
**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA, HISTOLÓGICA
E MORFOMÉTRICA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**

Eliane Basques Moura

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

Eliane Basques Moura

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA, HISTOLÓGICA
E MORFOMÉTRICA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde - Saúde da Criança
e do Adolescente da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Minas Gerais sob a orientação da Prof^a.
Dr^a. Ana Cristina Simões e Silva.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA, HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**

Eliane Basques Moura

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Mestre.

Orientadora: Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Professora Titular do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitor: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação:

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Benigna M. de Oliveira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE –
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE**

Coordenadora: Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Sub-coordenador: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE
DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Cassio da Cunha Ibiapina

Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Prof. Francisco José Penna

Prof^a. Ivani Novato Silva

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof. Marcos José Burle de Aguiara

Prof^a. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Representante discente: Maria de Lourdes Melo Baeta

**Ao meu marido Eduardo pela segurança e amor dedicados a
mim em todas as horas.
A Deus, presente em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Ana Cristina Simões e Silva, inspiração para esta tarefa e pela compreensão nos momentos difíceis, sem a qual isso não seria possível.

À Prof^a. Dra. Lúcia pela ajuda na jornada.

Aos meus familiares por compreenderem meus momentos de ausência.

Aos meus alunos William e Lucas pela ajuda sempre tão necessária, compartilhando e ajudando sempre que possível.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, o meu carinho.

**“Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que
faço, não do tamanho que as pessoas me enxergam”**

Carlos Drumond de Andrade

NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da presente dissertação foi organizada sob a forma de artigos científicos, de acordo com a resolução 03/2010, aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, disponível em http://www.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/arquivos/2010/Resolucao03-2010.pdf.

O primeiro artigo consiste em uma revisão da literatura sobre os modelos experimentais de obesidade mais utilizados, suas vantagens e limitações. O segundo artigo mostra a avaliação fenotípica, histológica e morfométrica de animais submetidos à dieta com alto teor de gordura.

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção, conforme as normas de Vancouver (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication - www.ICMJE.org).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DIO- obeso dieta induzida

DR- Dieta resistente

DP – Desvio padrão

FTO – *fat mass and obesity-associated*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC- Índice de massa corporal

KK- Camundongo Kuo Kondo

LOB- Late onset obesity rat

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

NZO – Camundongo obeso da nova Zelândia

PAI-1 - inibidor da ativação do plasminogênio

QLT – *quantitative trait loci*

TSOD - Camundongo Tsumura Suzuki obeso diabético

TSNO - Camundongo Tsumura Suzuki não obeso

SCV - sistema cardiovascular

SNC - sistema nervoso central

SNPs-single nucleotide polymorphisms

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

2. REVISÃO DA LITERATURA 12

2.1. RESUMO	22
2.2. MODELOS DE OBESIDADE EXPERIMENTAL	23
2.3. OBESIDADE INDUZIDA POR ALTERAÇÕES GENÉTICAS	23
2.3.1 OBESIDADE INDUZIDA POR MUTAÇÃO GENÉTICA ESPONTÂNEA	23
2.3.2 OBESIDADE DECORRENTE DE MUTAÇÃO GENÉTICA INDUZIDA ARTIFICIALMENTE	25
2.3.3 MODELOS TRANSGÊNICOS	25
2.3.4 MODELOS POLIGÊNICOS	27
2.4. OBESIDADE INDUZIDA POR ALTERAÇÃO AMBIENTAL	30
2.4.1 EXPOSIÇÃO A DIETA PALATÁVEL COM ALTO TEOR DE GORDURA	30
2.4.2 TRATAMENTO DIETÉTICO DA OBESIDADE POR RESTRIÇÃO CALÓRICA	33
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34

3. OBJETIVOS 38

4. METODOLOGIA

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.9

4.1. ANIMAIS	39
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	39
4.3. PREPARO DA DIETA DE ALTO TEOR DE GORDURA	40
4.4. ACOMPANHAMENTO DO GANHO PONDERAL	40
4.5. RETIRADA DOS ÓRGÃOS	41
4.6. HISTOLOGIA	CONVENCIONAL
ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
4.7. MORFOMETRIA	42
4.8. DOSAGENS BIOQUÍMICAS	43
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46

5.1. INTRODUÇÃO	47
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	49
5.2.1. ANIMAIS	49
5.2.2. EUTANÁSIA E RETIRADA DE ÓRGÃOS	50

	11
5.2.3. COLETA DE AMOSTRAS SANGUINEAS	51
5.2.4. HISTOLOGIA E MORFOMETRIA	51
5.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.3. RESULTADOS	52
5.4. DISCUSSÃO	62
5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6. ANEXO 1- PARECER DO CETEA	75

1- INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser conceituada como um acúmulo corporal de tecido adiposo, que determina aumento do índice de massa corporal (IMC) acima de parâmetros de referência para sexo e faixa etária. A prevalência mundial da obesidade mais que dobrou desde 1980. Em 2008, sobrepeso e obesidade foram detectados em 1,5 bilhões de adultos com 20 anos ou mais. Destes, 200 milhões de homens e, aproximadamente, 300 milhões de mulheres apresentavam obesidade. Em torno de 65% da população mundial vive em países aonde a obesidade mata mais do que a desnutrição. Aproximadamente 43 milhões de crianças abaixo de 5 anos apresentam sobrepeso(1).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2002-2003 detectaram um aumento considerável na proporção dos adolescentes brasileiros com excesso de peso (2). Enquanto, em 1974-1975 3,9% dos meninos e 7,5% das meninas entre 10 e 19 anos estavam acima do peso; em 2002-2003, os percentuais de excesso de peso aumentaram, respectivamente, para 18,0% e 15,4% (2). Um estudo realizado na cidade de Santos (São Paulo) observou que, em 10.822 crianças de 7 a 10 anos, as prevalências totais de sobrepeso e obesidade foram, respectivamente, de 15,7% e 18% (3). Em escolas privadas, a taxa de excesso de peso chegava a 50%, determinando a adoção de medidas de prevenção e intervencionismo (3). Em síntese, esses dados estatísticos mostram que a obesidade é um importante problema de saúde pública não só para a população adulta, mas também para a população infantil de nosso país. Dessa forma, estudos que abordem este tema apresentam um significativo impacto em nosso meio.

É amplamente conhecido que a obesidade primária é resultante do balanço positivo entre a quantidade de calorias ingeridas subtraída das calorias gastas, sendo o excesso de energia estocado em células gordurosas no tecido adiposo(4). O entendimento dos fatores que regulam o balanço entre a ingesta e o gasto é determinante para o desenvolvimento de tratamentos para obesidade, bem como mudanças em hábitos de vida e ambientais. Vale ressaltar que muitos dos avanços resultantes no entendimento atual da fisiopatologia da obesidade foram obtidos a partir de estudos utilizando animais de experimentação (5).

Houve grandes avanços na compreensão da patogênese da obesidade nos últimos 15 anos (4,5). Dentre eles, destaca-se a descoberta de uma citocina derivada do adipócito, chamada leptina e seu receptor, ambos descobertos através de uma mutação genética produzida em camundongo (ob/ob e db/db) (6). Desde 1994, ano da descoberta da leptina, o tecido adiposo deixou de ser considerado apenas como um reservatório passivo de energia, passando então a assumir o papel de órgão endócrino (6). Além da secreção de ácidos graxos livres, o tecido adiposo expressa e secreta vários peptídeos bioativos, as chamadas adipocinas, atuantes tanto em nível local (ação parácrina/autócrina) quanto sistêmico (ação endócrina) (7). Tais substâncias desempenham diversas funções metabólicas, como a regulação do acúmulo e gasto energético, a regulação do metabolismo de glicose, lípides, além de efeitos imunológicos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios (7-8). O tecido adiposo contém ainda uma complexa maquinaria metabólica, capaz de interagir com diversos órgãos e sistemas à distância, tais como o sistema nervoso central (SNC), o sistema cardiovascular (SCV) e os rins (7, 9).

O metabolismo de esteróides sexuais e de glicocorticóides tem sido implicado como um determinante da distribuição de gordura corporal e do risco cardiovascular. Nos últimos anos, outras substâncias, como as citocinas pró-inflamatórias, os fatores do complemento e componentes da cascata da coagulação e fibrinólise, têm ganhado destaque como participantes desse contexto, mediando complicações metabólicas e cardiovasculares associados à obesidade (7, 9-10). Estudos em crianças mostram que níveis elevados de PAI-1 (inibidor da ativação do plasminogênio) é um sinalizador precoce de eventos cardíacos futuros(11).

Dietas hipercalóricas, ricas em lípidos e em açúcares são frequentemente usadas em modelos experimentais para induzir distúrbios nutricionais e metabólicos, que são comumente encontrados em humanos (3). Vários estudos em animais tem demonstrado que os grupos alimentados com dieta hipercalórica apresentam uma eficiência dietética maior que o grupo que se alimenta com dieta padrão, ingerindo uma maior quantidade de dieta. Os animais chamados de obesos susceptíveis são aqueles que apresentam hiperfagia com resistência à ação central da insulina e da leptina, contribuindo assim para o desenvolvimento da obesidade(12).

E de grande importância o uso de modelos animais para entender a regulação da ingestão alimentar, do balanço energético e os efeitos de mudanças ambientais sobre tais mecanismos (13). A principal mudança ambiental estudada consiste na variação da composição da dieta e seus efeitos sobre a ingestão alimentar e o ganho de peso. Estudos com linhagens de camundongos como o C57BL/6 e o DAB/2J mostram que estes animais apresentam maior susceptibilidade ao ganho de peso com dietas de alto teor de

gordura ao passo que outras linhagens, como os camundongos A/J, são resistentes à indução de obesidade por acréscimo de gordura à dieta (13).

Por exemplo, camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gorduras desenvolvem obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia e esteatose hepática avançada, mimetizando a síndrome metabólica humana(14). Os modelos experimentais de obesidade induzida por modificações na composição dietética são os que mais se assemelham à obesidade primária humana de origem exógena, ou seja, resultante do excesso de consumo de alimentos com alto teor calórico (15). Esses modelos de obesidade exógena diferem da obesidade experimental de origem genética que pode ser observada em animais como o rato obeso Zucker, camundongos ob/ob ou db/db (15).

Há evidências de que a leptina, que é a principal adipocina responsável pela regulação do equilíbrio entre ingesta e o gasto energético, possa também influenciar na função cardíaca. Dessa forma, quando a produção de leptina aumenta de forma excessiva pode ocorrer obesidade associada a defeitos na morfometria e na função cardíaca. Além disso, tem sido detectado aumento dos níveis circulantes de leptina em pacientes com doenças cardiovasculares, corroborando a hipótese de que a leptina possa contribuir para a hipertrofia cardíaca e a aterosclerose. (16-17).

É importante ressaltar ainda que a hipertrofia cardíaca seja fator preditivo para mortalidade e morbidade cardiovascular. Além disso, a medida do tamanho dos cardiomiócitos distingue se a hipertrofia cardíaca é benigna ou patológica(18). A morfometria é utilizada, nestes casos, por fornecer uma medida quantitativa,

transformando imagens digitalizadas de tecido em um parâmetro numérico objetivo. Dessa forma, os resultados obtidos por meio de morfometria dos cardiomiócitos apresentam boa reprodutibilidade em estudos experimentais (19).

A obesidade está fortemente associada à esteatose hepática em humanos, porém ainda não está bem esclarecido qual o papel da ingestão excessiva de gordura na etiopatogênese desta alteração hepática. Estudar a influência de diferentes tipos de dieta no surgimento de obesidade associada ou não à esteatose hepática é muito difícil em seres humanos. De forma geral, é impossível separar a influência de fatores genéticos e ambientais responsáveis pelo surgimento de esteatose hepática em pacientes obesos. Por outro lado, estudos experimentais que induzem obesidade por modificações dietéticas podem auxiliar na compreensão do papel destas dietas na etiopatogênese da esteatose hepática associada à obesidade(20). Nesse contexto, foram observadas significativas alterações no fígado de camundongos C57BL/6 obesos machos, tais como infiltração mononuclear, necrose de hepatócitos, hiperplasia biliar epitelial e deposição de colágeno nos hepatócitos. Estas alterações inflamatórias coexistem com vacuolização microvesicular dos hepatócitos, caracterizando um quadro histopatológico de esteatohepatite(21).

Embora a associação entre obesidade e doença renal tenha sido previamente estabelecida, os mecanismos patogênicos envolvidos ainda não foram esclarecidos(22). A obesidade está associada a várias alterações funcionais e estruturais do rim que se assemelham àquelas encontradas na nefropatia diabética. Em fases precoces da instalação de obesidade, estudos experimentais têm mostrado hiperfiltração e hipertrofia glomerular associadas a

espessamento da membrana basal, expansão da matriz mesangial e alargamento da cápsula de Bowman. Estas alterações precoces podem ser consideradas precursoras de lesões mais significativas, como a glomeruloesclerose focal, que têm sido observadas na obesidade de duração mais prolongada (22). Nesse sentido, a avaliação da morfometria do tecido renal pode ser útil para a detecção precoce de hipertrofia glomerular em animais obesos, pois fornece medidas numéricas do diâmetro dos glomérulos renais (19). Acredita-se que um dos fatores responsáveis pela hipertrofia renal seja a hiperinsulinemia. Estudos em camundongos mostram que a hiperinsulinemia leva à hipertrofia de vários tecidos, como o tecido renal, através de estímulo à proliferação de células renais e por meio de liberação de fatores de crescimento e aumento da expressão dos receptores para os fatores crescimento (23).

Dentro desse contexto, o presente estudo teve como escopo avaliar as alterações fenotípicas, histológicas e morfométricas em camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura. Os achados foram comparados com camundongos de mesma linhagem recebendo dieta convencional, analisando-se o ganho ponderal, a ingesta alimentar, a presença de gordura intra-abdominal, as alterações histológicas e morfométricas nos tecidos cardíaco, renal e hepático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneve: World Health Organization. [Technical Report Series]. 2008;894.
2. IBGE. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. 2006.
3. Costa RF, Cintra Ide P, Fisberg M. [Prevalence of overweight and obesity in school children of Santos city, Brazil]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006 Feb;50(1):60-7.
4. Mantovani; RM, Viana; MFS, Cunha; SB, Moura; LCR, Oliveira; JM, Carvalho; FF, et al. Obesidade na infância e na adolescência. Revista Médica de Minas Gerais. 2008;18(4-S1).
5. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The contribution of animal models to the study of obesity. Lab Anim. 2008 Oct;42(4):413-32.
6. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
7. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2548-56.
8. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb;24(2):e13-8.
9. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2000 Oct;11(8):327-32.

10. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jun;280(6):E827-47.
11. Mantovani RM, Rios DRA, Moura LCR, Oliveira JM, Carvalho FF, Cunha SB, et al. Childhood obesity: evidence of an association between plasminogen activator inhibitor-1 levels and visceral adiposity. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* [doi: 10.1515/JPEM.2011.015]. 2011 2011/06/01;24(5-6):361-7.
12. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010 Jul;16(7):BR208-17.
13. Casper RC, Sullivan EL, Tecott L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Aug;199(3):313-29.
14. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.
15. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Aug;15(8):1996-2005.
16. Ren J, Dong F, Cai GJ, Zhao P, Nunn JM, Wold LE, et al. Interaction between age and obesity on cardiomyocyte contractile function: role of leptin and stress signaling. *PLoS One.* 2010;5(4):e10085.

17. Iacobellis G, Sharma AM. Obesity and the heart: redefinition of the relationship. *Obes Rev.* 2007 Jan;8(1):35-9.
18. Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice. *Physiol Genomics.* 2007 Oct 22;31(2):176-82.
19. Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol.* 2010;611:211-25.
20. Bhathena J, Kulamarva A, Martoni C, Malgorzata A, Malhotra UM, Paul A, et al. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011;4:195-203.
21. Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, et al. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine.* 2009 Oct;36(2):311-25.
22. do Carmo JM, Tallam LS, Roberts JV, Brandon EL, Biglane J, da Silva AA, et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Sep;297(3):R803-12.
23. Corpeleijn E, Bakker SJ, Stolk RP. Obesity and impaired renal function: potential for lifestyle intervention? *Eur J Epidemiol.* 2009;24(6):275-80.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Modelos experimentais de obesidade: Artigo de revisão

Eliane Basques Moura¹, Ana Cristina Simões e Silva¹

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA , HOSPITAL DAS CLÍNICAS,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, BELO
HORIZONTE, MG, BRASIL**

**PALAVRAS CHAVE: OBESIDADE, MODELOS ANIMAIS, DIETA DE
ALTO TEOR DE GORDURA, C57BL/6**

Correspondência: **Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD**
Avenida Bernardo Monteiro 1300 / 1104
Belo Horizonte - Minas Gerais
CEP: 30150-281
E - mail: acssilva@hotmail.com

2.1 Resumo

A obesidade resulta de alteração prolongada no balanço entre a energia ingerida e a energia gasta. Um grande número de modelos animais tem contribuído para o entendimento da obesidade. Fatores genéticos e ambientais têm sido modificados a fim de promover ganho excessivo de peso e aumento do conteúdo de gordura intra-abdominal nos animais de experimentação, procurando mimetizar a obesidade humana. Em linhas gerais, os modelos experimentais de obesidade utilizam diferentes linhagens de roedores e podem ser obtidos por meio de alterações genéticas tais como mutações simples, supressão ou aumento da expressão de diferentes genes. Outra estratégia muito utilizada consiste na modificação de fatores ambientais, destacando-se o emprego de dietas com alto teor calórico e lipídico. Este artigo de revisão descreve sucintamente os modelos animais que têm sido mais utilizados para o estudo da obesidade e os principais resultados obtidos a partir desses modelos.

Palavras-chave: obesidade, modelos animais, dieta com alto teor de gordura

2.2 Modelos experimentais de obesidade

A obesidade resulta de um balanço energético positivo entre energia ingerida e energia gasta. Até o presente momento, ainda não foram estabelecidos parâmetros antropométricos muito precisos para a definição de obesidade em animais de experimentação. Dessa forma, o conceito de obesidade em modelos animais tem-se baseado no ganho excessivo de peso corporal, no cálculo do denominado índice de obesidade de *Lee* ou na verificação de aumento significativo do conteúdo de gordura corporal(1)

Modelos animais têm exercido um papel fundamental para a compreensão das bases fisiológicas do consumo alimentar, do gasto energético e das respostas comportamentais frente a determinados tipos de alimentos (1-2). Os modelos animais contribuem também para a avaliação de distúrbios alimentares de diferentes etiologias, do papel epigenético das alterações ambientais e permitem que sejam testados vários agentes farmacológicos para o tratamento da obesidade(3).

A obesidade tem sido produzida experimentalmente por meio de alterações genéticas e ambientais realizadas em diversas linhagens de roedores. Este artigo de revisão tem como objetivo descrever sucintamente os modelos animais que têm sido mais utilizados para o estudo da obesidade e os principais resultados obtidos a partir desses modelos.

2.3 – Obesidades induzida por alterações genéticas

2.3.1 Obesidade induzida por mutação genética espontânea

O camundongo denominado de *ob/ob* é um exemplo clássico de mutação espontânea de um gene que produz perda de função. O

camundongo obeso (*ob/ob*) apresenta uma mutação autossômica recessiva, descrita há várias décadas, que provoca obesidade maciça(4-5). Em 1978, Coleman descreveu uma nova mutação recessiva levando a obesidade em murinos - o camundongo diabético (*db/db*). Ambas as linhagens, *ob/ob* e *db/db*, apresentam fenótipos idênticos, com peso corporal 3 vezes maior e gordura corporal 5 vezes maior do que camundongos normais (5-6). Coleman postulava que o gene *ob* codificaria ou seria responsável pela geração de um fator circulante que regularia o balanço energético, enquanto o gene *db* seria responsável pela codificação do receptor para este fator circulante(6). A clonagem e a caracterização do gene *ob* mostrou que o fator circulante codificado por esse gene é um hormônio peptídico denominado leptina (do grego *leptos*, magro), que atua no controle do apetite e é expressa no tecido adiposo e, em níveis menores, na placenta e no epitélio gástrico (5, 7) A leptina é um hormônio que age no Sistema Nervoso Central, em particular no hipotálamo, inibindo o consumo alimentar em longo prazo e estimulando o gasto energético(7). Duas mutações diferentes foram descritas nos camundongos *ob/ob*, uma na qual a transcrição gênica está ausente e, conseqüentemente, não ocorre síntese de leptina, enquanto que a outra resulta na produção de uma proteína truncada e inativa. Dessa forma, os animais que não sintetizam a leptina ou produzem forma inativa da proteína apresentam hiperfagia por descontrole do mecanismo de saciedade com conseqüente ganho excessivo de peso (3,4). Ressalta-se que se transcorreram aproximadamente 50 anos entre a descoberta do fenótipo desses animais e sua caracterização genética e fisiológica (1, 4).

2.3.2 Obesidade decorrente de mutação genética induzida artificialmente

Tem havido uma tendência em acelerar o processo de perda de função de determinado gene de forma artificial. Tais mutações genéticas podem ser obtidas administrando-se aos animais mutagênicos químicos ou expondo-os à radiação. O maior problema desta abordagem é o custo para a produção dos fenótipos desejados. Considerando-se que um roedor possui de 30.000 a 40.000 genes e que a mutação é efetivamente induzida em 3 a 5% dos casos, torna-se necessário aproximadamente um milhão de animais para a obtenção do fenótipo de interesse (4)

2.3.3 Modelos transgênicos de obesidade

Desde a caracterização dos primeiros genes relacionados à obesidade, têm sido desenvolvidos inúmeros modelos transgênicos que apresentam fenótipos variados, desde obesidade acentuada até desnutrição. A super-expressão do gene alvo foi a primeira abordagem técnica largamente utilizada para desenvolvimento destes modelos(3, 5)

Em 2005, o mapeamento de genes relacionados à obesidade humana mostrou que 248 genes poderiam ser expressos como transgenes em animais de experimentação, resultando em fenótipos com alterações do peso corporal e da adiposidade (4).

A habilidade de introduzir ou eliminar genes das células germinativas de animais, sobretudo de camundongos, tem facilitado o desenvolvimento de modelos genéticos complexos. Por exemplo, a ausência da forma ativa do receptor da leptina (Ob-Rb) no camundongo *db/db* resulta em obesidade e diabetes (5, 8). Por outro

lado, os modelos transgênicos mais reprodutíveis são obtidos por meio de deleção genética (*knockout*). Nesses modelos é realizada a ablação do gene alvo em todos os tecidos. O problema com os *knockouts* convencionais é o potencial de morte embriônica que a manipulação transgênica pode gerar. Na maioria das vezes, esta manipulação genética produz mudanças compensatórias durante o período de desenvolvimento dos animais (1, 4).

Os estudos em animais geneticamente modificados não só contribuem para o entendimento dos processos fisiológicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético, mas também para a compreensão da fisiopatologia das co-morbidades associadas à obesidade, tais como o diabetes mellitus tipo 2 e a síndrome metabólica. Nesse sentido, Bains e colaboradores descreveram uma linhagem de ratos transgênicos que foi obtida a partir de modificações genéticas no *locus* da vasopressina. Os animais transgênicos apresentavam obesidade de início tardio (*late onset obesity rat –LOB*) e eram capazes de acumular seletivamente gordura visceral na ausência de resistência insulínica (9).

Em 2007, foi identificada uma associação entre polimorfismos de um único nucleotídeo (*SNPs-single nucleotide polymorphisms*) no gene associado à massa de tecido adiposo e à obesidade, denominado *FTO (fat mass and obesity-associated)*(3) O gene *FTO* está localizado no cromossomo 16q12.2, possui 9 exons e é expresso no tecido adiposo, nas células pancreáticas e, principalmente no hipotálamo, sugerindo sua participação no controle da ingestão alimentar e do metabolismo corporal (3). A variante rs9939609 (T>A) do *FTO* é a mais estudada, e tem forte associação com o IMC, a relação cintura/quadril e o peso em caucasianos (3). Estudos em animais de experimentação mostraram que o RNA

mensageiro (RNAm) para o gene FTO apresenta alta expressão no cérebro e no hipotálamo. Durante o jejum os animais apresentam uma redução da expressão do RNAm para o gene FTO no hipotálamo, independente dos níveis de leptina (4)

Em síntese, estudos das alterações genéticas relacionadas à obesidade tem-se mostrado muito úteis para a compreensão dos mecanismos fisiológicos que regulam o balanço energético bem como para identificação de moléculas alvo de futuras intervenções terapêuticas(1, 4)

2.3.4 Modelos poligênicos

A obesidade pode ser considerada uma doença poligênica, resultante da combinação de vários genes. Nesse contexto, várias pesquisas têm focado nas bases poligênicas da obesidade e muitas delas têm usado modelos animais. Embora um determinado fenótipo do animal seja facilmente detectável ou quantitativamente mensurável, a identificação dos genes subjacentes a este traço ou característica é um processo laborioso. Apesar disso, a possibilidade de detectar características relacionadas a diferentes regiões do genoma é bem maior em modelos animais do que em seres humanos, principalmente devido ao tamanho da prole, o que facilita a estruturação do *pedigree*. A maior parte das pesquisas que avaliou as diferentes regiões do genoma responsáveis pelo fenótipo de obesidade utilizou a técnica de mapeamento dos *loci* genéticos relacionados aos traços quantitativos (*quantitative trait loci* - QTLs). Mais de 200 QLTs já foram localizados em diferentes regiões de um único gene de ratos (1, 4)

Ressalta-se ainda que, em alguns casos, estes modelos poligênicos requerem intervenções ambientais para o

desenvolvimento de obesidade, como a administração de dieta rica em gordura. Além disso, algumas linhagens de camundongos têm-se mostrado resistentes ao desenvolvimento de obesidade, independente de serem submetidas a dietas ricas ou pobres em gorduras. Por outro lado, outras linhagens desenvolvem obesidade facilmente quando submetidas à dieta rica em lipídios como é o caso de camundongos C57BL/6 (1-2, 4, 10-11)

2.3.4.1 Camundongo obeso da Nova Zelândia (NZO)

É um modelo poligênico que exhibe diabetes tipo 2 somente em machos. Este camundongo aumenta seu peso rapidamente nos dois primeiros meses de vida devido à hiperfagia. A obesidade do NZO é similar ao que se observa em seres humanos, pois está relacionada à hiperfagia, redução de gasto energético por insuficiência de atividade física (8).

2.3.4.2 Camundongo obeso diabético Tsumura Suzuki (TSOD)

A linhagem TSOD desenvolve obesidade associada ao diabetes, ao passo que a linhagem Tsumura Suzuki de camundongos não obesos (TSNO) apresenta hiperglicemia não acompanhada de aumento do peso corporal. Os camundongos TSOD podem desenvolver nefropatia e neuropatia em idades mais avançadas (8).

2.3.4.3 Camundongo M16

Neste tipo de camundongo ocorre aumento do peso corporal e da quantidade de gordura corporal. Machos e fêmeas desta

linhagem apresentam hiperfagia, mas somente os machos desenvolvem hiperglicemia (8).

2.3.4.4 Camundongo Kuo Kondo (KK)

Este é um modelo de diabetes tipo 2. O camundongo KK exibe hiperfagia, hiperinsulinemia e resistência à insulina com obesidade moderada aos 2 meses de idade. A resistência à insulina precede o surgimento da obesidade (8).

2.3.4.5 Rato obeso Zucker

Em 1961, L.M. Zucker descreveu uma mutação no gene *fatty* do cromossomo 5 (12). Estes ratos exibem obesidade precoce, com 5 semanas de vida. Ocorre acúmulo de gordura subcutânea e resistência à insulina, apesar de apresentarem níveis normais de glicose sanguínea. Quando esses ratos atingem 14 semanas de vida, verifica-se que o percentual de gordura corresponde a 40% do peso corporal (8, 13-14).

2.3.4.6 Rato Otsuka Long Evans Tokushima obeso (OLETF)

Estes ratos são hiperfágicos, o que determina aumento progressivo do peso corporal e estabelecimento de obesidade após as primeiras semanas de vida. Com 8 semanas podem apresentar hiperinsulinemia e com 12 semanas resistência à insulina. Em torno de 25 semanas, todos os machos e aproximadamente 30% das fêmeas desenvolvem diabetes, detectada por meio do teste de tolerância oral à glicose (8).

2.4 Obesidade induzida por alterações ambientais

2.4.1 Exposição à dieta palatável com alto teor de gordura

Em roedores, muitos estudos têm avaliado a resposta destes animais quando expostos a dietas de alto teor de gordura (2). Dois tipos de resposta têm sido observados – alguns animais mostram profundo aumento de sua gordura corporal (como por exemplo, camundongos da linhagem C57BL/6), sendo coletivamente denominados de “obesos sensíveis” ou obesos induzidos por dieta (*diet-induced obese-DIO*). Por outro lado, alguns roedores chamados de resistentes à dieta (DR) resistem ao ganho de peso quando exposto à dieta de alto teor de gordura (1-2, 4). Muitos estudos têm usado a obesidade induzida por dieta para avaliar a ingestão alimentar quando a dieta apresenta alto teor de gordura. Em resumo, nos modelos de obesidade dieta–induzida, os animais são classificados em obesos sensíveis ou resistentes ao ganho de peso, ao aumento da adiposidade corporal e à elevação dos níveis de catecolaminas na urina (2).

A tabela 1 mostra estudos experimentais que induziram obesidade por meio de modificações no teor de gordura da dieta.

Tabela 1 – Estudos experimentais de obesidade induzida por modificações no teor de gordura da dieta

Autor (ref.)	Animal	Teor de gordura da dieta	Objetivo
<i>Madarim & Lacerda (15)</i>	Ratos Wistar machos	30%	Avaliar hipertensão e remodelamento cardíaco
<i>Nishikawa et al.(16)</i>	Camundongos C57BL/6 e BALB	32%	Influência de sexo e idade no aparecimento de obesidade

<i>Buisson et al. (17)</i>	Ratas Wistar fêmeas	35%	Avaliar os efeitos da leptina
<i>Tulipano et al(18)</i>	Ratos Sprague-Dawley machos	20%	Avaliar os efeitos da leptina
<i>Lijnen et al. (19)</i>	Camundongos C57BL/6 machos	42%	Bloquear o receptor do VIP e avaliar efeitos na adiposidade
<i>Brake et al. (20)</i>	Camundongos C57BL/6 machos	21%	Avaliar efeitos da obesidade na resposta inflamatória
<i>Bhathena et al.(21)</i>	F1B Golden Syrian Hamster	6%	Desenvolver modelo de esteatose hepática
<i>Fraulob et al. (22)</i>	Camundongos C57BL/6 machos	60%	Desenvolver modelo de síndrome metabólica
<i>Gallou-Kabani et al. (23)</i>	Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas	60%	Desenvolver modelo de síndrome metabólica
<i>Souza-Mello et al. (11)</i>	Camundongos C57BL/6 machos	60%	Avaliar tratamentos para a resistência insulínica

VIP- Peptídeo intestinal vasoativo

A maior diferença entre os modelos experimentais de obesidade induzida por dieta e o que ocorre em seres humanos se deve aos aspectos comportamentais. Em seres humanos, o desenvolvimento de obesidade pode não diretamente estar relacionado à maior susceptibilidade ao ganho de peso quando expostos a uma dieta com alto teor de gordura, mas pode ocorrer devido à preferência individual por dietas com alto teor de gordura (2). Poucos estudos têm explorado os aspectos comportamentais relacionados à preferência por determinadas dietas em modelos animais(2) Nesse

sentido, alguns estudos têm mostrado que neuropeptídeos cerebrais participam da escolha dos macro-nutrientes, enquanto outros têm detectado que variações em receptores do paladar podem influenciar na preferência por determinado tipo de dieta (24).

Em geral, dietas que apresentam 30% ou mais de calorias sob a forma de gordura são consideradas potencialmente capazes de induzir obesidade. Por outro lado, alguns estudos têm mostrado que dietas com percentuais menores de gordura também podem induzir obesidade em animais de experimentação (11, 15-23). Observou-se que quando o aumento de gordura está associado ao maior teor de proteína na dieta, a obesidade pode não se desenvolver. Tal achado pode ser atribuído ao fato de que altos níveis de proteína na dieta estimulam a produção de colecistocinina e reduzem os níveis de grelina no plasma, levando a uma redução no esvaziamento gástrico, além de aumentar a sensibilidade do sistema nervoso central à leptina. Os altos níveis de proteína na dieta também diminuem a ação da enzima que faz a síntese de ácidos graxos, reduzindo, portanto, a lipogênese hepática(2).

A predisposição genética à obesidade também pode ser avaliada por meio destes modelos (25). Em algumas linhagens de ratos e camundongos é possível a identificação de animais resistentes e sensíveis ao desenvolvimento de obesidade através da exposição a uma dieta com alto teor de gordura *ad libitum*. Dentre essas linhagens podem ser mencionados ratos Sprague-Dawley, ratos Wistar e camundongos C57BL/6.(4)

Modelos animais de obesidade induzida por dieta têm auxiliado na compreensão da etiopatogênese da própria obesidade e de condições a ela associadas tais como resistência à insulina, esteatose hepática e dislipidemia. (21)

2.4.2 Tratamento dietético da obesidade pela restrição calórica

Embora a restrição calórica seja o tratamento mais frequentemente prescrito para obesidade, seu sucesso tem-se mostrado muito limitado. Para ser efetiva, a restrição da ingestão alimentar deve ser mantida indefinidamente; o que é frequentemente impossível de ser alcançado. Além disso, no período de restrição, há um ajuste em outros componentes do metabolismo energético, que pode comprometer ainda mais a capacidade de perda de peso. Os animais de experimentação são muito úteis para avaliação dos efeitos da restrição calórica, porque seu gasto energético é facilmente monitorado (2).

2.5 Considerações Finais

Existem inúmeros modelos animais para o estudo da obesidade com diferentes características. No entanto, todos têm em comum o fato de estarem proporcionando maior compreensão da etiopatogênese da obesidade e de suas co-morbidades, além de permitirem avaliação dos efeitos de diferentes intervenções terapêuticas. Atualmente, os modelos experimentais que se baseiam na exposição às dietas com alto teor de gordura têm sido cada vez mais utilizados por desencadearem obesidade de forma semelhante ao que ocorre em seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obes Rev.* 2007 Mar;8 Suppl 1:55-61.
2. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010 Dec;23(2):270-99.
3. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet.* 2010 Jun;26(6):266-74.
4. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim.* 2008 Oct;42(4):413-32.
5. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
6. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia.* 1978 Mar;14(3):141-8.
7. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
8. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:197636.
9. Bains RK, Wells SE, Flavell DM, Fairhall KM, Strom M, Le Tissier P, et al. Visceral obesity without insulin resistance in late-onset obesity rats. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2666-79.
10. Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, et al. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia,

hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine*. 2009 Oct;36(2):311-25.

11. Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Sep;119(6):239-50.
12. ZUCKER LM, ZUCKER TF. FATTY, A NEW MUTATION IN THE RAT. *Journal of Heredity*. 1961 November 1, 1961;52(6):275-8.
13. Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2009 Nov;102(9):1246-53.
14. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1784-9.
15. Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 Jun;17(5):365-75.
16. Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim*. 2007 Jul;56(4):263-72.
17. Buisson A, Pellizzon M, Ordiz F, Jr., Jen KL. Augmenting leptin circadian rhythm following a weight reduction in diet-induced obese rats: short- and long-term effects. *Metabolism*. 2004 Jun;53(6):782-9.
18. Tulipano G, Vergoni AV, Soldi D, Muller EE, Cocchi D. Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine

effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol.* 2004 Nov;183(2):289-98.

19. Lijnen HR, Freson K, Hoylaerts MF. Effect of VPAC1 Blockade on Adipose Tissue Formation and Composition in Mouse Models of Nutritionally Induced Obesity. *J Obes.* 2010;2010.

20. Brake DK, Smith EO, Mersmann H, Smith CW, Robker RL. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Dec;291(6):C1232-9.

21. Bhathena J, Kulamarva A, Martoni C, Malgorzata A, Malhotra UM, Paul A, et al. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011;4:195-203.

22. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.

23. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Aug;15(8):1996-2005.

24. Casper RC, Sullivan EL, Tecott L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Aug;199(3):313-29.

25. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010 Jul;16(7):BR208-17.

3-OBJETIVOS

O objetivo principal foi avaliar as alterações fenotípicas, morfométricas e morfológicas em animais submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura.

3.1 Objetivos específicos

- Comparar o ganho de peso de animais submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura com animais de mesma linhagem que receberam dieta convencional pelo mesmo período (grupo controle);
- Comparar a gordura peritoneal e o peso dos órgãos (coração, fígado e rins) de animais submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura com animais de mesma linhagem que receberam dieta convencional pelo mesmo período (grupo controle);
- Comparar os níveis circulantes de creatinina, colesterol e triglicérides de animais submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura com animais de mesma linhagem que receberam dieta convencional pelo mesmo período (grupo controle);
- Comparar a avaliação histológica dos tecidos renal, cardíaco e hepático e a análise morfométrica dos cardiomiócitos e dos glomérulos renais de animais submetidos à ingestão prolongada de dieta com alto teor de gordura com animais de mesma linhagem que receberam dieta convencional pelo mesmo período (grupo controle).

4-Metodologia

4.1 Animais

Foram utilizados para o estudo camundongos, machos, adultos jovens, da linhagem C57BL, com peso variando entre 20 a 25g, oriundos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB da UFMG. Todos os procedimentos seguiram Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Protocolo experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por um período de sete dias para aclimação. Durante a fase de aclimação, foi oferecida dieta comercial e água "*ad libitum*". Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e controle de temperatura e umidade, entre 22-24°C. Após este período de aclimação os animais foram randomizados em dois grupos: animais que receberam dieta convencional (grupo controle, n=10) e animais que receberam dieta rica em gordura (grupo obeso, n=20). No grupo obeso, foi incluído um maior número de animais devido à possibilidade de alguns animais desta linhagem apresentarem resistência ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta (obesos resistentes) (1-2). A dieta rica em gordura foi preparada a partir do acréscimo de gordura vegetal hidrogenada à dieta comercial que originalmente apresenta em sua composição 6% de gordura (Nuvital®). A dieta modificada passou a apresentar teor de gordura de 30%. Os animais do grupo controle receberam a dieta padrão (Nuvital®).

4.3 Preparo da dieta de alto teor de gordura

A dieta de alto teor de gordura foi preparada pelos pesquisadores envolvidos no projeto e fornecida aos animais sob a forma peletizada, conforme previamente descrito na literatura(1) A dieta padrão foi adquirida na forma farelada a fim de facilitar o preparo. A essa dieta farelada era acrescida gordura vegetal hidrogenada da marca Saúde®, que era processada em batedeira culinária. Para que a dieta fosse palatável ao animal acrescentou-se a essa mistura leite condensado Nestle®. Após a obtenção desta dieta, a mesma era acondicionada em recipiente fechado, em geladeira para fins de conservação. A dieta era administrada aos animais, sendo trocada a cada dois dias para evitar a degradação da mesma.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Componente	Dieta de alto teor de gordura (%)	Dieta comercial(%)
Dieta comercial ^a	60	100
Gordura vegetal hidrogenada ^b	25	–
Leite condensado ^c	15	–
Proteínas	15	23
Gorduras	30	6
Carboidrato	55	17,9

^a Nuvital®, ^b Saúde (Siol alimentos), ^c Nestlé®(3)

4.4 Acompanhamento do ganho ponderal

Os animais foram pesados semanalmente. A opção por determinação do peso semanal ao invés de pesagem devido ao fato do animal apresentar alto metabolismo e a manipulação freqüente

do mesmo e perda de peso. A dieta era trocada a cada dois dias a fim de evitar a degradação da mesma. O Grupo controle ingeriu a dieta padrão no mesmo período que o grupo experimental. Os animais do grupo controle e obeso eram pesados ao mesmo tempo e nas mesmas condições. Para determinação do peso corporal foi utilizada balança de precisão Gehaka® BG 2000 0,001g-202g , sendo consideradas duas casas decimais para leitura e registro do peso. Para tal procedimento, os animais foram colocados em um recipiente apropriado posicionado sobre a balança devidamente zerada e calibrada, aguardando-se o momento de estabilização da leitura do peso para seu registro.

4.5 Retirada de órgãos

Após injeção intraperitoneal de Cetamina (60-80mg/Kg) e Xylazina (8 a 15 mg/kg), associadas na mesma seringa, o animal era submetido à abertura da cavidade abdominal, sendo coletada amostra de sangue da veia cava inferior e, posteriormente, retirados os seguintes órgãos: coração, fígado, rins, gordura subcutânea e abdominal. Os órgãos foram pesados em balança de precisão Gehaka® BG 2000 0,001g-202g, considerando duas casas decimais.

Os tecidos cardíaco, renal e hepático foram fixados com solução de formol a 10%, sendo encaminhados para histologia. Os tecidos foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e avaliados por histologia convencional e análise morfométrica.

4.6 Histologia convencional

Foi realizada avaliação histológica das lâminas de coração, fígado e rins coradas por HE em microscópio Olympus BX-41, com

varredura total da lâmina a fim de se capturar imagens e avaliar possíveis alterações dos tecidos.

4.7 Morfometria

A análise morfométrica foi realizada no laboratório de biologia molecular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB- UFMG. As imagens obtidas das lâminas de rim, coração e fígado foram capturadas através de um microscópio Olympus BX-41, através de uma câmera Olympus Q Color 3, acoplada a um computador. O programa de processamento de imagens utilizado foi o Q-Capture pro 6.0, na resolução de 1280x1024 pixels e no formato TIFF. Posteriormente, as imagens foram convertidas em resolução 680X510 pixels, para se adequar a escala padrão utilizada de 50 μm . Após a adequação das imagens foi utilizado o programa IMAGEJ para medição do diâmetro das células. O IMAGE J é um *software* para processamento e análise de imagens, desenvolvido por **Wayne Rasband** no *National Institute of Mental Health, USA* (4). Foram medidos, em média, 100 cardiomiócitos por coração e, em média, 15 glomérulos renais por rim.

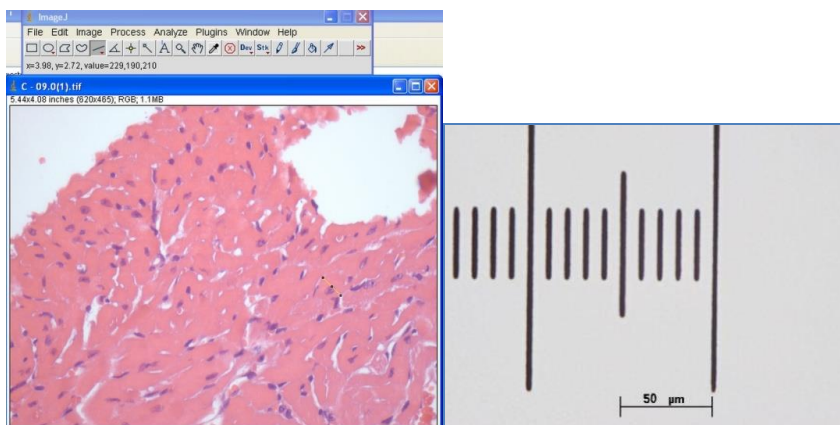


Figura 1 – Medida do Image J e escala em 680X512 para padrão de 50 μm

4.8 Dosagens bioquímicas

O sangue colhido da veia cava inferior foi coletado em tubos contendo citrato. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 800g e o plasma resultante foi pipetado, acondicionado em tubos estéreis e armazenado em freezer a -30°C . Este material foi enviado para processamento em laboratório especializado em dosagens de animais de experimentação. Foram realizadas dosagens de colesterol, triglicérides e creatinina por meio de técnicas colorimétricas convencionais.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* GraphPad Prism Versão 5.0. Os dados foram expressos como médias e desvio padrão. A comparação das médias entre os dois grupos foi feita através do teste T de Student. As medidas variadas dos cardiomiócitos e dos glomérulos foram analisadas em sua

uniformidade pela correlação de Pearson. Para as repetidas medidas dos glomérulos e cardiomiócitos comparando os grupos controle e obeso, foi usada a análise de variância seguida pelo pós teste de Student Newman-Keuls. Valores de significância foram considerados quando $P < 0,05$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010 Jul;16(7):BR208-17.
2. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010 Dec;23(2):270-99.
3. Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 Jun;17(5):365-75.
4. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer.* 2004 Jan-Mar;41(1):47.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo original - AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E HISTOMORFOMETRIA DOS ÓRGÃOS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À DIETA COM ALTO TEOR DE GORDURA

Eliane Basques Moura¹, Anderson J. Ferreira², Ana Cristina Simões e Silva¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

²Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

PALAVRAS CHAVE:

**Correspondence: Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD
Avenida Bernardo Monteiro 1300 / 1104
Belo Horizonte - Minas Gerais
Postal Code: 30150-281
E - mail: acssilva@hotmail.com**

Formatado: Fonte: Negrito

Formatado: Espaço Antes: 6 pt,
Depois de: 6 pt

Formatado: Espaçamento entre
linhas: simples

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações fenotípicas, histológicas e morfométricas em coração, rim e fígado de camundongos C57Bl6 resultantes da administração crônica de dieta rica em gordura. Foram utilizados 20 camundongos C57BL/6, machos submetidos a uma dieta de alto teor de gordura (30%), durante 10 semanas em comparação com 10 camundongos recebendo dieta convencional pelo mesmo período (grupo controle). Os animais foram pesados semanalmente. Ao término do período experimental foram coletadas amostras de sangue e retirados coração, rins e fígado para determinação do peso e análise histológica e morfométrica. Os resultados obtidos foram comparados com o grupo controle, considerando nível de significância $P < 0.05$. Os animais submetidos à dieta de alto teor de gordura mostraram um ganho de peso significativamente superior ao do grupo controle ($P < 0,05$). Em relação ao peso de órgãos, o fígado, o coração e o rim direito se mostraram maiores nos obesos em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). O fígado apresentou degeneração hidrópica apenas no grupo obeso. O diâmetro dos cardiomiócitos e as dimensões dos glomérulos renais foram significativamente maiores no grupo obeso em relação ao controle. A obesidade produziu degeneração hidrópica no fígado e alterações morfométricas significativas no coração e no rim que podem preceder as alterações funcionais relacionadas à obesidade.

5.1 INTRODUÇÃO

A obesidade resulta do balanço positivo entre a quantidade de calorias ingeridas subtraída das calorias gastas, sendo o excesso de

energia estocado em células gordurosas no tecido adiposo. Trata-se de uma doença multifatorial causada por interações complexas entre fatores ambientais e genéticos (1).

A obesidade tem sido produzida experimentalmente por meio de alterações genéticas e ambientais realizadas em diversas linhagens de roedores (2-8). As alterações genéticas resultam em geral de mutações simples, supressão ou aumento da expressão de diferentes genes, enquanto que a principal modificação de fatores ambientais consiste no emprego de dietas com alto teor calórico e lipídico(1, 9).

Os modelos experimentais de obesidade induzida por modificações na composição dietética são os que mais se assemelham à obesidade primária humana de origem exógena(1, 9-10) Nesse contexto, animais expostos à dieta com alto teor de gordura e calorias podem ou não desenvolver obesidade, sendo classificados em sensíveis e resistentes à dieta modificada (9, 11). Algumas linhagens de animais podem desenvolver também comorbidades associadas à obesidade como diabetes tipo 2, esteatose hepática e síndrome metabólica (4, 8).

Além da avaliação fenotípica, os modelos experimentais de obesidade induzida por dieta possibilitam o estudo de modificações histológicas e morfométricas em diferentes órgãos(11). A obesidade pode produzir infiltração de gordura e alterações morfológicas no coração, nos rins e no fígado (11-14). Para exemplificar, em camundongos da linhagem C57BL/6J, a exposição crônica a dietas com alto teor de gordura pode produzir hipertrofia cardíaca excêntrica (15). A obesidade leva a hipertrofia dos cardiomiócitos, que pode ser verificada pelo aumento da área de secção desta

célula à morfometria (16). Em relação aos rins, foi verificada correlação positiva entre níveis elevados de leptina e de insulina com o desenvolvimento de esclerose glomerular (14). Do ponto morfológico, a glomerulopatia relacionada à obesidade se apresenta como uma forma focal de fibrose glomerular, que também se associa ao aumento de tamanho dos glomérulos (17). A infiltração do fígado por gordura é uma das co-morbidades relacionadas à obesidade, que pode progredir para esteatohepatite com inflamação e fibrose progressivas, culminando em cirrose hepática (18).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações fenotípicas, histológicas e morfométricas em coração, rim e fígado de camundongos C57Bl6 resultantes da administração crônica de dieta rica em gordura.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Animais

Foram utilizados para o estudo camundongos, machos, adultos jovens, da linhagem C57BL, com peso variando entre 20 a 25g, oriundos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB da UFMG. Todos os procedimentos seguiram Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2.2 Protocolo experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por um período de sete dias para aclimação. Durante a fase de aclimação, foi oferecida dieta comercial e água "*ad libitum*". Os

animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e controle de temperatura e umidade, entre 22-24°C. Após este período de aclimatação, os animais foram randomizados em dois grupos: animais que receberam dieta convencional (grupo controle, n=10) e animais que receberam dieta rica em gordura (grupo obeso, n=20). No grupo obeso, foi incluído um maior número de animais devido à possibilidade de alguns animais desta linhagem apresentar resistência ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta (obesos resistentes) (9, 11). A dieta rica em gordura foi preparada a partir do acréscimo de gordura vegetal hidrogenada à dieta comercial que originalmente apresenta em sua composição 6% de gordura (Nuvital®). A dieta modificada passou a apresentar teor de gordura de 30%, cuja preparação foi realizada conforme descrito em estudos prévios(19). Os animais do grupo controle receberam a dieta padrão (Nuvital®). A dieta foi trocada a cada dois dias para evitar a degradação da mesma. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação do ganho de peso.

5.2.3 Eutanásia e retirada dos órgãos

Após 10 semanas de exposição à dieta, os animais foram sacrificados após injeção intraperitoneal de Cetamina (60-80mg/Kg) e Xylazina (8 a 15 mg/kg). Foram coletadas amostras de sangue e retirados fígado, coração, rins e gordura peritoneal. Estes órgãos foram pesados e colocados em solução de formol a 10% para posterior análise histológica e morfométrica.

5.2.4 Coleta de amostras sanguíneas

Durante a eutanásia do animal, ao ser aberta a cavidade abdominal, foi coletada amostra sanguínea da veia cava inferior, sendo o sangue colocado em tubo contendo citrato e acondicionado em gelo seco. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 800g e o plasma resultante foi pipetado, acondicionado em tubos estéreis e armazenado em freezer a -30°C. A seguir, foi realizada dosagem de colesterol total, triglicérides e creatinina nos grupos controle e obeso. As dosagens bioquímicas foram processadas por técnicas colorimétricas convencionais.

5.2.5 Histologia e Morfometria

Os tecidos foram corados pela hematoxilina e eosina e avaliados por histologia convencional e morfometria. As imagens obtidas no Microscópio Olympus BX51 foram capturadas em formato TIFF (1280x1024 pixels) pelo programa computacional *Q-capture* e analisadas pelo programa *Image J(20)*. Foram medidos cardiomiócitos, em média 100 células por animal, e glomérulos renais, em média 30 glomérulos por animal. Uma escala de 50 µm foi capturada em 680x512 pixels, sendo realizada a conversão de todas as imagens para este tamanho. Os cardiomiócitos foram medidos através do diâmetro da célula atravessando o seu núcleo e os glomérulos medidos no diâmetro da capsula de Bowman.

5.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa computacional GraphPad Prism Versão 5.0. Os dados foram expressos como médias e desvio padrão. A comparação das médias entre os dois grupos foi feita através do teste T de Student. As medidas variadas dos cardiomiócitos e dos glomérulos foram analisadas em sua uniformidade pela correlação de Pearson. Para as medidas repetidas dos glomérulos e cardiomiócitos, comparando os grupos controle e obeso, foi usada a análise de variância seguida pelo pós teste de Student Newman-Keuls. Valores de significância foram considerados quando $P < 0,05$

5.3- Resultados

5.3.1- Peso corporal

Ao final das 10 semanas do experimento, o peso corporal foi significativamente maior no grupo que consumiu a dieta com alto teor de gordura, comparado ao grupo controle, que recebeu dieta convencional, conforme mostrado na Figura 1 e na tabela 1 ($P < 0,05$). Entretanto, foi verificado que 6 (30%) dentre os 20 animais expostos à dieta não apresentaram aumento do ganho de peso em relação ao grupo controle, sendo considerados resistentes à indução de obesidade. Quando esses 6 animais são excluídos da análise, a comparação entre o ganho de peso dos dois grupos (obesos-sensíveis e controle) mostrou diferença bem mais pronunciada ($P < 0,0001$).

Os camundongos C57BL/6 expostos à dieta com alto teor de gordura aceleraram o ganho de peso em relação ao grupo controle a partir da terceira semana do uso da dieta (Figura 1).

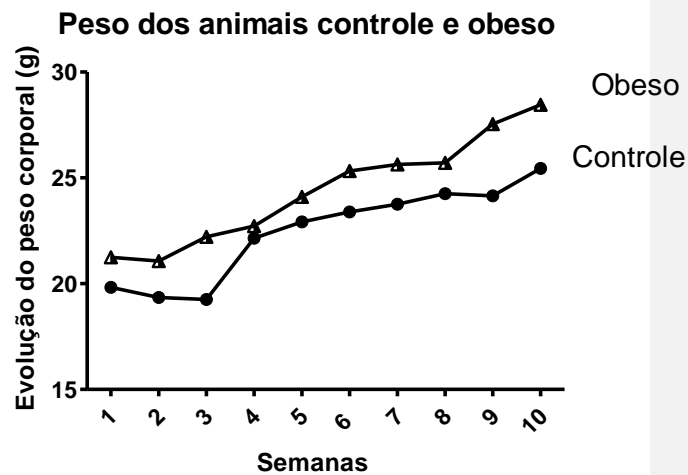


Figura 1 – Evolução do peso corporal dos animais expostos a dieta com alto teor de gordura (grupo obeso) e dos animais que receberam dieta convencional (grupos controle). Valores exibidos em médias. $P < 0,05$ para a comparação entre as duas curvas (ANOVA para medidas repetidas)

Tabela 1 – Comparação do peso corporal inicial e final, do ganho de peso e do peso dos órgãos em animais expostos à dieta com alto teor de gordura (grupo obeso) e animais que receberam dieta convencional (grupo controle)

Peso (g)	Grupo obeso (n=20)	Grupo controle (n=10)	Valor de p
Inicial	20,8 ± 1,81	19,8 ± 2,41	0,212
Final	27,1 ± 2,09	22,9 ± 3,52	0,003
Ganho de peso	7,7 ± 0,28	3,1 ± 1,47	0,001
Coração	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,032
Fígado	1,71 ± 0,29	1,35 ± 0,19	0,020
Rim direito	0,32 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,018
Rim esquerdo	0,28 ± 0,06	0,26 ± 0,06	0,363

Tabela 2 – Comparação do peso corporal inicial e final, do ganho de peso e do peso dos órgãos em animais que aumentaram o peso em resposta à dieta com alto teor de gordura (obesos sensíveis) e animais que receberam dieta convencional (grupo controle)

Peso (g)	Obesos sensíveis (n=14)	Grupo controle (n=10)	Valor de p
Inicial	21,2±1,82	19,8 ± 2,41	0,105
Final	28,4 ±1,43	22,9 ± 3,52	0,001
Ganho de peso	7,1±0,41	3,1 ± 1,47	0,001
Coração	0,31 ± 0,01	0,28 ± 0,08	0,025
Fígado	1,72 ± 0,06	1,35 ± 0,19	0,004
Rim direito	0,35 ± 0,01	0,25 ± 0,06	0,003
Rim esquerdo	0,30 ± 0,01	0,26 ± 0,06	0,101

5.3.2 Gordura abdominal

Após abertura da cavidade abdominal dos animais do grupo obeso, foi detectada grande quantidade de gordura que se estendia da bexiga até a gordura epididimal. Nos animais do grupo controle, não foi observado nenhum acúmulo de tecido gorduroso na cavidade abdominal.

5.3.3 Peso dos órgãos

As tabelas 1 e 2 mostram a comparação entre o peso dos órgãos dos animais expostos à dieta com alto teor (grupo obesos) de gordura e dos animais que receberam dieta convencional (grupo controle). As médias de peso do fígado e do coração foram significativamente maiores no grupo obeso em relação ao grupo controle (tabelas 1 e 2). Em relação ao peso dos rins, o grupo obeso

apresentou diferença significativa no peso do rim direito em relação ao grupo controle, porém não houve diferença no peso do rim esquerdo na comparação dos grupos (tabelas 1 e 2).

5.3.4 Dados bioquímicos

Conforme mostrado na tabela 3, as determinações das concentrações sanguíneas de colesterol, triglicérides e creatinina, não apresentaram diferenças significativas entre o grupo obeso e controle (teste T de Student).

Tabela 3 - Comparação das concentrações sanguíneas de colesterol, triglicérides e creatinina em animais expostos à dieta com alto teor de gordura (grupo obeso) e animais que receberam dieta convencional (grupo controle)

Parâmetro laboratorial	Grupo obeso (n=20)	Grupo controle (n=10)	Valor de p
Colesterol (mg/dl)	92,4 ± 28,6	95,4 ± 18,7	0,062
Triglicérides (mg/dl)	71,1 ± 42,1	73,5 ± 10,3	0,107
Creatinina (mg/dl)	0,89 ± 0,26	0,76 ± 0,20	0,332

5.3.5 Histologia do coração e morfometria dos cardiomiócitos

A análise histológica do coração (ventrículo esquerdo) não detectou alterações estruturais significativas nos dois grupos experimentais, como pode ser verificado na figura 2. Observou-se apenas um aumento aparente das dimensões dos cardiomiócitos no grupo obeso em relação ao grupo controle, que foi confirmado pela análise morfométrica.

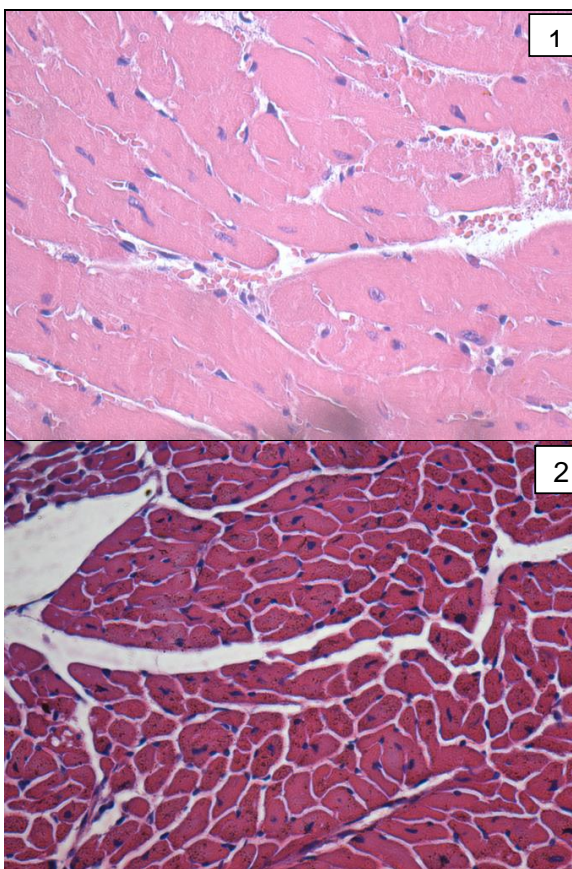


Figura 2- Microfotografias representativas da histologia do tecido cardíaco no grupo obeso (painel 1) e no grupo controle (painel 2). Não foram detectadas alterações estruturais nos dois grupos. Foi observado aumento aparente dos cardiomiócitos no grupo obeso em relação ao grupo controle (aumento de 40x).

O diâmetro dos cardiomiócitos foi expresso em μm e refere-se à média das medidas de 100 cardiomiócitos por animal. Os valores médios detectados no grupo obesos foram maiores em comparação ao grupo controle ($17,49 \pm 2,13$ versus $8,63 \pm 1,25 \mu\text{m}$, $p < 0,05$), como mostrado na figura 3.

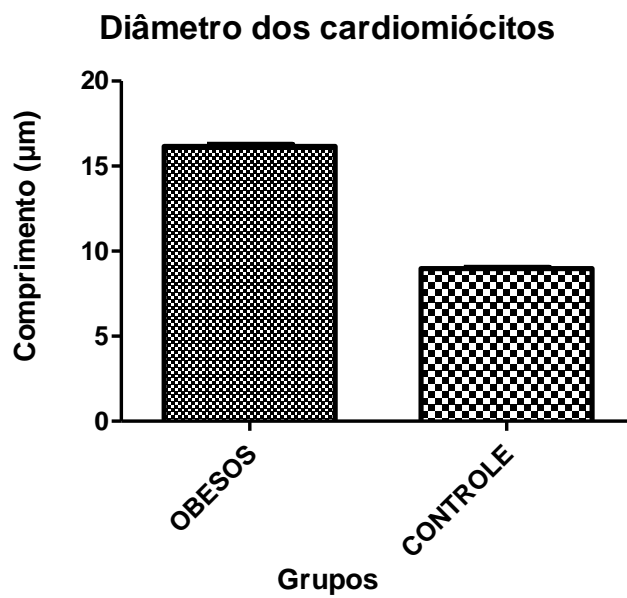


Figura 3- Comparação entre os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos no grupo obeso e no grupo controle.

*** $p < 0,0001$

5. 3.6 Histologia dos rins e morfometria dos glomérulos

A análise histológica do tecido renal não detectou alterações estruturais significativas nos dois grupos experimentais, como pode ser verificado na figura 4. Observou-se apenas um aumento aparente das dimensões dos glomérulos no grupo obeso em relação ao grupo controle, que foi confirmado pela análise morfométrica.

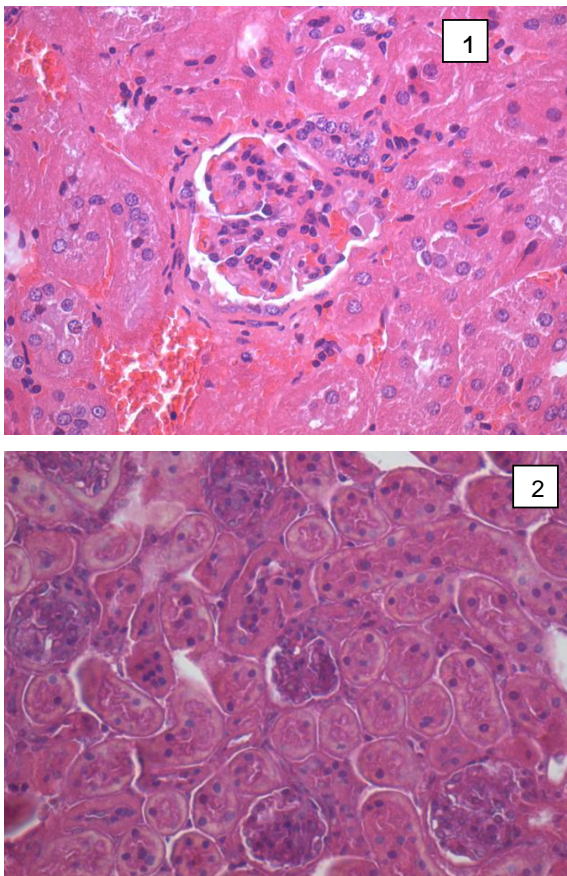


Figura 4- Microfotografias representativas da histologia do tecido renal no grupo obeso (painel 1) e no grupo controle (painel 2). Não foram detectadas alterações estruturais nos dois grupos. Foi observado aumento aparente dos glomérulos no grupo obeso em relação ao grupo controle (aumento de 40x).

O diâmetro dos glomérulos também foi expresso em μm e se referiu à média das medidas de X glomérulos por animal. Conforme mostrado na figura 5, o grupo obeso apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo controle ($66,55 \pm 10,90$ versus $32,70 \pm 4,15 \mu\text{m}$, $p < 0.001$).

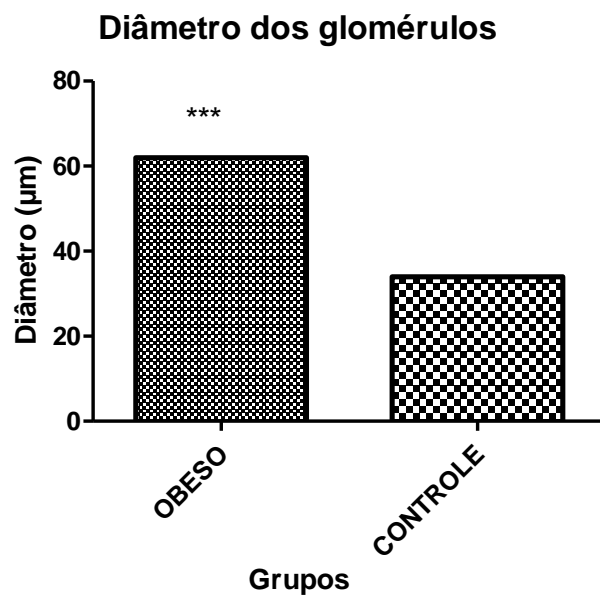


Figura 5. Comparação entre os valores médios do diâmetro dos glomérulos no grupo obeso e no grupo controle.

*** $p < 0,001$

5. 3.7 Histologia do fígado

O tecido hepático dos animais obesos apresentou sinais de degeneração hidrópica e discreto infiltrado inflamatório (figura 6, painel 1). Não foi detectada nenhuma alteração histológica no fígado dos animais do grupo controle (figura 6, painel 2).

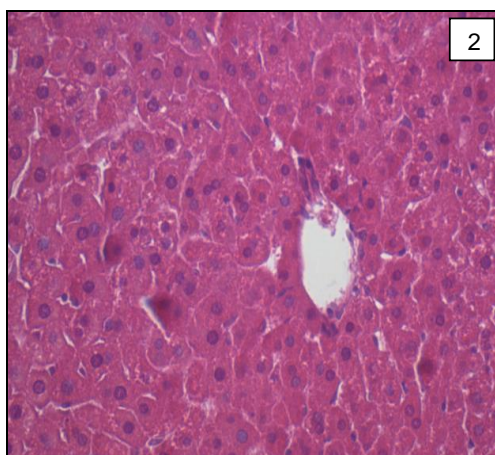
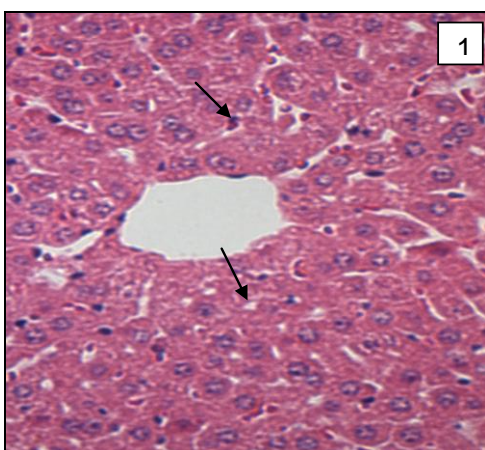


Figura 6 - Microfotografias representativas da histologia do tecido hepático no grupo obeso (painel 1) e no grupo controle (painel 2). O tecido hepático dos animais obesos mostrou sinais de degeneração hidrópica (setas) e discreto infiltrado inflamatório (painel 1). Não foram detectadas alterações estruturais no tecido hepático dos animais do grupo controle (aumento de 40x).

5.4 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o camundongo C57BL/6, após exposição à dieta com alto teor de gordura (30%) por 10 semanas, desenvolveu fenótipo de obesidade associado à degeneração hidrópica no fígado e aumento das dimensões de cardiomiócitos e de glomérulos. Tais alterações estruturais poderiam preceder disfunções orgânicas e co-morbidades relacionadas à obesidade.

O fenótipo de obesidade nos animais expostos à dieta com alto teor de gordura foi caracterizado pelo ganho progressivo e acelerado de peso, presença de gordura intra-abdominal e aumento do peso de órgãos como coração, fígado e rim D em comparação com animais que receberam dieta convencional pelo mesmo período. Nossos achados foram consistentes com estudos prévios que também mostraram que camundongos da linhagem C57BL/6 podem acelerar o ganho de peso em resposta ao aumento do teor de lípidos e de calorias da dieta (11, 13-14, 18-19, 21). A exposição de camundongos C57BL/6 a dietas com composição modificada tem sido utilizada como modelo experimental de obesidade e de síndrome metabólica por se assemelhar ao desenvolvimento da obesidade humana (4, 14). Além disso, alguns autores têm mostrado que os camundongos C57BL/6 apresentam resposta variável à exposição dietética, podendo um percentual variável de animais apresentar resistência ao desenvolvimento de obesidade (11). De acordo com este dado da literatura, em nosso estudo 6 dentre 20 animais expostos à dieta modificada exibiram comportamento semelhante ao grupo controle em relação ao ganho de peso, ou seja, foram considerados obesos-resistentes.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, não foi detectada dislipidemia e nem elevação significativa da creatinina no grupo exposto à dieta com 30% de gordura. De fato, os modelos experimentais de síndrome metabólica têm utilizado dietas com teor de gordura de 60% (4, 18). Outra possível explicação para a ausência de alterações bioquímicas pode ser o período de tempo de exposição à dieta, que, no presente estudo, foi de apenas 10 semanas. Foi verificado previamente que os níveis de leptina dos camundongos C57BL/6 se elevaram após 30 semanas de exposição à dieta modificada em comparação ao grupo controle que recebeu dieta convencional (14). Em outras palavras, pode-se inferir que para o desenvolvimento de alterações bioquímicas relacionadas à obesidade talvez seja necessário utilizar dieta com teor de gordura mais alto por tempo mais prolongado.

Apesar da ausência de dislipidemia, os animais do grupo obeso apresentaram aumento considerável do diâmetro dos cardiomiócitos em comparação ao grupo controle. O aumento de peso do coração e o maior diâmetro dos cardiomiócitos indicam hipertrofia cardíaca, que tem sido considerada a primeira manifestação de remodelamento cardíaco associado ao ganho excessivo de peso (11). Estudos prévios com camundongos C57BL/6 também mostraram que a obesidade induzida experimentalmente leva à hipertrofia dos cardiomiócitos, representada pelo aumento na área de secção do cardiomiócito (19). A utilização de outros modelos animais de obesidade, como o rato obeso *Zucker*, evidenciou o papel da lipotoxicidade na disfunção cardíaca (12). O rato obeso *Zucker* apresenta infiltração de gordura no tecido miocárdico que pode levar a apoptose das células cardíacas e redução da função contrátil miocárdica (12). Por outro lado, no presente estudo e em outros modelos experimentais de

obesidade induzida por dieta não foram detectadas infiltração gordurosa do miocárdio nem apoptose dos cardiomiócitos (22). De fato, os estudos sugerem que, na obesidade induzida por dieta, a apoptose não exerça um papel significativo na disfunção cardíaca (22).

De forma similar ao tecido cardíaco, o tecido renal dos animais obesos apresentou aumento significativo do diâmetro dos glomérulos no grupo obeso em relação ao grupo controle. A hipertrofia glomerular, contudo, não se acompanhou de outras alterações histológicas renais. Outros estudos mostraram, além de hipertrofia glomerular, o desenvolvimento de glomerulosclerose, aumento da matriz mesangial e aumento da cápsula de Bowman em camundongos obesos (13-14, 23). Além disso, a creatinina sérica dos animais obesos do presente estudo foi estatisticamente semelhante à creatinina sérica dos animais do grupo controle. Estudos prévios também mostraram que as alterações da função renal podem não ser detectáveis mesmo após períodos prolongados (até 40 semanas) de exposição à dieta com alto teor de gordura em camundongos C57BL/6 (14).

Na histologia hepática foi observada degeneração hidrópica sem sinais inflamatórios importantes. A presença de alterações discretas do tecido hepático pode ser atribuída ao teor não tão elevado de gordura da dieta e ao curto período de exposição. Em outros estudos que usaram dieta com teores mais altos de gordura (60%) por período de 40 semanas foi possível detectar infiltração mononuclear ao lado de focos esparsos de necrose de hepatócito, hiperplasia das células biliares e deposição de colágeno entre os hepatócitos. Além disso, foi observada microvacuolização dos hepatócitos, indicando resposta à lesão hepatocelular (14, 18, 24).

Concluindo, a obesidade pode ser facilmente induzida em camundongos C57BL/6 por meio de modificações simples na composição da dieta. O tempo de exposição parece ser uma variável importante para o desenvolvimento de alterações histopatológicas e funcionais associadas à obesidade. Por outro lado, nossos achados sugerem que a degeneração hidrópica do fígado e a hipertrofia dos cardiomiócitos e dos glomérulos renais poderiam ser eventos precoces na etiopatogênese da disfunção orgânica relacionada à obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casper RC, Sullivan EL, Tecott L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Aug;199(3):313-29.
2. Lijnen HR, Freson K, Hoylaerts MF. Effect of VPAC1 Blockade on Adipose Tissue Formation and Composition in Mouse Models of Nutritionally Induced Obesity. *J Obes*. 2010;2010.
3. Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Sep;119(6):239-50.
4. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15(8):1996-2005.
5. Bhathena J, Kulamarva A, Martoni C, Malgorzata A, Malhotra UM, Paul A, et al. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011;4:195-203.
6. Brake DK, Smith EO, Mersmann H, Smith CW, Robker RL. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Dec;291(6):C1232-9.
7. Buisson A, Pellizzon M, Ordiz F, Jr., Jen KL. Augmenting leptin circadian rhythm following a weight reduction in diet-induced obese rats: short- and long-term effects. *Metabolism*. 2004 Jun;53(6):782-9.

8. Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2009 Nov;102(9):1246-53.
9. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010 Dec;23(2):270-99.
10. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim.* 2008 Oct;42(4):413-32.
11. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010 Jul;16(7):BR208-17.
12. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1784-9.
13. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2005 Sep 16;280(37):32317-25.
14. Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, et al. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine.* 2009 Oct;36(2):311-25.
15. Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice. *Physiol Genomics.* 2007 Oct 22;31(2):176-82.

16. Marques CM, Motta VF, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res.* 2010 May;43(5):467-75.
17. Darouich S, Goucha R, Jaafoura MH, Zekri S, Ben Maiz H, Kheder A. Clinicopathological characteristics of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. *Ultrastruct Pathol.* 2011 Aug;35(4):176-82.
18. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.
19. Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 Jun;17(5):365-75.
20. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer.* 2004 Jan-Mar;41(1):47.
21. Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):42774-84.
22. Trivedi PS, Barouch LA. Cardiomyocyte apoptosis in animal models of obesity. *Curr Hypertens Rep.* 2008 Dec;10(6):454-60.
23. do Carmo JM, Tallam LS, Roberts JV, Brandon EL, Biglane J, da Silva AA, et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Sep;297(3):R803-12.

24. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lutjohann D, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):474-86.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A organização mundial de saúde estima que em poucos anos algumas doenças crônicas (aterosclerose, hipertensão, diabetes) sejam a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo(1). O papel da dieta nestas doenças é bem estabelecido, principalmente o consumo de alimento com alto teor de gorduras saturadas, o que além de levar ao aparecimento da obesidade agrava a evolução das doenças crônicas (2). Normalmente estas doenças são de progressão lenta, ocorrendo gradualmente. O Camundongo C57BL/6 desenvolve obesidade, hiperglicemia e resistência à insulina também de forma gradual como nas doenças humanas(3). Este camundongo desenvolve uma seletiva deposição de gordura no mesentério, sendo este um achado consistente, pois a obesidade abdominal é fator de risco de desenvolvimento de diabetes em humanos (4). Este animal tem uma eficiência dietética, pois ganha muito peso por caloria consumida. A adiposidade central que desenvolve o C57BL/6 é acompanhada de anormalidades metabólicas tais como hiperglicemia que se desenvolve dentro de um mês da introdução de dietas com alto teor de gordura. Após 16 semanas estes animais desenvolvem hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos resultando em animais com massa gorda de 93%(3, 5). O fenótipo de diabetes é evidente nestes animais tardiamente, após um mês de ingestão de dieta com gordura em torno de 40 a 60 %.

O C57BL/6 é uma linhagem bem conhecida, derivada do C57BL que foi definido por C.C Little em 1920 e tem sido amplamente usado, sendo uma mutação por geração espontânea e induzida. Dessa linhagem ainda foram desenvolvidas duas

sublinhagens C57BL/6J e o C57BL/6N, através de deleção dos exons 7-11 no nucleotídeo nicotinamida transhidrogenase (Nnt)(6).

Pudemos observar neste estudo que o C57BL/6 é um camundongo bem empregado para criação de modelos de obesidade, respondendo bem a dieta de alto teor de gordura por somente 10 semanas. Estudos futuros devem levar em conta o aumento do teor de gordura na dieta e o prolongamento desta dieta por mais semanas para que seja evidenciado o desenvolvimento de alterações fenotípicas mais importantes.

Vale ressaltar que apresentamos limitações neste estudo por dificuldades de obter um maior número de exemplares destes animais e compararmos os efeitos de vários níveis de gordura na dieta além da possibilidade de avaliarmos os efeitos em tempos diferentes o que modificaria o fenótipo destes animais, como visto em outros estudos(7).

Seis animais foram considerados obesos resistentes dos 20 do grupo experimental. É conhecido que certa fração de animais expostos a dieta de alto teor de gordura não se tornarão obesos sendo conhecidos como obesos resistentes. Os obesos suscetíveis são hiperfágicos e possivelmente tem uma resistência central a ação da insulina, além de uma redução da expressão hipotalâmica de peptídeos anorexígenos(8) .

Ainda assim pudemos observar alterações histológicas e morfométricas neste modelo de 10 semanas com teor de gordura na dieta de 30%. Encontramos aumento no diâmetro glomerular no grupo de alto teor de gordura comparado ao controle. Estudos tem demonstrado glomerulopatia e glomeruesclerose em modelos com alto teor de gordura na dieta (7, 9). Mas ainda é necessário se aprofundar nos mecanismos que leva à disfunção renal na obesidade.

A obesidade está relacionada a mudanças no coração de humanos e nos modelos de obesidade. (10) Estas mudanças são hipertrofia da parede do ventrículo esquerdo, disfunção diastólica e hipertrofia atrial esquerda(10). Além disso, é conhecido que a hipertrofia cardíaca é fator preditivo para mortalidade e morbidade cardiovascular(11).

Um importante fenômeno patológico associado à obesidade é a morte de cardiomiócitos, que ocorre por necrose e uma incontrolável desintegração da célula através da ruptura da membrana plasmática, levando a cardiomiopatia e remodelagem miocárdica(12).

No presente estudo pudemos observar a resposta de hipertrofia dos cardiomiócitos precocemente nos animais obesos estudados já que o experimento durou 10 semanas de uso da dieta de alto teor de gordura.

A infiltração do fígado por gordura ou também chamada esteatose não-alcoólica, é a maior forma de doença crônica em adultos e crianças. Isto é uma consequência da obesidade epidêmica e pode progredir para esteatohepatite não-alcoólica que é caracterizada na qual é caracterizada por esteatose, inflamação e fibrose progressiva(13).

Em estudos com dietas em torno de 60% de gordura estas alterações hepáticas descritas acima foram encontradas após 16 semanas de uso da dieta(13). No nosso estudo não conseguimos chegar a fase de esteatose possivelmente pelo período de 10 semanas de uso da dieta e pelo fato de usarmos uma dieta com 30% de gordura .

Ainda há um longo caminho para se entender os efeitos do ambiente na obesidade. Sem dúvida os modelos animais que já contribuíram grandemente para este fato, ainda serão necessários


para o entendimento em relação aos tipos de dietas e o comportamento do organismo frente às mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization. [Technical Report Series]. 2000;894.
2. Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ.* 2002;80(12):952-8.
3. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 2004 Apr;81(2):243-8.
4. Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1993 Nov;42(11):1405-9.
5. Tanja Y R. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models.* [doi: 10.1016/j.ddmod.2007.09.004]. 2007;4(1):3-8.
6. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim.* 2009 Apr;58(2):141-9.
7. Hoffler U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, et al. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57BL/6J mice. *Endocrine.* 2009 Oct;36(2):311-25.
8. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Apr;15(4):798-808.
9. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2005 Sep 16;280(37):32317-25.
10. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):389-419.
11. Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice. *Physiol Genomics.* 2007 Oct 22;31(2):176-82.
12. Trivedi PS, Barouch LA. Cardiomyocyte apoptosis in animal models of obesity. *Curr Hypertens Rep.* 2008 Dec;10(6):454-60.
13. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty

Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.

6-Anexo 1- Aprovação do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 22/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação dos níveis circulantes de adipocinas em modelo experimental de obesidade**", que tem como responsável(is) **Ana Cristina Simões e Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 06/2008**.

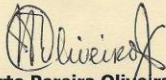
Este certificado expira-se em **11/ 06/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 22/2008**, related to the project entitled "**Evaluation of circulating levels of adipocins in experimental model of obesity**", under the supervisors of **Ana Cristina Simões e Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 11, 2008**.

This certificate expires in **June 11, 2013**.

Belo Horizonte, 16 de Junho de 2008.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

