MOZES, S. et al. Obesity and Alkaline Phosphatase in Small Intestine. **Physiol. Res**. 53: 177-186, 2004.
- NADERALI, E. K. et al. Dietinduced endothelial dysfunction in the rats in independent of the degree of increase in total body weight. **Clin Sci**, London, v. 100, p. 635- 641, 2001.

NAVARRO, N.; MAGA, A. M. Does 3D Phenotyping Yield Substantial Insights in the Genetics of the Mouse Mandible Shape? **G3-Genes Genomes Genetics**, fevereiro, 2016.

NETO, O. D. A. et al. Fatores associados à dislipidemia em crianças e adolescentes de escolas públicas de Salvador, Bahia. **Rev Bras Epidemiol**, v. 15, n. 2, p. 335– 345, 2012.

OSMOND, C. et al. Early growth and death from cardiovascular disease in women. **BMJ**, v.307, n. 6918, p.1519-24, 1993.

PASSOS, M.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition research**, v. 20, p. 1603–1612, 2000.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. 2, p. 18-28, 2011.

PETERSON, L.W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v.14, n.3, p.141-153, 2014.

PLAGEMANN, A. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of perinatal medicine**, v. 38, p. 393- 400, 2010.

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 99, n. 03, p. 154-158, 1992.

POIRIER, P. et al. **Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss**. An update of the American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 113, p. 898-918, 2006.

PORTELLA, A. K. et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. **Behavioural Brain Research**. v. 278, p. 66-73, 2015.

PORTER, S.A. et al. Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Prospective Fat Depot? **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1068-1075, 2009.

PRADO, W.L. et al. Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 5, Set/Out, 2009.

RAMIRO-PUIG, E. et al. The bowel: a key component of the immune system. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 100, n. 1, p. 29-34, 2008.

REILLY, J. J.; KELLY, J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. **International Journal of Obesity**, v. 35, p. 891-898, 2011.

RENAUD, S.; AUFFRAY, J.C.; PORTE, S. de la. Epigenetic effects on the mouse mandible: common features and discrepancies in remodeling due to muscular dystrophy and response to food consistency. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p.28, 2010.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos *Wistar*. **Revista de Nutrição**, v.25, n.3, p.321-330, 2012.

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte**, v. 8, n. 6, 2002.

RODRIGUES, A. L.; et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v. 195, n. 3, p. 485-494, 2007.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis of young and adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 11, p. 2647-2661, 2009.

ROMALDINI, C. C. et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n.2, mar./abr. 2004.

ROSA, E.C. et al. Visceral obesity, hyperension and cardio-renal risk: a review. **Arq Bras Endocrinal Metabol**, v.49, n.2, p. 196-204, abril, 2005.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S.R.; MORAIS, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 3, p.383-387, 2012.

SCHAGDARSURENGIN, U.; STEGER, K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol*, v.13, p. 584-595, 2016.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, 2003.

SLOMKO, H.; HEO, H. J.; EINSTEIN, F. H. Minireview: Epigenetics of Obesity and Diabetes in Humans. **Endocrinology**, v.153, n.3, p.1025–1030, março, 2012.

SOARES, F.L.P. **Efeitos e mecanismos de ação da exclusão dietética de glúten de trigo na obesidade e resistência à insulina experimentais** (Doutorado). Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 2012.

SOARES, F.L.P. et al. **Novo modelo experimental de síndrome metabólica induzida por dieta**. In: 12º Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição; 2013; Foz do Iguaçu. São Paulo: NutrIRE - Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. p. 234-4, 2013.

SOUBRY, A. Epigenetic inheritance and evolution: a paternal perspective on dietary influences. **Prog Biophys Mol Biol**, v.118, p. 79-85, 2015.

SOUBRY, A. et al. A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. **Bioessays**, v.36, p.359-71, 2014.

SOUZA, G. E.S da. et al. Physical exercise as a coping to the comorbidities associated with obesity tool: literature review. **Arch Health Invest**, v. 5, n.2, 2016.

SRINIVASAN, M. et al. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. **Experimenta Biology and Medicine**, v. 228, n. 1, p. 15-23, 2003.

STEIGMAN, S et al. Three-dimensional Evaluation of the Effects of Functional Occlusal Forces on the Morphology of Dental and Periodontal Tissues of the Rat Incisor. **J Dent Res**, v.68, p.1269, 1989.

STEPHENS, D.N; Does the Lee obesity index measure general obesity? **Physiology & Behavior**, v.25, n.2, p. 313-315, agosto, 1980.

STEWART, K. R.; VESELOVSKA, L.; KELSEY, G. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. **Epigenomics**, v.8, n.10, p.1399-1413, outubro, 2016.

SULIVAN, E. L.; GROVE, K. L. Metabolic Imprinting of Obesity. *Forum Nutr*, v. 63, p.186–194, 2010.

SUZUKI, K.; JAYASENA, C. N.; BLOOM, S. R. Obesity and appetite control. *Experimental diabetes research*, **2012**.

SYMONDS, M. E.; BUDGE, H.; FRAZIER-WOOD, A. C. Epigenetics and Obesity: A Relationship Waiting to Be Explained. **Hum Hered**, v.75, p.90–9, 2013.

TARTIDO, A.P; FALCÃO, M.C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. **Rev Bras Nutr Clin**, v.21, n.2, p.117-124, 2006.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

TEREPEK, M. et al. Is epigenetically programmed to regulate genetranscription in embryos. **Genome Res**, v. 26, p.1034-46, 2016.

THOLE, A. A et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue Cell**, v. 44, n.4, p. 238–248, 2012.

VAGUE, J.T. The degree of masculine, differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric acid calculous disease. **Am J Clin Nutr**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1956. VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, p. 1236–1243, 2005.

WADDINGTON, C.H. The epigenotype. **Endeavour**, v. 1, p.18-20, 1942.

WANG, Y. et al. Both the anti-and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover cell turnover and intestinal homeostasis. **Nature Publishing Group**, n. outubro, p. 1-10, 2016.

WAJCHENBERG, B.E. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine rev.**, v.21, p.697-738, 2000.

WATERLAND, R. A.; GARZA C. Potencial mechanisms of metabolic *imprinting* that lead to chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.2, p.179-197, 1999.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, v.20, p.63–68, 2004.

WILLIAMS, J. M. et al. mouse of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccheride, **Dis Model Mech**, v. 6, n. 6, p.1388-1399, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight** [internet]. 2017 out [acesso em 01 maio 2018]. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

YANG, X.; SMITH, U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1127-1139, 2007.

YUDKIN, J.S. et al. C Reactive Protein in Healthy subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction A Potential Role for Cytokines Originating from Adipose Tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, p. 972-978, 1999.