



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS



PROGRAMAÇÃO METABÓLICA INDUZIDA PELA REDUÇÃO DA NINHADA E
RESISTÊNCIA À INSULINA PROMOVE ALTERAÇÕES NO TECIDO ADIPOSEO
MARROM DE RATOS JOVENS

ISABELA JESUS DE DEUS

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2020

ISABELA JESUS DE DEUS

PROGRAMAÇÃO METABÓLICA INDUZIDA PELA REDUÇÃO DA NINHADA E
RESISTÊNCIA À INSULINA PROMOVE ALTERAÇÕES NO TECIDO ADIPOSEO
MARROM DE RATOS JOVENS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de
Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karina Barbosa de Queiroz

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D486p Deus, Isabela Jesus de.

Programação metabólica induzida pela redução da ninhada e resistência à insulina promove alterações no tecido adiposo marrom de ratos jovens. [manuscrito] / Isabela Jesus de Deus. - 2020.

181 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Karina Barbosa de Queiroz.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Carboidratos . 2. Tamanho da ninhada. 3. Sobrepeso . 4. Resistência à insulina. I. de Queiroz, Karina Barbosa . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 612.39

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Jesus de Deus

Programação metabólica induzida pela redução da ninhada e resistência à insulina promove alterações no tecido adiposo marrom de ratos jovens

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição

Aprovada em 18 de dezembro de 2020.

Membros da banca

Doutorado - Karina Barbosa de Queiroz - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutorado - Sílvia de Paula Gomes - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutorado - Melina Oliveira de Souza - Universidade Federal de Ouro Preto

Karina Barbosa de Queiroz, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 21/10/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Karina Barbosa de Queiroz, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/10/2021, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0235785** e o código CRC **B9D8919B**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.004031/2021-60

SEI nº 0235785

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591844 - www.ufop.br

Dedico este trabalho aos meus pais, Solange e Fernando, que, além de fonte de inspiração, com muito amor, carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. E às minhas irmãs Jaqueline e Fernanda, pela amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

Talvez seja esta a parte mais difícil de escrever diante de todo o trabalho, uma vez que nunca se conquista algo sozinho e muitos são aqueles que merecem meu agradecimento.

A Deus, por ter me dado o dom da vida e por me guiar todos os dias. E por ter me proporcionado uma família, tantas oportunidades incríveis e pelas pessoas que colocou em meu caminho. Acredito que tudo na vida tem um propósito de Deus e nada durante o meu caminho até aqui foi em vão.

Aos meus pais, Solange Jesus e Fernando José, pela educação que me deram, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e pela confiança que depositaram em mim. Sei que para que eu chegasse até aqui vocês abriram mão de muitas coisas. A vocês, amor e gratidão são palavras que definem o que eu sinto. Essa conquista a vocês pertence.

As minhas irmãs, Jaqueline Jesus e Fernanda Júnia, pela compreensão nos momentos difíceis e por tornarem os dias ruins mais suportáveis.

Aos meus avós, que sempre me apoiaram, rezaram e torceram por mim. E me perdoaram e entenderam durante as minhas faltas.

Durante meu início na graduação não sabia o mundo de oportunidades que se abririam para mim, o quanto eu poderia aprender e crescer profissionalmente e pessoalmente. E devo muito de tudo que aprendi e cresci a Prof.^a Dra.^a Karina Barbosa de Queiroz. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela oportunidade, pela confiança, amizade, pelos conselhos, pela paciência, pelos ensinamentos que foram além do mundo acadêmico e por ser um exemplo de profissionalismo e competência. Karina, você é minha inspiração, admiro sua dedicação e amor ao trabalho e à pesquisa. Sou imensamente grata de tê-la como orientadora na Iniciação Científica, nesse trabalho e por me fazer apaixonar pela ciência.

Agradeço também a todos os membros do meu Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) pela boa convivência diária, em especial à técnica Miliane Martins, por ser um exemplo de profissional, determinação, dedicação e prestatividade, sempre disposta a ajudar, não importando o dia ou hora. Sua ajuda foi imprescindível para a realização desse trabalho. À Thaís Araújo, que esteve comigo desde o início dessa caminhada; nós começamos e terminamos juntas esse trabalho. À Eduarda Santos, que se juntou a nós durante o caminho e tornou a

caminhada mais leve, me proporcionado ajuda e afeto sempre quando necessário. Ao ex aluno de mestrado Daniel Okushima pela disposição em sempre me ajudar, pelo apoio, ensinamentos e conselhos.

As minhas melhores amigas, que o curso de Nutrição me presenteou, Anna Luiza, Isabela Alcântara, Rayssa Martins, Roberta Luiza e Tayná Teixeira, com as quais vivi muitos momentos, dentre eles bons e momentos difíceis. Sem vocês acredito que a caminhada até aqui teria sido muito mais difícil. Agradeço por deixarem meus dias mais felizes, pelo apoio e colo quando sempre precisei. Deus coloca pessoas certas em nossos caminhos e vocês não deixam dúvida quanto a isso; agradeço a ele a chance de dividir essa experiência com mulheres tão especiais. Agradeço, ainda, ao nosso pequeno “Baby Henrique”, que desde o surgimento de sua existência tornou, não só os meus, mas o dia de todas mais felizes, em especial a mamãe Roberta. Eu sempre ouvi que uma criança é uma benção e isso fez mais sentindo com a sua chegada, suas mãozinhas e olhinhos tão delicados tornaram meus dias mais doces. Eu amo vocês.

Ao grupo PET-NUTRIÇÃO Alimentando ideias, pela oportunidade de viver uma experiência incrível que vai além de ensinamentos acadêmicos. Agradeço a todos os petianos que fizeram parte durante o meu período no programa. Em especial, a nossa tutora Maria Tereza de Freitas, que, além de uma excelente professora e tutora, é como uma mãe para todos, que nos proporciona desde os ensinamentos acadêmicos aos ensinamentos de vida. A minha dupla de programa Mariana Vidigal, pela paciência, dedicação e por sempre me acompanhar nas atividades.

Agradeço a todos os laboratórios que me apoiaram e ajudaram durante esse tempo. Sem eles, a construção desse trabalho não seria possível em tempos tão difíceis como esses. Em especial: ao Laboratório de Bromatologia, à professora Melina Oliveira e ao técnico Rafael Antônio; ao Laboratório Multiusuário de Pesquisa da Escola de Nutrição e ao técnico Gustavo Silveira. Agradeço ao Rafael e ao Gustavo pela paciência e boa vontade durante a realização das análises bromatológicas. Ao Centro de Ciência Animal (CCA) e à Ângela Antunes que teve todo um cuidado em manipular as nossas ninhadas. Ao Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) e à professora Daniela Caldeira e a doutoranda Sttefany Viana Gomes. Ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e à professora Cláudia Martins. Ao Laboratório Multiusuários de

Microscopia Avançada e Microanálise (Lmu-mam) do NUPEB/UFOP e à técnica Carolina Nogueira.

Aos animais experimentais, sem eles esse trabalho não existiria. Com eles aprendi muito mais que a pesquisa acadêmica pode proporcionar, aprendi a ser mais humana.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Nutrição pela oportunidade, em especial aos professores e a todos os funcionários que tornaram possível a minha caminhada até aqui.

"Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio".

-Hipócrates

Lista de Figuras

Figura 01 – Via de sinalização da insulina na captação de glicose por tecidos periféricos dependentes de insulina.....	24
Figura 02 – Diferença entre o TAB e o TAM, representadas pelos seus respectivos adipócitos.....	28
Figura 03 – Geração de calor por mitocôndrias desacopladas.....	29
Figura 04 – Delineamento experimental do estudo.....	35
Figura 05 – Efeito do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame dos filhotes.....	47
Figura 06 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre a ingestão alimentar diária (g), o CEA e o CGPCC dos animais após 8 semanas.....	51
Figura 07 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos após 8 semanas.....	54
Figura 08 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos após 8 semanas.....	57
Figura 09 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico sérico após 8 semanas.....	60
Figura 10 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o peso relativo do TAM após 8 semanas.....	63
Figura 11 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o número e tamanho de adipócitos multiloculares do TAM após 8 semanas.....	65
Figura 12 – Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídios totais do TAM após 8 semanas.....	66
Figura 13 – Figura resumo: Alterações morfológicas e no teor de lipídios do tecido adiposo marrom induzidas pela manipulação do tamanho da ninhada e resistência à insulina.....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição centesimal na base seca das diferentes dietas (dieta padrão e HSD), realizada no Laboratório de Bromatologia e no Laboratório de Multiusuários da Escola de Nutrição, da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais – Brasil, 2019.....	49
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AOAC	<i>Association of Oficial Analytical Chemists</i>
CEA:	Coefficiente de eficiência alimentar
CEUA:	Comissão de ética no uso de animais
CCA:	Centro de ciência animal
CGPCC:	Coefficiente de ganho de peso por consumo calórico
DMSO:	Dimetilsulfóxido
HOMA-IR:	Índice de resistência à insulina
HSD:	<i>High sugar diet</i> ; dieta rica em carboidratos simples
HSD-NC:	Grupo de animais alimentados com HSD da ninhada controle
HSD-NR:	Grupo animais alimentados com HSD da ninhada reduzida
IKK:	complexo I κ B quinase
INOS:	óxido nítrico-sintase induzida
JNK:	quinase c-Jun n-terminal
LIMP:	Laboratório de Imunopatologia
NaOH:	Hidróxido de sódio
NUPEB:	Núcleo de Pesquisa de Ciências Biológicas
NC:	Ninhada controle
NR:	Ninhada reduzida
OMS:	Organização Mundial da Saúde
RI:	Resistência à insulina
STD:	Dieta padrão
STD-NC:	Grupo de animais alimentados com dieta padrão da ninhada controle
STD-NR:	Grupo de animais alimentados com dieta padrão da ninhada reduzida
TAB:	Tecido adiposo branco
TAG:	Triacilglicerol
TAM:	Tecido adiposo marrom
<i>Ucp1</i> :	<i>Uncoupling protein 1</i> ; proteína desacopladora 1
UFOP:	Universidade Federal de Ouro Preto

RESUMO

A termogênese adaptativa tem sido descrita como um fator modulador de doenças metabólicas, tornando-se fundamental compreender os mecanismos decorrentes da programação metabólica, induzida pelo tamanho da ninhada e pela resistência à insulina (RI) decorrente do consumo de uma dieta rica em carboidratos simples (HSD) sobre o tecido adiposo marrom (TAM) na idade adulta. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da ninhada reduzida e da RI sobre o metabolismo e o TAM de ratos jovens. Ratos Wistar machos foram distribuídos, após o nascimento ($P=0$), de forma aleatória em ninhada controle ($n=8$ filhotes/ mãe; NC) e ninhada reduzida ($n=4$ filhotes/ mãe; NR). Após o desmame (21 dias), os animais ($n=23$) foram randomicamente divididos em quatro grupos: animais alimentados com dieta padrão da NC [grupo STD-NC ($n=5$)]; animais alimentados com HSD da NC [grupo HSD-NC ($n=6$)]; animais alimentados com dieta padrão da NR [grupo STD-NR ($n=6$)]; animais alimentados com HSD da NR [grupo HSD-NR ($n=6$)]. O grupo dieta padrão foi alimentado com ração comercial Nuvilab® e o grupo HSD foi alimentado com uma dieta “palatável” a base de leite condensado (79% CHO em relação ao % energia). Os efeitos da HSD foram avaliados durante 8 semanas. Após eutanásia, foram coletados os tecidos adiposos branco [retroperitoneal, inguinal, epididimal] e marrom e o sangue. Foram realizadas análises biométricas [ganho de massa corporal, índices de Lee (IL) e de Adiposidade (IA)] e de consumo alimentar [coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC)] e foram avaliados os parâmetros glicometabólicos [glicose, insulina e HOMA-IR] e o perfil lipídico sérico [colesterol total e triacilglicerol (TAG)]. Além disso, do TAM foi calculado o peso relativo e parte do tecido foi fixada com metanol-DMSO para análises histológicas (número e área dos adipócitos). A outra parte foi destinada para determinação de gordura total (método de FOLCH), seguida da dosagem de TAG no tecido. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram determinados pela ANOVA *TWO-WAY*, seguidos do pós-teste de Bonferroni. A manipulação do tamanho da ninhada foi eficiente em induzir sobrepeso neonatal, com ganho de massa corporal de ~19% do grupo da NR em relação ao grupo da NC ($p<0,05$). O CEA, CGPCC e as concentrações de glicose foram influenciados pela HSD ($p<0,05$), mas sem diferenças no pós-teste. Além disso, a HSD ($p<0,05$) aumentou o IA ~69%, a concentração de insulina ~201% e o HOMA-IR ~313% no grupo HSD-NC (em relação ao grupo STD-NC). Em relação ao perfil lipídico sérico, o tamanho das ninhadas alterou as concentrações de colesterol total ($p<0,05$), mas sem diferenças no pós-teste, enquanto a HSD

($p < 0,01$) aumentou ~117% a concentração de TAG no grupo HSD-NC. Quanto ao peso relativo do TAM, observamos efeito do tamanho da ninhada, HSD e interação ($p < 0,05$), com aumento de ~56% no grupo HSD-NC e uma redução de ~28% no grupo HSD-NR, quando comparados aos grupos STD-NC e HSD-NC, respectivamente. Para o número de adipócitos, observamos efeito do tamanho da ninhada, HSD e interação ($p < 0,001$), com redução: ~30% no grupo STD-NR; ~32% no grupo HSD-NC [comparados aos respectivos controles (STD-NC)] e aumento: ~24% no grupo HSD-NR; ~29% no grupo HSD-NR (comparados aos grupos STD-NR e HSD-NC, respectivamente). Para área dos adipócitos também observamos efeitos das três variáveis ($p < 0,001$), no entanto, de forma contrária, houve um aumento: ~6% no grupo STD-NR; ~35% no grupo HSD-NC (comparados ao grupo STD-NC)] e uma redução no grupo HSD-NR, de ~31% quando comparado ao grupo STD-NR e de ~46% quando comparado ao grupo HSD-NC. Esses resultados sugerem que, individualmente, a HSD e o tamanho da ninhada causam hipertrofia no TAM, enquanto a interação entre essas duas variáveis causam hiperplasia no tecido. Em relação ao percentual de lipídios totais no TAM, observamos efeito da interação, com um aumento de ~85% no grupo STD-NR ($p < 0,01$) e um aumento de ~54% no grupo HSD-NC ($p < 0,05$), (em relação ao STD-NC). Para a concentração tecidual de TAG, observamos efeito do tamanho da ninhada ($p < 0,05$), HSD ($p < 0,01$) e interação ($p < 0,001$). O grupo STD-NR teve um aumento de ~70 % na concentração tecidual de TAG (em relação ao STD-NC), enquanto observamos uma redução de ~51% de TAG no grupo HSD-NR (quando comparado ao STD-NR). Diante do exposto, os resultados apresentados até o momento são insuficientes para concluir se a manipulação do tamanho das ninhadas seria capaz de prevenir o desenvolvimento da RI induzida pela HSD modulando a termogênese adaptativa em ratos jovens, uma vez que futuros experimentos, como a análise da expressão gênica e proteica de *Ucp1*, são necessários para comprovar nossa hipótese.

PALAVRAS-CHAVE: programação metabólica, carboidratos simples, tamanho da ninhada, sobrepeso neonatal, resistência à insulina, TAM.

ABSTRACT

Adaptive thermogenesis has been described as a modulator of metabolic diseases, being crucial to understand the mechanisms underlying the metabolic imprinting, due to litter size and insulin resistance (IR) by high-sugar diet (HSD) intake on the brown adipose tissue (BAT) in adulthood. Therefore, the aim of this work was to verify the effect of litter size and IR on metabolism and BAT of young rats. Male Wistar rats were randomly distributed after birth ($P = 0$) in control litters ($n = 8$ pups / mother; NC) and small litters ($n = 4$ pups / mother; NR). After weaning (21 days), the rats ($n = 23$) were randomly divided into four groups: animals fed a standard NC diet [STD-NC group ($n = 5$)]; animals fed with HSD from NC [HSD-NC group ($n = 6$)]; animals fed a standard NR diet [STD-NR group ($n = 6$)]; animals fed with NR HSD [HSD-NR group ($n = 6$)]. The standard diet group was fed with commercial chow diet (Nuvilab®) and the HSD group was fed a “palatable” diet based on condensed milk (79% CHO compared to % energy). The effects of HSD were evaluated for 8 weeks. After euthanasia, white [retroperitoneal, inguinal, epididymal] and brown adipose tissues and blood were collected. Biometric analyzes [body mass gain, Lee (IL) and Adiposity (IA) indexes], food consumption [coefficient of food efficiency (CEA) and weight gain coefficient for caloric consumption (CGPCC) were performed and were the glycometabolic parameters [glucose, insulin and HOMA-IR], and the serum lipid profile [total cholesterol and triacylglycerol (TAG) were evaluated. In addition, the relative weight of the BAT was calculated and part of the tissue was fixed with methanol-DMSO for histological analysis (number and area of the adipocytes). The other part was used to determine total fat (FOLCH method), followed by TAG measurement in the tissue. The effects of litter size and post-weaning diet were determined by ANOVA TWO-WAY, followed by Bonferroni post-test. The manipulation of the litter size was efficient in inducing neonatal overweight, with a body mass gain of ~19% in the NR group compared to the NC group ($P < .05$). CEA, CGPCC and glucose concentrations were influenced by HSD ($P < .05$), but without differences in the post-test. In addition, HSD ($P < .05$) increased IA ~69%, insulin concentration ~201% and HOMA-IR ~313% in the HSD-NC group (compared to the STD-NC group). Regarding the serum lipid profile, the size of the litters changed the total cholesterol concentrations ($P < 0.05$), but without differences in the post-test, while the HSD ($P < .01$) increased ~117% the concentration of TAG in the HSD-NC group. As for the relative weight of BAT, we observed an effect of litter size, HSD and interaction ($P < .05$), with an increase of ~56% in the HSD-NC group and a reduction of ~28% in the HSD-NR group, when

compared to the STD-NC and HSD-NC groups, respectively. For the number of adipocytes, we observed an effect of litter size, HSD and interaction ($P < .001$), with a reduction: ~30% in the STD-NR group; ~32% in the HSD-NC group [compared to the respective controls (STD-NC)] and increase: ~24% in the HSD-NR group; ~29% in the HSD-NR group (compared to the STD-NR and HSD-NC groups, respectively). For the area of adipocytes, we also observed effects of the three variables ($P < .001$), however, on the contrary, there was an increase: ~6% in the STD-NR group; ~35% in the HSD-NC group (compared to the STD-NC group)] and a reduction in the HSD-NR group, of ~31% when compared to the STD-NR group and of ~46% when compared to the HSD-NC group. These results suggest that, individually, HSD and litter size cause hypertrophy in BAT, while the interaction between these two variables causes hyperplasia in the tissue. Regarding the percentage of total lipids in BAT, we observed an interaction effect, with an increase of ~85% in the STD-NR group ($P < .01$) and an increase of ~54% in the HSD – NC group ($P < .05$), (in relation to the STD-NC). For the tissue concentration of TAG, we observed an effect of litter size ($P < .05$), HSD ($P < .01$) and interaction ($P < .001$), the STD-NR group had an increase of ~70% in tissue concentration of TAG (in relation to STD-NC), while we observed a ~51% reduction in TAG in the HSD-NR group (when compared to STD-NR). Given the above, the results presented so far are insufficient to conclude whether manipulation of the size of the litters would be able to prevent the development of IR induced by HSD by modulating adaptive thermogenesis in young rats, since future experiments, such as the analysis of gene and protein expression of *Ucp1*, are necessary to prove our hypothesis.

KEY WORDS: metabolic imprinting, high-sugar diet, litter size, neonatal overfeeding, insulin resistance, BAT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Fundamentação Científica	19
1.1.1 Histórico da programação metabólica.....	19
1.1.2. Programação metabólica e os seus mecanismos	20
1.1.3 Consumo de carboidrato simples na infância e desenvolvimento da resistência à insulina	21
1.1.4 O tamanho da ninhada e a sua relação com a programação metabólica	25
1.1.5 A termogênese adaptativa e sua relação com o metabolismo	27
1.1.6 Tamanho da ninhada, CHO simples e termogênese adaptativa	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1 Animais e condições experimentais.....	34
3.2 Análises da composição centesimal das diferentes dietas (padrão e HSD).....	36
3.2.1 Determinação de umidade.....	36
3.2.2 Determinação de cinzas.....	37
3.2.3 Determinação de lipídios.....	37
3.2.4 Determinação de proteínas	38
3.2.5 Determinação de fibras.....	39
3.2.6 Determinação de carboidratos	40
3.2.7 Determinação do valor energético em calorías(Kcal) das diferentes dietas.....	40
3.3 Parâmetros avaliados	41
3.3.1 Análise do consumo	41

3.3.2 Análises biométricas – adiposidade corporal	41
3.3.3 Parâmetros glicometabólicos.....	41
3.3.3.1 Glicose sérica.....	41
3.3.3.2 Insulina sérica	42
3.3.3.3 Índice de resistência à insulina (HOMA-IR).....	42
3.3.4 Perfil lipídico sérico	42
3.3.4.1 Dosagem de colesterol total.....	42
3.3.4.2 Dosagem de triacilglicerol (TAG).....	43
3.3.5 Desenvolvimento do TAM.....	43
3.3.5.1 Peso relativo do TAM.....	43
3.3.5.2 Confeção e análise das lâminas histológicas	44
3.3.5.3 Teor de lipídios totais e dosagem de TAG no TAM	44
3.4 Análise estatística	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Efeitos do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame	47
4.2 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a ingestão alimentar, CEA e CGPCC após 8 semanas.....	49
4.3 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos (ganho de massa corporal e grau de adiposidade) após 8 semanas	53
4.4 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos (glicose, insulina e HOMA-IR) após 8 semanas	56
4.5 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico sérico (colesterol total e TAG) após 8 semanas	60
4.6 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a termogênese adaptativa (peso relativo do TAM, número e tamanho de adipócitos multiloculares e teor de gordura total) após 8 semanas.....	63
4.6.1 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o peso relativo do TAM.....	63

4.6.2 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o número e tamanho de adipócitos multiloculares.....	64
4.6.3 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídios totais do TAM .	66
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
6. REFERÊNCIAS.....	72
7. APÊNDICES	80
APÊNDICE 01 – Padronização das dosagens bioquímicas em placa de ELISA: glicose, colesterol total e TAG.....	80
APÊNDICE 02 – Dados da ingestão em gramas dos animais por grupo, durante as 8 semanas de experimento	85
APÊNDICE 03 – Massa corporal e ganho de massa corporal dos animais por grupo, durante as 8 semanas de experimento.	88
APÊNDICE 04 – Dados da eutanásia (massa corporal final, comprimento naso-anal (C.N/A), tecido adiposo branco (TAB): inguinal (ING); epididimal (EPI); retroperitoneal (RETRO), tecido adiposo marrom (TAM) e fígado) dos animais por grupo, após as 8 semanas de experimento	91
APÊNDICE 05 – Componentes para o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento	94
APÊNDICE 06	97
APÊNDICE 07 – Componentes para o cálculo do ganho de massa corporal dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento.....	100
APÊNDICE 09 – Dosagem bioquímicas de glicose e insulina do soro dos animais e ÍNDICE HOMA-IR, por grupo, após as 8 semanas de experimento	108
APÊNDICE 11 – Dosagem bioquímica de triacilglicerol (TAG) do soro dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento.....	115
APÊNDICE 12 – Componentes para o cálculo do peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM) dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento	119
APÊNDICE 13 – Análise morfométrica de número dos adipócitos das lâminas histológicas coradas em HE dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento	122

APÊNDICE 15 – Determinação do teor de lipídios pelo método de FOLCH dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento.....	165
APÊNDICE 16– Dosagem bioquímica de triacilglicerol (TAG) do soro dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento.....	168
8.ANEXOS	172
ANEXO 1 – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	172
ANEXO 2 – Trabalho apresentado do CONAN IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição, Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019	174
ANEXO 3 – Trabalho publicado nos anais do IV CONAN Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição, Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019	176
ANEXO 4 – Trabalho apresentado no XXVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP – ENCONTRO DE SABERES, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019	180

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por programação metabólica as respostas adaptativas que descrevem as relações entre a experiência nutricional durante o início da vida e o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta ^(1, 2). De acordo com evidências epidemiológicas e experimentais, os efeitos nutricionais sobre o epigenoma ocorrem nas janelas críticas do desenvolvimento, que abrangem o crescimento fetal e o período neonatal, e durante as “transições da dieta”, que ocorrem ao longo da vida adulta, como, por exemplo, ingestão excessiva de lipídios ou restrição calórica crônica ⁽³⁾.

A prevalência da obesidade na infância tem aumentado drasticamente nas últimas décadas. Um grande contribuinte para este aumento na prevalência da obesidade e sobrepeso são os maus hábitos alimentares infanto-juvenis, como o consumo excessivo de carboidratos simples em alimentos ultra processados e no adoçamento de alimentos, contribuindo para a obesidade e resistência à insulina (RI) na infância e adolescência ^(4, 5). O consumo excessivo de carboidratos simples durante os estágios iniciais do desenvolvimento afeta as respostas adaptativas que descrevem as relações entre as primeiras experiências nutricionais e o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta, caracterizando uma programação metabólica ^(2, 3).

Notavelmente, os primeiros anos de vida são um período crucial de desenvolvimento e os carboidratos da dieta (lactose, amido e sacarose) são uma das principais fontes de energia diária ⁽⁶⁾. No entanto, uma ingestão excessiva de carboidratos simples na infância resulta em hiperinsulinemia durante a puberdade e pode modular vias celulares que controlam a lipogênese, com efeitos adversos na composição corporal em jovens adultos ⁽⁷⁻⁹⁾. Estudos recentes sugerem que o tecido adiposo marrom (TAM) desempenha um papel no metabolismo de energia e glicose em humanos ⁽¹⁰⁾. E ainda, a ativação do TAM está relacionada à redução de armazenamento de gordura, prevenção de ganho de massa gorda corporal e melhora da RI ⁽¹¹⁾.

O modelo experimental de manipulação do tamanho das ninhadas resulta em animais significativamente mais pesados e com um perfil distinto de inflamação e micróglia ^(12, 13). A manipulação das ninhadas ocorre durante uma janela de oportunidade, na fase crítica do período neonatal (lactação), podendo ter efeitos sobre a programação metabólica ^(14, 15). Além disso, o

ganho de peso rápido durante a infância está consistentemente associado com risco aumentado para o desenvolvimento da obesidade na puberdade ⁽¹⁶⁾.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a dieta *high-sugar* (HSD) resulta em RI após 8 semanas de consumo ⁽¹⁷⁾. Além disso, a mesma dieta aumenta o tamanho do TAM e a expressão do RNAm e da proteína *Ucp1* após 8 semanas ⁽¹⁸⁾. Entretanto, o efeito da ninhada reduzida associado à HSD após o desmame sobre o TAM e o seu impacto na RI permanece por ser elucidado.

Sendo assim, o modelo experimental proposto neste trabalho visou abordar duas janelas de oportunidade da programação metabólica: o período neonatal (manipulação do tamanho das ninhadas) e a transição de dieta (HSD pós-desmame), sobre o desenvolvimento da RI na idade adulta. Considerando que a vulnerabilidade associada a essas duas variáveis podem predispor a alterações metabólicas permanentes, a pergunta deste trabalho foi a seguinte: a manipulação do tamanho das ninhadas seria capaz de interferir no desenvolvimento da RI induzida pela HSD, modulando a termogênese adaptativa em ratos jovens?

1.1 Fundamentação Científica

1.1.1 Histórico da programação metabólica

No início da década de 90, um estudo publicado por Barker e cols. ⁽¹⁹⁾ introduziu um conceito inovador, ao constatarem que as condições ambientais durante a vida fetal e a infância pareciam estar determinando a sobrevivência de cada geração ⁽¹⁹⁾. No ano de 1993, Barker e cols. e Vagg e cols. ^(20, 21), ao estudarem uma população de Hertfordshire (Reino Unido), observaram relação entre o baixo peso ao nascer e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta. Dessa forma, introduziram o conceito a respeito da etiologia das doenças metabólicas: diferentes alterações associadas à síndrome metabólica teriam origem na vida intrauterina ^(20, 21). Barker e cols. ⁽¹⁹⁾ sugeriam que o período de desenvolvimento embrionário caracteriza-se por grande plasticidade, tornando-o uma janela de sensibilidade especial, em que o feto se encontra mais suscetível às alterações que ocorrem no ambiente intrauterino, sendo capaz de causar alterações permanentes com consequências na vida adulta. Esse fenômeno hoje é denominado programação metabólica ⁽¹⁹⁾. A partir desses estudos e da hipótese da “programação fetal”, passou-se a considerar a importância do ambiente intrauterino na origem das doenças crônicas na vida adulta ⁽²²⁾.

Nesse contexto, alguns períodos históricos foram estudados e se tornaram de extrema importância para consolidar esse novo conceito, dentre eles a “fome holandesa”. Em 1970, Revelli e cols. ⁽²³⁾ realizaram um estudo retrospectivo em uma população de 300.000 homens jovens filhos de mulheres expostas a um período de escassez alimentar causada pela “fome holandesa”, que ocorreu entre novembro de 1944 e maio de 1945, pelo embargo de alimentos imposto pela Alemanha a parte ocidental da Holanda ⁽²³⁾. Os homens que tiveram as mães expostas a subnutrição nos dois primeiros trimestres de gestação apresentaram alterações no metabolismo de lipídios, e os homens que tiveram as mães expostas a subnutrição durante o último trimestre de gestação apresentaram distúrbios metabólicos de insulina e glicose. Estes resultados indicaram que o período gestacional da mãe durante a subnutrição influenciou no fenótipo metabólico dos filhos ⁽²³⁾.

Com base nesse e em outros estudos epidemiológicos ^(24, 25), Barker e cols. ⁽¹⁹⁾ estabeleceram a “hipótese do fenótipo poupador”, segundo a qual a subnutrição no período embrionário causaria adaptações no metabolismo do feto que permitiriam a sua sobrevivência em um ambiente de

privação alimentar ⁽¹⁹⁾. Entretanto, esse processo adaptativo levaria ao favorecimento metabólico de órgãos nobres em detrimento de outros, conferindo alterações persistentes no crescimento e função dos tecidos ⁽¹⁹⁾. No entanto, apesar de ter constituído um capítulo importante no estudo das associações entre a vida inicial e o risco para doenças crônicas, a hipótese de Barker não explica acertos metabólicos persistentes que acontecem em resposta a variações do ambiente fetal e que não são imediatamente necessárias para a sobrevivência do indivíduo ⁽²⁶⁾.

Na mesma época, alguns autores demonstraram, através de estudos clínicos, a influência dos diferentes tipos de dieta láctea sobre o crescimento somático, imune e o desenvolvimento neuropsicomotor de crianças ^(27, 28). Dentro desse contexto, Lucas e cols.⁽²⁷⁾ usaram o termo programação metabólica referindo-se ao conceito no qual um estímulo ocorrido em um período crítico ou sensível pode ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função de um organismo ⁽²⁷⁾. Este conceito ainda é utilizado por autores em estudos recentes ^(29, 30).

1.1.2. Programação metabólica e os seus mecanismos

Atualmente, entende-se por programação metabólica as respostas adaptativas que descrevem as relações entre a experiência nutricional durante o início da vida e o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta ^(1, 2). De acordo com evidências epidemiológicas e experimentais, os efeitos nutricionais sobre o epigenoma ocorrem nas janelas críticas do desenvolvimento, que abrangem o crescimento fetal e o período neonatal, e durante as “transições da dieta”, que ocorrem ao longo da vida adulta, como, por exemplo, ingestão excessiva de lipídios ou restrição calórica crônica ⁽³⁾. O mecanismo para explicar o desenvolvimento da programação metabólica relaciona-se a modificações epigenéticas, que regulam os padrões de expressão gênica. Para as alterações epigenéticas, é sugerido que elas podem ser estabelecidas durante o período fetal e em estágios iniciais da vida pós-natal ⁽³¹⁾, apresentando plasticidade no desenvolvimento em resposta ao período pré-natal, sendo mantidas ao longo da vida ^(32, 33).

Modificações epigenéticas referem-se às mudanças na estrutura do DNA, sem alterar a sequência de bases nitrogenadas, que possuem um papel importante na regulação da cromatina, bem como na expressão gênica da diferenciação e desenvolvimento celular ^(32, 34). Essas modificações incluem a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNA não-codificantes ⁽³⁵⁾. As alterações epigenéticas do DNA de um indivíduo são herdadas e

modificáveis, de modo que podem ser passados de pais para gerações futuras, ou podem ser modificados em resposta a estímulos ambientais ⁽³³⁾. Estas alterações foram observadas em associação com condições patológicas, oferecendo evidências dos efeitos deletérios que ocorrem durante o desenvolvimento fetal advindo dessas alterações e que podem permanecer até a vida adulta.

Na gestação, as dezesseis semanas iniciais compreendem a multiplicação celular, na qual ocorre, simultaneamente, os processos de hiperplasia e hipertrofia celular ⁽³⁶⁾. A taxa de proliferação celular é diretamente dependente da disponibilidade de nutrientes e pode ser indiretamente dependente do estado nutricional geral do organismo. Limitações ou excessos de nutrientes durante períodos críticos de crescimento hiperplásico, que afetam as taxas de divisão celular, podem levar a mudanças permanentes no número de células, independentemente da disponibilidade posterior de nutrientes ⁽²⁾. Portanto, a programação metabólica durante os períodos de plasticidade neural, como a gestação, infância e adolescência, pode desencadear desordens fisiológicas, levando a comorbidades associadas à obesidade, como síndrome metabólica e doenças cardiovasculares na idade adulta ^(27, 37-42). Dessa forma, estudos experimentais têm investigado o efeito da dieta da mãe nos períodos críticos do desenvolvimento, como gestação e lactação, submetendo-as aos efeitos da desnutrição, como na restrição calórica ⁽⁴³⁾ e aos efeitos da obesidade, associada a supernutrição durante o período de amamentação em decorrência da manipulação do tamanho da ninhada ⁽⁴⁴⁾. Para entender melhor o papel da saúde materna e nutrição nos estágios iniciais do desenvolvimento fetal e progressão de doenças na infância e na idade adulta, é necessário identificar os papéis fisiológicos e / ou patológicos de nutrientes específicos, bem como possíveis intervenções dietéticas ainda na vida pós-natal, e como estes poderiam modular o risco de doença, através de alteração do epigenoma.

1.1.3 Consumo de carboidrato simples na infância e desenvolvimento da resistência à insulina

A nutrição adequada após o desmame é essencial para crescimento e desenvolvimento das crianças e os carboidratos simples são a principal fonte de energia durante esse período. Considerando que os primeiros anos de vida são um período de crescimento muito rápido, a nutrição adequada é essencial durante esta fase, uma vez que crianças que não recebem energia e nutrientes suficientes não sustentarão o crescimento e desenvolvimento esperado ⁽⁴⁵⁾. Os

carboidratos digeríveis, principalmente a lactose, o amido e sacarose, são uma das principais fontes de energia da dieta nesse período crucial⁽⁴⁵⁾. No entanto, a ingestão excessiva de carboidratos simples pode alterar a expressão de genes que atuam em redes relacionadas à diferenciação celular e metabolismo de lipídios no tecido adiposo, aumentando a prevalência de doenças cardiovasculares e metabólicas após a puberdade ⁽⁴⁵⁾.

Dentro desse contexto, é importante destacar que o novo Guia Alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos, do ano de 2019, apresenta que o desmame precoce e a alimentação de baixa qualidade e pouco variada ocasionam diferentes formas de má nutrição (como o excesso de peso e obesidade), prejudicando o desenvolvimento infantil ⁽⁴⁶⁾. E ainda, destacam que não oferecer açúcar nem preparações ou produtos que contenham açúcar à criança até 2 anos de idade é um dos 12 passos para uma alimentação saudável ⁽⁴⁶⁾.

A crescente preocupação com a tentativa de controlar o excessivo ganho de peso nas populações ocidentais, aumentando o gasto de energia e reduzindo a ingestão calórica dos indivíduos, contribuiu para a ocorrência de mudanças no comportamento nutricional, resultando na substituição da gordura saturada por carboidratos com alto índice glicêmico, que, por sua vez, contribuem para o aumento geral da incidência de obesidade e diabetes mellitus tipo II, mesmo em crianças ⁽⁴⁷⁾. Além disso, o consumo excessivo de dietas ricas em carboidratos simples modula as vias celulares que controlam a lipogênese, levando a maior adiposidade e, conseqüentemente, RI ⁽⁶⁾.

Dados do último VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) indicaram que a taxa de obesidade no país passou de 11,8% para 19,8%, entre 2006 e 2018, com um aumento de 67,8%. A obesidade, excesso de peso e diabetes evoluíram de forma desfavorável e significativa em todo o período ⁽⁴⁸⁾. Outro dado desse cenário é o aumento do sobrepeso infantil: estima-se que 7,3% das crianças menores de cinco anos estão acima do peso, sendo as meninas as mais afetadas, 7,7% ⁽⁴⁹⁾.

Embora a obesidade seja considerada uma desordem com etiologia multifatorial e está frequentemente associada a uma dieta rica em gorduras, o consumo excessivo de açúcar no início da vida tem sido descrito como um modulador lipogênico, afetando períodos críticos da infância e promovendo obesidade e RI em adultos jovens ^(7, 50).

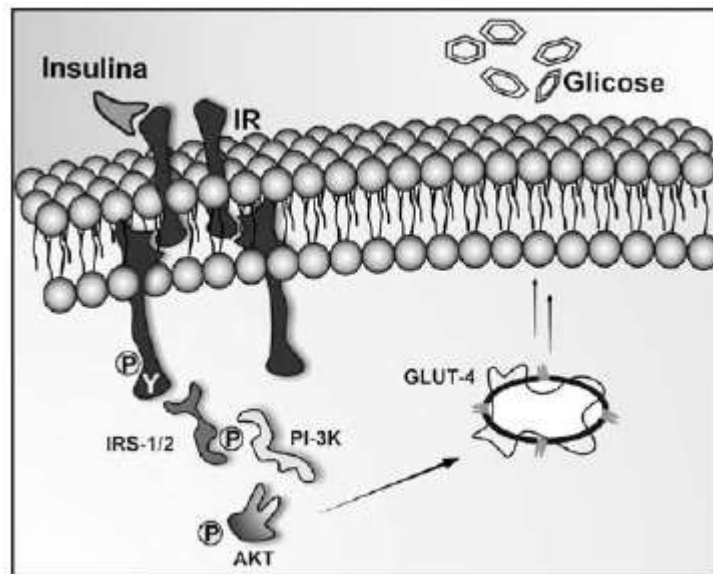
A insulina é um hormônio anabólico, secretado pelas células β -pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose após as refeições ⁽⁵¹⁾. Ela regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose e aumentando a sua captação periférica, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Além disso, a insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica ⁽⁵¹⁾. A RI inicia-se alguns anos antes do aparecimento dos sintomas, pois ocorre hiperinsulinemia compensatória (aumento da secreção da insulina), que consegue induzir tanto a captação da glicose quanto a supressão da neoglicogênese, mantendo as concentrações glicêmicas dentro dos limites normais. Posteriormente aparecem as disfunções nas células β , as quais não conseguem mais produzir insulina em quantidade suficiente, o que resulta em hiperglicemia, levando à instalação da diabetes mellitus tipo II ⁽⁵²⁾

A glicose é uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática, e o seu transporte é realizado através de difusão facilitada, portanto, a favor de seu gradiente de concentração, e dependente da presença de proteínas transportadoras (denominadas GLUT) na superfície de todas as células ⁽⁵³⁾. Em um funcionamento normal do metabolismo humano, a glicose precisa ser transportada da corrente sanguínea para o citosol, uma vez que a glicólise ocorre no citosol. Existem 12 isoformas de GLUT descritas, sendo as quatro isoformas a seguir as mais estudadas: o GLUT-1 (expresso com maior prevalência nas hemácias e nas células do encéfalo), o GLUT-2 (expresso nas células do fígado e rins), o GLUT-3 (expresso nos neurônios) e o GLUT-4 (expresso nas células musculares esqueléticas e cardíacas), sendo este último dependente de insulina ⁽⁵⁴⁾.

De forma sucinta, sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação. A PI3q é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina. A PI3q fosforila o fosfatidilinositol na membrana, levando ao ancoramento da quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PKB) e a proteína quinase B (Akt). Conseqüentemente, ocorre a fosforilação, permitindo o transporte de

glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular. Portanto, a ativação da Akt resulta na translocação do GLUT-4 para a membrana, permitindo a entrada de glicose por difusão facilitada ^(51, 54, 55). O esquema resumido das etapas de sinalização da insulina envolvida na captação de glicose encontra-se apresentado na Figura 01, a seguir:

Figura 01- Via de sinalização da insulina na captação de glicose por tecidos periféricos dependentes de insulina.



A insulina, ao se ligar ao seu receptor de membrana, promove a auto fosforilação da subunidade beta em resíduos de tirosina e desencadeia uma cascata de sinalização que culminam para a translocação de GLUT-4 do interior das vesículas para a membrana celular, resultando na captação de glicose sanguínea para o interior da célula de tecidos dependentes de insulina.

Fonte: Adaptado de ⁽⁵⁵⁾.

Após insulina desencadear a translocação dos transportadores GLUT-4 na membrana plasmática e permitir a captação de glicose do sangue, a glicemia diminui e, conseqüentemente, um dos estímulos para a secreção de insulina reduz, o que resulta na diminuição dos níveis de insulina no sangue. Dessa forma, o GLUT-4 é ressequestrado em vesículas por endocitose. O preciso mecanismo envolvido na causa da RI ainda não é totalmente conhecido. Contudo, muitos estudos têm demonstrado que alterações moleculares na via de sinalização da insulina, principal responsável pela ativação da translocação do GLUT-4 à membrana plasmática, são

determinantes no estado de RI em tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o tecido adiposo ^(56, 57). Na ausência de insulina, a translocação de GLUT-4 até as membranas, assim como outros processos normalmente estimulados pela insulina, estão inibidos. Dessa forma, a deficiência de insulina impede a captação de glicose por GLUT-4 e, como consequência, as células musculares esqueléticas e cardíacas são privadas de glicose, enquanto ela está elevada na corrente sanguínea ⁽⁵⁴⁾.

Na obesidade ocorrem alterações em diversos pontos da via de transdução do sinal da insulina, com redução na concentração e atividade quinase do IR, na concentração e fosforilação do IRS-1 e IRS-2, na atividade da PI3q, na translocação dos GLUTs e na atividade das enzimas intracelulares. Isso atenua, conseqüentemente, a captação de glicose nos tecidos insulino-dependentes ^(58, 59). Evidências científicas apontam uma relação direta entre os ácidos graxos livres (AGLs) e RI, que pode ser decorrente do acúmulo de TAG e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e no fígado ^(60, 61). O aumento desses metabólitos provenientes da oxidação das gorduras no músculo é capaz de provocar a ativação da PKC e/ou da quinase IκB, e também causar fosforilação em resíduos de serina do IR e de seus substratos, sendo estes importantes mecanismos que explicam a relação entre acúmulo de gordura tecidual e RI ⁽⁶⁰⁾. Contudo, nos últimos anos, vários fatores regulatórios produzidos por adipócitos (adipocinas) ou macrófagos na condição de obesidade podem provocar a ativação de serina-quinases, especialmente a complexo IκB quinase (IκK), quinase c-Jun n-terminal (JNK) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), capazes de fosforilar moléculas em resíduos de serina ou causar nitrosilação em proteínas como o IRS-1 e IRS-2, inibindo, assim, a sinalização da insulina ⁽⁶²⁾.

1.1.4 O tamanho da ninhada e a sua relação com a programação metabólica

Após o nascimento, mãe e prole estão ligadas exclusivamente via leite materno e o início da vida e da experiência nutricional têm conseqüências importantes sobre o crescimento, desenvolvimento e saúde da prole ⁽⁶³⁾. Como tal, a lactação é considerada uma janela crítica de desenvolvimento, durante a qual as mães, via condições maternas nutricionais e metabólicas, podem programar a homeostase energética da prole, predispondo-a à obesidade e comorbidades correlacionadas ⁽⁶⁴⁾.

A manipulação do tamanho da ninhada tem sido usada para estudar os efeitos, em longo prazo, da supernutrição e/ ou subnutrição durante o período de lactação. Os filhotes são redistribuídos logo após o nascimento para ninhadas pequenas ou grandes, e este modelo forneceu algumas das primeiras evidências da influência de uma janela crítica do desenvolvimento (período neonatal) na modulação da composição corporal durante o período de lactação ⁽²⁾. A literatura relata que a supernutrição durante a vida neonatal leva à hipermetilação no promotor do receptor de insulina hipotalâmico, envolvido na regulação da ingestão e metabolismo alimentar ⁽⁶⁵⁾. Além do mais, este modelo experimental resulta em animais significativamente mais pesados e com um perfil distinto de inflamação e micróglia ^(12,13). Por outro lado, vale destacar que alguns autores demonstraram um efeito protetor da redução do tamanho das ninhadas na prevenção da obesidade e diabetes na vida adulta ^(66,67), sendo, portanto, os achados controversos.

Está bem estabelecido que o leite materno exerce um efeito positivo na saúde, por prevenir a manifestação de doenças crônicas, como o sobrepeso/ obesidade e diabetes mellitus tipo II ⁽⁶⁸⁾ na vida adulta. O efeito protetor do leite humano tem sido associado às suas propriedades anti-infecciosas, representadas, por exemplo, pelas imunoglobulinas, IgA, IgM, IgD, IgE, IgG, lisozima, lactoferrina, componentes do sistema do complemento (C3, C4), peptídeos bioativos, oligossacarídeos e lipídios, e pelo fato de o seu emprego evitar a exposição precoce a outros agentes etiológicos que podem estar presentes em outros tipos de leite, como, por exemplo, a *E. coli* ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

As crianças que recebem leite materno têm menor risco de apresentarem sobrepeso ao longo da infância, pois o leite materno resulta em maior saciedade do que as fórmulas infantis, evitando o ganho de peso excessivo durante a infância, adolescência e, posteriormente, na vida adulta ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. A proteção do período de lactação contra o excesso de peso, obesidade e alterações metabólicas está associada aos constituintes do leite materno. Além disso, o leite materno contém quantidade suficiente de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) para garantir o número adequado de receptores insulínicos no cérebro da criança, necessários para manter o metabolismo glicêmico normal ⁽⁷⁵⁾. Observa-se que os fosfolipídios das membranas de crianças amamentadas apresentam quantidade significativamente maior do ácido graxo docosahexaenoico (DHA) e outros PUFA do que aquelas não amamentadas ao seio. Acredita-se que baixas concentrações de DHA e PUFA podem resultar em RI ⁽⁷⁶⁾. Altas concentrações basal e pós-prandial de insulina e neurotensina (peptídeo que inibe a secreção de insulina e

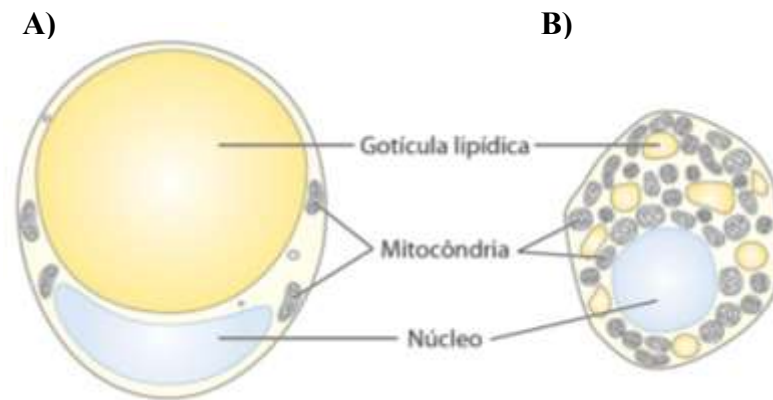
estimula a secreção de glucagon) têm sido relatados em lactentes alimentados com fórmulas em relação àqueles amamentados ao seio ⁽⁷⁷⁾. Tais diferenças podem levar ao desenvolvimento de RI e diabetes mellitus tipo II na vida adulta ⁽⁷⁸⁾.

A modulação da dieta durante os estágios críticos do período de desenvolvimento também pode afetar a regulação epigenética de genes envolvidos na ingestão de alimentos, peso corporal e homeostasia energética, com consequente risco de desenvolvimento obesidade e RI. Uma programação inadequada pode comprometer a correta estocagem e utilização das reservas energéticas, colaborando para o acúmulo de peso e doenças relacionadas com o passar dos anos ^(79, 80).

1.1.5 A termogênese adaptativa e sua relação com o metabolismo

Existem dois tipos de tecido adiposo: o branco e o marrom, com funções bastante distintas. Compreender essas particularidades é fundamental para o entendimento desse trabalho. Nos vertebrados pequenos e nos animais hibernantes, uma proporção significativa do tecido adiposo é formada pelo tecido adiposo marrom, o TAM, que é distinguido do tecido adiposo branco, o TAB, por seus adipócitos menores (20 a 40 µm de diâmetro) com formato diferente (poligonais, em vez de redondos) ⁽⁸¹⁾. As diferenças apresentadas entre os adipócitos do TAB e no TAM são exemplificadas pela Figura 02, a seguir:

Figura 02- Diferença entre o TAB e o TAM, representadas pelos seus respectivos adipócitos.



A) Adipócito branco, no qual temos uma gotícula lipídica unilocular, apresentando um diâmetro de 30-70 μ m, em formato esférico totalmente preenchida com uma única e grande gota lipídica de TAG, a qual constitui 65% da massa celular e comprime as mitocôndrias e o núcleo em uma fina camada contra a membrana plasmática; **B)** Adipócito marrom, no qual temos várias gotículas lipídicas multiloculares, apresentando um diâmetro de 20-40 μ m, em formato poligonais, armazenando TAG em suas várias gotículas de lipídeo menores; apresentam, ainda, um número maior de mitocôndrias (comparado ao adipócito branco) que estão dispersas junto com as gotículas lipídicas no citoplasma, apresentando o núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. TAG, triacilglicerol.

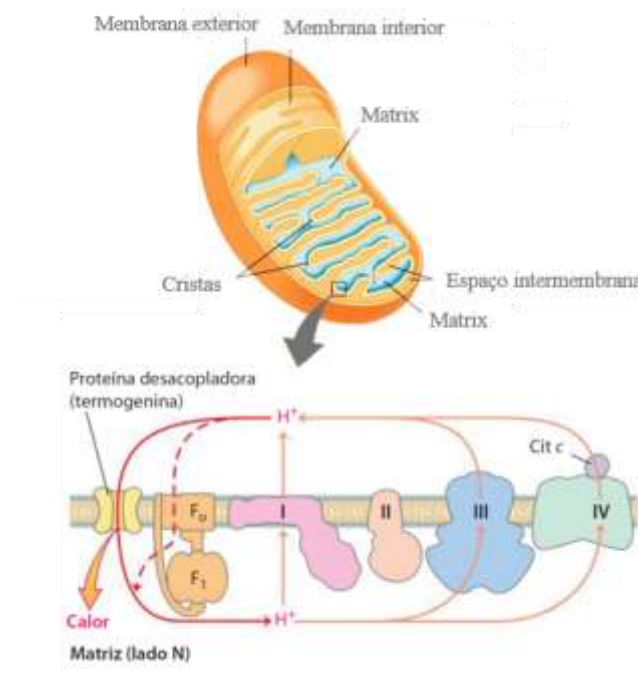
Fonte: Adaptado de ⁽⁵⁴⁾.

No feto humano, a diferenciação dos fibroblastos “pré-adipócitos” em TAM começa na vigésima semana da gestação e o TAM representa, no nascimento, de 1 a 5% da massa corporal total. Os depósitos de gordura marrom estão localizados onde o calor gerado pela termogênese garante que os tecidos vitais, vasos sanguíneos para a cabeça, principais vasos sanguíneos abdominais, e as vísceras, incluindo o pâncreas, as glândulas suprarrenais e os rins, não tenham sua temperatura reduzida quando o recém-nascido entra em contato com uma temperatura ambiente mais baixa ⁽⁵⁴⁾. Após o nascimento, o TAB começa a se desenvolver e o TAM começa a desaparecer. Os humanos adultos jovens têm depósitos muito diminuídos de TAM, em torno de 3% de todo o tecido adiposo nos machos a 7% nas fêmeas, perfazendo menos de 0,1% da massa corporal ⁽⁵⁴⁾.

Como os adipócitos brancos, os marrons armazenam triacilgliceróis (TAG), mas em várias gotículas de lipídeo menores por célula, em vez de uma única gota central. As células do TAM têm mais mitocôndrias e um suprimento mais rico de capilares e de inervação do que as células do TAB, e sua característica cor marrom é conferida pelos citocromos das mitocôndrias e pela hemoglobina dos capilares ⁽⁵⁴⁾. Uma característica singular dos adipócitos marrons é a alta

expressão do gene *Ucp1*, que codifica a proteína desacopladora 1, também conhecida por termogenina (Figura 03). A termogenina é expressa nas mitocôndrias do TAM, na qual desacopla a respiração celular para produzir calor ^(82, 83).

Figura 03- Geração de calor por mitocôndrias desacopladas.



A proteína desacopladora 1 (termogenina) nas mitocôndrias do TAM, ao fornecer uma via alternativa para os prótons reentrem na matriz mitocondrial, faz com que a energia conservada pelo bombeamento de prótons seja dissipada como calor.

TAM, tecido adiposo marrom.

Fonte: Adaptado de ⁽⁵⁴⁾.

Nos adipócitos marrons, os ácidos graxos armazenados nas gotículas de gordura são liberados, entram nas mitocôndrias e sofrem conversão em acetil-CoA pela β -oxidação e pelo ciclo do ácido cítrico. O $FADH_2$ e o $NADH$ reduzidos gerados passam seus elétrons pela cadeia respiratória para o oxigênio molecular. No TAB, os prótons bombeados para fora da mitocôndria durante a transferência de elétrons reentram na matriz por meio da ATP-sintase, e a energia dessa transferência é conservada na síntese de ATP. No TAM, a termogenina proporciona uma via alternativa para a entrada dos prótons na matriz, que ignora a ATP-sintase; a energia do gradiente de prótons é, assim, dissipada na forma de calor ⁽⁵⁴⁾ (Figura 03). Dessa

forma, a atividade dessa proteína é responsável por uma das principais funções do TAM: a termogênese.

A principal função do TAM em dissipar a energia sob a forma de calor, a termogênese, é um mecanismo fundamental para a homeostase do organismo. Ainda, ela tem sido descrita como um fator modulador de doenças metabólicas, uma vez que aumenta o gasto de energia e melhora resistência à obesidade ^(10, 84). A literatura relata que a exposição ao frio pode induzir a termogênese ⁽⁸⁵⁾ e a dieta também pode ativar o TAM de maneira semelhante (termogênese induzida pela dieta) ⁽⁸⁶⁾.

Dentro desse contexto, um estudo recente sugere que o TAM desempenha um papel no metabolismo de energia e glicose em humanos, podendo exercer um efeito contra o acúmulo de gordura corporal ⁽¹⁰⁾. E ainda, a termogênese adaptativa é descrita de suma importância para o metabolismo energético, pois induz o aumento da energia gasta, o que colabora para a redução da adiposidade e melhora na RI ^(11, 14). Isso pode estar relacionado ao fato de que os adipócitos do TAM produzem calor tanto pela oxidação de seus próprios ácidos graxos quanto dos ácidos graxos e glicose circulantes ⁽⁵⁴⁾. Nessa perspectiva, é de suma importância nesse trabalho, compreender o efeito da ninhada reduzida associada à HSD após o desmame, sobre o metabolismo do TAM.

1.1.6 Tamanho da ninhada, CHO simples e termogênese adaptativa

A lactação é considerada uma janela crítica do desenvolvimento, durante a qual as condições nutricionais e metabólicas maternas podem programar o sistema de homeostase energética da prole e alterar sua função mais tarde na vida, predispondo à obesidade e comorbidades correlatas ^(64, 87). Nesse âmbito, a redução do tamanho da ninhada durante o período pós-natal é realizada com o intuito de melhor compreender os distúrbios metabólicos que podem estar associados a essa manipulação.

Dentro desse contexto, na literatura encontramos efeitos negativos e positivos, associados a manipulação do tamanho da ninhada em relação ao metabolismo dos animais. Exemplificando os efeitos negativos, alguns autores sugerem uma piora no surgimento de doenças devido ao sobrepeso gerado nas ninhadas reduzidas ^(88, 89), e ainda Cancian ⁽⁹⁰⁾ demonstrou que a redução artificial do tamanho natural da ninhada de ratos (três ou quatro filhotes por mãe) expõe os

filhotes à superalimentação precoce, causando o aparecimento de obesidade prematura que é mantida ao longo da vida ⁽⁹⁰⁾. Além disso, Clarke e cols. e Stefanini e cols. ^(12, 13) sugerem que o modelo experimental de manipulação do tamanho das ninhadas resulta em animais significativamente mais pesados e com um perfil distinto de inflamação e micrógliã ^(12, 13). Sendo importante destacar que, alguns outros estudos mostraram um efeito protetor da manipulação do tamanho das ninhadas contra obesidade e diabetes na vida adulta ^(12, 91).

Sob o mesmo ponto de vista, Xiao e cols. ⁽⁹²⁾ investigaram o efeito, em longo prazo, do excesso de ganho de peso precoce, através da redução do tamanho das ninhadas no período da lactação, trabalhando com ninhada reduzida (três filhotes por mãe) e ninhada normal (oito filhotes por mãe), na regulação do peso corporal e sua relação com a termogênese do TAM ⁽⁹²⁾. Os autores realizaram a análise da expressão gênica, morfológica e funcional do TAM dos animais adultos (8 semanas), sob condições ambientais ou frias e observaram que os animais da ninhada reduzida comparados aos animais da ninhada normal, apresentaram ganho de peso excessivo pós-desmame, e, quando adultos (8 semanas), tiveram a capacidade termogênica reduzida, com redução na expressão de *Ucp1*. Quando expostos ao frio, o TAM destes animais demonstrou menor responsividade ao frio, sugerindo que o ganho excessivo de peso pós-natal resulta em anormalidades na termogênese do TAM e na termogênese adaptativa (induzida nesse estudo pelo frio). Isso provavelmente aumenta a suscetibilidade à obesidade na idade adulta ⁽⁹²⁾.

Em um outro estudo, De Almeida e cols. ⁽⁹³⁾ observaram que a programação precoce da supernutrição da obesidade altera a estrutura do TAM interescapular na idade adulta, levando à hipoatividade local da termogênese, que pode contribuir para a obesidade em adultos ⁽⁹³⁾. Esses estudos associam, a menor atividade do TAM em desempenhar a sua função de termogênese nos animais de ninhadas reduzidas.

A literatura sugere que a dieta pode induzir a termogênese adaptativa, estimulando a ativação do TAM, o que aumenta a massa do tecido ^(94, 95), em um aparente esforço fisiológico para conter ganho de peso e a obesidade ⁽⁹⁶⁾. Dietas altamente palatáveis, bem como as dietas com altos níveis de açúcar, são usadas como método para aumentar a TAM e, conseqüentemente, a expressão de *Ucp1* ⁽⁸⁵⁾. Dados do nosso grupo demonstram que a HSD aumenta o tamanho do TAM e a expressão do RNAm e da proteína da *Ucp1* após 8 semanas ⁽¹⁸⁾. Entretanto, o efeito da ninhada reduzida associado à HSD após o desmame sobre o TAM e a termogênese

adaptativa, bem como o seu impacto no metabolismo na vida adulta permanecem por ser elucidado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da programação metabólica induzida pelo tamanho da ninhada e a resistência à insulina (RI) sobre o tecido adiposo marrom (TAM) em ratos jovens.

2.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer o modelo experimental de ninhada reduzida e de resistência à insulina;
2. Determinar a composição centesimal das diferentes dietas (padrão e rica em carboidratos simples - HSD);
3. Avaliar os efeitos da ninhada reduzida e da HSD sobre a ingestão calórica e a eficiência alimentar após 8 semanas;
4. Avaliar os efeitos da ninhada reduzida e da HSD sobre os parâmetros biométricos (ganho de massa corporal e grau de adiposidade) após 8 semanas;
5. Avaliar os efeitos da ninhada reduzida e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos (glicose, insulina e HOMA-IR) após 8 semanas;
6. Avaliar os efeitos da ninhada reduzida e da HSD sobre o perfil lipídico sérico (colesterol total e triacilglicerol -TAG) após 8 semanas;
7. Avaliar os efeitos da ninhada reduzida e da HSD sobre os parâmetros do TAM (peso relativo, número e área dos adipócitos multiloculares e teor de gordura total).

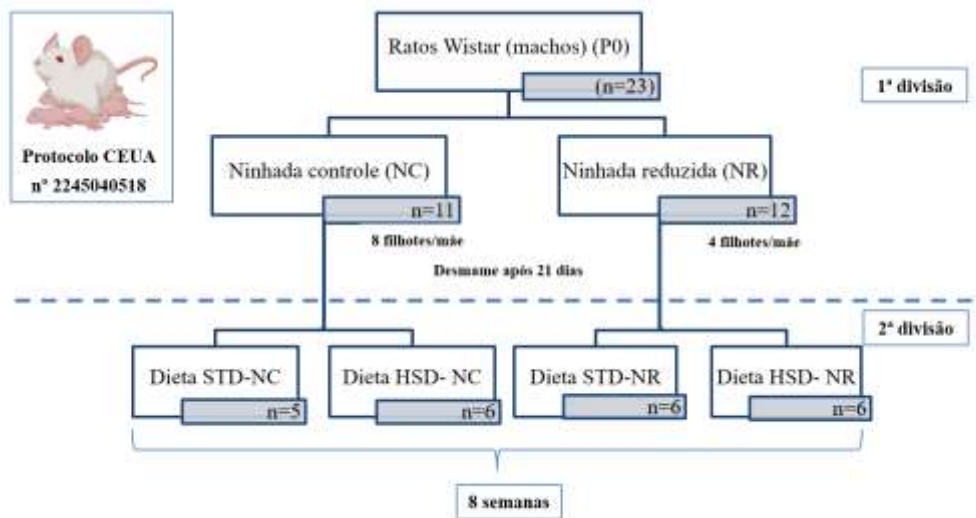
3. METODOLOGIA

3.1 Animais e condições experimentais

Todos os procedimentos experimentais desse estudo receberam aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com o número de protocolo 2245040518, presente no Anexo I.

Foram utilizados 23 ratos machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. A manipulação do tamanho das ninhadas foi estabelecida conforme previamente publicado ⁽⁹⁷⁾. Após o nascimento, os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em duas ninhadas: 8 animais por ninhada, caracterizando a ninhada controle (NC, n=11) e 4 animais por ninhada, caracterizando a ninhada reduzida (NR, n=12) ⁽⁹⁷⁾. Após o desmame (21 dias), os animais (n=23) foram novamente divididos em quatro grupos experimentais: Grupo i (n=5), animais alimentados com dieta padrão da NC (STD-NC); Grupo ii (n=6), animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (HSD) da NC (HSD-NC); Grupo iii (n=6), animais alimentados com dieta padrão da NR (STD-NR); Grupo iiiii (n=6), animais alimentados com HSD da NR (HSD-NR). O delineamento experimental encontra-se na Figura 04, a seguir.

Figura 04 - Delineamento experimental do estudo.



A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado⁽⁹⁷⁾. Os animais foram divididos em duas ninhadas: a NC tinha 8 filhotes por mãe (n=11) e a NR 4 filhotes por mãe (n=12). Após o desmame (21 dias), os animais foram novamente divididos em quatro grupos experimentais: Grupo i (n=5), animais alimentados com dieta padrão da NC (STD-NC); Grupo ii (n=6), animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (HSD) da NC (HSD-NC); Grupo iii (n=6), animais alimentados com dieta padrão da NR (STD-NR); Grupo iii (n=6), animais alimentados com HSD da NR (HSD-NR).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; STD: dieta padrão; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

Os animais foram alimentados *ad libitum*. O grupo submetido à dieta padrão (STD) foi alimentado com ração comercial Nuvilab® (Nuvital-CR, Colombo, Brasil) e o grupo HSD foi alimentado por uma dieta “palatável” a base de leite condensado, constituída por 33% de ração comercial Nuvilab®, 33% de leite condensado Moça Nestlé, 7% de açúcar cristal e o remanescente em água, conforme previamente publicado⁽⁹⁸⁾. Os animais foram mantidos em temperatura de 24±2°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os efeitos da HSD foram avaliados durante 8 semanas. O peso corporal foi mensurado semanalmente e o consumo alimentar foi mensurado três vezes por semana durante o período de experimentação. Após esse período, foi realizado a eutanásia por anestesia por isoflurano (Isoforine, São Paulo, Brasil), seguida por decapitação com guilhotina. Foram coletados os tecidos adiposos branco [retroperitoneal, inguinal, epididimal] e marrom (TAM), bem como o sangue dos animais foi coletado em tubos estéreis e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o soro foi alíquotado e congelado para análises futuras. Além disso, parte do TAM foi fixada para análise histológica e outra parte foi destinada a análises posteriores.

3.2 Análises da composição centesimal das diferentes dietas (padrão e HSD)

Para realizar as análises de composição centesimal, foram selecionadas 100 gramas das duas rações utilizadas, dieta padrão e HSD. As análises foram realizadas em triplicata para a determinação de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, fibras e carboidratos, segundo as metodologias do Instituto Adolfo Lutz ^(99, 100) e da AOAC (*Association Of Official Analytical Chemists*) ⁽¹⁰¹⁾.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Pesquisa da Escola de Nutrição, supervisionadas pelo técnico responsável Gustavo Silveira Breguez, e no Laboratório de Bromatologia da Escola de Nutrição da UFOP, supervisionadas pelo técnico responsável Raphael Antônio Borges e pela professora da disciplina de Bromatologia de Alimentos, Melina Oliveira De Souza. A ração foi preparada no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da UFOP no início do experimento, a fim de minimizar perda de umidade.

3.2.1 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada por secagem em estufa simples, pelo método determinado pelo Instituto Adolfo Lutz ⁽⁹⁹⁾. Brevemente, trata-se de um método gravimétrico baseado na perda de peso da amostra após a remoção da água por evaporação, partindo da premissa de que toda perda de peso da amostra será devido à umidade. Resumidamente, 5 g das amostras das rações STD e HSD foram pesadas em balança analítica (Marte Científica, São Paulo, Brasil), em triplicata. As amostras foram levadas à estufa (Tecnal, São Paulo, Brasil) a 85°C por 1 hora. Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até 105°C. Após três dias, as amostras foram retiradas da estufa (Tecnal), esfriadas em dessecador (Pyrex, São Paulo, Brasil) e pesadas até que o peso permanecesse constante. Foi estabelecido que, se a variação entre duas pesagens consecutivas não ultrapassasse 0,5 mg/ grama da amostra, o peso da amostra estaria estável. O percentual de umidade (%U) presente nas amostras foi determinado pela seguinte fórmula: $\%U = [(peso\ da\ amostra\ úmida) - (peso\ da\ amostra\ seca) / peso\ da\ amostra\ inicial] \times 100$.

3.2.2 Determinação de cinzas

Para a determinação de cinzas foi utilizado o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz ⁽⁹⁹⁾ a partir das amostras secas em estufa (Tecnal) a 105°C. A cinza é o nome dado ao resíduo mineral fixo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550-570°C. Cinco gramas das amostras das rações STD e HSD foram pesadas em balança analítica (Marte Científica) em cadinhos e em triplicata. Posteriormente, os cadinhos foram levados para a mufla (Tecnal) a 550°C por 7 horas. O percentual de cinzas presente nas amostras foi determinado pela seguinte fórmula: % cinzas= [(peso final do cadinho) - (peso inicial do cadinho vazio) / peso da amostra] ×100.

Também foram feitos novos cálculos para se obter a porcentagem de cinzas nas rações úmidas, uma vez que essa análise partiu de amostras secas, através da seguinte fórmula: % cinza ração úmida= [(% cinzas) × (massa seca) / 100].

3.2.3 Determinação de lipídios

A determinação de lipídios totais foi realizada utilizando o método a quente de *Goldfish*, uma adaptação do método de *Soxhlet*, conforme estabelecido pela AOAC ⁽¹⁰¹⁾. Em resumo, nesse método são utilizadas amostras previamente secas em um sistema de refluxo contínuo de solvente a quente no determinador de gordura (Tecnal), equipamento que é capaz de realizar a extração em mais de uma amostra. Dando início ao experimento, foram feitos filtros com papel de filtração para serem colocados dentro dos cartuchos e preenchidos com 5 gramas das amostras das rações STD e HSD em cada filtro, em triplicata. Em seguida, foram adicionados a cada cartucho 100 ml de éter de petróleo P.A (Neon, São Paulo, Brasil), os quais foram, posteriormente, conectados ao extrator de gordura (Tecnal) para extração de lipídios a quente por 6 horas. Após este período, os cartuchos foram levados à estufa (Tecnal) à 105°C por 1 hora, para evaporação do solvente, sendo resfriados em dessecador (Pyrex) e pesados. O percentual de lipídios presente nas amostras foi determinado pela seguinte fórmula: % lipídios= [(peso final do frasco) × (peso inicial do frasco vazio) / peso da amostra] ×100.

Também foram feitos novos cálculos para se obter a porcentagem de lipídios nas rações úmidas, uma vez que essa análise partiu das amostras secas, pela fórmula: % lipídios ração úmida= [(% lipídios) × (massa seca) /100].

As amostras desengorduradas foram armazenadas em tubos Falcons para serem utilizados na determinação de fibras, descrita posteriormente.

3.2.4 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteínas foi utilizado o método de Kjeldahl, conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz ⁽⁹⁹⁾, a partir de amostras secas. Esse método é dividido em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Na etapa da digestão, 0,3 mg das amostras secas das rações STD e HSD foram pesadas em balança analítica (Marte Científica), em triplicata. Essas amostras foram levadas para o bloco digestor (Tecnal) para serem oxidadas com 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Neon) e com 2,5 g de mistura catalítica ($Na_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (sulfato de sódio, Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil, sulfato de cobre, Reagen, Rio de Janeiro, Brasil, respectivamente). O bloco digestor (Tecnal) foi aquecido lentamente, mantendo-se a temperatura de $50^\circ C$ por 1 hora. Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até atingir $350^\circ C$. Esse procedimento durou aproximadamente 1 dia. Após este período, as amostras apresentaram um aspecto de líquido transparente, indicando o fim da destilação. Nesse processo de oxidação, o nitrogênio presente na amostra foi convertido em sais de amônio, que permaneceram no digerido.

Na etapa de destilação, foi acoplado ao destilador de nitrogênio (Tecnal) um erlenmeyer contendo 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) (Neon) e 5 gotas de indicador de Tashiro (mistura feita no próprio Laboratório de Bromatologia, à base de vermelho de metila e azul de metileno, com 200mg de vermelho de metila, 100mg de azul de metileno, solubilizados em Etanol PA) (Neon). A amostra contida no tubo digestor foi acoplada ao destilador (Tecnal), que já continha a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L (Neon). No início deste experimento, o contato da amostra no tubo digestor com a solução de NaOH resultou numa solução de coloração negra. A destilação ocorreu até a mudança de coloração da solução de NaOH, sendo coletados cerca de 150 ml da solução no erlenmeyer. Nessa etapa, os sais de amônio, inicialmente formados durante a digestão, foram alcalinizados pela adição de NaOH, resultando na formação de amônia. Através da destilação por arraste de vapor, a amônia foi recolhida em solução de H_3BO_3 (Neon), adicionada do indicador de pH Tashiro formando o metaborato de amônio. O metaborato de amônio formado foi responsável pela mudança de cor do indicador de Tashiro presente. Na etapa da titulação, o metaborato de amônio foi titulado por uma solução

diluída de ácido clorídrico (HCl) (Alphatec) a 0,1 mol/L, até mudança de cor do indicador de pH Tashiro. A quantidade de HCl (Alphatec) utilizada na titulação foi anotada para os cálculos, a fim de se estipular o teor de nitrogênio das amostras. O percentual de proteínas totais presente nas amostras foi determinado pela seguinte fórmula: % proteína= [(volume de HCl gasto × fator proteico(6,25) × 0,14 × 0,9539) peso da amostra] × 100.

Também foram feitos novos cálculos para se obter a porcentagem de proteínas nas rações úmidas, uma vez que essa análise partiu das amostras secas, pela seguinte fórmula: % proteína ração úmida= [(% proteína) × (massa seca) /100].

3.2.5 Determinação de fibras

Para a determinação de fibras foi utilizado o método de determinação de Fibra Alimentar Total e Fibra Solúvel e Insolúvel, conforme descrito pela AOAC ⁽¹⁰¹⁾, a partir de amostras secas e desengorduradas. Foram utilizadas três amostras de cada ração (STD e HSD) e, para cada amostra, foi realizada uma triplicata, totalizando, ao final, dezoito amostras. Em poucas palavras, trata-se de um método enzimático gravimétrico, no qual as amostras das dietas (STD e HSD) foram tratadas com três enzimas que simulam as condições do intestino humano, a saber: uma enzima amilase (Termamyl. LNF Latino Americana, Rio Grande do Sul, Brasil); uma enzima protease (Alcalase. LNF Latino Americana) e outra enzima amilase (Amiloglucosidase. LNF Latino Americana). Dessa forma, foi possível quantificar a quantidade de fibras solúveis e insolúveis presentes nas amostras. Um béquer de 500 ml foi pesado em balança analítica (Marte Científica) e foi adicionado 50 ml de uma solução tampão fosfato pH=6. Primeiramente, foi feita a adição da enzima Termamyl (LNF Latino Americana), deixando a solução em banho-maria por 15 minutos. Após resfriamento e correção do pH por uma solução de NaOH 0,275mol/L (Neon), a enzima Alcalase (LNF Latino Americana) foi adicionada, permanecendo em banho-maria por 30 minutos. Após resfriamento, o pH foi corrigido com uma solução de HCl 0,325mol/L (Alphatec). Finalmente, foi adicionada a enzima Amiloglucosidase (LNF Latino Americana), que foi mantida por 30 minutos em banho-maria.

Após o processo de digestão, todas as amostras foram filtradas com o auxílio de uma bomba a vácuo (Tecnal). Os cadinhos (número 3) foram preparados com celite (Nuclear, São Paulo, Brasil), sendo que a fração insolúvel ficou retida nos mesmos. Em seguida, os cadinhos foram levados à estufa (Tecnal) a 105°C, *overnight*, para secagem da parte insolúvel, a qual foi

separada para a determinação de cinzas e proteínas. O material solúvel foi filtrado por mais três vezes: a primeira vez com etanol 78% (Alphatec), a segunda vez com etanol 95% e a terceira vez com acetona. A parte solúvel que ficou retida no cadinho também foi deixada na estufa (Tecnal) a 105°C, *overnight*, para a determinação de cinzas e proteínas. O percentual de fibras totais presente nas amostras foi determinado pela fórmula: fibra alimentar total = [peso do resíduo - (peso proteína + cinza)].

Também foram feitos novos cálculos para se obter a porcentagem de fibras nas rações úmidas, uma vez que essa análise partiu das amostras secas e desengorduradas, pela seguinte fórmula: % fibras ração úmida = [(% fibras) × (massa seca - % lipídios) / 100].

3.2.6 Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada pelo método de diferença após as análises de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e fibras totais, pela fórmula a seguir: % carboidrato = [100 - (% proteínas + % umidade + % cinzas + % lipídios + % fibras totais)].

3.2.7 Determinação do valor energético em calorias(Kcal) das diferentes dietas

Após a realização das análises bromatológicas, foram realizados os cálculos para determinação das calorias (em Kcal) presentes em cada dieta, dieta padrão e HSD. Esses cálculos foram realizados com base nos valores já estabelecidos pela literatura para determinação de valor energético dos alimentos, utilizando-se os coeficientes de *ATWATER* que considera que 1 grama de carboidrato e proteína fornecem 4 Kcal, enquanto 1 grama de lipídios fornece 9 Kcal (102, 103). Dessa forma, foi multiplicado em cada dieta o valor de carboidrato e proteína por 4 e lipídios por 9, somando os três valores encontrados obtendo a Kcal de cada dieta.

3.3 Parâmetros avaliados

O conjunto de experimentos a seguir foi responsável por verificar os efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a composição corporal, o metabolismo e o desenvolvimento do TAM nos animais após 8 semanas.

3.3.1 Análise do consumo

A análise do consumo foi realizada através da ingestão alimentar (em gramas) e pelos cálculos do coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e pelo coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC), da maneira seguinte. A ingestão calórica foi realizada pelo cálculo da ingestão em gramas de ração consumida por animal, por semana, multiplicando pela Kcal da sua respectiva dieta, dada pela análise bromatológica. A eficiência alimentar (CEA) foi calculada pela relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido, pela seguinte fórmula: $CEA = (\text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Quantidade total de ração ingerida no período(g)}$. O coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) foi calculado pela seguinte fórmula: $CGPCC = (\text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Kcal ingerida}^{(104)}$.

3.3.2 Análises biométricas – adiposidade corporal

O grau de adiposidade foi avaliado pelos índices de Lee [$\sqrt[3]{\text{peso corporal} / \text{comprimento naso-anal (CNA)} \times 10}$] ⁽¹⁰⁵⁾ e de adiposidade [$100 = (\text{soma do peso dos coxins adiposos}) / \text{peso corporal}$] ⁽¹⁰⁶⁾.

3.3.3 Parâmetros glicometabólicos

Os experimentos a seguir foram responsáveis por verificar os efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a glicemia, insulinemia e HOMA-IR dos animais em estudo após 8 semanas.

3.3.3.1 Glicose sérica

Concentrações séricas de glicose foram mensuradas pelo método colorimétrico, utilizando o kit Glicose Monoreagente (Ref. K082; Bioclin, Paraná, Brasil). Brevemente, o método para determinação de glicose foi realizado pelo teste enzimático colorimétrico, na qual a glicose é oxidada, liberando peróxido de hidrogênio, que é responsável por formar um cromógeno vermelho cereja, cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de glicose

presente na amostra. A leitura da absorvância foi feita no comprimento de onda a 505 nm pelo leitor de absorvância em microplacas ELx808 (Biospectro, Paraná, Brasil). Os cálculos foram efetuados pela seguinte fórmula: glicose (mg/dl) = (absorvância da amostra/ absorvância do padrão) × 100. Os resultados foram expressos em mmol/ L, utilizando-se o fator de correção de 0,0556.

3.3.3.2 Insulina sérica

A insulina sérica foi quantificada usando o kit Rat/Mouse Insulin ELISA (Cat # EZRMI-13K; Merck Millipore, Burlington, MA), conforme protocolo do fabricante. De forma sucinta, esse ensaio se baseia na quantificação não radioativa de insulina no soro, ocorrendo em cinco etapas: (1) a captura de moléculas de insulina de amostras; (2) lavagem dos materiais não ligados das amostras; (3) ligação da enzima peroxidase aos anticorpos; (4) lavagem dos conjugados enzimáticos livres; (5) quantificação dos conjugados anticorpo-enzima imobilizados. A leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro (Biospectro), no comprimento de onda 490nm. A concentração de insulina, foi dada por uma curva dose-resposta, em que foi plotado um gráfico de curva de referência de 450nm no eixo y e no eixo x continha as concentrações de insulina de ratos, derivada por interpolação a partir de uma curva de referência gerada no mesmo ensaio com padrões de referência de concentrações conhecidas de insulina de rato.

3.3.3.3 Índice de resistência à insulina (HOMA-IR)

O índice de resistência à insulina (HOMA) foi calculado a partir da fórmula: (insulina de jejum × glicose)/ 22,5⁽¹⁰⁷⁾.

3.3.4 Perfil lipídico sérico

Os experimentos a seguir foram responsáveis por verificar os efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre as concentrações de colesterol total e TAG dos animais em estudo após 8 semanas.

3.3.4.1 Dosagem de colesterol total

Concentrações séricas de colesterol total foram mensuradas pelo método colorimétrico utilizando o kit Colesterol Liquiform (Ref. 76; Labtest Diagnóstico S.A, Minas Gerais, Brasil) e o Leitor de Absorvância em Microplacas ELx808 (Biospectro). Brevemente, o método para

determinação de colesterol total foi feito pelo teste enzimático colorimétrico, no qual os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a ácidos graxos e colesterol livre. Este último passa por reações que formam como produto final a antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada na reação é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 500 nm pelo leitor de absorbância em microplacas ELx808 (Biospectro). Os cálculos foram efetuados seguindo a fórmula: colesterol total (mg/ dl) = (absorbância do teste - absorbância do padrão) × 200. Os resultados foram expressos em mg/ dl.

3.3.4.2 Dosagem de triacilglicerol (TAG)

Concentrações séricas de TAG foram mensuradas pelo método colorimétrico, utilizando o kit Triglicérides Liquiform (Ref. 87; Labtest Diagnóstica S.A) e o Leitor de Absorbância em Microplacas ELx808 (Biospectro). Resumidamente, o método para determinação de TAG foi realizado pelo teste enzimático colorimétrico, no qual a lipoproteína lipase promove a hidrólise do TAG, liberando glicerol, o qual após uma série de reações enzimáticas produz como produto final uma quinoneimina. A intensidade da cor vermelha formada na reação é diretamente proporcional à concentração de TAG presente na amostra. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda a 505 nm pelo leitor de absorbância em microplacas ELx808 (Biospectro). Os cálculos foram efetuados segundo a fórmula: TAG (mg/dl) = (absorbância do teste/ absorbância do padrão) × 200. Os resultados foram expressos em mg/ dl.

3.3.5 *Desenvolvimento do TAM*

Os experimentos a seguir foram responsáveis por avaliar os efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o peso relativo do TAM, número e área dos adipócitos multiloculares e teor de gordura total nesse tecido, bem como seu teor de TAG após 8 semanas.

3.3.5.1 Peso relativo do TAM

O peso relativo do TAM foi calculado a partir da fórmula: peso relativo do TAM =(peso absoluto do TAM/ massa corporal do animal) ⁽⁹⁾.

3.3.5.2 Confeção e análise das lâminas histológicas

Para medição do número e área dos adipócitos, seções de TAM dos animais retiradas durante a eutanásia foram fixados em solução de Metanol 80%- Dimetilsulfóxido 20% (metanol-DMSO), (Metanol, Alphatec; Dimetilsulfóxido, Labsynth) durante três dias, com trocas do fixador a cada 24h, sendo as amostras mantidas durante toda a fixação em freezer a -20°C. Em seguida, essas amostras foram levadas para o Laboratório de Imunopatologia (LIMP), no qual foram processadas e fixadas, embebidos em parafina, cortados a uma espessura de 5 µm com um micrótomo e corado com hematoxilina-eosina.

Os cortes das lâminas coradas em hematoxilina-eosina (Synth, São Paulo, Brasil) dos quatro grupos analisados, depois de finalizadas, foram fotografados na objetiva de 40× com uma câmera digital, acoplada ao Microscópio Óptico Digital Leica DM5000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O número de adipócitos (que corresponde ao número de núcleos) foi calculado analisando microscopicamente em uma área fixa ($7,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$), através da plataforma de Morfometria e Microanálise do Laboratório Multiusuários de Microscopia Avançada e Microanálise (Lmu-mam) do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP. O Software Leica Qwin v3.5.1 (Leica Microsystems) foi utilizado para contar os núcleos presentes nos 15 campos (fotos) analisados em cada lâmina, realizando, ao final, o cálculo da média do número de núcleos encontrados em cada lâmina, correspondente a um animal. Para o cálculo da área dos adipócitos foi medida a área de todos os adipócitos presentes nos 15 campos (fotos), realizando, ao final, a média da área dos adipócitos encontrados em cada lâmina, que correspondente a um animal.

3.3.5.3 Teor de lipídios totais e dosagem de TAG no TAM

Para a determinação de teor de lipídios no TAM foi utilizado o método de extração de lipídios adaptado de FOLCH ⁽¹⁰⁸⁾. Em resumo, esse método consiste na extração física da gordura presente no tecido pela lavagem dos solventes clorofórmio-metanol (2:1). Inicialmente, 100 mg de TAM foi macerada com auxílio de um Gral e Pistilo de porcelana (Chiarotti, São Paulo, Brasil), juntamente com 2.000 µl de solução Clorofórmio-Metanol (2:1) (Alphatec), que foi adicionada com auxílio de uma pipeta (LabMate) de forma gradativa. Após completa maceração, todo o conteúdo do Gral foi transferido para o primeiro tubo de vidro, que foi previamente lavado com Éter de Petróleo (Alphatec), secado em estufa à 50° C (Tecnal) e

identificado. Nesse primeiro tubo foi adicionado, com auxílio de uma pipeta (LabMate), 400 µl de Metanol (Alphatec) e levados para homogeneizar no Vórtex (Phoenix Luferco, São Paulo, Brasil) por 3 minutos. Em seguida, foram centrifugados (Centribio) por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo de vidro que, além de ser lavado, secado e identificado, também foi pesado. Foi adicionado 800 µl de Clorofórmio (Alphatec) e 640 µl de solução de NaCl 0,73% (Cloreto de Sódio, NaCl, Labsynth, São Paulo, Brasil). Este segundo tubo foi levado ao Vórtex (Phoenix Luferco) por 1 minuto e em seguida levado a centrífuga (Centribio) por 10 minutos à 3000 rpm. Nessa última etapa, após serem retirados da centrífuga, o sobrenadante de cada tubo foi descartado com auxílio de uma pipeta (LabMate), a parede do tubo foi lavada com a solução de FOLCH (para o preparo de 30 ml da solução de FOLCH, foi adicionado 14,69 ml de metanol, 0,98 ml de clorofórmio e 14,38 ml de água destilada) (Alphatec). O tubo foi agitado delicadamente e o sobrenadante foi novamente descartado. Finalmente, os tubos foram levados a estufa (Tecnal) semiaberta a 80° C por 14 horas. Ou até completa evaporação do solvente, sendo que a temperatura da estufa foi reduzida de 80°C para 55°C e as amostras eram avaliadas no período de a cada 60 minutos, para conferir se todo o solve foi evaporado, variando assim de amostra para amostra o tempo de retirada da estufa. Ao final, os tubos foram pesados, e, por diferença, foi calculado o teor de lipídio, pela seguinte fórmula: % lipídios = (Peso final do tubo - Peso inicial do tubo) / peso da amostra ×100.

Para a dosagem de TAG no TAM, após o procedimento de determinação de lipídios totais pelo método de FOLCH, a gordura contida em cada tubo foi reesuspensas com 1mL de álcool isopropílico (Alphatec), e, em seguida, os tubos foram levados para homogeneizar no Vórtex (Phoenix Luferco) por 30 segundos. Após a resuspensão da gordura, foi realizada a dosagem de TAG utilizando o kit Triglicérides Liquiform (Ref. 87; Labtest Diagnóstica S.A, Minas Gerais, Brasil) e o Leitor de Absorbância em Microplacas ELx808 (Biospectro), conforme descrito na seção 3.3.4.2. da Metodologia. Os resultados foram expressos em mg/ dl.

3.4 Análise estatística

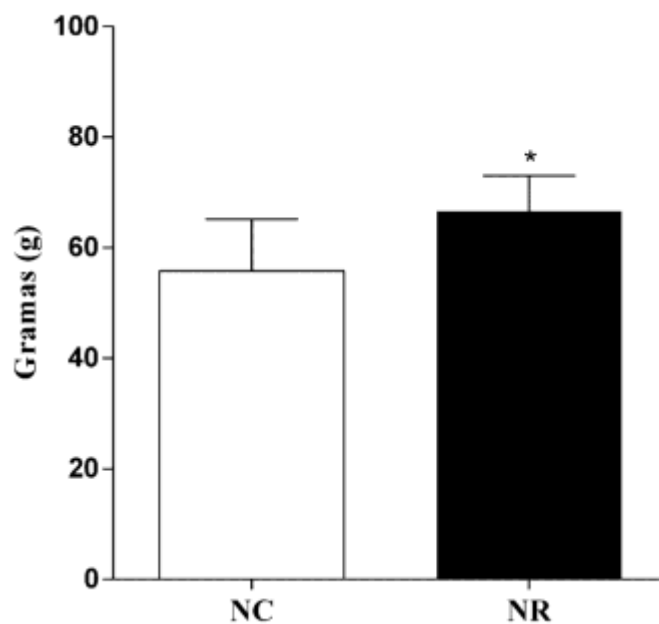
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism (version 6.0)* (GraphPad Software Inc., Irvine, CA). A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro–Wilk. Os dados paramétricos foram representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos da dieta ou do tamanho da ninhada foram avaliados usando *ANOVA TWO-WAY*, seguida pelo teste de Bonferroni. O limite de significância dos resultados foi de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame

Conforme descrito anteriormente, na seção Metodologia, após o nascimento dos animais foi feita a manipulação do tamanho das ninhadas, em 8 filhotes por mãe, caracterizando a NC, e 4 filhotes por mãe, caracterizando a NR. O resultado a seguir demonstra os efeitos da manipulação do tamanho das ninhadas sobre a massa corporal dos animais após o desmame (Figura 05). De acordo com a Figura 05, a manipulação do tamanho das ninhadas foi eficiente em induzir o sobrepeso neonatal, resultando em um ganho de massa corporal de ~19% na NR, em relação a NC.

Figura 05 - Efeito do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame dos filhotes.



A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a NC tinha 8 filhotes por mãe e a NR 4 filhotes por mãe, NC com um n=11 animais e NR com um n=12 animais. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada foram analisados pelo teste t de Student. *p < 0,05.

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida.

Fonte: elaboração própria.

Nesse trabalho foi proposto avaliar os efeitos do tamanho da ninhada e a introdução da HSD pós-desmame sobre a RI e o TAM. Dentro desse contexto, o nosso primeiro objetivo, que foi estabelecer o modelo experimental de ninhada reduzida, foi cumprido e os nossos resultados assemelham-se aos encontrados em estudos que utilizaram uma metodologia similar ^(104, 109). No nosso trabalho, a manipulação do tamanho das ninhadas foi eficiente em induzir sobrepeso neonatal, resultando em aumento de peso dos animais da NR. Esse resultado é corroborado pelos estudos de Nery e cols. ⁽¹⁰⁴⁾ e Balonan e Sheng ⁽¹⁰⁹⁾, no qual o tamanho das ninhadas alterou significativamente as taxas de crescimento dos animais: aqueles amamentados em ninhadas grandes tiveram os pesos corporais mais baixos e aqueles amamentados em ninhadas pequenas tiveram os pesos corporais mais altos pós-desmame. Dessa forma, os autores demonstraram a existência de uma relação inversa entre o tamanho da ninhada e a massa corporal pós-desmame dos filhotes ^(104, 109, 110).

Essa relação inversa pode ser explicada pelo fato de que a prole terá um maior consumo de alimentar, uma vez que nas ninhadas reduzidas a disponibilidade de leite é maior, o que resulta em uma maior ganho de massa corporal dos filhotes ^(104, 109, 110). Esta maior oferta se associa com o ajuste inicial da síntese de leite materno em função do número de filhotes nascidos ⁽¹¹¹⁾. Por conseguinte, provavelmente ocorre maior ingestão alimentar coerente à imaturidade do mecanismo de controle da ingestão alimentar dos filhotes nessa idade, resultando em maior ganho de peso corporal ⁽¹¹¹⁾. Essa relação inversa também foi observada pelo estudo feito por Nery e cols. ⁽¹⁰⁴⁾, no qual a evolução ponderal de animais provenientes de ninhadas com quatro animais (GN4) ou ninhadas com dez filhotes (GN10) durante a lactação foi diferente, tendo o grupo GN4 um peso corporal 52% maior que no grupo controle (GN10) ⁽¹⁰⁴⁾. Duas variáveis podem ter sido limitantes na diferença da magnitude de porcentagem da massa corporal dos animais nesse estudo, comparados ao nosso. A primeira diz respeito a manipulação do tamanho da ninhada: trabalhamos com um grupo controle com uma ninhada com oito filhotes por mãe e não dez animais por mãe como feito por Nery e cols. ⁽¹⁰⁴⁾. A segunda é pelo fato de termos utilizado filhotes de mães com diferentes idades gestacionais (variando da segunda a sexta gestação da rata), o que pode ter contribuído para tamanha variação no ganho de peso dos animais da ninhada reduzida.

Tendo a primeira variável estabelecida, a manipulação das ninhadas no período neonatal, foi permitindo a partir dela introduzir a outra variável, a introdução da HSD, e dar continuidade ao modelo proposto.

4.2 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a ingestão alimentar, CEA e CGPCC após 8 semanas

Como descrito anteriormente, na seção Metodologia, após o desmame, os animais foram novamente divididos em quatro grupos experimentais, e foram submetidos as suas respectivas dietas (dieta padrão e HSD). Os animais tiveram a ingestão alimentar e a massa corporal monitoradas semanalmente durante o período experimental de 8 semanas.

A composição centesimal das diferentes dietas (padrão e HSD) está representada pela Tabela 1, a seguir. A partir dessa análise foi possível efetuar os cálculos da ingestão em Kcal desses animais e calcular o Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico (CGPCC).

Tabela 1 - Composição centesimal na base seca das diferentes dietas (dieta padrão e HSD), realizada no Laboratório de Bromatologia e no Laboratório de Multiusuários da Escola de Nutrição, da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais – Brasil, 2019.

Nutriente/Componente (em 100 g)	Dieta padrão	HSD
Carboidrato	46,05	57,97
Proteínas	23,18	13,63
Lipídios	4,55	4,69
Cinzas	8,52	4,96
Fibras totais	17,70	18,75
Fibra solúvel	1,53	6,57
Fibra insolúvel	16,17	12,18
Total	100,00	100,00
Kcal/ g	3,17	3,30

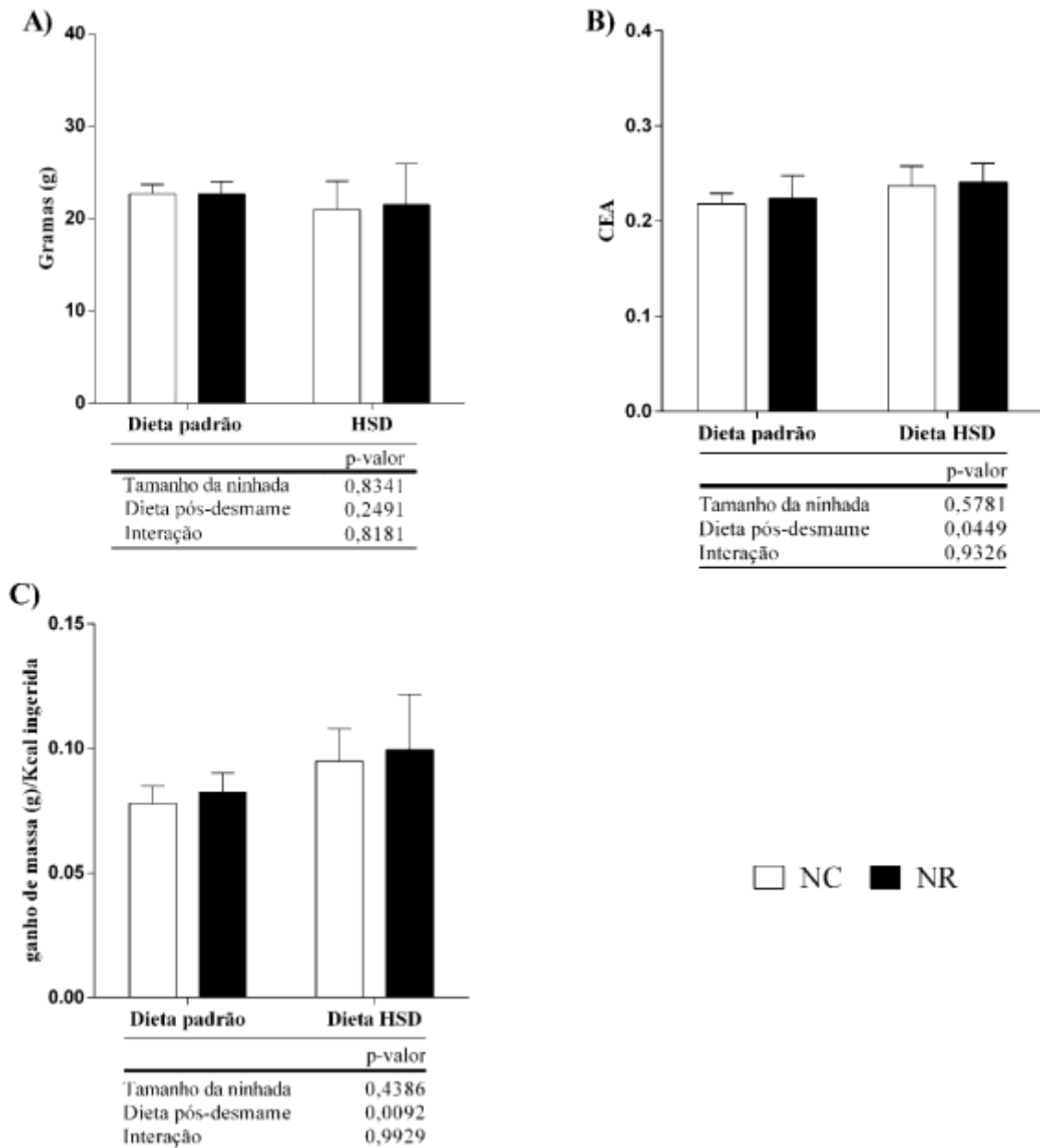
Dieta padrão composta apenas pela ração comercial Nuvilab® (Nuvital-CR, Colombo, Brasil). Dieta HSD constituída por 33% de ração comercial Nuvilab®, 33% de leite condensado Moça Nestlé, 7% de açúcar cristal e o remanescente em água, adaptado de ⁽⁹⁸⁾.

Fonte: elaboração própria.

A composição centesimal demonstrou que a HSD contém ~40% de umidade e a dieta padrão contém ~11% de umidade. De acordo com a Tabela 01, a dieta padrão apresentou ~46% de carboidratos, enquanto a HSD apresentou ~58% de carboidratos. Diferença essa que torna ainda mais acentuada, ao analisarmos a porcentagem de carboidrato em relação a porcentagem de energia total, a dieta padrão apresentou ~58% de carboidratos em relação a porcentagem de energia total, que foi de 3,17 Kcal/g, enquanto a HSD apresentou ~70% de carboidratos em relação a porcentagem de energia total, que foi de 3,30 Kcal/ g. Além disso, ao analisarmos os demais macronutrientes, observou-se que a porcentagem de lipídios e proteína da HSD foi menor quando comparada a dieta padrão; entretanto, não foram observados prejuízos aos animais submetidos a HSD no período experimental de 8 semanas, visto que em todos os grupos houve ganho de massa corporal e crescimento satisfatórios.

A Figura 06 representa a ingestão alimentar diária dos animais, em gramas, o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), calculado pela relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC), calculado pela relação entre peso do animal e Kcal consumida.

Figura 06 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre a ingestão alimentar diária (g), o CEA e o CGPCC dos animais após 8 semanas.



A) Ingestão alimentar diária (gramas); B) Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA). O CEA foi calculado pela fórmula: $[\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}] / \text{Quantidade total de ração ingerida no período (g)}$; C) Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico (CGPCC). O CGPCC foi calculado pela fórmula: $[\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}] / \text{Quantidade total de Kcal ingeridas no período}$. A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós teste de Bonferroni.

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

A ingestão alimentar diária não foi influenciada por nenhuma das variáveis (Figura 06A). Em relação ao CEA e ao CGPCC (Figura 06B e 06C), observamos efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,05$), apesar do pós-teste não ter mostrado diferença em ambas as análises.

A literatura relata que, não foi observada nenhuma diferença no CEA ou CGPCC nas idades de 45-55 dias e 70 a 110 dias de vida, intra e intergrupos de animais provenientes de ninhadas reduzidas e submetidos a uma dieta padrão (ração comercial Labina® - Purina, Brasil) ⁽¹⁰⁴⁾. De acordo com Nery e cols. ⁽¹⁰⁴⁾, valores menores de CEA estão relacionados a uma pior metabolização do alimento, necessitando de maior quantidade para suprir as necessidades do animal, enquanto valores maiores de CGPCC indicam maior capacidade de indução de peso decorrente do consumo daquela dieta.

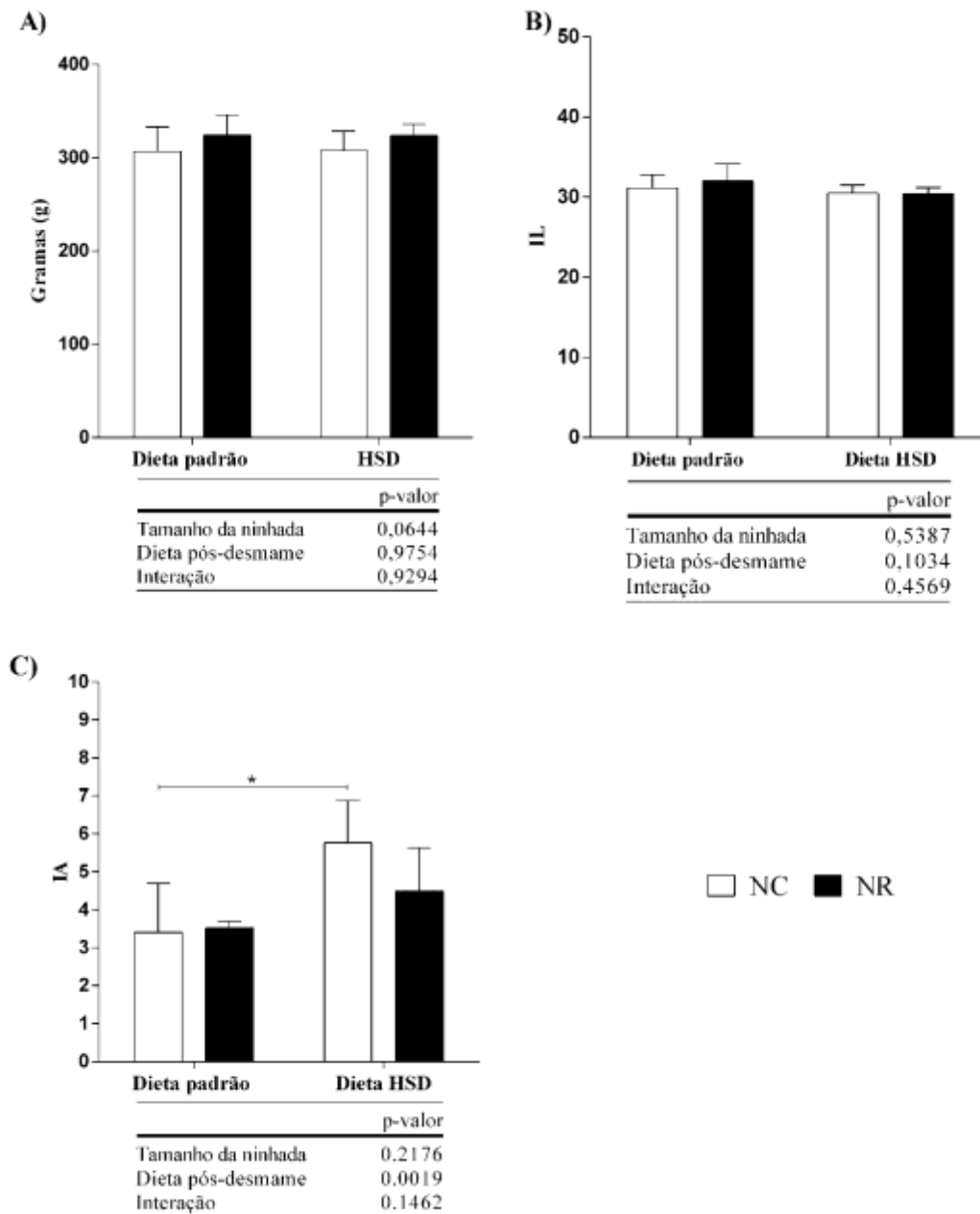
Apesar de termos identificado um efeito da dieta pós-desmame sobre estes parâmetros e o pós-teste não ter mostrado em qual grupo essa diferença ocorreu, uma possível explicação poderia estar associada aos fenômenos de *catch-down* e *catch-up growth* pós-natal ⁽¹⁰⁴⁾. A menor ingestão de alimento por animais no período pós-desmame pode ser associada à redução na velocidade de ganho de peso (*catch-down growth*), e, de forma antagônica, animais que sofrem desnutrição na vida perinatal tendem a aumentar o consumo alimentar com rápido ganho de peso nesta idade (*catch-up growth*). Esses fenômenos referem-se à mudança na massa adiposa pós-natal ⁽¹⁰⁴⁾, sugerindo que o CEA e o CGPCC seriam influenciados por estes fatores. Esta hipótese é bastante atrativa, uma vez que pode ser reforçada pelo resultado de maior Índice de Adiposidade nos animais da ninhada controle que foram submetidos a HSD (resultado a seguir). Entretanto, futuros experimentos seriam necessários para compreender estes mecanismos, como aumentar o poder da análise (aumentando o número de animais) e identificarmos diferenças no pós-teste.

4.3 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos (ganho de massa corporal e grau de adiposidade) após 8 semanas

Após o período experimental de 8 semanas, os animais foram pesados, o comprimento naso-anal foi mensurado e, posteriormente, foram eutanasiados. Os depósitos de TAB (inguinal, retroperitoneal e epididimal) e o TAM foram dissecados e pesados. O ganho de massa corporal, em gramas, índice de Lee (IL) e o índice de adiposidade (IA) foram calculados conforme descrito na seção Metodologia.

A Figura 07 representa o ganho de massa corporal, o IL e o IA dos animais ao final das 8 semanas de experimento. Tanto o ganho de massa corporal (Figura 07A) quanto o IL (Figura 07B) não foram influenciados por nenhuma das variáveis. No entanto, para o IA (Figura 07C) observamos efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,05$), aumentando ~69% no grupo HSD-NC.

Figura 07 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos após 8 semanas.



A) Ganho de massa corporal (g); B) Índice de Lee (IL). O ganho de massa corporal foi calculado, pela fórmula: massa corporal final - massa corporal inicial. O IL foi calculado pela fórmula: $(3\sqrt{\text{peso corporal} / \text{CNA} \times 10})$; C) Índice de Adiposidade (IA). O IA foi calculado pela fórmula: $[100 \times (\text{soma do peso dos coxins adiposos}) / \text{peso corporal}]$. A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós- teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

CNA: comprimento naso-anal; NC, ninhada controle; NR, reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

Para o ganho de massa corporal, em uma metodologia similar ao nosso estudo, Wurtman e Miller ⁽⁸⁸⁾, ao realizarem manipulação do tamanho da ninhada durante a lactação, não detectaram diferença no peso corporal no 58º dia. Ainda dados anteriores do nosso grupo demonstram que o peso corporal não é afetado pela HSD ^(9,17). Quanto ao índices preditores de excesso de peso, para o IL não observamos diferenças entre os grupos, indo de acordo com dados anteriores do nosso grupo e um outro estudo similar, que também realizou a manipulação do tamanho da ninhada, e em ambos os estudos para o IL não foram encontradas diferenças ^(104, 112). Para o IA, o presente estudo demonstrou que a HSD alterou a composição corporal dos animais, uma vez que o IA está aumentado na ninhada controle. Estes resultados corroboram resultados anteriores do nosso grupo, os quais demonstraram que a HSD aumenta a adiposidade corporal, mesmo com massa corporal final idênticas ⁽¹⁷⁾.

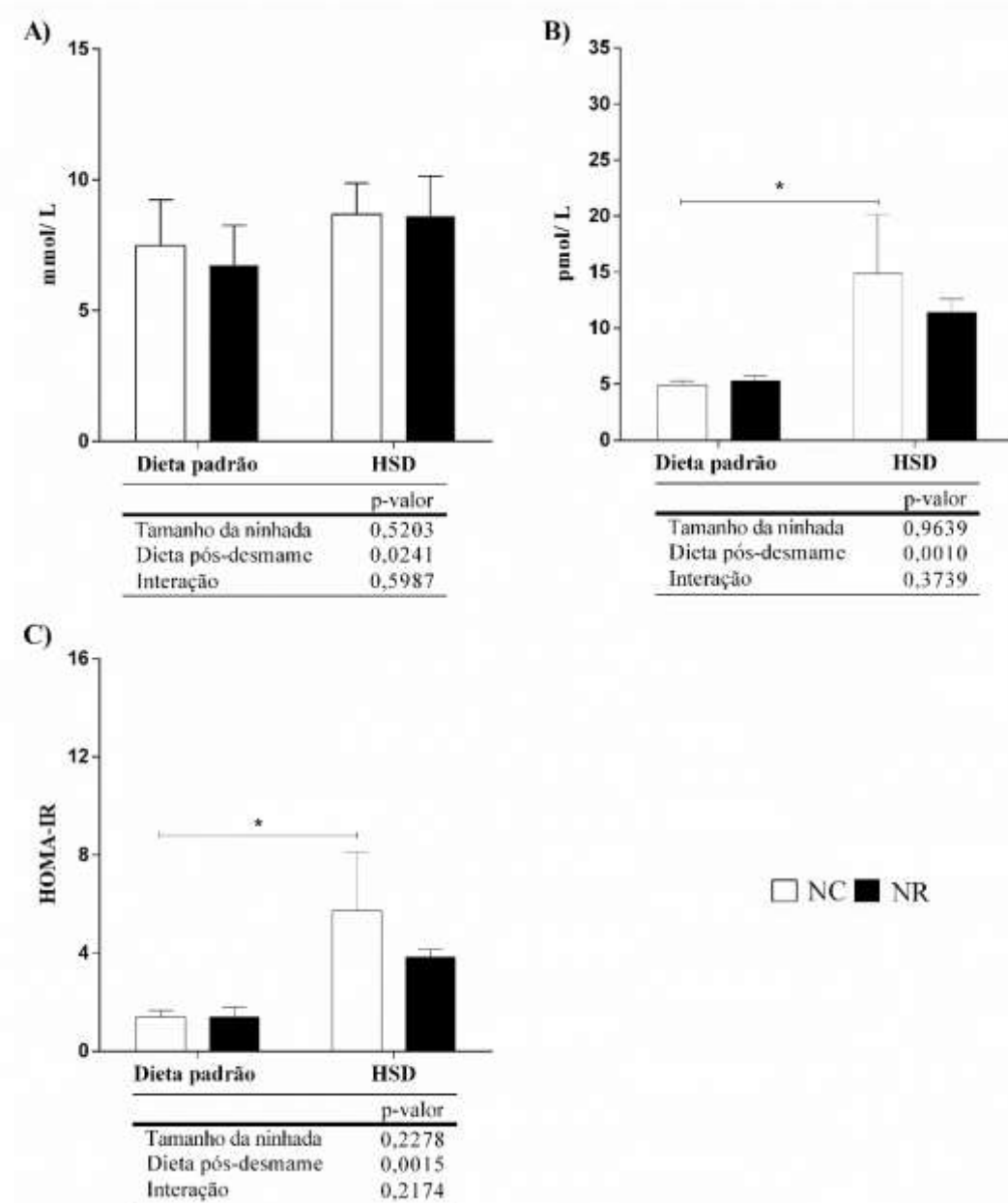
O consumo excessivo de dietas ricas em carboidratos simples modula as vias celulares que controlam a lipogênese (síntese de ácidos graxos e TAG), levando a maior adiposidade ⁽⁶⁾. Isso pode ser exemplificado em nosso trabalho pelo fato de que, os animais submetidos a HSD, tiveram uma maior ingestão de carboidratos simples, sendo esse consumo maior do que o necessário para suprir as necessidades energéticas. Isso porque, na matriz mitocondrial o complexo piruvato desidrogenase atua convertendo o piruvato (um produto da glicólise) em acetil-CoA, a qual então é oxidada na mitocôndria para produzir energia, no ciclo de ácido cítrico. Sendo assim, a maior ingestão de carboidratos simples induzida por essa dieta leva durante processo de glicólise a produção em excesso do piruvato. Dessa forma, a conversão do piruvato em acetil-CoA pela enzima piruvato carboxilase fornece o substrato para a síntese dos ácidos graxos. O acetil-CoA, que por consequência também está em excesso, é convertido em malonil-CoA, que é o primeiro intermediário comprometido com a via de síntese dos ácidos graxos. O complexo da ácido graxo-sintase produz ácidos graxos que são exportados para o tecido adiposo e armazenados na forma de TAG ⁽⁵⁴⁾. Em outras palavras, o excesso de carboidrato simples da dieta é armazenado como gordura, o que levou a maior adiposidade nos animais alimentados com a HSD nesse estudo, sendo este um efeito esperado dessa dieta.

4.4 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos (glicose, insulina e HOMA-IR) após 8 semanas

Após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas e o soro foi separado e alíquotado para determinar as concentrações séricas de glicose e insulina, para posterior cálculo do HOMA-IR, como descrito anteriormente na seção Metodologia.

A Figura 08 representa as concentrações séricas de glicose, insulina e o HOMA-IR dos animais ao final do período experimental de 8 semanas. Na Figura 08A, observa-se que a dieta pós-desmame ($p < 0,05$) influenciou a glicose sérica, apesar do pós-teste não ter mostrado diferença. Para as concentrações de insulina, observamos efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,05$) com aumento ~201% na insulina sérica do grupo HSD-NC (Figura 08B). De maneira similar, o HOMA-IR também foi influenciado pela dieta pós-desmame ($p < 0,05$) aumentando ~313% no grupo HSD-NC (Figura 08C).

Figura 08 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos após 8 semanas.



A) Glicose sérica (mmol/L); B) Insulina sérica (pmol/L); C) HOMA-IR. O HOMA-IR foi calculado pela fórmula: (insulina de jejum \times glicose) / 22,5. A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

HOMA-IR, *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

Nesse estudo, observamos que a HSD, influencia as concentrações de glicose sérica, aumenta as concentrações de insulina, e o HOMA-IR, induzindo a RI no grupo HSD-NC. Esses resultados são corroborados por dados anteriores do nosso grupo, nos quais demonstraram que a HSD resulta em RI após 8 semanas de consumo ^(9, 17).

A manipulação do tamanho da ninhada, que pode acarretar na supernutrição (nas ninhadas pequenas) e subnutrição (nas ninhadas grandes), pode exercer efeito sobre os parâmetros glicometabólicos ⁽¹¹³⁾, sendo por consequência, de diferentes formas de acordo com o tamanho da ninhada. A literatura relata que a indução de supernutrição com ninhadas de ratos compostas por três filhotes detectaram de forma precoce aumento de peso corporal, hiperglicemia, hiperinsulinemia com RI ⁽⁸⁹⁾, e, ainda, associada à hiperinsulinemia na infância, tolerância à glicose prejudicada e obesidade na vida adulta ⁽¹¹⁴⁾. Em um estudo realizado por Balonan e Sheng ⁽¹⁰⁹⁾, foi observado que ingestão excessiva de leite durante a lactação (supernutrição) pode causar uma diminuição na tolerância à glicose, enquanto a ingestão deficiente de leite (subnutrição) pode causar um aumento nesta tolerância no desmame em ratos ⁽¹⁰⁹⁾. Entretanto, a subnutrição pré-natal nos animais leva ao aumento da deposição de gordura na idade adulta ⁽¹¹⁵⁾. É ainda relatado pela literatura um comprometimento persistente da secreção de insulina e na tolerância à glicose após realimentação em ratos submetidos à desnutrição proteico-calórica e proteica durante a lactação ^(116, 117).

Apesar de não termos identificado nenhum efeito do tamanho da ninhada e a metodologia desses estudos divergirem da utilizada em nosso estudo, esses achados da literatura, são bastante atrativos, uma vez que contribuem para o melhor entendimento desse trabalho. Entretanto, futuros experimentos seriam necessários para compreender estes mecanismos, como aumentar o poder da análise (aumentando o número de animais) e identificarmos diferenças no pós-teste para as concentrações de glicose. Além disso, realizar a análise dos parâmetros glicometabólicos após o desmame, como realizado no estudo de Balonan e Sheng ⁽¹⁰⁹⁾ seria uma alternativa para melhor compreender esse resultado.

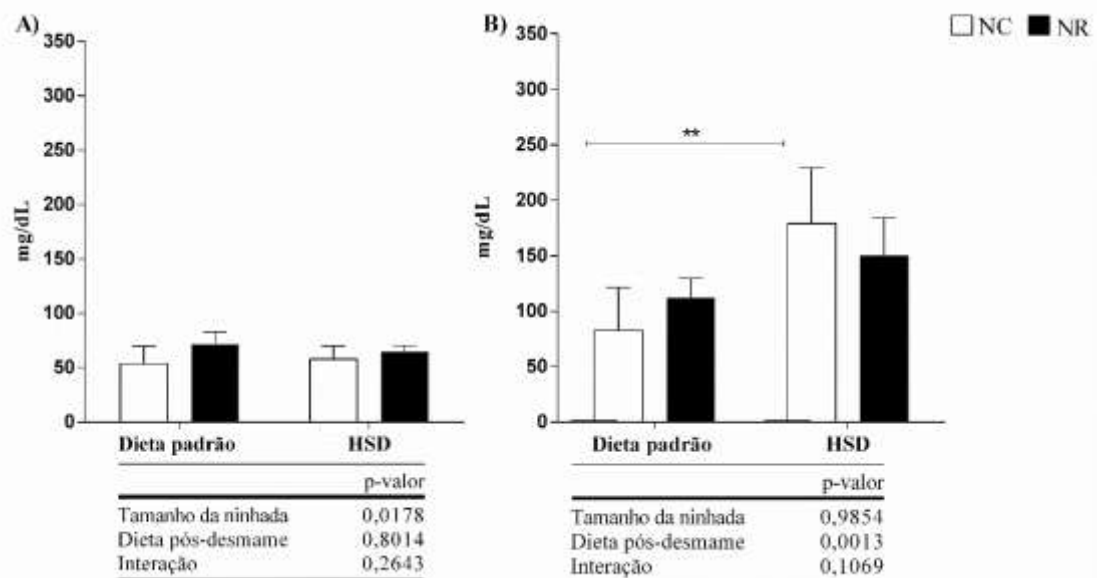
A RI observada na ninhada controle alimentada pela HSD, pode estar relacionada à diminuição na capacidade da insulina de estimular a utilização da glicose, ocorrendo o aumento na produção e a secreção de insulina (pelas células β -pancreáticas) como mecanismo compensatório (hiperinsulinemia) ⁽¹¹⁸⁾. Em nosso trabalho observamos influência da HSD na

concentração da glicose sérica, com aumento nas concentrações de insulina. Esses achados são consistentes com os resultados de outros estudos ^(6, 119), nos quais observaram maior acréscimo da massa adiposa (observada pelo aumento do IA) e o desenvolvimento concomitante da RI (observada pelo HOMA-IR) e disfunção metabólica (observada pelo aumento na concentração de TAG, resultado a seguir) após o consumo da HSD. Evidências científicas apontam uma relação direta entre os ácidos graxos livres e a RI, que pode ser decorrente do acúmulo de TAG e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e no fígado ^(60, 61). Leahy e cols. ⁽¹²⁰⁾ relataram que a exposição prolongada de ratos a altos níveis de glicose pode induzir falhas na secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, uma condição frequentemente observada na supernutrição ⁽¹²⁰⁾. Em nosso trabalho, em um período de 8 semanas de consumo da HSD foi possível observar uma hiperinsulinemia. Estes resultados sugerem que, em um período maior de consumo da HSD, poderíamos observar prejuízos na secreção de insulina de acordo com estes achados.

4.5 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico sérico (colesterol total e TAG) após 8 semanas

Ao final do período experimental de 8 semanas foi realizada a eutanásia dos animais, amostras de sangue foram coletadas e o soro foi alíquotado para determinar as concentrações de colesterol total e TAG, conforme descrito na seção Metodologia. A Figura 09 representa as concentrações de colesterol total e TAG dos animais ao final das 8 semanas de experimento. Para o colesterol total sérico (Figura 09A), foi observado um efeito do tamanho da ninhada ($p < 0,05$), apesar do pós-teste não ter mostrado diferença. No entanto, para as concentrações de TAG foi observado efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,01$) com aumento $\sim 117\%$ do TAG sérico no grupo HSD-NC (Figura 09B).

Figura 09 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico sérico após 8 semanas



A) Colesterol total (mg/dl); B) Triacilglicerol (mg/dl). A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós-teste de Bonferroni, ** $p < 0,01$.

NC, ninhada controle; NR, reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

Em nosso estudo, observamos efeito do tamanho da ninhada nas concentrações de colesterol total, embora essa diferença não tenha sido identificada no pós-teste. Em um estudo realizado por Rinaldi e cols. ⁽¹²¹⁾, no qual foi feita a manipulação do tamanho da ninhada, com nove filhotes por mãe para a ninhada padrão e três filhotes por mãe para a ninhada reduzida, foi observado na análise do perfil lipídico (colesterol total e frações) que os animais da ninhada reduzida apresentaram uma concentração plasmática de colesterol total maior que os animais da ninhada padrão ($p < 0,05$), sendo que, a concentração plasmática de HDL foi a que apresentou maior alteração, tendo os animais da ninhada reduzida mostrado uma diminuição dessa fração, em relação aos animais da ninhada padrão ($p < 0,05$) ⁽¹²¹⁾. Isso sugere, que as concentrações de colesterol total podem estar aumentadas em decorrência de alterações em suas frações. Nessa perspectiva, pontuamos duas análises futuras que podem auxiliar no entendimento desse resultado e melhor compreender os mecanismos envolvidos: primeiramente, seria necessário aumentar o poder da análise (aumentando o número de animais) para identificarmos diferenças no pós-teste; uma segunda análise seria realizar a dosagem das frações do colesterol total (HDL e LDL), na medida que, o efeito do tamanho da ninhada sobre o colesterol total pode ser decorrente de alterações em suas frações, como observado no estudo realizado por Rinaldi e cols. ⁽¹²¹⁾.

Nessa perspectiva, na literatura encontramos que o tipo de nutrição na vida precoce acarreta mudanças que têm consequências duradouras, particularmente no que diz respeito às concentrações de colesterol total no sangue em ratos adultos ⁽¹²²⁾. Alguns autores sugerem que as concentrações baixas de colesterol em ratos machos na vida adulta dependem da quantidade de colesterol recebido pelo animal no período de lactação ⁽¹²³⁾. Hahn e Walker ⁽¹²³⁾, em um estudo de manipulação de tamanho de ninhada em ratos, ao alimentar os dois grupos com a mesma dieta após o desmame de 22 dias, encontraram diferenças na atividade da enzima HMG-CoA-redutase (enzima envolvida na via metabólica do colesterol), sugerindo que tanto o ato de comer demais quanto comer menos possuem efeitos no metabolismo do colesterol ⁽¹²³⁾.

Outros autores associam, ainda, o desmame precoce e a introdução a uma dieta rica em carboidratos a uma maior tendência à hipercolesterolemia em ratos adultos ⁽¹²⁴⁾. Apesar de não podermos afirmar se houve um aumento ou redução nas concentrações de colesterol total, por não apresentar diferença no pós-teste, os estudos apresentados acima são de suma importância para entendermos melhor nosso resultado e auxiliam na escolha de análises futuras.

O aumento na concentração de TAG no grupo controle, observado pelo efeito da dieta pós-desmame é corroborado por dados da literatura, nos quais a hipertrigliceridemia tem sido associada à HSD, por aumentar a lipogênese hepática e por causar a secreção de VLDLc, resultando em concentrações séricas mais altas de TAG ^(6, 125). Além disso, dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a HSD aumenta as concentrações de VLDLc e TAG sérico, após o período de 4 semanas ⁽¹¹²⁾. De fato, este é um efeito esperado pela HSD, devido à alta quantidade de carboidratos simples e, conseqüentemente, a disponibilidade de glicose aumentada ⁽¹²⁶⁾. Em um estado com excesso de glicose, ocorrem as seguintes alterações no metabolismo: (1) as concentrações de insulina estão elevadas e esse hormônio estimula a enzima fosfatase; (2) a enzima fosfatase promove a desfosforilação da enzima acetil-CoA-carboxilase, deixando-a ativa; (3) a enzima acetil-CoA-carboxilase ativa converte acetil-CoA em malonil-CoA; (4) a formação de malonil-CoA favorece a síntese de ácido graxo; (5) por conseguinte, o aumento de malonil-CoA inibe a enzima carnitina acil-transferase I, envolvida na oxidação de ácidos graxos; (6) nessas condições, no fígado ocorre a conversão dos ácidos graxos em TAG e esse é transportado para outros tecidos, através do seu compactamento com apolipoproteínas específicas, formando o VLDL ⁽⁵⁴⁾. Dessa forma, essas alterações no metabolismo em decorrência do excesso de glicose aumentam a síntese e o armazenamento de ácidos graxos na forma de TAG.

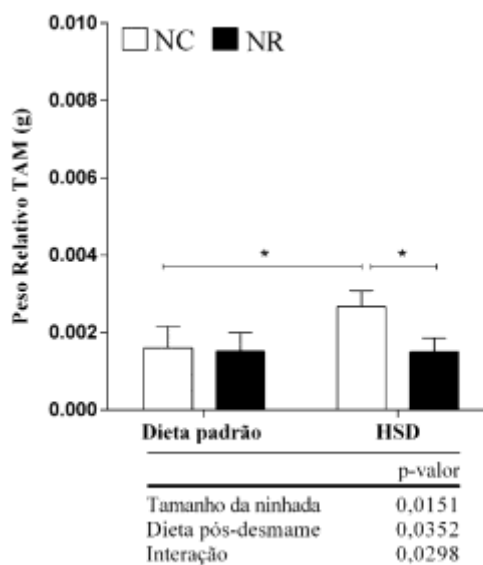
4.6 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre a termogênese adaptativa (peso relativo do TAM, número e tamanho de adipócitos multiloculares e teor de gordura total) após 8 semanas.

4.6.1 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o peso relativo do TAM

Após a eutanásia, o TAM foi dissecado e pesado, parte foi destinada às análises histológicas e a outra parte destinada às análises bioquímicas, conforme descrito na seção Metodologia.

A Figura 10 representa o peso relativo do TAM dos animais ao final do período de 8 semanas de experimento. Para essa variável analisada, foi observado um efeito do tamanho da ninhada, da dieta pós-desmame e da interação ($p < 0,05$), com aumento ~56% no peso relativo do TAM no grupo HSD-NC e uma redução de ~28% no grupo HSD-NR (quando comparados ao STD-NC e HSD-NC, respectivamente). Esses resultados serão discutidos ao final dessa seção.

Figura 10 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o peso relativo do TAM após 8 semanas.



O peso relativo TAM foi calculado a partir da fórmula: (peso absoluto do TAM/ massa corporal do animal). A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

TAM, tecido adiposo marrom; NC, ninhada controle; NR, reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

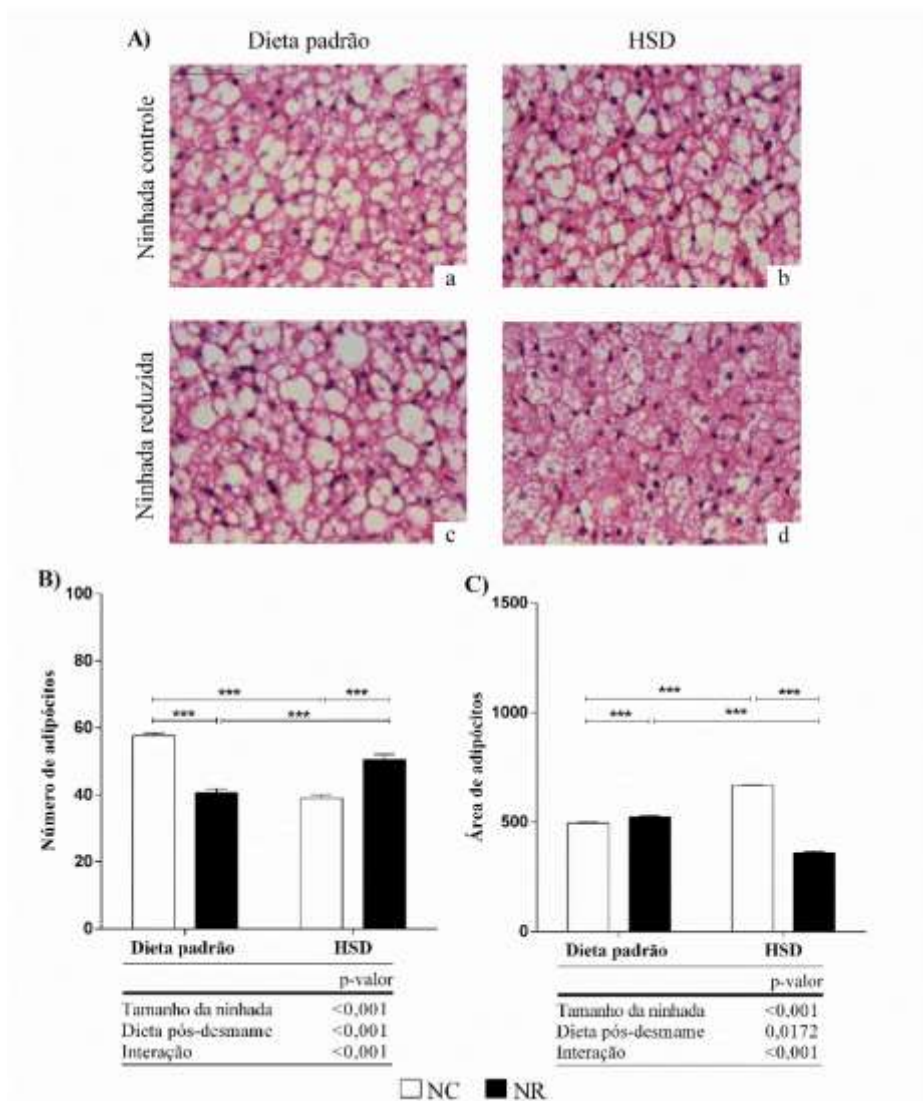
Fonte: elaboração própria.

4.6.2 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o número e tamanho de adipócitos multiloculares

Após a eutanásia, o TAM foi removido e parte foi enviada para a confecção de lâminas histológicas, e, posteriormente, analisada morfometricamente em relação ao número e área dos adipócitos.

A Figura 11 representa secções histológicas da área média dos adipócitos coradas com hematoxilina-eosina, o número e tamanho de adipócitos do TAM após 8 semanas de experimento. Na Figura 11A, encontra-se as secções histológicas dos quatro grupos experimentais: (a) STD-NC; (b) HSD-NC; (c) STD-NR; (d) HSD-NR. Em relação ao número de adipócitos (Figura 11B), observamos efeito do tamanho da ninhada, efeito da dieta pós-desmame e efeito da interação ($p < 0,001$). Para os efeitos do tamanho da ninhada, observamos, uma redução de ~30% no número de adipócitos no grupo STD-NR, comparado ao seu controle (STD-NC). Para os efeitos da dieta pós-desmame, observamos uma redução de ~32% no número de adipócitos no grupo HSD-NC e um aumento de ~24% no número de adipócitos no grupo HSD-NR, quando comparado aos respectivos controles (STD-NC e STD-NR). E por fim, para os efeitos da interação observamos, aumento de ~29% no número de adipócitos nos animais do grupo HSD-NR, comparado ao seu controle (HSD-NC). Para a área dos adipócitos (Figura 11C) também foi observado efeito do tamanho da ninhada, da dieta pós-desmame e da interação ($p < 0,001$). De forma contrária, observamos para os efeitos do tamanho da ninhada, um aumento de ~6% na área dos adipócitos no grupo STD-NR, comparado ao seu controle (STD-NC). Para os efeitos da dieta pós desmame, observamos um aumento de ~35% na área dos adipócitos no grupo HSD-NC e uma redução de ~31% na área dos adipócitos no grupo HSD-NR quando comparado aos respectivos controles (STD-NC e STD-NR). E por fim, para os efeitos da interação, observamos uma redução de ~46% na área dos adipócitos nos animais do grupo HSD-NR, comparado ao seu controle (HSD-NC). Esses resultados sugerem que, individualmente a HSD e o tamanho da ninhada causam hipertrofia e a interação entre essas duas variáveis causam hiperplasia no TAM. Esses resultados serão discutidos ao final dessa seção.

Figura 11 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o número e tamanho de adipócitos multiloculares do TAM após 8 semanas.



A) Secções histológicas dos adipócitos multiloculares coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Barra = 50 μ m. Os cortes das lâminas dos quatro grupos analisados foram fotografados com uma câmera digital, acoplada ao Microscópio Óptico Digital Leica DM5000B. B) Número de adipócitos. O número de adipócitos (que corresponde ao número de núcleos) foi calculado analisando microscopicamente em uma área fixa ($7,5 \times 105 \mu\text{m}^2$), através da plataforma de Morfometria e Microanálise. O Software Leica Qwin v3.5.1 foi utilizado para contar os núcleos presentes nos 15 campos (fotos) analisados em cada lâmina, realizando ao final o cálculo da média do número de núcleos encontrados em cada lâmina, correspondente a um animal. C) Área de adipócitos. A área dos adipócitos foi calculada medindo a área de todos os adipócitos presentes nos 15 campos (fotos), realizando ao final a média da área dos adipócitos encontrados em cada lâmina, que correspondente a um animal. A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$.

TAM, tecido adiposo marrom; NC, ninhada controle; NR, reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

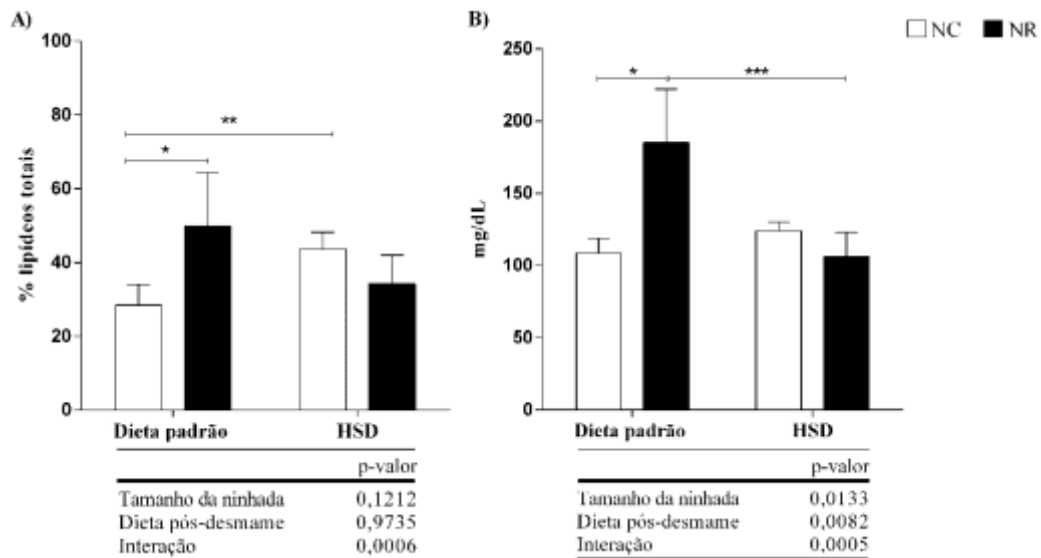
Fonte: elaboração própria.

4.6.3 Efeitos do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídios totais do TAM

Como descrito anteriormente na seção Metodologia, após a eutanásia parte do TAM foi utilizada para determinação do teor de lipídios totais.

A Figura 12 representa o percentual de lipídios totais e a concentração de TAG no TAM. Em relação ao percentual de lipídios totais, foi observado um efeito da interação entre as variáveis, com um aumento de 85% no grupo STD-NR ($p < 0,01$) e um aumento de ~ 54% no grupo HSD-NC ($p < 0,05$), (em relação ao STD-NC) (Figura 12A). Para a concentração tecidual de TAG, observamos um efeito do tamanho da ninhada ($p < 0,05$), da dieta pós-desmame ($p < 0,01$) e da interação ($p < 0,001$). O grupo STD-NR teve um aumento de ~70 % na concentração tecidual de TAG (em relação ao STD-NC), enquanto observamos uma redução de ~51% de TAG no grupo HSD-NR (quando comparado ao STD-NR) (Figura 12B).

Figura 12 - Efeito do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídios totais do TAM após 8 semanas.



A) Percentual de lipídios totais em relação ao peso relativo do TAM. B) Concentração de TAG presente no TAM. A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita conforme previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes por mãe e a ninhada reduzida 4 filhotes por mãe. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA TWO-WAY, seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

TAM, tecido adiposo marrom; NC, ninhada controle; NR, reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples. Fonte: elaboração própria.

Para melhor entendimento dos resultados apresentados nessa seção, voltaremos às características do TAM, que é constituído por adipócitos marrons, armazenam TAG em gotículas multiloculares e apresentam um número maior de mitocôndrias (comparado ao adipócito branco)⁽⁵⁴⁾. Ademais, o TAM tem como função principal oxidar lipídios para produzir calor, portanto, é especializado na termogênese adaptativa, induzida pela exposição ao frio ou à dieta⁽¹²⁷⁾, função essa que se devem à intensa atividade metabólica do número enorme de mitocôndrias, que expressam a proteína *Ucp1*⁽¹²⁸⁾.

Dado o exposto, observamos que, em relação à manipulação do tamanho das ninhadas, nossos resultados sugerem que a redução do tamanho da ninhada provocou uma discreta hipertrofia no TAM, evidenciada pelo aumento da área e pela redução do número de adipócitos no grupo STD-NR (Figura 11B e 11C), sem alterar o peso relativo do tecido (Figura 10), mas com aumento na concentração tecidual de TAG (Figura 12B). Similarmente, Almeida e cols.⁽⁹³⁾, ao manipularem ninhadas de ratos Wistar em três filhotes por mãe (ninhada reduzida) e nove filhotes por mãe (ninhada controle), na análise morfológica encontraram menor número de gotículas lipídicas na área central e periférica do TAM, no grupo controle em comparação à ninhada reduzida. Além disso, na avaliação da área das gotículas lipídicas na periferia dos tecidos mostrou maior deposição de gotículas lipídicas hipertróficas no TAM de ratos da ninhada controle, em comparação com a ninhada reduzida⁽⁹³⁾. De forma semelhante ao observado em nosso trabalho, o que corrobora os nossos resultados, no qual o tamanho da ninhada leva a uma diminuição no número de adipócitos e um aumento em sua área evidenciando uma discreta hipertrofia no TAM.

Por outro lado, os efeitos observados pela introdução da dieta pós desmame, a HSD, sugerem uma hipertrofia do TAM, evidenciada pela maior área e menor número de adipócitos (Figura 11B e 11C), com aumento do peso relativo do tecido no grupo HSD-NC (Figura 10) e sem alteração na concentração tecidual de lipídios e TAG no TAM (Figura 12A e 12B). Esses resultados indicam que a termogênese induzida pela dieta poderia estar estimulando a ativação do TAM, o que explicaria o aumento de sua massa^(94, 95). A literatura relata que esta ativação do TAM relaciona-se a um aparente esforço fisiológico do tecido para conter ganho de peso e a obesidade induzidos pela dieta⁽⁹⁶⁾, sendo esse um mecanismo compensatório do organismo para liberar energia na forma de calor e proteger contra a obesidade. Esses achados sugerem que, apesar do peso relativo do TAM estar aumentado, a sua função poderia estar afetada, uma

vez que a capacidade do TAM em aumentar o gasto de energia pode ser comprometida em indivíduos com sobrepeso⁽⁹¹⁾. Nesse sentido, a literatura ainda sugere que um aumento sustentado do tônus simpático após exposição prolongada ao frio por várias semanas (aclimatação ao frio) induz adicionalmente o recrutamento de novos adipócitos marrons, levando à hiperplasia e hipertrofia tecidual⁽¹²⁹⁻¹³¹⁾. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a HSD pode exercer, como a exposição ao frio, uma ativação simpática produzindo a hipertrofia do TAM. Essa hipótese vai de acordo com os dados anteriores do nosso grupo, que demonstram que a HSD aumenta o tamanho do TAM, a expressão do RNAm e da proteína da *Ucp1* após 8 semanas⁽¹⁸⁾, sugerindo que a HSD induz a termogênese adaptativa no TAM.

Por fim, surpreendentemente, a interação entre as duas variáveis (tamanho da ninhada e HSD) resultou em hiperplasia do TAM, evidenciada pelo maior número de adipócitos e uma menor área dos adipócitos (Figura 11), apesar de diminuir o peso relativo do tecido (Figura 10), com efeito na porcentagem de lipídios no TAM (Figura 12A), apesar do pós-teste não ter mostrado diferença nessa análise. Em um estudo realizado por Xiao e cols.⁽⁹²⁾ ao investigarem o efeito, a longo prazo, do excesso de ganho de peso precoce através da redução do tamanho das ninhadas (três filhotes por mãe) no período da lactação, observaram que os animais da ninhada reduzida apresentaram ganho de peso excessivo pós-desmame, e, quando adultos (8 semanas), tiveram a capacidade termogênica reduzida, com redução na expressão de *Ucp1*. Além disso, quando expostos ao frio, o TAM destes animais demonstrou menor responsividade, sugerindo que a manipulação do tamanho da ninhada pode afetar tanto a termogênese do TAM, quanto a termogênese adaptativa⁽⁹²⁾. Dessa forma, de acordo com estes achados, a redução do TAM no grupo HSD-NR poderia ser explicada pelo fato de que o ganho excessivo de peso pós-natal resultaria em anormalidades na termogênese adaptativa. Entretanto, faz-se necessário realizar a análise da expressão gênica e proteica de *Ucp1* para comprovar nossa hipótese, uma vez que, apesar dos dados anteriores demonstrarem alteração no grupo HSD, precisamos analisar a eficiência do TAM em nosso modelo, para confirmar essa hipótese.

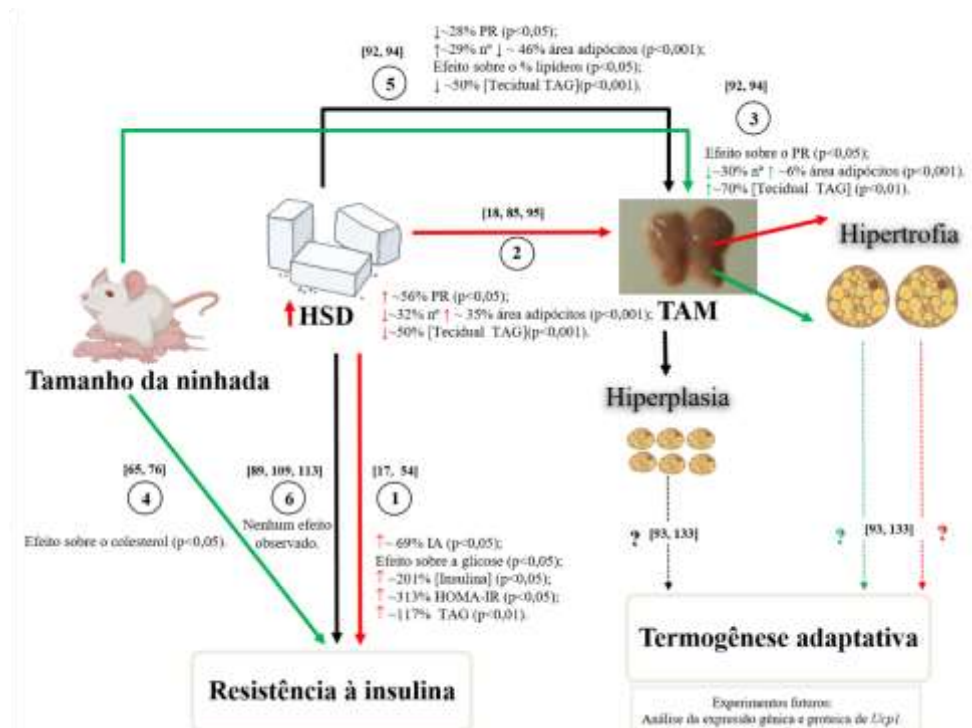
Além disso, considerando o que foi já discutido, podemos acrescentar que, na visão atual da literatura, encontramos que a lipólise do TAM é essencial para a termogênese induzida pelo frio, porque os ácidos graxos derivados do TAM ativam a *Ucp1* e atuam como substrato do combustível primário⁽⁸⁵⁾. Entretanto, em um estudo realizado por Schreiber e cols.⁽¹³²⁾ em ratos com diferentes genótipos, foi demonstrado que a perda da enzima lipase de triacilglicerol do

adipócito específica para o TAM altera a morfologia desse tecido, mas não prejudica a termogênese induzida pelo frio, uma vez que eles observaram que a termogênese induzida pelo frio depende do suprimento de nutrientes ou lipólise no tecido adiposo branco durante o jejum, sugerindo que os substratos de energia circulante são suficientes para alimentar essa termogênese ⁽¹³²⁾. Em outras palavras, esse estudo demonstra que o TAM não necessita necessariamente da oxidação dos ácidos graxos tecidual para ativação da termogênese adaptativa. Dessa forma, nossos resultados sugerem que, apesar da interação entre as duas variáveis (tamanho da ninhada e HSD) não alterar o percentual de lipídeo no TAM, há uma redução de ~51% na concentração tecidual de TAG no TAM, sugerindo uma oxidação. Nessa perspectiva, nossos resultados sugerem que, a função termogênica do tecido ainda pode ser realizada, mediante ao fato que a termogênese não ocorre apenas devido aos ácidos graxos do TAM, podendo ainda vir da circulação, como exemplificado por Schreiber e cols. ⁽¹³²⁾. No entanto, apesar de atrativos, esses resultados são insuficientes para confirmarmos a nossa hipótese, que a redução no tamanho na ninhada seria capaz de modular a termogênese adaptativa em ratos. Dessa forma, faz-se necessário realizar novos experimentos, como, por exemplo, realizar a análise da expressão gênica e proteica de *Ucp1* para analisarmos a eficiência do TAM nesse grupo de animais. Partindo da premissa que a ativação do metabolismo do TAM desempenha um papel substancial no metabolismo energético de todo o corpo e, portanto, é um alvo atraente para facilitar a perda de peso e melhorar a saúde metabólica, considerando que a modulação nutricional da termogênese adaptativa é uma área de pesquisa recentemente desenvolvida, é necessário avaliar minuciosamente seu potencial.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados obtidos nesse estudo são exemplificados e resumidos pela Figura 13, a seguir.

Figura 13 – Figura resumo: Alterações morfológicas e no teor de lipídios do tecido adiposo marrom induzidas pela manipulação do tamanho da ninhada e resistência à insulina.



- ① Representa os efeitos da dieta pós-desmame (HSD) sobre a RI, após o período de 8 semanas experimentais;
- ② Representa os efeitos da dieta pós-desmame (HSD) sobre os parâmetros do TAM (peso relativo, número e área dos adipócitos multiloculares e teor de gordura total), após o período de 8 semanas experimentais;
- ③ Representa os efeitos do tamanho da ninhada sobre os parâmetros do TAM (peso relativo, número e área dos adipócitos multiloculares e teor de gordura total), após o período de 8 semanas experimentais
- ④ Representa os efeitos do tamanho da ninhada sobre a RI, após o período de 8 semanas experimentais;
- ⑤ Representa os efeitos da interação entre as duas variáveis (tamanho da ninhada e dieta pós-desmame (HSD)) sobre os parâmetros do TAM (peso relativo, número e área dose adipócitos multiloculares e teor de gordura total), após o período de 8 semanas experimentais;
- ⑥ Representa os efeitos da interação entre as duas variáveis (tamanho da ninhada e dieta pós-desmame (HSD)) sobre a RI, após o período de 8 semanas experimentais;
- ↑ Seta contínua verde: efeitos do tamanho da ninhada
- ↑ Seta contínua vermelha: efeitos da dieta pós-desmame (HSD)
- ↑ Seta contínua preta: efeitos da interação [tamanho da ninhada e dieta pós-desmame (HSD)]
- ↑ Seta tracejada: possíveis efeitos (não comprovados pelo trabalho)
- HSD: dieta rica em carboidratos simples; TAM: tecido adiposo marrom; RI: resistência à insulina; IA: Índice de Adiposidade; HOMA-IR: Índice de resistência à insulina; TAG: triacilglicerol; PR: peso relativo do TAM; *Ucp1*: proteína desacopladora 1; n°: número; []: concentração.
- Fonte: elaboração própria.

Em suma, os principais resultados obtidos foram:

- A manipulação do tamanho das ninhadas foi eficiente em induzir sobrepeso neonatal;
- A HSD foi responsável por influenciar o CEA e o CGPCC (Figura 06B e C), exercendo um efeito no índice de adiposidade (Figura 07C) e elevando as concentrações de TAG (Figura 09B), bem como resultando em RI na ninhada controle (Figura 08).
- A HSD aumentou o peso relativo do TAM (Figura 10), reduzindo o número de adipócitos marrons (Figura 11B) e aumentando o seu diâmetro (Figura 11C), bem como aumentou o teor de TAG do tecido (Figura 12), sugerindo uma hipertrofia do TAM na ninhada controle.
- O tamanho da ninhada influenciou as concentrações de colesterol sérico (Figura 09A) e o peso relativo do TAM (Figura 10). Além disso, resultou numa diminuição do número de adipócitos marrons (Figura 11B) e um aumento na sua área (Figura 11C), sem modificar o percentual de lipídios totais, mas elevando o teor de TAG no TAM.
- Entretanto, a interação entre as duas variáveis (tamanho da ninhada e dieta pós-desmame) foi capaz de reduzir o peso relativo do TAM (Figura 10), aumentando o número de adipócitos (Figura 11B) e reduzindo a sua área (Figura 11C), bem como influenciou o percentual de lipídios totais (Figura 12A) e diminuiu o teor de TAG no tecido (Figura 12B), sugerindo a ocorrência de hiperplasia do TAM na ninhada reduzida alimentada com HSD.

Diante do exposto, os resultados apresentados até o momento são insuficientes para concluir se a manipulação do tamanho das ninhadas seria capaz de interferir no desenvolvimento da RI induzida pela HSD modulando a termogênese adaptativa em ratos jovens, uma vez que futuros experimentos, como a análise da expressão gênica e proteica de *Ucp1*, são necessários para comprovar a nossa hipótese.

6. REFERÊNCIAS

1. Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson A-M, Matthews PJ, Morgan ML, Mckee C, et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of hepatology*. 2010;52(6):913-20.
2. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;69(2):179-97.
3. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*. 2012;94(11):2242-63.
4. Guran T, Bereket A. International epidemic of childhood obesity and television viewing. *Minerva Pediatr*. 2011;63(6):483-90.
5. Hackman CL, Knowlden AP. Theory of reasoned action and theory of planned behavior-based dietary interventions in adolescents and young adults: a systematic review. *Adolescent health, medicine and therapeutics*. 2014;5:101.
6. Shankar K, Harrell A, Kang P, Singhal R, Ronis MJ, Badger TM. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. *Endocrinology*. 2010;151(1):153-64.
7. Joslowski G, Goletzke J, Cheng G, Günther A, Bao J, Brand-Miller J, et al. Prospective associations of dietary insulin demand, glycemic index, and glycemic load during puberty with body composition in young adulthood. *International journal of obesity*. 2012;36(11):1463-71.
8. McDevitt RM, Bott SJ, Harding M, Coward WA, Bluck LJ, Prentice AM. De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(6):737-46.
9. de Queiroz KB, Honorato-Sampaio K, Junior JVR, Leal DA, Pinto ABG, Kappes-Becker L, et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. *PloS one*. 2017;12(2).
10. Bonet ML, Mercader J, Palou A. A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie*. 2017;134:99-117.
11. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(2):143.
12. Clarke MA, Stefanidis A, Spencer SJ. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. *Journal of neuroendocrinology*. 2012;24(3):511-24.
13. Stefanidis A, Spencer SJ. Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat. *PloS one*. 2012;7(12):e52130.
14. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl M. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50(4):237-43.
15. Hou M, Liu Y, Zhu L, Sun B, Guo M, Burén J, et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PloS one*. 2011;6(11).
16. Ong KK, Loos RJ. Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta paediatrica*. 2006;95(8):904-8.
17. de Queiroz KB, Guimarães JB, Coimbra CC, Rodovalho GV, Carneiro CM, Evangelista EA, et al. Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids*. 2014;49(1):85-96.
18. de Queiroz KB, Rodovalho GV, Guimarães JB, de Lima DC, Coimbra CC, Evangelista EA, et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue

- while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Nutrition research*. 2012;32(9):709-17.
19. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35(7):595-601.
 20. Barker DJ, Hales CN, Fall C, Osmond C, Phipps K, Clark P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36(1):62-7.
 21. Vaag A, Grunnet L, Arora G, Brøns C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia*. 2012;55(8):2085-8.
 22. Silveira VMFd, Horta BL. Peso ao nascer e síndrome metabólica em adultos: meta-análise. *Revista de Saúde Pública*. 2008;42:10-8.
 23. Ravelli G-P, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *New England Journal of Medicine*. 1976;295(7):349-53.
 24. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *British medical bulletin*. 2001;60(1):5-20.
 25. Eriksson J, Forsen T, Jaddoe V, Osmond C, Barker D. The effects of childhood growth and maternal body size on insulin resistance in elderly men and women. *Diabetologia*. 2002;45:342-9.
 26. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). *Jornal de Pediatria*. 2007;83(6):494-504.
 27. Lucas A, Brooke O, Morley R, Cole T, Bamford M. Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. *Bmj*. 1990;300(6728):837-40.
 28. Lucas A, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *Bmj*. 1998;317(7171):1481-7.
 29. Panel N-SE. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(6):S1-S58.
 30. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics*. 2005;115(5):1367-77.
 31. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003;33(3s):245.
 32. Gali Ramamoorthy T, Begum G, Harno E, White A. Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:126.
 33. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani K, Rached M, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *International journal of obesity*. 2008;32(9):1373-9.
 34. Delage B, Dashwood RH. Dietary manipulation of histone structure and function. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:347-66.
 35. Nistala R, Hayden MR, DeMarco VG, Henriksen EJ, Lackland DT, Sowers JR. Prenatal programming and epigenetics in the genesis of the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Medicine*. 2011;1(4):243-54.
 36. Kusawa C. Fetal origins of developmental plasticity: are fetal cues reliable predictors of the future nutrition environments. *Am J Hum Biol*. 2005;17:5-21.

37. Smith CJ, Ryckman KK. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2015;8:295.
38. Anzman SL, Rollins BY, Birch LL. Parental influence on children's early eating environments and obesity risk: implications for prevention. *International journal of obesity*. 2010;34(7):1116-24.
39. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annual review of public health*. 2001;22(1):355-75.
40. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clinical science*. 1998;95(2):115-28.
41. Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Archives of disease in childhood*. 1994;71(4):288.
42. Hanson Ma, Gluckman P. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*. 2014;94(4):1027-76.
43. He Z, Sun Z, Liu S, Zhang Q, Tan Z. Effects of early malnutrition on mental system, metabolic syndrome, immunity and the gastrointestinal tract. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2009;71(9):1143-50.
44. Xavier JLP, Scomparin DX, Pontes CC, Ribeiro PR, Cordeiro MM, Marcondes JA, et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019;91.
45. Stephen A, Alles M, De Graaf C, Fleith M, Hadjilucas E, Isaacs E, et al. The role and requirements of digestible dietary carbohydrates in infants and toddlers. *European journal of clinical nutrition*. 2012;66(7):765-79.
46. Saúde BMD. GUIA ALIMENTAR PARA CRIANÇAS BRASILEIRAS MENORES DE 2 ANOS: Ministério da Saúde; 2019.
47. Brand-Miller J, Buyken AE. The glycemic index issue. *Current opinion in lipidology*. 2012;23(1):62-7.
48. VIGITEL B. Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Agência Nacional de Saúde Suplementar–Brasília: Ministério da Saúde. 2018.
49. OMS/OPS. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ...; 2016.
50. Wang Y, Li M, Du J, Mao C. Prevention of taxi accidents in Xi'an, China: what matters most? *Central European journal of public health*. 2015;23(1):77-83.
51. Carvalheira JB, Zecchin HG, Saad MJ. Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46(4):419-25.
52. Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Experimental biology and medicine*. 2001;226(1):13-26.
53. Machado UF. Transportadores de glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 1998;42:413-21.
54. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*: Artmed Editora; 2018.
55. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(2):165-9.
56. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-70.

57. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
58. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England journal of medicine*. 2002;346(6):393-403.
59. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(18):1343-50.
60. Shulman GI. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology*. 2004;19(4):183-90.
61. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*. 2007;87(2):507-20.
62. Pauli JR, Cintra DE, Souza CTd, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2009;53:399-408.
63. Isganaitis E, Woo M, Ma H, Chen M, Kong W, Lytras A, et al. Developmental programming by maternal insulin resistance: hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dysregulated lipid metabolism in male offspring of insulin-resistant mice. *Diabetes*. 2014;63(2):688-700.
64. Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;291(4):E792-E9.
65. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology*. 2009;587(20):4963-76.
66. Rodekamp E, Harder T, Kohlhoff R, Franke K, Dudenhausen JW, Plagemann A. Long-term impact of breast-feeding on body weight and glucose tolerance in children of diabetic mothers: role of the late neonatal period and early infancy. *Diabetes care*. 2005;28(6):1457-62.
67. Grunewald M, Hellmuth C, Demmelmair H, Koletzko B. Excessive weight gain during full breast-feeding. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2014;64(3-4):271-5.
68. Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen KF, et al. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;49(1):112-25.
69. Gimeno S, Souza J. Breast-feeding, bottle-feeding and the type 1 diabetes mellitus: examining the evidences. *Rev Bras Epidemiol*. 1998;1:4-13.
70. Leal D, Fialho F, Dias I, Nascimento L, Arruda W. The profile of people with Type 1 Diabetes considering their history of breast feeding. *Esc Anna Nery*. 2011;15:68-74.
71. Passanha A, Cervato-Mancuso AM, Silva MEMPe. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias. *Journal of Human Growth and Development*. 2010;20:351-60.
72. Gunderson EP. Breast-feeding and diabetes: long-term impact on mothers and their infants. *Current diabetes reports*. 2008;8(4):279-86.

73. Parikh NI, Hwang S-J, Ingelsson E, Benjamin EJ, Fox CS, Vasan RS, et al. Breastfeeding in infancy and adult cardiovascular disease risk factors. *The American journal of medicine*. 2009;122(7):656-63. e1.
74. Hunsberger M, Lanfer A, Reeske A, Veidebaum T, Russo P, Hadjigeorgiou C, et al. Infant feeding practices and prevalence of obesity in eight European countries—the IDEFICS study. *Public health nutrition*. 2013;16(2):219-27.
75. Das UN. Breastfeeding prevents type 2 diabetes mellitus: but, how and why? *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(5):1436-7.
76. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(5):1043-54.
77. Lucas A, Boyes S, Bloom S, Aynsley-Green A. Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: differences between breast and cow's milk formula feeding. *Acta Pædiatrica*. 1981;70(2):195-200.
78. Pereira PF, Rita de Cássia GA, Araújo RMA. O aleitamento materno influencia o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus na criança? Uma análise das evidências atuais. *Jornal de Pediatria*. 2014;90(1):7-15.
79. Draganski B, May A. Training-induced structural changes in the adult human brain. *Behavioural brain research*. 2008;192(1):137-42.
80. Higa-Taniguchi KT, Felix JV, Michelini LC. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. *Experimental physiology*. 2009;94(11):1103-13.
81. DAVID LN, COX M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed; 2014.
82. Rousset S, Alves-Guerra M-C, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier A-M, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004;53(suppl 1):S130-S5.
83. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology*. 2011;2:85.
84. Kajimura S, Saito M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annual review of physiology*. 2014;76:225-49.
85. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004;84(1):277-359.
86. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 73 (1): 9-15.
87. Cerf ME, Chapman CS, Louw J. High-fat programming of hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperleptinemia, and altered islet architecture in 3-month-old wistar rats. *ISRN endocrinology*. 2012;2012.
88. Wurtman JJ, Miller SA. Effect of litter size on weight gain in rats. *The Journal of nutrition*. 1976;106(5):697-701.
89. Plagemann A, Rake A, Harder T, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Reduction of cholecystinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Neuroscience letters*. 1998;258(1):13-6.
90. Cancian CRC. *A MANIPULAÇÃO DA PROLE DURANTE O PERÍODO LACTACIONAL MODIFICA A MORFOFISIOLOGIA MATERNA*. 2014.
91. Stefanidis A, Spencer SJ. Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat. *PloS one*. 2012;7(12).

92. Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS, et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2007;148(9):4150-9.
93. de Almeida DL, Fabrício GS, Trombini AB, Pavanello A, Tófolo LP, da Silva Ribeiro TA, et al. Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32(6):1621-30.
94. Moriya M. Nutritional adaptation in brown adipose tissue thermogenesis--with special reference to overfeeding and iron deficiency. [*Hokkaido igaku zasshi*] *The Hokkaido journal of medical science*. 1994;69(5):1115-31.
95. Margareto J, Marti A, Martínez JA. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPAR γ . *The Journal of nutritional biochemistry*. 2001;12(3):130-7.
96. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*. 1979;281(5726):31-5.
97. Spencer SJ, Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(8):1133-43.
98. de Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metabolic brain disease*. 2008;23(4):361-73.
99. Lutz-OAL OA. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São PauloI: OAL; 2008.
100. IAL IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IAL, Normas Analíticas. 2008.
101. Cunniff P. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis. AOAC; 1996.
102. TORRES EA, CAMPOS NC, DUARTE M, GARBELOTTI ML, PHILIPPI ST, MINAZZI-RODRIGUES RS. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Food Science and Technology*. 2000;20(2):145-50.
103. Watt BK, Merrill AL. Composition of foods: raw, processed, prepared: Consumer and Food Economics Research Division, Agricultural Research Service ...; 1964.
104. Nery CdS, Pinheiro IL, Muniz GdS, Vasconcelos DAAd, França SPd, Nascimento Ed. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2011;17(1):49-55.
105. Lee MO. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1929;89(1):24-33.
106. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*. 1996;34(3):389-98.
107. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
108. Folch J, Lees M, Stanley GS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*. 1957;226(1):497-509.
109. Balonan LC, Sheng H-P. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. *Pediatric research*. 2000;48(5):668-73.

110. Houtp KA, Epstein AN. Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1973;225(1):58-66.
111. Davidowa H, Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport*. 2001;12(15):3201-4.
112. de Queiroz KB, Coimbra RS, Ferreira AR, Carneiro CM, Paiva NCN, Costa DC, et al. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(12):2331-41.
113. Swenne I, Borg L, Crace C, Landström AS. Persistent reduction of pancreatic beta-cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia*. 1992;35(10):939-45.
114. Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 1992;99(03):154-8.
115. Thompson N, Huber K, Bedürftig M, Hansen K, Miles-Chan J, Breier BH. Metabolic programming of adipose tissue structure and function in male rat offspring by prenatal undernutrition. *Nutrition & metabolism*. 2014;11(1):50.
116. Weinkove C, Weinkove E, Pimstone B. Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. *Clinical science and molecular medicine*. 1976;50(3):153-63.
117. Crace C, Swenne I, Milner R. Long-term follow-up after early protein-calorie malnutrition in young rats: sex difference in glucose tolerance and serum insulin levels. *Metabolism*. 1989;38(10):933-8.
118. de OLIVEIRA CL, de MELLO MT, de Pádua CINTRA I, FISBERG M. Obesity and metabolic syndrome in infancy and adolescence. 2004.
119. Boque N, Campi3n J, Paternain L, Garcia-Diaz D, Galarraga M, Portillo M, et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2009;65(4):387-95.
120. Leahy J, Cooper H, Deal D, Weir G. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *The Journal of clinical investigation*. 1986;77(3):908-15.
121. Rinaldi W, Ribeiro TAdS, Marques AS, Fabricio GS, T3f3lo LP, Gomes RM, et al. Efeito da redu33o de ninhada sobre as respostas auton33micas e metab33licas de ratos Wistar. *Revista de Nutri33o*. 2012;25(3):321-30.
122. Hahn P, Koldovsk33 O. *Utilization of Nutrients During Postnatal Development: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology: Zoology*: Elsevier; 2013.
123. Hahn P, Walker BL. Hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase response to litter size in suckling rats. *Canadian journal of biochemistry*. 1979;57(10):1216-9.
124. Hahn P. Late effect of premature weaning on blood cholesterol levels in adult rats. 1976.
125. Parks EJ. Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2002;61(2):281-6.
126. Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(10):2244-50.
127. Himms-Hagen J. Obesity may be due to a malfunctioning of brown fat. *Canadian Medical Association Journal*. 1979;121(10):1361.
128. Gonzalez-Barroso MDM, Ricquier D, Cassard-Doulicier AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *obesity reviews*. 2000;1(2):61-72.

129. Bukowiecki LJ, Geloan A, Collet AJ. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1986;250(6):C880-C7.
130. Cameron IL, Smith RE. Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. *The Journal of cell biology*. 1964;23(1):89-100.
131. Davis T, Johnston D, Bell F, Cremer B. Regulation of shivering and nonshivering heat production during acclimation of rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1960;198(3):471-5.
132. Schreiber R, Diwoky C, Schoiswohl G, Feiler U, Wongsiriroj N, Abdellatif M, et al. Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell metabolism*. 2017;26(5):753-63.e7.
133. Fukano K, Okamatsu-Ogura Y, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K. Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a β 3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166579.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Padronização das dosagens bioquímicas em placa de ELISA: glicose, colesterol total e TAG

Para a padronização das dosagens de glicose além da leitura com as diluições recomendadas pelo kit em cubetas no espectrofotômetro, foram realizados teste com diluições diferentes em placa de elisa no leitor de absorvância. Para a leitura na cubeta foi utilizado as diluições 20 μ l de amostra, 20 μ l de reagente nº 2 (padrão) e para 1000 μ l de reagente nº 1, para a leitura na placa de elisa foi determinado duas diluições diferentes, no teste 1: 2,5 μ l de amostra de soro, 2,5 μ l do reagente nº 2 (padrão) e 247,5 μ l do reagente nº 1 e no teste 2: 5 μ l de amostra de soro, 5 μ l do reagente nº 2 (padrão) e 245 μ l do reagente nº 1. Foram utilizadas as amostras de soro extra da ninhada 1, 2 e 3, analisando uma amostra de cada grupo, todo o experimento foi realizado em duplicata.

De forma resumida, o teste na cubeta consistiu primeiramente na marcação dos 12 eppendorf (2ml), seguindo com B1 e B2 para os brancos; P1 e P2 para os padrões e os demais eppendorf foram marcados com a identificação do animal utilizado (Por exemplo N101). Em seguida com o auxílio de uma pipeta (LabMate, Voivodia de Opole Polônia), foi pipetado 10 μ l das mostras de soro dos respectivos animais nos 8 eppendorf, em seguida foi pipetado 10 μ l do reagente nº2 (padrão) nos 2 eppendorf P1 e P2, e por último foi medido 14 ml do reagente nº 1 em uma proveta (Ionglass, Paraná, Brasil) e transferido para um béquer Béquer (Satelit, São Paulo, Brasil) e pipetado 1000 μ l desse reagente em todos os 12 eppendorf. Em seguida, todos os eppendorf foram passados no agitador de tubos (Fanem, São Paulo, Brasil) para misturar amostra e reagente. Feito isso, eles foram levados ao banho maria (Hemoquímica, Minas Gérias, Brasil) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feito a leitura de cada conteúdo dos eppendorf no espectrofotômetro (Biospectro, Minas Gérias, Brasil), os valores foram anotados para os cálculos futuros.

No teste na placa de elisa como forma de planejamento do experimento foi feito o mapa da placa de cultura (Kasvi, Paraná, Brasil), uma vez que é importante saber a localização das amostras, para posterior leitura da absorvância. Feito isso, iniciou o experimento, em resumo, com o auxílio de uma pipeta (LabMate) para o teste 1 pipetou 2,5 μ l de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 2,5 μ l do reagente nº 2 (padrão) nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 247,5 μ l do reagente nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Para o teste 2 pipetou 5 μ l de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 5 μ l do reagente nº 2 (padrão) nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 245 μ l do reagente

nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Em seguida a placa foi levada a estufa (Cienlab Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feita a leitura da absorbância no leitor de absorbância (Biotek, Winooski, VT) e os cálculos para encontrar os valores de glicose foram efetuados, pela seguinte fórmula: $\text{Glicose(mg/dl)} = (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do padrão}) \times 100$.

Para a padronização das dosagens de Colesterol Total além da leitura com as diluições recomendadas pelo kit em cubetas no espectrofotômetro, foram realizados teste com diluições diferentes em placa de elisa no leitor de absorbância. Para a leitura na cubeta foi utilizado as diluições 10µl de amostra, 10µl de reagente nº 2 (padrão) e para 1000µl de reagente nº 1, para a leitura na placa de elisa foi determinado duas diluições diferentes, no teste 1: 2,5µl de amostra de soro, 2,5µl do reagente nº 2 (padrão) e 247,5 µl do reagente nº 1 e no teste 2: 5µl de amostra de soro, 5µl do reagente nº 2 (padrão) e 245µl do reagente nº 1. Também foram utilizadas as amostras de soro extra da ninhada 1, 2 e 3, analisando uma amostra de cada grupo, todo o experimento foi realizado em duplicata.

De forma resumida e similar a dosagem anterior, o teste na cubeta consistiu primeiramente na marcação dos 12 eppendorf (2ml), seguindo com B1 e B2 para os brancos; P1 e P2 para os padrões e os demais eppendorf foram marcados com a identificação do animal utilizado (Por exemplo: N101). Em seguida com o auxílio de uma pipeta (LabMate), foi pipetado 10µl das mostras de soro dos respectivos animais nos 8 eppendorf, em seguida foi pipetado 10µl do reagente nº2 (padrão) nos 2 eppendorf P1 e P2, e por último foi medido 14 ml do reagente nº 1 em uma proveta (Ionglass) e transferido para um béquer Béquer (Satelit) e pipetado 1000µl desse reagente em todos os 12 eppendorf. Em seguida, todos os eppendorf foram passados no agitador de tubos (FANEM) para misturar amostra e reagente. Feito isso, eles foram levados ao banho maria (Hemoquímica) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feita a leitura de cada conteúdo dos eppendorf no espectrofotômetro (Biospectro).

No teste na placa de elisa como forma de planejamento do experimento foi feito o mapa da placa de cultura (Kasvi), uma vez que é importante saber a localização das amostras, para posterior leitura da absorbância. Feito isso, iniciou o experimento, em resumo, com o auxílio de uma pipeta (LabMate) para o teste 1 pipetou 2,5µl de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 2,5µl do reagente nº 2 (padrão)

nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 247,5µl do reagente nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Para o teste 2 pipetou 5µl de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 5 µl do reagente nº 2 (padrão) nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 245 µl do reagente nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Em seguida a placa foi levada a estufa (Cienlab) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feita a leitura da absorbância no leitor de absorbância (Biotek) e os cálculos para encontrar os valores de colesterol total foram efetuados, segue abaixo a fórmula utilizada: $\text{Colesterol total(mg/dl)} = (\text{absorbância do teste} - \text{absorbância do padrão}) \times 200$.

Para a padronização das dosagens de TAG além da leitura com as diluições recomendadas pelo kit em cubetas no espectrofotômetro, foram realizados teste com diluições diferentes em placa de elisa no leitor de absorbância. Para a leitura na cubeta foi utilizado as diluições 10 µl de amostra, 10µl de reagente nº 2 (padrão) e para 1000µl de reagente nº 1, para a leitura na placa de elisa foi determinado duas diluições diferentes, no teste 1: 2,5µl de amostra de soro, 2,5µl do reagente nº 2 (padrão) e 247,5µl do reagente nº 1 e no teste 2: 5µl de amostra de soro, 5µl do reagente nº 2 (padrão) e 245µl do reagente nº 1. Também foram utilizadas as amostras de soro extra da ninhada 1, 2 e 3, analisando uma amostra de cada grupo, todo o experimento foi realizado em duplicata.

De forma resumida e similar a dosagem anterior, o teste na cubeta consistiu primeiramente na marcação dos 12 eppendorf (2ml), seguindo com B1 e B2 para os brancos; P1 e P2 para os padrões e os demais eppendorf foram marcados com a identificação do animal utilizado (Por exemplo: N101). Em seguida com o auxílio de uma pipeta (LabMate), foi pipetado 10µl das mostras de soro dos respectivos animais nos 8 eppendorf, em seguida foi pipetado 10µl do reagente nº2 (padrão) nos 2 eppendorf P1 e P2, e por último foi medido 14 ml do reagente nº 1 em uma proveta (Ionglass) e transferido para um béquer Béquer (Satelit) e pipetado 1000µl desse reagente em todos os 12 eppendorf. Em seguida, todos os eppendorf foram passados no agitador de tubos (FANEM, São Paulo, Brasil) para misturar amostra e reagente. Feito isso, eles foram levados ao banho maria (Hemoquímica) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feito a leitura de cada conteúdo dos eppendorf no espectrofotômetro (Biospectro).

No teste na placa de elisa como forma de planejamento do experimento foi feito o mapa da placa de cultura (Kasvi), uma vez que é importante saber a localização das amostras, para

posterior leitura da absorbância. Feito isso, iniciou o experimento, em resumo, com o auxílio de uma pipeta (LabMate) para o teste 1 pipetou 2,5µl de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 2,5µl do reagente nº 2 (padrão) nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 247,5µl do reagente nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Para o teste 2 pipetou 5µl de amostra de soro nos respectivos poços da placa referentes as amostras dos animais, em seguida pipetou 5 µl do reagente nº 2 (padrão) nos poços referentes ao padrão e por último pipetou 245 µl do reagente nº 1 em todos os poços da placa utilizados. Em seguida a placa foi levada a estufa (Cienlab) por 10 minutos a 37°C, após esse tempo foi feito a leitura da absorbância no leitor de absorbância (Biotek) e os cálculos para encontrar os valores de TAG foram efetuados, segundo a fórmula: TAG (mg/dl)=(absorbância do teste/absorbância do padrão) ×200.

Após os experimentos para padronização das dosagens bioquímicas ficou definido utilizar a placa de elisa para fazer as leituras de absorbância, com a diluição de 50 vezes com os valores de 5µl de amostra de soro, 5µl do reagente nº 2 (padrão) e 245µl do reagente nº1.

APÊNDICE 02 – Dados da ingestão em gramas dos animais por grupo, durante as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Semanas (ingestão em gramas)									Ingestão diária(g)	Ingestão final(g)	Ingestão final (Kcal)
		Adaptação	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª			
Dieta padrão- NC	N1.01	0	0	120	160	161	170	461	174	257	22,3	1246,0	3875,1
	N2.01	30	104	222	180	189	180	238	204	109	24,1	1347,0	4189,9
	N3.01	77	111	153	138	176	237	134	166	222	21,3	1192,0	3708,1
	N4.01	82	115	159	182	207	164	182	189	99	22,8	1278,0	3974,6
	N4.02	82	115	159	182	207	164	182	189	99	22,8	1278,0	3974,6
	Média	-	54,3	88,8	162,4	168,4	188,0	182,8	239,4	184,2	157,2	22,6	1268,3
SD	-	37,4	49,8	36,9	19,4	19,9	31,0	129,2	14,7	76,4	1,0	56,3	175,2
Dieta HSD- NC	N1.04	0	0	58	126	143	219	183	172	322	16,1	901	2531,8
	N2.04	30	114	250	170	180	184	234	274	58	25,6	1436	4035,8
	N3.04	77	124	165	171	173	222	132	189	186	22,4	1253	3521,9
	N4.03	24	115	158	167	171	160	170	180	60	20,5	1146	3221,2
	N4.04	24	115	158	167	171	160	170	180	60	20,5	1146	3221,2
	N4.05	24	115	158	167	171	160	170	180	60	20,5	1146	3221,2
Média	-	30,1	97,3	158,0	161,5	168,3	184,0	176,3	196,0	124,4	20,9	1171,6	3292,2
SD	-	25,4	47,8	60,8	17,5	12,9	29,8	33,1	38,6	109,2	3,1	174,3	489,7
Dieta padrão-NR	N1.02	0	0	120	160	161	170	461	174	257	22,3	1246,0	3875,1
	N1.03	0	0	120	160	161	170	461	174	257	22,3	1246,0	3875,1
	N2.02	43	104	222	180	189	180	238	204	109	24,3	1360,0	4229,6
	N2.03	43	104	222	180	189	180	238	204	109	24,3	1360,0	4229,6
	N3.02	79	111	153	138	176	237	134	166	222	21,3	1194,0	3715,4
	N3.03	79	111	153	138	176	237	134	166	222	21,3	1194,0	3715,42
Média	-	40,9	71,7	165,0	159,3	175,3	195,7	277,7	181,3	196,0	22,6	1266,9	3940,0
SD	-	35,7	55,6	46,6	18,8	12,5	32,3	149,4	17,9	69,2	1,2	75,7	235,4

(Continuação)													
	N1.05	0	0	58	126	143	219	183	172	322	16,1	901,0	2531,8100
	N1.06	0	0	58	126	143	219	183	172	322	25,9	901,0	2531,8100
	N2.05	43	114	250	170	180	184	234	274	58	25,9	1449,0	4071,6900
	N2.06	43	114	250	170	180	184	234	274	58	22,4	1449,0	4071,6900
	N3.05	79	124	165	171	173	222	132	189	186	22,4	1255,0	3528,4327
Dieta HSD- NR	N3.06	79	124	165	171	173	222	132	189	186	21,5	1255,0	3528,4327
Média	-	40,9	79,3	157,7	155,7	165,3	208,3	183,0	211,7	188,7	21,5	1201,9	3377,3
SD	-	32,6	56,2	78,6	21,0	16,0	17,2	41,6	44,6	107,8	4,1	226,9	637,7

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a ingestão em gramas desde a semana de adaptação até a última semana de experimento (semana 8). E por fim, são apresentados a ingestão diária em gramas, que foi calculada pela soma de toda dieta consumida durante as 8 semanas de experimento dividido pelos 56 dias de experimento, a ingestão final em gramas, que foi calculada pela soma da ingestão durante as 8 semanas de experimento e a ingestão em Kcal final, que foi calculada pela multiplicação da ingestão final em gramas dos animais pelas Kcal de cada dieta (Dieta padrão com 3,11 Kcal/g e HSD 2,81 Kcal/g). Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 03 – Massa corporal e ganho de massa corporal dos animais por grupo, durante as 8 semanas de experimento.

Grupo	Animais	Semanas (massa (M) e ganho de massa)																		
		RD	Adaptação		1 ^a		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a		6 ^a		7 ^a		8 ^a	
		M	M	GM	M	GM	M	GM	M	GM	M	GM	M	GM	M	GM	M	MG	M	GM
Dieta padrão- NC	N1.01	44	44	0	96	52	163	119	201	157	250	206	299	255	338	294	367	323	390	346
	N2.01	62	62	0	105	43	150	88	196	134	244	182	282	220	312	250	320	258	360	298
	N3.01	66	66	0	109	43	158	92	199	133	246	180	278	212	307	241	320	254	340	274
	N4.01	65	83	18	128	63	175	110	227	162	268	203	309	244	330	265	353	288	377	312
	N4.02	66	86	20	130	64	180	114	230	164	270	204	305	239	317	251	342	276	370	304
	Média	-	61		5	38		75		107		139		167		186		200		219
SD	-	9		9	27		52		74		96		115		128		138		151	
Dieta HSD- NC	N1.04	44	44	0	85	41	121	77	160	116	203	159	242	198	270	226	306	262	327	283
	N2.04	59	59	0	115	56	149	90	188	129	236	177	279	220	312	253	349	290	364	305
	N3.04	64	64	0	101	37	146	82	196	132	245	181	285	221	322	258	358	294	380	316
	N4.03	62	77	15	117	55	155	93	200	138	245	183	274	212	308	246	340	278	372	310
	N4.04	65	81	16	124	59	164	99	205	140	249	184	277	212	301	236	333	268	356	291
	N4.05	65	83	18	128	63	178	113	224	159	271	206	312	247	345	280	375	310	407	342
Média	-	60		7	44		79		116		156		187		214		243		264	
SD	-	8		9	22		37		53		70		84		96		108		118	
Dieta padrão- NR	N1.02	54	54	0	104	50	157	103	203	149	252	198	278	224	301	247	326	272	342	288
	N1.03	52	52	0	101	49	155	103	196	144	244	192	290	238	331	279	356	304	382	330
	N2.02	75	75	0	121	46	170	95	227	152	276	201	324	249	344	269	375	300	415	340
	N2.03	73	73	0	119	46	166	93	223	150	280	207	321	248	362	289	300	227	390	317
	N3.02	66	66	0	135	69	181	115	232	166	290	224	327	261	362	296	395	329	416	350
	N3.03	54	54	0	121	67	172	118	218	164	274	220	305	251	334	280	360	306	375	321
Média	-	62		0	47		90		132		177		210		237		248		278	

SD	-	10	0	23	41	59	79	93	106	114	124									
(Continuação).																				
	N1.05	53	53	0	102	49	145	92	186	133	236	183	277	224	318	265	357	304	385	332
	N1.06	53	53	0	98	45	132	79	177	124	223	170	258	205	297	244	358	305	365	312
	N2.05	66	66	0	106	40	155	89	192	126	242	176	299	233	335	269	341	275	407	341
	N2.06	59	59	0	110	51	147	88	188	129	239	180	288	229	321	262	353	294	377	318
	N3.05	61	61	0	119	58	158	97	202	141	249	188	287	226	314	253	343	282	372	311
Dieta HSD-NR	N3.06	50	50	0	114	64	151	101	196	146	243	193	279	229	321	271	350	300	379	329
Média	-	57	0	44	78	114	156	192	223	251	278									
SD	-	6	0	21	35	51	69	85	99	111	123									

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a massa corporal dos animais pós-desmame (recém desmamado – R) em gramas, seguido pela semana de adaptação, e por fim as 8 semanas experimentais, apresentando a massa corporal(M) e o ganho de massa. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples, RD: recém desmamado; M: massa corporal; GM: ganho de massa; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 04 – Dados da eutanásia (massa corporal final, comprimento naso-anal (C.N/A), tecido adiposo branco (TAB): inguinal (ING); epididimal (EPI); retroperitoneal (RETRO), tecido adiposo marrom (TAM) e fígado) dos animais por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Massa corporal (g)	C. N/A(cm)	TAB ING(g)	TAB EPI(g)	TAB RETRO(g)	TAM(g)	Fígado(g)
Dieta padrão-NC	N1.01	390	22,0	2,973	2,860	2,533	0,933	15,774
	N2.01	360	24,0	3,878	2,780	1,667	0,954	12,637
	N3.01	340	22,0	5,797	2,514	3,014	0,403	16,439
	N4.01	377	21,0	4,600	4,770	3,070	7,250	6,080
	N4.02	370	24,0	5,060	3,530	2,710	8,790	6,220
Média	-	367,4	22,6	4,5	3,3	2,6	3,7	11,4
SD	-	18,8	1,3	1,1	0,9	0,6	4,0	5,0
Dieta HSD- NC	N1.04	327	22,0	3,864	4,040	5,332	0,969	14,858
	N2.04	364	24,0	5,594	4,866	5,986	0,975	14,964
	N3.04	380	24,0	9,362	5,298	6,530	1,097	17,034
	N4.03	372	23,0	7,610	6,080	6,180	7,830	6,400
	N4.04	356	22,5	5,430	3,900	4,300	6,860	6,180
	N4.05	407	25,5	6,800	5,270	4,670	9,220	6,360
Média		367,7	23,5	6,4	4,9	5,5	4,5	11,0
SD		26,5	1,3	1,9	0,8	0,9	3,9	5,2
Dieta padrão-NR	N1.02	342	22,0	2,454	1,901	2,002	0,440	15,833
	N1.03	382	20,0	4,853	3,994	3,891	0,654	17,182
	N2.02	415	24,0	5,043	5,130	3,861	1,093	13,963
	N2.03	390	24,0	6,193	4,542	3,368	0,361	20,890
	N3.02	416	24,0	5,462	4,554	3,799	0,619	14,489
	N3.03	375	23,0	6,667	1,256	3,401	0,840	13,048
Média	-	386,7	22,8	5,1	3,6	3,4	0,7	15,9
SD	-	27,7	1,6	1,5	1,6	0,7	0,3	2,8

(Continuação)								
Dieta HSD- NR	N1.05	385	23,0	4,949	3,604	4,574	0,433	13,308
	N1.06	365	23,0	3,258	4,475	6,477	1,360	13,734
	N2.05	407	25,0	7,675	9,974	8,642	0,749	15,020
	N2.06	377	25,0	4,643	4,421	4,987	0,476	12,774
	N3.05	372	24,0	6,159	4,311	3,392	0,661	15,476
	N3.06	379	24,0	6,677	5,822	4,494	1,093	13,043
Média	-	380,8	24,0	5,6	5,4	5,4	0,8	13,9
SD	-	14,5	0,9	1,6	2,3	1,9	0,4	1,1

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a massa corporal em gramas, o comprimento naso-anal em centímetros(cm) (C.N/A) e o peso em gramas dos seguintes tecidos: do tecido adiposo branco inguinal (TAB ING); do tecido adiposo branco epididimal (TAB EPI); do tecido adiposos retroperitoneal (TAB RETRO); do tecido adiposos marrom (TAM) e do fígado dos animais após as 8 semanas experimentais. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples, C.N/A: comprimento naso-anal; TAB ING: tecido adiposo branco inguinal; TAB EPI: tecido adiposo branco epididimal; TAB RETRO: tecido adiposo branco retroperitoneal; TAM: tecido adiposo marrom; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 05 – Componentes para o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Massa corporal final(g)	Massa corporal inicial(g)	Ingestão final(g)	CEA
Dieta padrão-NC	N1.01	390	44	1503	0,2302
	N2.01	360	62	1426	0,2090
	N3.01	340	66	1337	0,2049
	N4.01	377	65	1377	0,2266
	N4.02	370	66	1377	0,2208
Média	-	367,4	60,6	1404,0	0,2
SD	-	18,8	9,4	63,7	0,011
Dieta HSD-NC	N1.04	327	44	1223	0,2314
	N2.04	364	59	1464	0,2083
	N3.04	380	64	1362	0,2320
	N4.03	372	62	1257	0,2466
	N4.04	356	65	1257	0,2315
	N4.05	407	65	1257	0,2721
Média	-	367,7	59,8	1303,3	0,2
SD	-	26,5	8,1	91,8	0,021
Dieta padrão-NR	N1.02	342	54	1503	0,1916
	N1.03	382	52	1503	0,2196
	N2.02	415	75	1426	0,2384
	N2.03	390	73	1426	0,2223
	N3.02	416	66	1337	0,2618
	N3.03	375	54	1537	0,2088
Média	-	386,7	62,3	1455,3	0,2
SD	-	27,7	10,3	73,4	0,024

(Continuação)					
Dieta HSD-NR	N1.05	385	53	1223	0,2715
	N1.06	365	53	1223	0,2551
	N2.05	407	66	1466	0,2326
	N2.06	377	59	1466	0,2169
	N3.05	372	61	1362	0,2283
	N3.06	379	50	1362	0,2416
Média	-	380,8	57,0	1350,3	0,2
SD	-	14,5	6,0	109,0	0,020

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados massa corporal inicial e final dos animais após as 8 semanas experimentais. Seguidas pelo Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA). O CEA foi calculado pela fórmula: $CEA = \frac{\text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Quantidade total de ração ingerida no período(g)}}$. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 06 – Componentes para o cálculo do Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico (CGPCC) s dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Massa corporal final(g)	Massa corporal inicial(g)	Ingestão calórica final(Kcal)	CGPCC
Dieta padrão- NC	N1.01	390	44	3875,0600	0,0893
	N2.01	360	62	4189,8853	0,0711
	N3.01	340	66	3708,1463	0,0739
	N4.01	377	65	3974,5800	0,0785
	N4.02	370	66	3974,5800	0,0765
Média	-	367,4	60,6	3944,5	0,1
SD	-	18,8	9,4	175,1	0,007
Dieta HSD- NC	N1.04	327	44	2531,8100	0,1118
	N2.04	364	59	4035,8063	0,0756
	N3.04	380	64	3521,8573	0,0897
	N4.03	372	62	3221,1967	0,0962
	N4.04	356	65	3221,1967	0,0903
	N4.05	407	65	3221,1967	0,1062
Média	-	367,7	59,8	3292,2	0,1
SD	-	26,5	8,1	489,7	0,013
Dieta padrão- NR	N1.02	342	54	3875,0600	0,0743
	N1.03	382	52	3875,0600	0,0852
	N2.02	415	75	4229,6000	0,0804
	N2.03	390	73	4229,6000	0,0749
	N3.02	416	66	3715,4237	0,0942
	N3.03	375	54	3715,4237	0,0864
Média	-	386,7	62,3	3940,0	0,1
SD	-	27,7	10,3	235,4	0,008

(Continuação)					
Dieta HSD NR	N1.05	385	53	2531,8100	0,1311
	N1.06	365	53	2531,8100	0,1232
	N2.05	407	66	4071,6900	0,0837
	N2.06	377	59	4071,6900	0,0781
	N3.05	372	61	3528,4327	0,0881
	N3.06	379	50	3528,4327	0,0932
Média	-	380,8	57,0	3377,3	0,1
SD	-	14,5	6,0	698,5	0,022

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados massa corporal inicial e final dos animais após as 8 semanas experimentais. Seguidas pelo Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico (CGPCC). O CGPCC foi calculado pela fórmula: $CGPCC = ((\text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Quantidade total de Kcal ingeridas no período})$. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; CGPCC: Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 07 – Componentes para o cálculo do ganho de massa corporal dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupo	Animais	Massa corporal inicial(g)	Massa corporal final(g)	Ganho de massa corporal(g)
Dieta padrão-NC	N1.01	44	390	346
	N2.01	62	360	298
	N3.01	66	340	274
	N4.01	65	377	312
	N4.02	66	370	304
	Média	-	60,60	367,40
SD	-	9,42	18,81	26,10
Dieta HSD-NC	N1.04	44	327	283
	N2.04	59	364	305
	N3.04	64	380	316
	N4.03	62	372	310
	N4.04	65	356	291
	N4.05	65	407	342
Média	-	59,83	367,67	307,83
SD	-	8,08	26,54	20,72

(Continuação)				
Dieta padrão-NR	N1.02	54	342	288
	N1.03	52	382	330
	N2.02	75	415	340
	N2.03	73	390	317
	N3.02	66	416	350
	N3.03	54	375	321
	Média	-	62,33	386,67
SD	-	10,33	27,67	21,55
Dieta HSD-NR	N1.05	53	385	332
	N1.06	53	365	312
	N2.05	66	407	341
	N2.06	59	377	318
	N3.05	61	372	311
	N3.06	50	379	329
	Média	-	57,00	380,83
SD	-	6,03	14,48	12,06

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a massa corporal inicial em gramas, e a massa corporal final em gramas. E por fim é apresentado o ganho de massa corporal em gramas.

Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD). NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 08 – Componentes para o cálculo do Índice de Lee e Índice de Adiposidade dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupo	Animais	Massa corporal(g)	C. N-A(cm)	TAB ING(g)	TAB EPI(g)	TAB RETRO(g)	TAM (g)	Índice de Lee	Índice de Adiposidade
	N1.01	390	22,0	2,973	2,860	2,533	0,933	33,210	2,384
	N2.01	360	24,0	3,878	2,780	1,667	0,954	29,641	2,578
	N3.01	340	22,0	5,797	2,514	3,014	0,403	31,725	3,449
	N4.01	377	21,0	4,600	4,770	3,070	7,250	34,400	5,223
Dieta padrão-NC	N4.02	370	24,0	5,060	3,530	2,710	8,790	29,913	5,430
Média	-	367,400	22,600	4,462	3,291	2,599	3,666	31,778	3,813
SD	-	18,810	1,342	1,086	0,908	0,566	4,018	2,060	1,441
	N1.04	327	22,0	3,864	4,040	5,332	0,969	31,316	4,344
	N2.04	364	24,0	5,594	4,866	5,986	0,975	29,750	4,786
	N3.04	380	24,0	9,362	5,298	6,530	1,097	30,180	5,865
	N4.03	372	23,0	7,610	6,080	6,180	7,830	31,269	7,446
Dieta HSD-NC	N4.04	356	22,5	5,430	3,900	4,300	6,860	31,499	5,756
	N4.05	407	25,5	6,800	5,270	4,670	9,220	29,062	6,378
Média	-	367,667	23,500	6,443	4,909	5,500	4,492	30,513	5,763
SD	-	26,538	1,265	1,919	0,828	0,885	3,884	0,999	1,113

(Continuação)									
Dieta padrão-NR	N1.02	342	22,0	2,454	1,901	2,002	0,440	31,787	1,987
	N1.03	382	20,0	4,853	3,994	3,891	0,654	36,279	3,506
	N2.02	415	24,0	5,043	5,130	3,861	1,093	31,079	3,645
	N2.03	390	24,0	6,193	4,542	3,368	0,361	30,442	3,709
	N3.02	416	24,0	5,462	4,554	3,799	0,691	31,104	3,487
	N3.03	375	23,0	6,667	1,256	3,401	0,840	31,353	3,244
Média	-	386,667	22,833	5,112	3,563	3,387	0,680	32,008	3,263
SD	-	27,667	1,602	1,473	1,592	0,717	0,267	2,138	0,645
Dieta HSD-NR	N1.05	385	23,0	4,949	3,604	4,574	0,433	31,630	3,522
	N1.06	365	23,0	3,258	4,475	6,477	1,360	31,072	4,266
	N2.05	407	25,0	7,675	9,974	8,642	0,749	29,643	6,644
	N2.06	377	24,0	4,643	4,421	4,987	0,476	30,100	3,853
	N3.05	372	24,0	6,159	4,311	3,392	0,661	29,967	3,904
	N3.06	379	24,0	6,667	5,822	4,494	1,093	30,153	4,769
Média	-	380,833	23,833	5,559	5,435	5,428	0,795	30,427	4,493
SD	-	14,483	0,753	1,586	2,337	1,864	0,364	0,758	1,136

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a massa corporal em gramas, o comprimento naso-anal em centímetros(cm) (C.N/A) e o peso em gramas dos seguintes tecidos: do tecido adiposo branco inguinal (TAB ING); do tecido adiposo branco epididimal (TAB EPI); do tecido adiposos retroperitoneal (TAB RETRO); do tecido adiposos marrom (TAM) dos animais após as 8 semanas experimentais, que foram utilizados para o Índice de Lee (IL) e Índice de Adiposidade(IA). O IL foi calculado pela fórmula: $(3\sqrt{\text{peso corporal} / \text{comprimento naso-anal (CNA)}} \times 10)$ e o IA foi calculado pela fórmula: $(100 \times (\text{soma do peso dos coxins adiposos}) / \text{peso corporal})$. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples, C.N/A: comprimento naso-anal; TAB ING: tecido adiposo branco inguinal; TAB EPI: tecido adiposo branco epididimal; TAB RETRO: tecido adiposo branco retroperitoneal; TAM: tecido adiposo marrom; IL: Índice de Lee; IA: Índice de Adiposidade; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 09 – Dosagem bioquímicas de glicose e insulina do soro dos animais e ÍNDICE HOMA-IR, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Glicose(mmol/l)	Insulina(pmol/l)	ÍNDICE HOMA-IR
Dieta padrão-NC	N1.01	9,238	4,871	1,590
	N2.01	9,224	5,296	1,510
	N3.01	7,329	-	-
	N4.01	6,418	4,628	1,070
	N4.02	5,216	-	-
Média	-	7,485	4,932	1,390
SD	-	1,761	0,338	0,280
Dieta HSD- NC	N1.04	7,452	-	-
	N2.04	8,034	8,696	3,110
	N3.04	7,691	18,292	6,250
	N4.03	10,130	-	-
	N4.04	10,086	17,502	7,850
	N4.05	8,721	-	-
Média	-	8,686	14,830	5,737
SD	-	1,182	5,327	2,411
Dieta padrão-NR	N1.02	4,461	4,931	0,980
	N1.03	5,912	-	-
	N2.02	6,658	5,174	1,530
	N2.03	6,740	5,781	1,730
	N3.02	7,801	-	-
	N3.03	8,862	-	-
Média	-	6,739	5,295	1,413
SD	-	1,518	0,438	0,388

(Continuação)				
Dieta HSD- NR	N1.05	7,719	10,822	3,810
	N1.06	10,620	12,765	4,150
	N2.05	7,910	10,640	3,580
	N2.06	7,322	-	-
	N3.05	7,568	-	-
	N3.06	10,525	-	-
Média	-	8,611	11,409	3,847
SD	-	1,532	1,178	0,287

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a concentração de glicose em mmol/l e insulina pmol/l no soro de cada animal, por fim o ÍNDICE HOMA-IR, que foi calculado, seguida pela média desses valores. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 10 – Dosagem bioquímica de colesterol total do soro dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	COL (mg/dl)	Média das duplicatas
Dieta padrão-NC	N1.01	79,2190	75,8585
	N1.01	72,4980	
	N2.01	52,6600	55,9060
	N2.01	59,1520	
	N3.01	60,5950	55,3650
	N3.01	50,1350	
	N4.01	36,2350	33,9703
	N4.01	31,7056	
	N4.02	31,7056	34,2534
	N4.02	36,8011	
Média	-	51,071	51,071
SD	-	16,946	17,546
Dieta HSD-NC	N1.04	69,6120	67,4480
	N1.04	65,2840	
	N2.04	82,9580	80,4330
	N2.04	77,9080	
	N3.04	51,2170	53,3815
	N3.04	55,5460	
	N4.03	30,0071	40,0566
	N4.03	50,1062	
	N4.04	51,2385	48,1246
	N4.04	45,0106	
	N4.05	36,5180	38,4996
N4.05	40,4812		
Média	-	54,657	54,657
SD	-	16,387	16,411

(Continuação)			
Dieta padrão-NR	N1.02	41,1180	44,725
	N1.02	48,3320	
	N1.03	60,2340	69,071
	N1.03	77,9080	
	N2.02	63,8410	72,319
	N2.02	80,7970	
	N2.03	86,5640	89,089
	N2.03	91,6140	
	N3.02	54,1030	62,2185
	N3.02	70,3340	
	N3.03	56,6280	58,792
	N3.03	60,9560	
Média	-	66,036	66,036
SD	-	14,160	14,841
Dieta HSD-NR	N1.05	50,1350	52,4795
	N1.05	54,8240	
	N1.06	54,4630	67,989
	N1.06	81,5150	
	N2.05	53,3810	53,201
	N2.05	53,0210	
	N2.06	45,8070	60,7755
	N2.06	75,7440	
	N3.05	55,5460	56,4475
	N3.05	57,3490	
Média	-	60,565	60,565

SD	-	11,884	8,174
-----------	---	---------------	--------------

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a concentração de colesterol total no soro de cada animal em duplicata, seguida pela média desses valores. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 11 – Dosagem bioquímica de triacilglicerol (TAG) do soro dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	TAG (mg/dl)	Média das duplicatas
Dieta padrão-NC	N1.01	160,1240	152,0661
	N1.01	144,0083	
	N2.01	86,1570	100,0000
	N2.01	113,8430	
	N3.01	168,3884	164,8760
	N3.01	161,3636	
	N4.01	45,2479	50,8264
	N4.01	56,4050	
	N4.02	66,3223	57,4380
	N4.02	48,5537	
Média	-	105,041	105,041
SD	-	50,335	52,493
Dieta HSD-NC	N1.04	199,7934	191,9421
	N1.04	184,0909	
	N2.04	278,3058	272,1074
	N2.04	265,9091	
	N3.04	179,9587	194,4215
	N3.04	208,8843	
	N4.03	138,2231	161,9835
	N4.03	185,7438	
	N4.04	71,2810	84,5041
	N4.04	97,7273	
	N4.05	141,1157	131,1983
	N4.05	121,2810	
Média	-	172,693	172,693
SD	-	62,503	63,780

(Continuação)			
Dieta padrão-NR	N1.02	109,2975	75,2066
	N1.02	41,1157	
	N1.03	119,2149	102,6860
	N1.03	86,1570	
	N2.02	106,8182	110,9504
	N2.02	115,0826	
	N2.03	158,0579	146,4876
	N2.03	134,9174	
	N3.02	131,6116	139,0496
	N3.02	146,4876	
	N3.03	82,0248	77,8926
	N3.03	73,7603	
Média	-	108,712	108,712
SD	-	33,357	29,870
Dieta HSD-NR	N1.05	119,2149	123,9669
	N1.05	128,7190	
	N1.06	170,4545	205,3719
	N1.06	240,2893	
	N2.05	197,7273	162,1901
	N2.05	126,6529	
	N2.06	115,4959	116,5289
	N2.06	117,5620	
	N3.05	215,0826	265,0826
	N3.05	315,0826	
Média	-	190,083	190,083

SD	-	72,636	66,917
-----------	---	---------------	---------------

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a concentração de triacilglicerol no soro de cada animal em duplicata, seguida pela média desses valores. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples. SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 12 – Componentes para o cálculo do peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM) dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Peso do TAM(g)	Massa corporal(g)	Peso relativo
Dieta padrão- NC	N1.01	0,9330	390	0,0024
	N2.01	0,9540	360	0,0027
	N3.01	0,4030	340	0,0012
	N4.01	0,450	377	0,0012
	N4.02	0,590	370	0,0016
Média	-	0,666	367,400	0,002
SD	-	0,263	18,810	0,001
Dieta HSD-NC	N1.04	0,9690	327	0,0030
	N2.04	0,9750	364	0,0027
	N3.04	1,0970	380	0,0029
	N4.03	0,7700	372	0,0021
	N4.04	0,5500	356	0,0015
	N4.05	0,7300	407	0,0018
Média	-	0,849	367,667	0,002
SD	-	0,201	26,538	0,001
Dieta padrão- NR	N1.02	0,4400	342	0,0013
	N1.03	0,6540	382	0,0017
	N2.02	1,0930	415	0,0026
	N2.03	0,3610	390	0,0009
	N3.02	0,6190	416	0,0015
	N3.03	0,8400	375	0,0022
Média	-	0,668	386,667	0,002
SD	-	0,268	27,667	0,001

(Continuação)				
	N1.05	0,4330	385	0,0011
	N1.06	1,3600	365	0,0037
Dieta HSD- NR	N2.05	0,7490	407	0,0018
	N2.06	0,4760	377	0,0013
	N3.05	0,6610	372	0,0018
	N3.06	1,0930	379	0,0029
Média	-	0,795	380,833	0,002
SD	-	0,364	14,483	0,001

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados o peso relativo do tecido adiposo marrom em gramas, a massa corporal em gramas dos animais após as 8 semanas experimentais e por fim é apresentado o peso relativo. O peso relativo TAM foi calculado a partir da fórmula: peso relativo TAM = (peso do TAM/ massa corporal do animal). Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; TAM: tecido adiposo marrom; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 13 – Análise morfométrica de número dos adipócitos das lâminas histológicas coradas em HE dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Número de adipócitos por foto						
Dieta padrão-NC						
Foto	N1.01	N2.01	N3.01	N4.01	N4.02	
1	53	64	63	52	53	
2	55	47	58	53	58	
3	69	62	56	58	53	
4	53	58	55	58	65	
5	66	52	57	54	56	
6	58	54	55	62	66	
7	60	61	53	55	56	
8	67	68	56	68	60	
9	46	59	62	58	63	
10	53	40	60	53	55	
11	64	62	59	52	58	
12	49	63	58	54	54	
13	53	65	51	59	58	
14	50	62	59	56	57	
15	61	64	58	63	64	
Média	57,1333	58,7333	57,3333	57,0000	58,4000	
SD	7,0798	7,5258	3,1773	4,5826	4,3061	

Dieta HSD-NC							
Foto	N1.04	N2.04	N3.04	N4.03	N4.04	N4.05	
1	40	42	30	52	57	42	
2	37	44	41	55	49	47	
3	37	46	31	44	46	44	
4	38	36	47	45	30	51	
5	43	47	45	59	44	37	
6	47	37	45	49	28	43	
7	44	34	46	49	39	28	
8	37	33	35	41	41	45	
9	55	34	41	31	46	36	
10	40	34	34	24	34	28	
11	35	36	37	22	26	21	
12	43	35	44	21	36	36	
13	35	36	44	31	43	27	
14	36	32	48	36	28	49	
15	42	42	32	22	29	44	
Média	40,6000	37,8667	40,0000	38,7333	38,4000	38,5333	
SD	5,3692	4,9550	6,2564	12,9641	9,2102	9,0543	

Foto	Dieta padrão-NR					
	N1.02	N1.03	N2.02	N2.03	N3.02	N3.03
1	38	35	42	45	53	47
2	39	36	40	48	58	37
3	49	38	42	31	53	49
4	45	49	46	37	65	31
5	44	49	37	38	56	49
6	37	36	37	42	66	42
7	33	35	39	36	56	49
8	45	37	32	35	60	41
9	41	46	36	38	63	40
10	48	46	45	40	55	40
11	42	53	45	43	58	34
12	32	47	38	42	54	37
13	51	36	39	41	58	47
14	41	36	41	36	57	45
15	42	38	43	34	64	36
Média	41,8000	41,1333	40,1333	39,0667	58,4000	41,6000
SD	5,4798	6,3456	3,8520	4,5114	11,2313	5,8773

Foto	Dieta HSD-NR					
	N1.05	N1.06	N2.05	N2.06	N3.05	N3.06
1	48	29	49	46	62	51
2	64	39	34	64	58	49
3	58	35	40	67	58	53
4	55	32	33	63	56	53
5	49	54	38	68	65	52
6	49	49	62	64	54	57
7	55	61	63	43	53	46
8	57	66	55	64	59	59
9	35	65	59	44	50	51
10	54	50	68	34	61	49
11	53	46	57	36	46	48
12	47	45	35	44	30	43
13	41	44	54	38	40	54
14	62	54	44	37	32	64
15	51	53	52	40	45	54
Média	51,8667	48,1333	49,5333	50,1333	51,2667	52,2000
SD	7,5486	11,2749	11,5255	13,0157	10,6936	5,2126

Na primeira linha é identificado o grupo experimental a qual os animais pertencem. Na primeira coluna são apresentadas as fotos das lâminas de cada animal, indo de 1 a 15. E nas colunas seguintes são identificados os animais do grupo em questão. Ao final de cada grupo experimental é expresso a média dos valores do número de adipócitos de cada animal. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 14 – Análise morfométrica da área dos adipócitos das lâminas histológicas coradas em HE dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Área dos adipócitos por foto																
Dieta padrão-NC																
N1.01																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	687,7	675,9	529,5	464,4	693,0	418,5	620,1	682,1	401,2	494,4	423,4	420,7	431,0	456,4	658,7	
Adip.2	687,8	505,2	554,6	356,9	469,8	450,4	372,2	421,2	427,6	574,3	639,6	423,4	480,9	390,2	598,7	
Adip.3	571,3	393,0	467,9	512,8	503,4	464,4	561,9	357,8	389,9	494,2	582,4	409,4	402,3	671,5	665,8	
Adip.4	578,8	366,2	640,4	487,5	375,9	552,1	541,2	492,8	428,7	493,5	364,6	537,5	551,9	335,7	458,5	
Adip.5	649,3	623,8	646,7	465,4	343,2	637,3	532,7	376,2	421,5	405,9	564,3	648,8	377,2	432,8	702,9	
Adip.6	422,7	649,5	615,2	450,1	383,2	438,9	384,2	493,8	697,4	440,1	417,6	492,7	513,5	469,3	613,2	
Adip.7	671,3	519,2	419,4	455,6	356,6	424,7	552,8	443,6	312,5	426,1	635,5	323,4	683,1	364,1	500,0	
Adip.8	507,9	612,5	442,2	714,6	401,4	421,8	669,4	511,8	593,3	503,2	380,8	485,9	408,4	406,7	343,9	
Adip.9	608,3	328,6	463,7	409,7	424,5	423,5	569,5	507,1	629,4	627,5	382,5	748,5	427,5	522,7	554,8	
Adip.10	405,1	619,4	483,6	355,4	373,2	489,0	566,1	402,4	307,8	536,2	478,5	383,0	577,3	671,2	340,0	
Adip.11	359,1	459,5	399,4	370,4	354,2	357,7	518,2	577,9	485,8	455,9	692,3	415,6	296,8	354,1	514,7	
Adip.12	377,5	491,4	387,7	454,0	403,5	412,0	461,8	497,0	529,6	352,6	316,0	570,2	604,8	414,2	714,6	
Adip.13	536,2	394,1	557,6	451,4	497,2	606,8	394,6	388,3	611,7	366,7	362,6	516,4	523,2	360,0	371,6	
Adip.14	422,4	386,7	483,7	800,4	534,7	493,0	405,0	385,3	620,5	375,4	615,8	486,7	424,0	485,1	700,7	
Adip.15	549,6	454,9	751,4	510,1	500,0	537,5	462,0	457,5	340,5	671,0	486,2	443,3	339,3	433,3	433,5	
Adip.16	460,1	519,4	634,2	633,2	771,6	418,1	579,3	573,3	580,3	434,7	574,2	490,2	499,2	471,9	412,1	
Adip.17	426,7	561,8		512,0	384,8	467,3	398,9	682,4			351,7	252,5	310,6	638,3		
Adip.18	381,9	425,1					490,4	410,1			699,2	319,1		473,3		
Adip.19		428,6									689,9					
Adip.20																
Média da foto	516,9	495,5	529,8	494,3	457,1	471,4	504,5	481,1	486,1	478,2	508,3	464,8	461,8	463,9	536,5	490,0

SD	113,9	104,6	104,6	120,4	120,2	74,2	87,8	97,6	124,3	90,9	132,0	118,4	106,4	103,7	132,9	
N2.01																
Foto/Adipócitos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	620,3	470,9	586,9	762,9	504,2	552,2	576,5	438,7	383,7	393,4	476,1	413,8	438,9	545,8	380,9	
Adip.2	516,8	669,7	442,6	539,4	656,3	692,2	615,5	416,7	463,0	488,1	427,2	503,6	398,8	372,4	732,4	
Adip.3	539,6	606,0	573,8	453,8	375,1	341,2	534,8	451,5	510,3	567,5	584,8	568,0	312,1	478,2	288,1	
Adip.4	754,7	389,6	681,3	482,2	655,5	562,9	531,4	546,5	391,8	546,9	767,6	646,4	509,6	521,9	226,6	
Adip.5	455,2	792,4	550,8	676,1	420,8	348,6	335,1	649,9	504,6	662,7	719,7	387,1	324,6	497,9	591,7	
Adip.6	555,1	385,0	540,4	445,6	402,8	453,8	554,4	547,8	636,0	526,4	460,5	539,8	390,6	414,8	499,3	
Adip.7	361,8	267,6	530,7	440,2	574,7	403,0	469,5	467,3	280,0	578,8	488,7	382,6	415,1	667,6	665,7	
Adip.8	520,1	423,6	453,4	514,8	508,0	401,9	506,6	589,8	564,5	600,7	631,9	674,5	596,9	380,4	350,3	
Adip.9	393,8	708,7	341,2	441,7	818,0	635,7	718,7	709,8	489,3	353,1	740,5	613,2	388,6	476,5	383,2	
Adip.10	401,4	378,7	478,0	506,2	564,3	435,9	433,4	656,9	434,0	412,4	346,2	486,4	293,8	434,5	559,5	
Adip.11	398,6	472,7	353,5	463,2	629,4	649,2	449,5	456,1	603,9	306,6	535,5	430,4	530,4	338,2	382,7	
Adip.12	486,1	564,9	431,9	534,7	602,1	532,3	566,3	492,6	405,8	469,2	425,4	399,6	467,2	347,3	391,5	
Adip.13	512,4	462,4	493,4	590,9	470,1	456,4	420,3	552,6	387,8	466,5	559,4	319,4	271,0	534,5	344,0	
Adip.14	291,2	415,4	578,5	440,6	372,8	717,3	521,0	667,7	466,3	745,2	629,1	273,4	374,0	305,9	371,5	
Adip.15	269,4	527,8	687,7	427,9	317,4	724,6	281,7	474,9		466,8	754,9	403,2	302,0	661,3	329,2	
Adip.16	505,4	411,9	342,0	427,6	414,8	531,7	428,9	547,7		353,0	372,0	331,6	421,0	496,3	271,1	
Adip.17	482,2	682,3	593,6	401,8	434,0	555,5	495,2	416,4		574,0	658,4	516,2	451,8		497,7	
Adip.18	341,7			480,8	497,5	600,9	1066,4	433,6			633,8	283,9	598,7		636,4	
Adip.19	439,0				334,3	564,9	856,7	433,7			422,9	307,0	468,6		368,3	
Adip.20	428,5					407,5	416,1	469,6				222,3	655,9		419,3	
Média	463,7	507,6	509,4	501,7	502,7	528,4	538,9	521,0	465,8	500,7	559,7	435,1	430,5	467,1	434,5	491,1
SD	112,9	142,4	106,6	93,6	130,7	119,0	177,1	92,2	95,8	116,9	134,0	129,5	107,6	106,7	139,1	

Foto/Adipócito	N3.01															Média final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	522,7	574,3	573,8	444,7	479,6	639,2	412,2	521,7	408,6	483,5	404,8	548,8	462,9	591,2	595,9	
Adip.2	698,4	523,5	577,9	489,7	558,0	547,7	537,3	375,9	456,7	510,0	521,2	452,4	575,2	554,5	567,6	
Adip.3	517,4	674,9	514,1	580,8	568,8	674,5	579,5	396,3	500,8	523,4	447,6	511,7	501,1	497,0	482,3	
Adip.4	414,9	546,1	514,8	490,8	495,8	629,5	432,7	413,0	422,7	485,2	418,8	559,1	607,6	592,4	491,9	
Adip.5	603,0	511,6	505,0	599,5	505,4	515,5	539,0	373,3	418,9	542,8	520,2	534,3	520,5	586,7	537,5	
Adip.6	468,5	482,9	675,7	426,3	465,4	557,5	449,0	394,7	386,1	488,2	404,5	458,5	414,4	556,5	497,5	
Adip.7	391,6	596,8	431,0	403,3	595,9	417,7	507,4	423,7	575,3	517,6	659,8	425,4	473,4	454,2	536,9	
Adip.8	506,2	649,8	503,9	544,0	505,0	440,2	580,3	440,2	341,6	522,1	545,2	583,6	589,3	420,3	446,6	
Adip.9	332,9	402,5	522,7	410,4	598,3	604,0	511,6	409,3	490,7	504,9	413,7	579,9	409,6	470,3	516,2	
Adip.10	491,7	487,2	620,9	529,1	501,7	474,0	580,4	611,3	377,4	586,2	557,0	567,0	448,7	583,5	554,3	
Adip.11	610,1	519,2	471,0	545,8	475,1	511,1	577,6	571,2	434,6	497,1	337,1	429,0	573,1	568,6	445,0	
Adip.12	554,6	436,6	593,4	476,1	454,3	471,7	413,2	418,2	473,3	528,4	482,3	543,8	526,7	412,4	437,1	
Adip.13	475,2	390,7	538,0	476,6	650,3	368,1	551,8	570,2	475,9	509,0	487,7	364,9	393,2	361,5	472,0	
Adip.14	351,8	562,0	371,4	491,0	417,9	519,6	596,7	409,8	554,6	465,6	550,8	573,3	518,5	401,6	511,1	
Adip.15	422,3	550,2	464,0	446,0	685,5	430,7	438,5	616,8	657,7	502,0	481,0	437,1	588,7	610,8	564,5	
Adip.16	385,4	418,5	325,3	353,3	375,5	609,0		399,9	351,8	559,3	438,8	404,9	538,1	551,9	567,1	
Adip.17	394,3	382,3	460,9	643,8	460,4	442,4		581,5	271,6	510,2		492,2	520,1	404,2	561,8	
Adip.18	396,3	497,1	566,8	626,9	422,2	449,0		399,8	377,0	547,3		379,8	435,5	501,2	481,8	
Adip.19	473,2	520,9	484,7	513,4	411,8	471,7		521,9	456,2			445,0	476,2	525,3	516,4	
Adip.20	436,5		452,2			469,5		526,8	391,7				547,7	545,5	453,6	
Média	472,3	511,9	508,4	499,6	506,7	512,1	513,8	468,8	441,1	515,7	479,4	489,0	506,0	509,5	511,8	496,4
SD	93,8	82,2	82,5	78,2	83,4	84,1	67,4	85,3	88,5	29,6	79,0	72,0	64,8	77,2	47,7	

N4.01																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	495,7	433,5	442,1	488,8	627,9	504,5	385,7	434,2	449,5	422,8	589,0	565,5	450,1	575,4	415,2	
Adip.2	490,6	797,1	466,9	609,4	550,2	440,7	694,1	408,1	601,1	472,2	494,3	590,2	531,2	438,8	569,2	
Adip.3	465,7	701,0	494,0	438,0	417,3	477,3	488,9	474,2	475,4	497,4	418,9	699,0	443,6	550,2	408,9	
Adip.4	442,4	441,6	399,0	478,4	520,1	437,4	399,0	569,6	648,7	546,0	523,4	469,1	463,1	570,2	641,5	
Adip.5	386,3	797,6	427,1	594,6	499,6	550,5	468,0	717,6	468,6	495,0	410,9	534,0	534,2	482,8	492,7	
Adip.6	434,9	418,0	482,2	591,3	725,3	599,8	571,7	464,9	658,0	625,5	596,2	441,8	427,4	495,1	616,5	
Adip.7	687,9	454,8	477,3	421,3	364,4	538,3	419,0	673,0	462,8	580,7	532,1	498,5	604,2	598,1	661,5	
Adip.8	514,0	623,8	499,2	560,7	418,2	642,4	403,3	784,6	423,7	401,6	512,1	505,6	401,6	408,3	444,2	
Adip.9	476,4	471,1	612,2	426,8	555,4	505,2	392,1	648,1	464,1	429,1	433,9	411,9	465,1	703,5	457,1	
Adip.10	506,9	269,3	495,0	444,5	368,6	599,4	546,1	426,7	512,4	681,7	617,9	525,6	485,9	604,4	419,5	
Adip.11	615,9	441,1	421,3	474,9	286,2	439,7	344,2	472,0	697,3	643,1	567,0	413,3	570,9	581,3	387,4	
Adip.12	395,2	475,1	501,3	573,0	668,8	534,5	449,5	577,1	587,2	429,2	499,6	446,8	470,6	470,6	472,3	
Adip.13	419,4	516,2	420,5	529,3	398,0	533,9	419,0	470,7	494,8	706,9	425,2	460,4	451,3	314,9	431,3	
Adip.14	546,8	538,7	484,7	537,1	476,8	619,6	406,0	505,4	586,1	431,8	511,4	494,6	625,8	520,9	523,5	
Adip.15	501,9	458,4	356,4	428,5	630,4	502,1	296,5	479,2	544,8	616,0	356,1	651,0	686,5	349,8	570,5	
Adip.16	561,7	505,3	456,2	537,1	461,1	441,0	229,7	478,8		327,2	497,4	643,2	413,9	438,0	542,1	
Adip.17	511,0	487,7		483,1	576,5	590,5	406,8	517,2			495,0	623,4	627,9	645,2	504,6	
Adip.18	521,2	502,8		506,4	475,1	542,7	431,1	335,5			447,6	484,7	535,7	421,6	414,7	

Adip.19	396,3			592,2	565,8	489,7	452,5	315,3			427,3	512,6	460,9	468,6	497,8	
Adip.20	420,3			401,8	693,1		401,6	257,8				399,8	492,9			
Adip.21	331,6				438,8		382,4	359,2				474,0	469,0			
(Continuação)																
Adip.22	356,1											413,1	607,0			
Adip.23	505,7											538,4				
Adip.24	236,6															
Adip.25	327,7															
Adip.26	377,9															
Média	458,7	518,5	464,7	505,9	510,4	525,7	428,0	493,8	538,3	519,1	492,4	512,9	509,9	507,2	498,4	498,9
SD	96,2	133,9	57,0	66,7	117,4	63,9	95,9	132,8	86,2	112,3	70,6	83,3	79,3	100,9	83,1	

	N4.02															
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	515,0	653,3	546,8	676,8	651,2	934,9	446,0	651,3	448,6	340,0	331,0	577,6	519,2	411,4	520,3	
Adip.2	547,3	667,3	671,2	612,1	579,0	651,3	558,7	516,4	595,4	531,5	486,2	489,5	599,3	291,3	519,5	
Adip.3	609,8	434,6	597,7	540,1	683,2	959,9	423,4	498,0	583,2	255,7	409,3	523,5	483,8	440,7	486,2	
Adip.4	469,4	511,7	506,0	768,5	423,9	826,9	527,7	550,9	368,0	320,8	385,6	320,8	659,2	516,0	591,2	
Adip.5	566,3	684,2	658,9	474,3	510,9	679,2	552,4	470,9	711,0	480,9	375,7	462,4	521,2	423,2	411,6	
Adip.6	369,8	627,6	470,9	562,4	472,0	602,7	425,9	549,1	322,9	390,8	480,0	489,3	475,1	440,3	513,9	
Adip.7	407,6	406,2	529,0	640,6	690,5	578,5	691,5	480,9	647,3	380,6	430,7	479,9	468,7	401,3	715,6	
Adip.8	365,3	568,1	405,4	535,0	504,0	823,0	663,3	386,3	546,5	588,3	393,0	331,3	661,7	281,1	402,2	
Adip.9	550,2	543,0	457,3	1081,6	552,2	582,0	552,3	487,7	470,6	376,2	481,8	337,9	417,2	483,7	465,1	
Adip.10	341,2	674,1	814,3	557,7	506,0	489,2	441,3	506,8	448,3	275,6	462,0	302,8	368,0	269,1	424,3	
Adip.11	933,7	447,8	502,5	615,0	408,6	467,1	321,8	699,2	450,3	561,8	293,4	561,2	478,0	626,3	282,6	
Adip.12	323,2	534,8	436,0	407,8	541,1	640,2	423,5	808,0	656,7	477,4	313,2	298,7	409,9	424,8	334,1	
Adip.13	564,9	432,1	357,9	678,4	747,1	431,6	444,8	625,1	528,0	437,1	381,6	289,3	408,9	487,0	220,3	
Adip.14		469,2	335,5	639,5	567,1	348,4	659,5	623,3	548,0	531,2	385,0	270,8	388,7	802,9	513,3	
Adip.15		754,2	315,1	439,5	585,9	612,3	581,4	410,5	245,0	570,0	379,3	297,6	561,9	526,9	528,0	
Adip.16		605,2	427,0	9,3	484,0	345,6	461,0	486,4	486,3	671,8	567,4	425,3	503,8	483,8	451,7	
Adip.17		536,1	561,7	374,3	528,0	458,1	591,3	393,3	350,5	409,7	479,0	452,3	382,6	365,1	308,6	
Adip.18		419,1	416,1	397,8	504,1		518,7	561,9	505,8	332,8	473,1	571,4	418,3	603,1	596,6	
Adip.19		379,8		402,2			755,2	546,7	373,9	508,3	480,1	603,5	448,0	396,8	437,9	
Adip.20							512,9	329,6	417,9	450,1	477,3		359,1	513,3	497,8	
Média	504,9	544,6	500,5	548,1	552,2	613,6	527,6	529,1	485,2	444,5	423,2	425,5	476,6	459,4	461,0	499,7
SD	161,9	110,9	128,2	210,0	91,9	186,7	108,5	113,7	120,4	112,2	69,6	114,2	89,9	125,1	116,1	

Dieta HSD-NC																
N1.04																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	477,8	816,1	856,2	1150,0	981,0	444,6	827,5	539,8	803,1	774,8	902,6	831,0	803,3	595,4	494,7	
Adip.2	406,9	659,5	682,8	770,3	986,2	535,3	873,9	415,7	785,6	788,8	986,6	776,2	1320,0	625,5	598,5	
Adip.3	449,0	860,9	824,1	1127,8	834,3	567,2	495,3	1140,9	686,3	11,4	888,1	859,3	463,2	799,6	795,3	
Adip.4	483,8	651,2	1117,1	1152,6	735,7	636,9	376,1	768,4	495,7	755,8	941,7	1088,3	635,5	586,1	611,0	
Adip.5	614,6	813,3	730,4	826,9	647,7	663,9	589,7	892,3	570,9	895,2	771,3	887,5	629,2	475,9	408,0	
Adip.6	440,6	709,0	672,5	711,3	735,2	814,4	604,0	1022,5	660,0	738,1	861,3	753,0	741,9	500,0	463,8	
Adip.7	428,9	1031,3	544,8	608,2	615,3	815,3	640,5	759,5	714,4	658,4	725,9	1009,2	580,3	449,7	591,5	
Adip.8	394,1	693,0	704,6	691,1	495,6	567,7	721,6	853,1	515,2	897,9	697,8	770,8	614,6	728,2	528,1	
Adip.9	214,6	808,1	774,5	622,5	447,1	650,7	584,8	823,9	511,3	657,7	763,2	664,7	620,1	462,9	606,2	
Adip.10	409,5	1070,5	604,1	590,4	566,7	445,6	588,4	747,3	622,4	704,7	749,1	750,8	529,2	486,0	687,5	
Adip.11	399,5	898,0	1040,9	376,5	455,2	587,5	658,5	712,1	684,9	801,7	672,6	852,9	769,5	423,6	865,0	
Adip.12	461,5	863,8	691,6	487,6	597,0	668,4	982,1	957,2	586,8	620,3	441,8	745,0	490,5	542,8	657,5	
Adip.13	518,7	578,0	713,0	699,0	693,4	459,2	722,3	674,9	579,9	490,4	676,6	494,2	585,4	566,9	598,5	
Adip.14	511,9	701,8	605,1	617,4	478,5	538,6	515,3	641,6	698,4	634,8	477,8	502,0	868,3	656,6	554,9	
Adip.15	327,8	622,6	743,3	524,8	578,3	627,9	1059,1	695,3	707,6	562,4	746,0	896,5	676,7	421,2	498,3	
Adip.16	388,4	575,7	863,0	488,6	567,0	458,2	641,2	632,3		654,7	622,9	736,5	533,9	492,8		
Adip.17	424,3	562,9	618,0		600,0	575,6		814,3		578,8	687,5	607,2	586,9	548,2		
Adip.18					716,0	607,4								583,1		
Média	432,5	759,7	752,1	715,3	651,7	592,5	680,0	770,1	641,5	660,3	741,9	777,9	673,4	552,5	597,2	666,6
SD	85,5	153,2	151,9	240,3	160,0	109,4	180,1	176,0	96,5	201,1	148,1	156,9	199,8	103,3	120,6	

N2.04																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	795,8	605,8	473,4	625,1	506,4	474,1	471,3	526,8	509,8	569,7	441,3	657,9	525,9	637,4	569,0	
Adip.2	1017,3	671,2	584,0	583,3	970,2	762,2	527,7	439,7	408,0	752,6	432,7	592,4	372,0	369,2	325,7	
Adip.3	726,5	640,4	763,3	539,2	608,1	468,4	533,4	662,1	380,0	536,9	577,6	443,7	636,9	873,3	585,0	
Adip.4	710,2	559,6	498,2	539,9	436,5	299,0	579,2	526,6	531,0	561,4	337,8	482,2	720,6	504,1	557,6	
Adip.5	547,9	592,8	454,9	515,8	404,1	455,4	635,3	765,6	490,7	489,3	454,4	731,2	835,0	421,6	589,2	
Adip.6	625,0	707,9	826,4	534,9	463,7	423,8	805,0	447,0	368,8	525,4	645,8	613,0	922,4	486,5	362,6	
Adip.7	497,7	758,6	603,6	420,8	530,8	555,2	636,0	674,7	569,9	792,9	695,4	478,7	538,6	652,5	377,9	
Adip.8	699,5	681,8	632,6	294,4	509,7	644,7	765,8	477,4	626,2	415,1	610,1	342,2	458,8	615,2	659,5	
Adip.9	551,3	641,7	666,3	474,4	561,5	660,1	635,5	641,8	673,4	480,5	582,4	376,2	832,8	520,2	518,7	
Adip.10	539,4	665,1	543,6	409,3	688,7	403,4	785,7	723,1	541,8	593,1	450,1	507,1	460,7	467,0	514,4	
Adip.11	963,0	627,1	824,3	7394,2	592,8	437,8	767,3	454,3	526,1	460,5	563,2	524,3	673,8	332,9	392,0	
Adip.12	749,3	567,3	645,7	814,3	643,6	338,3	418,7	529,0	732,8	526,8	604,1	674,6	563,3	277,1	401,7	
Adip.13	773,7	551,7	562,7	638,8	494,7	556,1	635,0	515,6	499,0	512,9	372,3	534,3	554,2	336,7	683,1	
Adip.14	666,6	383,4	556,1	6404,8	395,8	7369,4	672,1	367,8	605,7	380,6	474,9	390,0	492,2	584,3	585,1	
Adip.15	567,8	434,0	449,9		407,8	430,8	595,5	798,4	522,1	471,0	356,2	603,8		552,6	7246,9	
Adip.16	501,8	407,4			479,1	488,5	679,9	529,3			510,2	480,1		663,5	330,0	
Adip.17	574,8	551,9			778,6	398,0	313,6	629,2			531,7			523,5	332,2	
Adip.18					690,7		662,6				414,1			412,7	477,1	
Adip.19							623,7								513,4	
Adip.20															410,9	
Média	676,9	591,0	605,7	1442,1	564,6	892,1	618,1	571,1	532,4	537,9	503,0	527,0	613,4	512,8	821,6	667,3
SD	152,0	104,5	123,1	2323,4	148,7	1673,4	126,6	124,2	101,7	111,0	104,0	111,9	163,6	146,7	1516,5	

N3.04																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	530,4	556,2	951,7	842,1	822,0	805,7	1152,3	923,7	750,2	407,9	740,6	998,5	679,8	834,1	515,8	
Adip.2	542,2	932,9	754,8	807,5	739,0	781,1	886,9	774,6	845,4	440,9	673,2	1029,5	636,5	610,6	643,0	
Adip.3	429,6	751,2	874,8	890,8	573,9	458,4	708,9	788,7	817,1	515,6	555,5	521,2	651,1	497,4	588,2	
Adip.4	662,1	957,0	1226,5	635,4	633,5	644,9	752,4	798,5	619,8	639,2	588,4	390,9	569,3	641,9	1049,9	
Adip.5	943,0	713,8	1233,8	619,3	977,4	836,2	597,1	807,7	744,0	669,5	402,9	925,6	584,3	646,1	756,7	
Adip.6	582,7	870,6	599,0	616,6	659,0	511,3	707,0	724,3	504,8	497,6	563,3	532,9	444,5	760,0	617,8	
Adip.7	769,1	579,6	751,4	718,1	575,7	664,2	541,6	945,1	504,7	660,2	577,0	446,7	492,0	672,5	724,5	
Adip.8	639,6	755,7	1136,5	711,3	552,6	797,6	585,3	792,4	612,9	469,3	419,5	700,0	492,6	607,3	875,9	
Adip.9	781,9	785,4	1445,2	482,3	304,4	906,2	760,1	617,9	527,9	529,7	489,8	578,9	451,2	781,5	719,5	
Adip.10	491,5	659,8	636,4	592,1	898,9	590,3	657,6	771,3	482,3	574,5	465,0	512,9	637,8	570,5	460,2	
Adip.11	759,6	877,6	489,5	752,8	724,4	562,6	563,8	400,9	667,2	617,4	717,4	519,4	554,2	1165,5	499,5	
Adip.12	612,7	803,0	878,3	749,5	1042,1	484,1	619,2	713,2	475,8	492,2	503,8	685,4	384,3	491,2	699,8	
Adip.13	955,2	723,7	868,7	687,8	902,9	622,0	436,5	994,2	485,7	877,5	611,6	814,2	550,9	865,1	528,5	
Adip.14	1295,6	579,7	771,4	532,3	825,1	803,3	752,8	848,8	662,1	812,5	590,1	617,2	472,6	828,2	671,9	
Adip.15	745,4		775,4	368,6	502,5	865,0	598,4	707,2	657,0	917,7	454,5	426,9	451,5	564,1	560,3	
Adip.16	526,7		485,7	467,3	525,8	627,4	537,8	821,6	542,3	648,6	450,2	692,5	537,3	475,9	577,7	
Adip.17	591,8			382,1	677,3	577,0	616,8	902,5	457,2	696,6	597,0	409,3	306,5	915,4	742,6	
Adip.18	765,5			551,5	418,5	758,0		672,2	745,3	440,7	541,9	440,3		1021,3	569,1	
Adip.19	896,0			529,8		576,1			768,8		485,3	550,8			782,8	
Adip.20	662,2			522,4								688,3			511,9	
Média	709,1	753,3	867,4	623,0	686,4	677,4	675,0	778,0	624,8	606,0	548,8	624,1	523,3	719,4	654,8	671,4
SD	202,2	129,1	275,0	146,5	198,4	136,9	163,3	135,3	127,0	150,3	95,6	192,5	100,6	191,8	144,5	

N4.03																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	734,7	800,6	655,3	607,8	799,9	537,7	640,8	872,1	883,4	686,1	879,9	882,8	845,7	791,3	777,2	
Adip.2	433,0	636,9	505,1	573,0	689,0	673,0	700,2	681,9	571,0	615,0	666,8	619,5	680,4	601,6	721,6	
Adip.3	641,2	703,8	629,6	841,7	622,9	524,0	616,4	882,6	745,3	635,7	525,1	752,5	565,1	657,4	794,2	
Adip.4	466,7	883,7	771,0	864,2	681,1	542,2	702,9	739,3	786,3	78,1	845,9	702,8	641,3	607,8	699,2	
Adip.5	759,6	593,8	741,0	522,8	489,4	952,8	629,8	915,7	611,1	575,7	764,7	630,3	542,0	738,0	1047,4	
Adip.6	602,5	818,8	875,3	531,7	517,9	442,3	539,6	631,4	496,9	803,6	882,3	473,3	684,0	706,2	827,8	
Adip.7	482,1	519,3	721,3	843,5	574,3	583,0	629,9	502,2	584,1	662,6	592,2	625,3	645,0	907,6	812,6	
Adip.8	670,0	462,6	882,3	697,9	674,0	686,0	843,6	528,8	560,3	898,9	755,9	854,8	544,6	606,5	644,9	
Adip.9	830,7	730,8	569,8	743,0	592,1	522,0	887,1	693,7	450,8	558,3	467,9	774,2	627,3	714,2	846,1	
Adip.10	860,8	451,4	665,6	815,6	700,8	835,7	775,8	681,8	734,4	603,9	505,4	811,4	679,2	517,7	657,0	
Adip.11	635,7	734,3	769,0	616,2	850,4	594,3	777,3	648,2	709,0	515,5	627,4	684,2	446,8	754,8	819,8	

Adip.12	637,4	707,5	444,6	735,5	563,8	779,8	787,6	506,6	646,0	586,1	727,3	617,9	731,0	848,7	669,7	
Adip.13	713,8	463,9	631,6	728,2	544,9	568,6	760,6	785,5	821,6	534,6	597,9	575,8	469,5	835,9	622,6	
Adip.14	675,7	696,3	729,9	571,8	764,0	774,2	627,3	718,0	527,1	602,4	742,2	501,0	686,2	751,2	634,8	
Adip.15	712,7	695,0	613,2	705,6	450,9	511,0	672,6	620,1	849,0	627,2	753,7	724,3	960,1	588,2	910,9	
Adip.16	623,2	438,5	661,8	628,4	734,0	503,4	692,4	643,6	521,8	671,9	742,6	550,4	698,0	622,8	683,0	
Adip.17	679,7	616,0	757,8		423,2	836,9	468,8	526,1	565,5	861,0	427,7	710,5	812,9	538,1	666,3	
Adip.18	754,6	794,1	706,1		439,7	796,9	619,7	607,0	492,9	862,0	430,7	487,0	802,8	647,1	793,3	
Adip.19	606,1	867,2	822,8		832,6	484,4	796,4	464,6	723,4	560,7	566,7	425,9	661,6			
Adip.20	646,7	781,1	503,5		732,3	417,7	526,8	449,1	416,7	434,8	578,6	465,6	594,1			
Média	658,3	669,8	682,8	689,2	633,9	628,3	684,8	654,9	634,8	618,7	654,0	643,5	665,9	690,8	757,1	664,5
SD	110,0	141,9	119,2	114,3	131,8	152,8	108,9	137,4	138,3	176,9	143,1	134,4	125,7	110,4	111,8	

N4.04																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	460,6	517,8	779,8	535,7	733,5	1167,5	700,8	987,4	776,4	483,0	782,9	872,8	688,8	735,5	733,9	
Adip.2	505,9	572,0	680,7	648,5	552,2	834,4	620,3	984,5	610,1	830,6	867,2	744,2	930,3	743,4	568,9	
Adip.3	571,1	474,9	740,1	556,5	554,7	791,4	590,4	936,9	997,5	772,2	651,4	959,9	828,0	636,8	547,1	
Adip.4	396,2	520,6	565,2	362,7	9,7	746,5	676,9	1044,6	1191,9	846,4	978,4	1045,8	678,1	1086,4	695,3	
Adip.5	488,8	505,4	422,2	694,5	480,6	617,1	664,1	635,9	777,8	647,1	857,0	874,2	921,6	930,7	651,4	
Adip.6	443,9	527,4	632,7	809,5	554,3	575,6	723,7	794,9	675,1	567,5	742,8	812,7	953,9	1185,9	687,9	
Adip.7	515,7	524,8	506,4	524,6	493,9	658,0	595,4	695,1	533,9	766,3	494,3	729,0	874,4	604,5	1079,2	
Adip.8	476,7	510,6	696,2	890,1	749,8	908,2	489,7	741,1	1083,8	645,0	513,5	551,9	648,3	634,6	700,3	
Adip.9	664,0	498,2	576,5	520,2	813,0	674,2	433,4	734,8	864,1	1009,0	467,7	696,1	730,7	766,8	679,1	
Adip.10	504,6	616,5	481,6	330,3	497,2	639,0	660,6	728,8	777,9	655,1	697,8	1036,7	709,6	857,7	830,5	
Adip.11	996,1	579,2	619,3	514,6	612,3	711,7	457,1	618,3	359,5	777,1	804,9	790,9	789,4	844,3	595,9	
Adip.12	450,4	512,7	718,0	495,3	755,8	610,1	517,6	788,0	514,5	444,8	604,7	545,3	822,8	1048,8	696,6	
Adip.13	513,5	479,4	498,9	566,4	538,6	548,5	643,4	671,6	486,2	448,8	667,3	796,9	916,3	560,7	903,9	
Adip.14	458,2	500,5	564,2	384,1	1141,1	718,1	641,7	831,3	1062,2	934,5	560,4	818,7	858,0	570,2	681,6	
Adip.15	423,6	449,5	485,7	559,2	646,3	592,6	474,2	791,8	853,5	591,7	666,5	471,7		514,5	657,2	
Adip.16	624,1	469,0	386,4	362,4	367,9	732,6	666,8	679,0	751,5	402,6	949,8	442,7		894,7	749,0	
Adip.17	626,2	467,9	539,5	606,8	591,5	459,0	427,2	622,5	794,3	477,2	907,9			576,7	449,0	
Adip.18	583,1	613,4	421,2	370,0	760,5	619,5	457,5	920,8						582,6	719,8	
Adip.19	600,5	419,8		461,8		670,3	670,7	670,0								
Adip.20	506,8			470,7		409,9	452,7	534,4								
Média	540,5	513,7	573,0	533,2	602,9	684,2	578,2	770,6	771,2	664,6	718,5	761,8	810,7	765,3	701,5	666,0
SD	129,8	52,1	116,8	146,9	227,4	163,5	102,1	141,4	228,5	182,7	160,8	184,6	104,1	201,7	138,4	

Foto/Adipócito	N4.05															Média final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	715,9	802,8	872,8	668,3	743,0	701,3	706,2	649,2	686,0	598,7	548,9	700,8	774,2	515,8	909,9	
Adip.2	605,2	552,1	455,7	521,0	834,2	521,2	717,1	653,1	641,1	517,7	898,1	620,3	711,0	643,0	774,5	
Adip.3	542,0	519,7	797,3	847,8	609,1	639,2	732,8	699,3	740,6	652,2	750,6	590,4	803,4	588,2	604,1	
Adip.4	887,0	657,3	474,1	628,9	677,0	834,3	710,5	742,1	535,2	840,9	693,0	676,9	706,8	1049,9	1040,9	
Adip.5	592,1	413,3	830,9	491,2	877,6	476,2	843,4	731,5	450,0	497,1	880,7	664,1	1079,2	756,7	691,6	
Adip.6	684,6	490,8	308,1	519,8	503,2	810,7	686,0	844,2	784,2	664,6	860,8	723,7	700,3	617,8	713,0	
Adip.7	498,6	460,0	411,4	435,2	753,9	519,3	895,0	707,4	625,2	598,7	615,2	795,4	679,1	724,5	605,1	
Adip.8	612,8	428,1	738,7	393,3	602,8	543,4	715,0	696,9	543,2	590,8	714,0	489,7	830,5	875,9	743,3	
Adip.9	467,3	766,9	880,6	666,1	537,3	435,1	877,7	442,3	730,3	459,5	588,1	714,6	595,9	719,5	863,0	
Adip.10	509,1	483,7	695,3	629,3	756,2	731,2	879,9	513,8	970,1	396,3	652,5	495,3	696,6	674,2	473,3	
Adip.11	520,2	512,5	738,1	473,3	709,8	650,7	791,2	855,0	675,3	816,0	805,2	866,4	903,9	639,0	828,4	
Adip.12	648,0	833,6	616,5	328,4	891,9	786,7	843,2	418,9	519,0	447,0	763,9	384,1	681,6	711,7	411,7	
Adip.13	406,4	629,9	836,2	411,7	467,2	613,1	682,3	891,9	603,5	520,9	635,5	559,2	657,2	610,1	351,0	
Adip.14	895,7	796,5	816,0	351,0	687,8	525,1	763,9	835,9	760,2	777,3	567,5	862,4	749,0	548,5	866,9	
Adip.15	985,6	876,1	844,6	468,3	704,3	594,2	848,4	771,4	716,4	632,6	776,9	606,8	649,0	718,1	483,7	
Adip.16	359,7	745,3	627,4	521,0	658,9	895,8	709,7	826,7	509,7	733,6	634,6	423,6	1019,8	892,6	512,5	
Adip.17	422,8	810,6	698,2	847,8	669,0	684,5	656,3	660,2	525,7	633,5	525,2	624,1	606,8	732,6	633,6	
Adip.18	660,8	626,6	754,0	628,9	774,9	484,1	603,6	741,3	885,3	848,8	638,9	626,2	770,0	859,0	629,9	
Adip.19	673,5	703,2	860,3	491,2	636,0	757,5	786,0	610,2	899,9	642,2	627,6	583,1	761,8	619,5	796,5	
Adip.20	732,1	859,6	695,7	519,8			627,2	807,7		534,5	560,9	600,5	670,7	670,3	776,1	
Média	621,0	648,4	697,6	542,1	689,2	642,3	753,8	705,0	673,7	620,1	686,9	630,4	752,3	708,3	685,4	670,4
SD	167,3	156,6	167,5	143,4	143,4	135,2	87,6	132,1	145,4	132,0	114,2	128,3	126,3	129,6	180,0	

Dieta padrão-NR																
N1.02																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	623,9	458,0	681,0	550,9	698,2	482,8	453,7	782,5	670,5	549,6	498,5	436,8	597,9	513,7	477,3	
Adip.2	503,4	596,6	436,1	539,7	541,4	581,2	455,0	441,6	416,3	360,7	413,4	474,5	568,4	563,9	536,3	
Adip.3	490,8	593,5	531,7	521,2	488,7	523,2	521,1	334,9	425,8	563,3	454,5	345,9	638,0	795,9	646,4	
Adip.4	453,4	606,0	594,9	645,7	477,4	591,1	799,8	387,6	271,1	614,1	574,1	313,4	565,1	695,6	542,9	
Adip.5	444,6	565,4	485,6	426,9	462,2	799,5	496,6	375,3	414,8	345,4	537,8	532,4	652,5	319,7	568,0	
Adip.6	527,1	394,0	349,7	552,9	348,0	546,2	447,0	524,9	359,8	725,4	347,9	402,8	245,4	555,9	603,2	
Adip.7	431,5	520,6	534,2	453,5	660,5	573,4	1037,9	596,1	565,6	358,4	500,5	363,4	491,0	575,1	584,3	
Adip.8	521,3	353,2	606,4	519,1	638,6	516,2	1133,7	392,0	442,4	392,4	531,1	413,5	323,2	708,8	549,9	
Adip.9	435,3	343,7	699,8	446,1	554,0	515,7	713,8	476,9	465,9	562,1	658,4	523,5	398,3	643,5	577,5	
Adip.10	418,8	402,7	751,4	533,7	399,2	610,5	637,1	413,6	480,6	421,2	352,8	600,0	453,9	611,8	603,7	
Adip.11	420,6	486,9	544,0	448,4	427,0	619,9	577,9	436,1	581,2	312,9	515,3	507,9	602,6	560,3	590,2	
Adip.12	467,5	693,3	358,7	515,8	413,3	521,4	296,5	472,5	579,6	515,7	563,2	547,3	610,4	491,6	453,0	
Adip.13	480,5	488,6	392,7	617,3	673,8	499,0	839,1	343,1	560,7	433,7	665,2	504,3	439,7	437,0	484,2	
Adip.14	481,7	503,6	507,4	483,9	415,8	400,2	569,1	567,4	509,6	454,7	515,0	442,8	425,6	432,6	475,8	
Adip.15	628,5	420,2	464,0	520,0	764,2	582,9	476,1	438,3	347,5	355,2	485,7	440,8	422,8	866,8	382,3	
Adip.16	466,2	408,3	517,8	468,4	587,5	538,6	502,5	415,8	427,7	752,7	710,7	484,7	303,8	650,2	637,5	
Adip.17	634,9	434,4	744,1	460,2	610,5	605,5	547,4	362,1	854,0	428,0	590,0	354,4	382,2	457,7	477,2	
Adip.18	433,5	390,9	455,0	409,1	421,5	713,3	433,8	421,2	459,0	667,1	437,0	566,8	405,2	289,3	366,9	
Adip.19	480,4	425,1	535,3	1037,9	411,1	432,9	489,7	489,0	446,7	545,2	383,6	535,3	586,2	526,3	725,5	
Adip.20	434,4	615,7	541,3	733,7	715,5	714,9	567,6	511,5	402,8	487,1	716,8	355,9	435,5	473,5	731,6	
Adip.21	402,2	461,2	683,1	713,8	796,1	354,0	597,9	470,6	447,2	422,8	688,4	393,2	425,0	471,6	602,0	
Adip.22	402,2	478,8	295,5	637,1	627,1	643,7	596,8	519,9	631,7	400,7	535,7	365,7	444,2	591,8	70,0	

Adip.23	687,2	689,6	535,2	677,9	426,4	501,8	439,2	449,9	390,0	494,3	610,9	344,7	254,0	399,7	369,2	
Adip.24	465,4	765,4	445,5	596,5	598,3	765,3	546,2	439,5	610,4	437,9	861,4	341,3	421,4	543,1	312,5	
Adip.25	430,0		461,7	839,1	606,2	633,3	873,4	407,2	439,7		517,4	303,1	422,1	514,8		
(Continuação)																
Adip.26	413,3				446,8	684,3	516,2	408,3	406,5		565,6	483,1	418,7	812,2		
Adip.27	542,6				541,1				359,4		496,8	554,8	295,4	607,0		
Adip.28	581,1				679,3								350,8			
Adip.29	503,5												560,0			
Adip.30													335,0			
Média	489,8	504,0	526,1	573,9	551,1	575,0	598,7	456,8	480,2	483,3	545,5	441,9	449,1	559,6	515,3	516,7
SD	76,4	113,8	120,6	143,8	124,5	106,6	194,2	92,6	121,0	119,8	118,5	87,1	115,3	138,6	143,8	

Foto/Adipócito	N1.03															Média final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	735,9	617,1	580,3	672,8	657,6	380,7	502,6	658,1	644,5	550,2	601,9	655,2	555,2	539,8	810,8	
Adip.2	692,6	641,8	363,3	505,0	435,1	489,7	642,1	10,6	515,1	600,2	484,6	555,1	595,9	389,9	586,2	
Adip.3	386,8	399,9	248,4	683,7	572,5	444,2	548,0	1037,8	408,3	732,3	501,2	773,9	457,5	419,9	698,6	
Adip.4	391,8	443,1	219,8	645,1	456,2	617,2	412,9	587,8	557,9	560,0	573,8	433,5	661,4	549,4	584,6	
Adip.5	526,0	531,2	365,3	543,6	569,5	591,1	549,5	586,6	453,7	307,6	899,2	455,6	517,4	616,3	654,7	
Adip.6	528,5	467,2	503,3	566,7	354,8	799,5	500,8	793,0	503,5	545,3	463,5	644,2	705,6	517,5	933,7	
Adip.7	382,4	709,1	484,3	582,0	516,0	546,2	702,7	563,5	564,9	302,8	524,2	465,4	496,8	351,3	641,8	
Adip.8	598,4	534,5	560,0	269,4	439,3	373,4	817,1	535,8	378,6	467,3	515,6	925,3	457,1	508,9	369,8	
Adip.9	631,4	743,0	528,6	302,2	474,7	516,2	593,4	789,5	480,4	613,4	503,0	528,1	392,8	521,8	851,0	
Adip.10	658,6	548,2	792,8	740,7	449,0	515,7	436,4	694,7	781,7	459,3	537,6	630,6	309,3	577,8	1042,9	
Adip.11	754,0	466,7	484,9	488,5	512,9	610,5	392,4	808,2	628,3	362,7	682,7	642,8	394,9	447,8	1039,0	
Adip.12	379,7	559,5	458,9	404,3	753,5	319,9	622,5	880,6	569,2	438,8	513,4	541,4	733,5	599,2	500,2	
Adip.13	664,3	548,4	526,7	361,5	609,7	521,4	570,4	799,7	606,5	313,8	561,1	470,2	599,8	485,1	745,1	
Adip.14	478,5	669,6	579,4	528,0	436,1	499,0	381,6	586,5	747,0	598,8	402,0	332,0	522,5	519,4	800,0	
Adip.15	546,3	571,3	683,9	323,8	761,6	400,2	728,0	566,0	520,7	397,5	427,9	701,1	502,9	953,5	535,3	
Adip.16	566,8	323,3	413,7	457,5	327,4	577,0	716,7	726,1	539,3	436,4	505,4	686,1	238,1	560,5	390,5	
Adip.17	604,0	365,3	314,8	457,0	380,3	394,1	630,7	607,5	647,7	377,0	400,3	701,4	359,8	236,2	406,1	
Adip.18	404,4	692,4	458,0	297,7	415,3	360,2	430,5	631,0	420,8	516,6	529,1	495,3	394,9	396,5	426,6	
Adip.19	457,3	468,8	440,1	305,7	523,7	419,3	388,7	595,7	543,7	471,5	387,9	442,3	505,9	513,7	488,9	
Adip.20	539,1	466,7	471,0	365,5	384,0	501,8	698,2	626,8	584,9	568,0	381,4	502,1	539,0	335,7	698,3	
Adip.21	508,5	612,5	432,3	445,7	459,0	579,6	551,0	671,9	471,1	513,9	468,9	370,6	393,2	618,4	712,5	
Adip.22	513,7	449,8	368,8	578,9	470,8	570,3	884,8	574,8	770,4	629,9	434,2	347,2	545,7	473,7	352,4	
Adip.23	474,9	423,2	306,5	407,7	532,3	412,5	570,3	702,0	701,8	452,1	616,0	375,0	526,6	282,9	788,9	
Adip.24	757,1	461,1	304,6	353,7	531,1	377,0	317,8	431,1	595,6	653,4	558,1	675,8	549,3	391,5	353,0	
Adip.25	690,3	533,1	271,4	633,6	512,1	419,7	326,3	530,5	385,9	636,5	567,8	604,7	372,2	296,9	473,0	

Adip.26	638,7	565,3	474,9	727,5	503,1	447,7	533,2	525,2	347,9	454,7	355,9	532,8	721,9	344,7	572,0	
(Continuação)																
Adip.27	532,5	503,4	497,0	740,8	450,4	363,3	434,8		619,0		671,1		398,1	363,6		
Adip.28	451,8	291,6	249,8	717,8	565,1	368,4	399,4		645,8		356,2		508,9			
Adip.29		305,3	395,6	360,0	403,7	390,2	525,0									
Adip.30		215,5	336,2	411,0	332,1											
Média	553,4	504,3	437,1	495,9	493,0	476,1	545,1	635,4	558,4	498,5	515,1	557,2	498,4	474,5	632,9	525,0
SD	116,6	127,9	131,1	149,7	106,8	107,0	144,1	182,6	116,5	114,8	115,4	143,2	122,0	143,5	204,3	

Foto/Adipócito	N2.02															Média final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	567,8	573,6	636,4	585,6	757,3	467,9	537,8	485,0	547,1	423,0	564,4	678,4	733,0	469,5	680,9	
Adip.2	645,5	707,4	502,7	363,9	709,6	420,7	604,7	511,4	533,1	540,2	526,1	532,7	576,2	756,3	456,3	
Adip.3	451,7	507,3	531,7	477,2	711,7	388,6	633,0	533,1	569,3	655,8	408,8	455,0	521,6	597,2	420,5	
Adip.4	494,0	600,2	636,0	498,2	479,9	484,0	557,8	520,5	517,3	699,1	521,9	563,6	658,1	703,3	523,0	
Adip.5	542,3	490,1	492,0	468,1	505,0	504,6	491,9	522,6	484,0	950,8	415,6	445,0	689,1	693,0	504,1	
Adip.6	709,1	588,6	493,0	778,8	515,3	368,8	581,7	556,7	483,4	501,0	629,5	547,8	609,2	795,7	613,4	
Adip.7	431,6	593,0	643,1	606,6	379,2	284,1	566,8	405,2	562,5	564,9	587,2	895,1	594,4	602,9	661,8	
Adip.8	504,8	610,2	544,7	635,6	595,0	362,1	556,9	520,6	500,1	408,0	500,3	613,7	474,1	826,9	587,3	
Adip.9	500,8	625,3	552,4	501,7	661,7	444,2	506,5	474,9	576,7	748,5	402,4	417,1	603,0	567,3	441,9	
Adip.10	348,2	565,5	551,1	584,7	535,4	682,7	599,7	518,5	540,6	475,4	450,2	714,1	450,5	549,2	717,6	
Adip.11	570,6	435,7	588,8	443,0	586,5	631,9	477,5	612,6	442,5	550,9	317,4	242,8	676,5	492,0	341,3	
Adip.12	365,0	431,7	450,1	745,4	371,7	654,1	583,6	593,7	421,9	811,7	504,4	421,9	837,1	393,7	649,6	
Adip.13	393,2	511,2	631,1	407,2	448,1	780,5	458,6	582,5	445,1	601,1	408,8	636,0	605,7	393,9	484,0	
Adip.14	366,6	390,8	433,2	334,1	459,6	511,9	785,4	415,2	484,4	612,0	436,3	532,8	364,8	528,6	479,3	
Adip.15	667,6	321,4	512,9	437,7	427,5	358,0	536,4	643,0	332,4	540,2	538,2	383,7	392,2	435,0	537,6	
Adip.16	486,1	542,2	527,6	459,8	466,4	520,2	607,8	415,8	405,3	469,6	408,5	526,6	531,7	316,6	578,5	
Adip.17	621,4	358,3	376,6	472,9	300,1	490,9	558,2	469,3	600,0	501,4	504,2	305,5	700,4	423,5	487,1	
Adip.18	471,8	492,2	410,8	486,5	394,2	651,4	427,1	407,6	542,5	500,9	451,8	352,6	521,1	746,4	678,5	
Adip.19	545,5	293,5	397,9	386,7	520,8	424,5	546,3	468,6	404,7	683,0	424,6	381,7	542,9	644,6	549,0	
Adip.20	444,7	512,9	506,8	411,9	439,0	377,9	567,3	358,5	1035,0	330,3	383,5	491,5	700,3	608,6	466,2	
Adip.21	378,0	505,8	442,9	418,8	470,7	410,2	748,3	362,3	703,5	478,5	555,1	413,2	543,1	392,8	444,8	
Adip.22	577,0	264,8	722,2	505,4	611,3	407,2	672,8	367,4	1052,4	449,9	524,1	543,6	357,8	375,7	521,2	
Adip.23	498,2	380,2	775,3	376,7	438,2	451,4	782,9	723,8	324,6	462,3	850,3	360,8	678,6	462,9	428,1	
Adip.24	473,0	381,2	327,8	492,6	832,7	430,1	694,1	479,6	480,2	389,7	483,7	349,1	457,6	569,6	382,4	
Adip.25	514,1	316,1	316,1	403,5	513,9	484,0	429,6	263,2	689,5	755,6	494,0	341,9	220,0	594,8	379,3	

Adip.26	636,3	396,6	360,5	564,6	538,8	331,5	432,0	271,5	367,1	521,5	544,8	481,4	340,9	497,8	470,1	
(Continuação)																
Adip.27	505,8	661,2	431,6	500,3			488,7	667,2		550,7		496,5	586,3		549,5	
Adip.28		378,5	801,1	601,7			425,9					350,6	506,5			
Adip.29		300,2											508,1			
Adip.30													482,5			
Média	507,8	473,6	521,3	498,2	525,7	474,0	566,4	487,0	540,2	562,1	493,7	481,2	548,8	555,3	519,8	517,0
SD	96,4	121,5	125,7	107,9	127,9	119,7	101,4	112,4	175,1	141,1	102,4	140,8	134,1	140,0	100,0	

N2.03																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	577,1	669,0	602,1	560,7	655,1	523,3	501,4	422,9	590,3	412,1	506,3	649,2	508,3	629,2	507,5	
Adip.2	598,1	645,1	350,3	525,9	828,7	410,4	642,6	418,7	655,3	788,0	356,7	622,9	433,4	480,8	676,0	
Adip.3	553,2	512,1	396,4	5633,7	496,5	490,7	640,2	755,0	541,9	634,1	543,8	518,5	438,5	444,6	417,4	
Adip.4	422,0	586,3	426,4	645,9	629,9	418,5	472,3	534,0	582,4	542,0	520,2	370,6	456,7	651,6	740,0	
Adip.5	413,1	515,9	441,2	748,5	391,7	715,6	851,9	749,4	518,1	691,0	488,6	403,9	561,9	596,8	503,1	
Adip.6	477,0	512,9	396,1	576,5	637,1	400,6	848,7	449,0	454,1	528,9	514,5	816,7	433,9	541,3	611,8	
Adip.7	441,8	677,7	585,2	480,0	494,8	451,1	520,1	471,6	562,2	639,5	529,7	586,3	456,0	546,0	682,9	
Adip.8	465,9	475,3	466,8	491,9	509,0	749,0	603,5	545,2	554,9	421,8	423,5	441,0	516,9	561,8	471,5	
Adip.9	467,1	517,2	465,2	402,7	521,1	523,8	712,8	471,6	403,5	506,5	311,5	665,6	485,4	584,1	412,3	
Adip.10	314,4	460,9	631,2	385,4	421,2	722,9	643,0	547,2	377,6	450,3	352,6	509,4	449,9	463,5	501,9	
Adip.11	486,2	666,9	365,4	469,4	778,4	346,8	681,2	535,5	464,9	465,1	462,3	483,6	343,8	521,8	520,3	
Adip.12	302,6	513,1	666,5	424,5	576,6	581,1	732,6	698,4	447,5	652,9	356,5	376,1	413,2	410,5	481,9	
Adip.13	460,3	442,8	351,6	453,1	499,2	409,3	613,8	644,2	456,6	459,9	554,1	434,7	441,0	408,3	698,0	
Adip.14	580,0	429,0	385,4	730,9	431,8	620,8	464,2	502,4	297,6	519,3	511,7	455,9	438,4	478,9	378,7	
Adip.15	524,5	480,7	656,9	491,5	489,8	459,2	475,8	311,2	484,8	537,3	498,9	531,0	460,7	536,6	530,5	
Adip.16	515,9	484,0	509,0	502,5	411,8	494,3	522,2	572,2	390,3	532,3	419,3	343,7	367,5	445,7	422,5	
Adip.17	471,1	542,9	319,7	461,6	293,6	407,8	512,3	495,0	339,1	574,4	544,2	440,8	642,7	422,0	683,3	
Adip.18	536,3	640,3	347,8	421,9	435,5	441,6	488,3	486,5	472,5	543,9	478,6	562,6	492,4	459,3	453,5	
Adip.19	604,8	428,2	293,1	469,4	384,1	543,4	470,4	407,9	457,0	656,2	480,4	439,8	414,9	419,0	743,7	
Adip.20	466,6	595,7	586,1	394,0	298,9	439,5	738,4	415,4	350,9	472,0	710,3	700,2	486,5	572,1	639,0	
Adip.21	302,3	472,3	392,9	398,3	380,2	534,6	502,1	393,4	483,5	420,1	539,1	532,2	475,1	454,4	510,1	
Adip.22	368,6	442,8	582,3	412,8	354,5	554,3	332,6	556,2	431,3	543,9	783,8	624,5	654,3	345,5	645,5	
Adip.23	420,5	429,0	465,8	375,0	521,5	507,8	607,7	455,4	326,2	432,9	500,2	453,1	710,4	302,2	662,8	
Adip.24	493,4	458,7	620,3	567,8	619,3	503,3	610,3	501,6	437,2	407,9	743,9	730,9	627,1	566,0	468,0	
Adip.25	529,0	603,2	496,3	515,6	451,5	387,7	420,5	439,0	369,2	723,6	445,8	491,5	410,8	602,1	698,0	

Adip.26	574,4	370,9	399,5	357,7	516,0	486,9	500,0	585,3	532,1	607,7	420,0					
(Continuação)																
Adip.27	574,6	352,6	447,7	799,2	603,8	693,3		707,0		710,3	533,9					
Adip.28	478,6	632,0		631,8	524,6	488,6										
Adip.29	399,1			689,8	581,2											
Adip.30					776,2											
Média	471,7	528,1	476,8	674,8	494,8	521,2	587,0	516,0	458,0	540,6	513,7	527,4	486,6	509,7	556,1	524,2
SD	86,2	83,2	110,5	77,4	131,2	123,2	124,4	108,6	90,4	103,1	116,9	121,5	89,1	96,6	113,8	

N3.02																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	399,2	527,1	522,2	408,8	395,9	593,0	467,2	485,6	394,0	639,0	568,4	454,1	531,7	572,5	491,9	
Adip.2	427,0	431,5	512,3	521,9	695,6	610,2	709,1	349,7	620,6	510,1	638,0	562,2	636,0	456,2	402,7	
Adip.3	413,3	521,3	488,3	415,6	319,7	625,3	534,5	534,2	353,2	645,5	565,1	554,9	492,0	569,5	385,4	
Adip.4	373,8	435,3	470,4	629,5	555,9	565,5	743,0	606,4	343,7	662,8	652,5	403,5	493,0	354,8	469,4	
Adip.5	415,8	418,8	738,4	587,2	575,1	435,7	548,2	699,8	402,7	465,9	245,4	377,6	643,1	516,0	424,5	
Adip.6	6264,2	420,6	502,1	500,3	708,8	431,7	466,7	751,4	486,9	467,1	491,0	464,9	544,7	439,3	453,1	
Adip.7	587,5	467,5	607,7	402,4	643,5	511,2	559,5	544,0	293,3	714,4	323,2	447,5	552,4	474,7	730,9	
Adip.8	310,5	480,5	610,3	450,2	611,8	390,8	548,4	358,7	488,6	486,2	398,3	456,6	551,1	449,0	491,5	
Adip.9	421,5	481,7	420,5	617,4	560,3	621,4	669,6	392,7	503,6	302,6	453,9	297,6	588,8	512,9	502,5	
Adip.10	411,1	628,5	516,0	504,4	491,6	542,2	571,3	507,4	420,2	460,3	602,6	484,8	450,1	753,5	461,6	
Adip.11	715,5	466,2	603,8	408,8	437,0	358,3	723,3	464,0	408,3	580,0	390,9	390,3	631,1	609,7	421,9	
Adip.12	396,1	634,9	524,6	436,3	432,6	492,2	365,3	517,8	434,4	524,5	425,1	646,4	433,2	436,1	469,4	
Adip.13	327,1	433,5	581,2	538,2	866,8	293,5	692,4	744,1	390,9	515,9	425,6	542,9	512,9	761,6	394,0	
Adip.14	426,4	347,8	433,9	408,5	650,2	512,9	468,8	455,0	425,1	471,1	422,8	568,0	527,6	327,4	398,3	
Adip.15	298,3	293,1	456,0	504,2	457,7	505,8	466,7	298,0	315,7	536,3	603,8	603,2	376,6	380,3	412,8	
Adip.16	306,2	586,1	516,9	451,8	419,3	764,8	612,5	378,7	611,8	304,8	7560,1	584,3	410,8	415,3	375,0	
Adip.17	446,8	392,9	485,4	424,6	544,2	380,2	449,8	530,5	682,9	466,6	748,5	549,9	697,9	523,7	567,8	
Adip.18	341,1	582,3	449,9	383,5	478,6	530,5	423,2	422,5	471,5	302,3	576,5	577,5	506,8	384,0	515,6	
Adip.19	379,3	465,8	343,8	555,1	480,4	422,5	461,1	683,3	412,3	542,2	480,0	603,7	530,5	459,0	370,9	
Adip.20	537,3	620,3	475,1	454,1	710,3	683,3	533,1	453,5	501,9	358,3	491,9	590,2	422,5	470,8	352,6	
Adip.21	532,3	496,3	413,2	562,2	539,1	453,5	486,2	743,7	520,3	492,2	402,7	453,0	683,3	532,3	339,1	
Adip.22	574,4	574,4	441,0	554,9	783,8	743,7	302,6	639,0	481,9	293,5	385,4	484,2	453,5	531,1	472,5	
Adip.23	543,9	574,6	438,4	403,5	500,2	639,0	460,3	510,1	298,0	512,9	469,4	475,8	743,7	512,1	457,0	
Adip.24	656,2	478,6	460,7	677,6	743,9	510,1	580,0	645,5	378,7	505,8	424,5	382,3	639,0	503,1	471,1	
Adip.25	472,0	399,1	367,5	464,9	445,8	645,5	524,5	662,8	530,5	264,8	453,1	637,5	510,1		536,3	

Adip.26	420,1	642,7	447,5	585,3	662,8	515,9	468,0	422,5	380,2	730,9	477,2	645,5	304,8			
(Continuação)																
Adip.27	543,9	492,4	456,6	468,0	698,0	683,3	381,2	491,5	366,9	662,8	466,6					
Adip.28	432,9	414,9	297,6	698,0	420,0	453,5			325,5	468,0	302,3					
Adip.29	407,9	486,5	484,8	420,0		743,7			331,6	698,0						
Adip.30	723,6		390,3	533,9						420,0						
Média	650,2	486,3	497,1	478,1	562,8	534,8	534,0	534,4	464,6	473,6	756,3	486,0	548,6	497,7	444,3	529,9
SD	166,3	88,8	85,1	84,6	132,8	118,3	109,0	132,4	115,2	119,8	164,9	98,7	99,6	106,1	86,9	

N3.03																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	602,1	493,0	517,3	520,3	436,4	383,5	450,2	542,9	411,2	453,1	395,9	503,3	549,5	595,7	371,7	
Adip.2	350,3	643,1	484,0	481,9	377,0	555,1	317,4	568,0	534,6	730,9	695,6	484,3	500,8	525,9	448,1	
Adip.3	396,4	544,7	483,4	298,0	516,6	629,9	504,4	603,2	606,0	491,5	319,7	560,0	702,7	662,8	459,6	
Adip.4	426,4	552,4	562,5	378,7	471,5	628,5	408,8	584,3	506,8	502,5	555,9	528,6	817,1	453,0	427,5	
Adip.5	441,2	551,1	500,1	530,5	568,0	466,2	436,3	549,9	333,3	461,6	575,1	792,8	593,4	748,5	466,4	
Adip.6	396,1	588,8	576,7	422,5	513,9	334,9	453,9	577,5	463,3	421,9	708,8	484,9	436,4	576,5	300,1	
Adip.7	585,2	450,1	540,6	683,3	629,9	433,5	602,6	603,7	692,7	469,4	643,5	458,9	392,4	480,0	394,2	
Adip.8	466,8	631,1	442,5	453,5	424,6	347,8	683,3	590,2	406,9	394,0	611,8	526,7	622,5	491,9	520,8	
Adip.9	465,2	433,2	421,9	639,5	544,2	693,1	453,5	453,0	494,1	398,3	560,3	447,5	570,4	402,7	439,0	
Adip.10	480,5	512,9	445,1	421,8	478,6	586,1	425,6	484,2	534,8	412,8	491,6	456,6	381,6	385,4	470,7	
Adip.11	481,7	527,6	484,4	506,5	480,4	392,9	422,8	475,8	466,0	375,0	437,0	297,6	728,0	469,4	611,3	
Adip.12	628,5	376,6	332,4	450,3	710,3	582,3	303,8	382,3	332,6	567,8	432,6	484,8	716,7	424,5	566,0	
Adip.13	466,2	410,8	405,3	465,1	539,1	465,8	0,1	310,5	607,7	515,6	866,8	390,3	630,7	453,1	726,1	
Adip.14	334,9	397,9	600,0	352,9	783,8	620,3	748,5	421,5	610,3	370,9	650,2	646,4	430,5	730,9	607,5	
Adip.15	433,5	506,8	542,5	459,9	500,2	438,8	576,5	411,1	420,5	515,3	457,7	542,9	388,7	521,1	631,0	
Adip.16	347,8	530,5	404,7	519,3	743,9	313,8	480,0	715,5	516,0	379,2	789,3	568,0	698,2	421,2	595,7	
Adip.17	593,1	422,5	1035,0	366,6	445,8	598,8	491,9	396,1	603,8	595,0	745,4	603,2	551,0	278,4	626,8	
Adip.18	586,1	683,3	703,5	667,6	538,2	397,5	465,9	327,1	524,6	661,7	407,2	552,4	586,6	576,6	671,9	
Adip.19	392,9	453,5	1052,4	486,1	408,5	436,4	480,6	426,4	581,2	535,4	334,1	551,1	793,0	499,2	828,7	
Adip.20	582,3	743,7	513,1	621,4	504,2	377,0	381,2	298,3	433,9	586,5	437,7	588,8	563,5	431,8	496,5	
Adip.21	465,8	639,0	442,8	471,8	451,8	516,6	579,6	306,2	456,0	371,7	459,8	450,1	535,8	486,2	629,9	
Adip.22	620,3		429,0	545,5	6513,1	471,5	360,7	427,7	516,9	448,1	472,9	631,1	789,5	302,6	391,7	
Adip.23	496,3		480,7	444,7	442,8	568,0	509,6	354,0	485,4	459,6	486,5	433,2	694,7	460,3	637,1	
Adip.24	574,4		484,0	378,0	529,0	513,9	347,5		449,9	427,5	386,7	512,9	808,2	580,0	494,8	
Adip.25			542,9		480,7				343,8	466,4	411,9	527,6	880,6		509,0	

Adip.26			640,3				300,1		418,8	376,6	799,7						
(Continuação)																	
Adip.27			428,2						505,4		586,5						
Adip.28			595,7														
Média	483,9	528,2	539,0	481,9	761,3	489,7	453,5	470,0	493,3	473,5	528,1	515,4	620,3	498,2	532,9	524,6	
SD	92,2	99,8	163,1	99,0	102,5	107,5	144,1	115,8	92,8	97,6	142,9	97,3	144,7	115,1	123,0		

Dieta HSD-NR																
N1.05																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adp.1	396,2	308,2	392,7	311,3	402,7	483,6	411,6	384,3	625,2	530,8	609,3	531,0	387,3	362,7	353,3	
Adp.2	228,1	355,3	354,5	358,5	255,9	395,8	492,1	359,3	244,2	509,4	453,3	359,7	426,2	389,0	343,1	
Adp. 3	258,3	274,9	388,7	340,9	206,2	331,8	355,8	320,9	368,3	467,5	473,0	364,3	296,6	350,1	526,2	
Adp.4	356,7	247,5	356,1	572,2	234,6	323,4	396,9	337,7	316,9	551,9	552,1	285,3	493,4	370,1	506,8	
Adp. 5	294,8	295,3	324,9	387,6	228,4	521,3	460,6	449,1	423,8	325,5	401,0	244,4	384,9	348,5	369,9	
Adp. 6	279,7	304,6	214,2	366,4	207,3	241,8	372,0	330,6	246,7	450,6	286,3	530,2	247,3	360,5	267,5	
Adp. 7	319,9	360,2	288,2	253,1	317,6	519,7	449,4	440,4	264,8	351,1	572,0	419,4	298,7	394,2	393,6	
Adp. 8	387,3	295,9	429,5	333,4	303,9	458,9	715,6	431,0	221,4	235,7	300,3	388,1	348,2	275,3	378,9	
Adp. 9	408,8	250,5	524,5	296,4	353,9	519,5	642,9	350,8	238,7	357,4	316,6	330,9	273,7	331,7	388,5	
Adp. 10	416,7	272,7	265,9	257,4	374,0	330,1	473,7	350,2	264,7	276,3	351,0	316,0	235,7	293,0	515,5	
Adp.11	403,0	588,6	294,2	320,1	431,9	415,9	455,8	333,7	332,3	298,5	323,7	378,8	306,9	391,3	463,1	
Adp. 12	572,2	482,5	434,7	320,3	559,2	299,0	378,2	392,4	529,9	234,7	212,4	392,0	367,3	355,4	439,2	
Adp.13	403,5	285,0	378,1	263,4	561,8	194,5	420,8	297,2	374,7	305,5	209,0	537,7	320,6	222,2	564,1	
Adp.14	292,1	590,3	272,8	488,5	505,3	315,7	405,8	472,5	353,4	436,6	224,8	456,7	470,7	312,5	367,3	
Adp.15	493,2	221,0	336,3	205,8	886,8	217,5	286,3	238,3	133,8	529,3	538,7	374,0	244,8	585,3	541,4	
Adp. 16	284,5	526,6	394,6	235,6	521,2	207,1	482,5	287,2	243,5	274,9	213,8	350,3	455,8	294,6	382,7	
Adp.17	517,8	251,1	409,2	597,9	439,0	255,4	369,3	349,5	466,3	247,5	332,5	267,7	322,3	279,7	273,8	
Adp.18	219,8	266,8	397,0	372,2	350,0	282,6	302,4	428,9	258,9	295,3	513,8	439,9	246,8	265,4	301,4	
Adp.19	219,8	188,3	308,5	338,1	464,7	342,4	271,2	287,3	305,6	304,6	353,2	244,9	319,7	248,7	413,0	
Adp.20	240,2	205,1	549,8	322,3	462,7	317,6	287,3	282,4	208,7	349,0	329,6	500,0	362,7	355,4	354,6	
Adp.21	590,2	583,9	260,6	236,0	313,0	270,7	316,2	231,8	358,1	442,2	269,6	442,6	231,6	232,7	312,3	
Adp.22	366,3	321,4	211,4	228,7	300,2	323,0	277,4	312,0	310,3	339,2	265,6	495,8	275,7	228,4	406,6	
Adp.23	351,6	359,0	236,1	203,4	241,9	247,7	570,6	357,4	378,3	382,3	292,4	444,2	414,7	356,2	598,2	
Adp.24	329,9	188,5	218,2	163,1	500,0	202,9	322,6	313,7	488,2	340,3	497,4	461,1	321,8	263,9	343,9	

Adp.25	452,1	670,4	258,6	191,3	276,4	270,8	345,2	232,3	347,7	335,1	371,7	345,5	492,3	323,4	424,5	
(Continuação)																
Adp.26	427,0	223,6	576,8	218,7	299,9	212,9	279,4	352,9	274,6	313,2	280,5	4349,0	455,3	293,4	372,3	
Adp. 27	201,2	326,6	315,8	291,0	216,6	190,7	272,3	382,1	496,7	420,0	323,1	243,2		180,9	595,7	
Adp.28	317,9	543,6	279,9	259,5	319,0	245,7	222,3	213,5	289,7	258,5	367,8	241,8		190,2	422,0	
Adp.29	357,4	221,8	298,3	391,0	593,3	333,3	264,7	286,3	280,9	424,5	343,8	324,7		339,5	265,1	
Adp.30	280,8	292,3	203,6	494,9	225,1	269,6		591,5	293,5	278,5	243,1	345,1			312,4	
Adp.31	228,1	355,3	253,3	598,5				280,4		231,6	325,3	306,6			287,8	
Adp.32	258,3	274,9	332,8					162,1			239,1	282,4			352,0	
Adp. 33	356,7	247,5	382,0												360,3	
Adp.34	294,8	295,3	289,1												318,2	
Adp.35	279,7	304,6	358,4													
Adp. 36		260,8														
Média	345,3	334,4	336,8	329,6	378,4	318,0	389,7	338,7	331,3	358,0	355,8	499,8	346,2	317,0	397,5	358,4
SD	99,1	127,5	92,8	116,7	152,1	100,6	116,9	85,6	107,2	94,5	113,4	108,1	82,9	79,3	93,1	

N1.06																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média final
Adip.1	264,2	304,8	511,7	476,7	205,8	301,0	529,5	329,7	543,1	317,9	351,1	549,2	326,1	397,6	330,3	
Adip.2	162,9	384,1	390,7	341,4	348,0	226,5	348,0	333,7	463,7	310,5	335,1	266,9	329,9	315,8	332,2	
Adip.3	161,4	238,0	325,5	360,5	267,1	368,5	380,3	496,5	410,7	536,0	316,2	248,3	437,3	417,6	407,4	
Adip.4	279,4	292,1	324,9	515,2	386,0	208,3	297,8	348,6	432,7	413,6	384,4	204,7	283,5	411,9	496,0	
Adip.5	279,3	445,9	468,7	503,8	440,1	289,8	258,1	495,6	494,3	414,9	331,3	300,8	267,0	348,9	314,3	
Adip.6	300,0	288,9	342,4	292,5	408,8	276,8	249,3	511,1	509,4	441,5	273,3	299,0	325,3	271,1	390,8	
Adip.7	286,6	484,5	318,6	360,3	269,7	303,1	337,3	366,8	498,8	298,5	400,5	377,3	359,2	244,4	448,7	
Adip.8	391,4	397,3	329,3	382,7	351,8	363,6	291,3	337,0	287,2	257,1	376,9	405,9	385,4	343,8	317,9	
Adip.9	205,8	569,3	623,8	323,5	427,1	345,3	442,0	373,2	523,1	493,4	311,9	395,1	465,3	316,6	372,7	
Adip.10	266,5	329,0	474,9	556,9	689,8	400,3	357,5	383,8	357,0	355,3	246,7	395,4	427,0	385,0	191,6	
Adip.11	387,6	329,0	213,8	386,0	355,6	221,7	321,4	433,5	480,7	254,7	171,7	234,0	401,9	393,1	262,7	
Adip.12	345,8	237,9	332,5	251,0	180,5	294,0	269,9	305,4	423,9	511,4	159,1	234,6	523,1	243,8	353,4	
Adip.13	246,8	273,7	513,8	463,6	370,7	259,9	365,4	480,3	347,6	477,0	392,5	350,9	357,0	369,9	440,3	
Adip.14	280,3	435,8	353,2	479,8	475,0	378,2	305,2	431,0	369,0	273,1	280,6	261,0	480,7	376,5	498,4	
Adip.15	464,3	250,0	329,6	410,2	392,0	378,6	418,7	368,2	323,7	275,4	255,1	326,2	423,9	390,7	342,1	
Adip.16	434,4	465,0	269,6	596,3	537,7	257,7	480,5	395,0	405,6	216,4	144,6	155,9	347,6	496,0	343,4	
Adip.17	424,6	336,1	265,6	465,1	456,7	334,2	171,3	392,0	360,2	372,3	317,0	339,2	244,6	405,4	296,8	
Adip.18	312,8	323,5	249,4	455,3	374,0	402,2	396,4	379,2	392,7	278,6	224,0	212,5	402,5	506,5	280,7	
Adip.19	261,1	310,0	204,7	324,2	350,3	440,4	317,5	327,3	277,8	337,3	295,5	254,6	306,3	430,6	219,6	
Adip.20	214,6	266,7	273,9	325,7	267,7	248,1	353,9	498,4	232,1	495,5	423,5	228,0	402,5	455,2	301,8	
Adip.21	224,2	477,8	379,4	274,7	439,9	441,6	324,1	314,0	282,2	639,5	244,1	324,4	378,5	439,0	427,4	
Adip.22	369,1	202,9	413,0	245,0	364,3	443,6	376,6	301,0	156,4	449,8	471,4	361,9	546,8	450,7	263,7	

Adip.23	370,6	501,4	417,3	318,5	261,3	185,5	352,2	482,4	392,7	424,2	353,0	246,9	293,8	232,5	670,9	
Adip.24	218,4	384,6	388,3	250,2	493,7	508,6	315,2	563,0	387,8	322,9	271,6	346,1	565,9	260,8	527,3	
(continuação)																
Adip.25	429,5	364,4	286,1	356,8	425,2	348,8	338,4	340,6	357,1	521,3	287,6	348,6	788,4	203,5	320,2	
Adip.26	312,1	266,1	274,2	383,6	272,8	250,9	483,1	308,9	370,0	356,8	415,8	308,4	202,0	274,2	248,8	
Adip.27	402,4	322,5	263,4	595,9	350,0	418,7	248,7	270,4	258,6	567,3	283,9	253,5	162,4	441,6	317,3	
Adip.28	268,8	356,6	263,9	656,5	497,0	287,9	317,1	281,1	266,6	403,1	465,2	197,6	351,4	401,3	384,1	
Adip.29	287,0	279,0	249,2	313,1	337,4	304,1	306,7	383,1	355,8	251,2	382,2	300,9	415,3	428,0	289,5	
Adip.30		199,0	435,0	255,6		315,4	314,5	304,5	400,7	414,0		254,3	438,4	223,1	388,0	
Adip.31		473,4	373,0	290,2		334,1	407,8		232,7			305,2		122,1	241,7	
Adip.32		472,2	378,1	325,4		503,0	307,6		235,7					330,3	373,2	
Adip.33			357,3	299,1			199,9		238,9							
Adip.34									382,5							
Média	305,2	351,9	351,4	388,9	379,2	332,5	338,9	384,5	366,2	389,3	316,1	299,6	388,0	354,0	356,0	353,4
SD	82,6	96,4	94,6	111,3	106,0	83,5	77,3	78,4	96,3	108,3	84,8	79,1	120,7	92,6	99,5	

Foto/Adipócito	N2.05															Média fina
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	349,0	344,8	411,0	446,7	509,5	354,1	481,5	321,1	397,0	446,4	472,4	517,2	319,9	397,9	452,3	
Adip.2	316,7	306,8	275,8	389,3	552,9	394,7	307,1	319,8	344,4	493,7	316,0	360,3	432,7	381,9	444,9	
Adip.3	254,8	254,9	316,4	300,1	468,3	118,4	385,1	256,5	511,4	482,7	388,3	320,3	270,3	265,2	498,3	
Adip.4	357,5	221,7	313,9	250,6	552,8	531,1	294,0	243,1	240,4	134,9	486,2	243,1	308,5	533,6	262,5	
Adip.5	343,8	275,6	463,5	169,4	379,3	397,5	430,8	187,0	514,4	366,5	486,5	361,9	468,6	521,8	369,1	
Adip.6	306,8	263,3	350,0	734,6	380,1	305,7	406,0	375,3	327,8	155,9	320,4	285,5	306,0	477,1	324,2	
Adip.7	364,6	297,0	368,9	686,4	421,8	478,6	359,6	385,2	446,9	339,2	302,6	349,0	362,5	489,8	325,7	
Adip.8	384,8	493,0	368,7	315,6	588,0	421,9	595,3	391,2	580,8	212,5	304,8	453,6	382,2	406,8	274,7	
Adip.9	338,9	306,4	278,0	372,1	229,5	521,9	409,9	373,6	407,3	254,6	317,1	264,1	462,2	384,5	245,0	
Adip.10	288,4	278,0	332,1	439,5	310,6	556,1	513,8	397,2	169,4	228,0	432,4	292,8	293,1	450,5	318,5	
Adip.11	310,1	412,6	295,5	378,8	234,1	438,4	653,9	530,3	506,4	324,4	576,9	276,2	405,9	340,9	250,2	
Adip.12	269,5	349,8	299,8	381,4	480,2	167,4	483,1	362,9	385,2	361,9	370,2	281,3	344,0	288,6	356,8	
Adip.13	300,8	331,5	246,7	352,2	353,8	402,7	488,2	419,1	451,0	246,9	301,1	328,1	296,3	514,2	383,6	
Adip.14	365,1	300,8	325,7	302,5	355,6	316,4	339,2	488,9	366,5	346,1	240,6	264,7	362,9	490,7	595,9	
Adip.15	425,0	471,2	274,7	477,4	264,8	364,6	348,0	425,2	574,5	348,6	375,1	363,0	436,8	364,3	156,5	
Adip.16	407,7	326,7	245,0	280,6	401,8	444,0	386,4	472,3	326,5	308,4	397,9	319,5	396,5	454,3	313,1	
Adip.17	213,7	362,4	318,5	324,8	360,2	421,0	345,3	429,5	457,7	253,5	629,4	435,1	358,9	542,5	413,0	
Adip.18	422,5	359,0	250,2	454,6	396,3	216,3	483,1	682,6	319,3	197,6	283,4	255,6	287,7	320,8	417,3	
Adip.19	333,6	265,6	356,8	488,7	361,9	395,4	382,0	495,3	306,5	300,9	348,4	274,3	393,2	486,3	388,3	
Adip.20	303,2	288,2	383,6	318,3	221,6	259,9	335,1	485,8	438,0	531,6	320,8	185,5	398,9	146,8	286,1	
Adip.21	454,5	281,7	295,9	417,0	445,6	443,2	322,5	437,6	422,0	282,4	471,3	497,7	323,8	388,6	274,2	
Adip.22	425,3	332,4	356,5	383,0	342,8	375,0	349,0	472,5	473,2	419,9	440,2	710,9	314,4	467,4	263,4	
Adip.23	320,0	248,2	313,1	524,2	335,6	258,5	423,2	541,0	362,3	340,0	486,2	323,2	230,0	371,8	263,9	
Adip.24	231,5	198,8	255,6	335,3	375,5	471,8	346,6	423,6	301,1	430,9	489,6	327,7	404,9	386,0	249,2	
Adip.25	316,1	282,4	290,2	387,0	333,3	354,9	437,1	468,7	298,0	451,6	352,1	251,1	464,0	356,6		

Adip.26	332,2	353,9	325,4	350,4	322,5	352,6	226,4	442,5	538,4	323,1	305,6	415,3	374,7	357,6		
(Continuação)																
Adip.27	224,0	336,0	299,1	308,7	446,5	425,4		521,1	283,3		475,1		252,5			
Adip.28	449,3	324,9		345,1	276,9	332,2		474,1	261,6		511,6					
Adip.29	360,7	282,3		461,4	277,5	341,4		415,5	208,0		259,7					
Adip.30	331,6	351,1		465,2	321,4	426,1		341,4	426,2		449,5					
Adip.31	267,8	261,4		345,8		389,0		496,1								
Adip.32	277,2	413,0		211,6		293,9										
Adip.33	309,9	363,7				411,4										
Adip.34		223,9														
Adip.35		266,4														
Adip.36		264,4														
Média	332,0	313,7	318,9	387,4	376,7	375,2	405,1	421,8	388,2	330,1	397,0	344,5	357,4	407,2	338,6	366,3
SD	62,7	64,8	52,0	116,8	96,7	97,7	94,6	97,7	106,9	104,4	97,7	109,6	66,2	92,9	97,9	

Foto/Adipócito	N2.06															Média final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Adip.1	320,9	297,8	357,8	486,1	466,6	413,3	366,3	368,0	286,6	375,2	249,9	342,5	478,7	462,0	449,4	
Adip.2	361,4	546,3	367,1	262,2	299,1	236,1	340,2	517,7	334,3	253,1	445,5	335,4	364,4	374,1	329,0	
Adip.3	327,9	573,6	341,0	356,0	485,1	211,3	370,5	331,2	540,4	278,3	461,9	410,9	377,9	267,7	272,8	
Adip.4	327,0	386,4	385,7	441,0	443,0	259,9	288,5	351,7	371,0	536,8	481,3	258,9	356,0	312,4	325,1	
Adip.5	310,1	227,3	280,0	342,8	397,6	349,2	297,5	242,2	314,9	330,3	409,8	432,5	310,0	386,4	344,6	
Adip.6	235,2	400,8	379,2	496,0	335,9	429,1	234,7	477,7	473,4	318,7	376,5	414,4	393,3	366,8	232,9	
Adip.7	266,0	217,3	230,8	226,7	206,3	327,2	284,3	206,9	520,5	431,6	294,4	269,2	367,6	370,5	295,6	
Adip.8	266,2	351,0	200,5	339,1	248,5	408,5	274,7	282,8	270,7	312,4	322,7	399,8	468,2	454,9	350,7	
Adip.9	345,6	475,3	228,2	445,0	351,4	309,8	328,9	583,7	302,5	265,4	210,9	303,2	374,3	241,9	567,6	
Adip.10	203,7	390,8	356,9	508,2	269,2	457,3	429,9	232,9	317,8	350,2	296,3	426,1	304,9	411,1	283,9	
Adip.11	269,8	279,2	243,8	489,1	263,1	588,5	385,8	362,8	349,6	271,7	447,0	333,0	317,5	410,4	356,1	
Adip.12	330,9	309,7	447,7	320,4	372,5	338,4	364,1	318,9	362,4	484,0	422,8	336,1	255,6	272,2	330,6	
Adip.13	336,0	158,8	286,6	301,5	510,1	481,4	528,6	273,1	223,7	332,7	367,4	298,2	478,5	670,6	212,0	
Adip.14	349,4	228,5	303,4	414,7	290,2	339,2	372,1	287,8	261,7	473,3	356,1	248,2	366,5	311,2	381,1	
Adip.15	357,8	524,8	291,5	371,6	493,1	393,7	423,8	325,5	401,0	244,4	384,9	385,4	420,2	406,0	359,3	
Adip.16	233,1	251,1	337,3	304,4	557,1	290,8	246,7	450,6	286,3	530,2	247,3	270,8	223,7	387,3	374,2	
Adip.17	229,5	373,3	342,7	408,5	280,1	402,9	264,8	351,1	572,0	419,4	298,7	350,3	484,5	328,8	336,3	
Adip.18	577,1	203,7	268,3	597,5	320,5	610,4	221,4	235,7	300,3	388,1	348,2	283,0	398,2	501,1	381,6	
Adip.19	321,4	280,3	341,8	300,8	303,3	292,4	238,7	357,4	316,6	330,9	273,7	439,6	386,6	454,0	478,1	
Adip.20	376,1	417,7	232,4	264,5	246,9	358,3	264,7	276,3	351,0	316,0	235,7	481,5	315,2	497,7	278,3	
Adip.21	598,6	274,7	227,7	415,3	343,2	551,8	332,3	298,5	323,7	378,8	306,9	291,9	230,0	627,4	272,4	
Adip.22	226,9	332,0	208,1	346,1	412,5	286,8	292,7	249,8	318,4	537,2	362,7	337,7	319,6	434,0	407,6	
Adip.23	244,1	456,9	426,2	592,5	351,8	339,2	332,9	256,4	321,4	317,5	222,3	252,1	488,4	489,9	267,8	

Adip.24	253,9	328,6	316,6	238,5	254,2	295,9	364,0	260,5	335,4	339,1	324,6	245,8	301,0	391,3	282,4	
Adip.25	389,6	366,0	274,9	193,9	212,3	267,6	216,1	383,3	331,3	267,0	366,2	346,1	472,6	361,7	395,9	
Adip.26	209,8	275,9	300,7	299,1	368,9	219,3	406,1	313,9	272,0	510,6	331,3	355,7	395,9	357,4	210,1	
(Continuação)																
Adip.27	284,3	463,6	367,4	367,6	288,4	327,5	255,7	315,4	254,4	293,8	277,2	363,8	491,7	417,1		
Adip.28	246,0	383,2	314,7	322,8	412,8	247,3	467,8	517,5	196,5	361,1	452,3	356,3	331,6	389,8		
Adip.29	265,5	339,3	297,1	361,8	381,2	344,2	395,6	287,9	248,7	490,1	241,2	359,4	209,0	554,7		
Adip.30	496,8	625,0	338,8	462,0	374,6	375,1	219,5	537,3	300,2	204,4	577,7	325,3	219,8	412,3		
Adip.31	232,6	495,5	367,4	506,0	335,1	253,3		298,0	294,1	364,0	330,8	326,7	249,0	392,3		
Adip.32	3196,8	303,7	309,1	548,8	359,1	324,7		349,3		329,6						
Adip.33	470,7	262,1	327,8	363,5	477,2	421,8										
Adip.34	345,9	366,5	276,2		391,5	269,3										
Adip.35	295,9	331,0	489,4		302,9											
Média	402,9	357,1	316,1	384,7	354,4	353,6	327,0	340,7	334,0	363,6	345,9	341,3	359,7	410,2	337,5	355,2
SD	195,3	110,9	66,8	104,5	88,1	99,4	79,2	96,8	87,4	92,7	86,9	61,7	87,0	95,1	81,8	

N3.05																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média fina
Adip.1	341,8	357,3	393,7	423,8	325,5	401,0	244,4	384,9	385,4	420,2	280,1	333,0	281,3	570,8	372,1	
Adip.2	402,8	235,2	290,8	246,7	450,6	286,3	130,2	247,3	270,8	223,7	320,5	336,1	328,1	259,9	439,5	
Adip.3	353,5	490,0	402,9	264,8	351,1	172,0	419,4	298,7	350,3	484,5	303,3	298,2	264,7	443,2	378,8	
Adip.4	321,5	340,9	610,4	221,4	235,7	300,3	388,1	348,2	283,0	398,2	246,9	248,2	363,0	375,0	381,4	
Adip.5	318,2	210,4	292,4	238,7	357,4	316,6	330,9	273,7	439,6	386,6	343,2	341,8	319,5	258,5	352,2	
Adip.6	323,1	397,1	358,3	264,7	276,3	351,0	316,0	235,7	481,5	315,2	412,5	232,4	435,1	471,8	302,5	
Adip.7	301,8	216,6	551,8	332,3	298,5	323,7	378,8	306,9	291,9	230,0	385,0	227,7	555,6	576,9	477,4	
Adip.8	297,1	264,5	246,9	358,3	264,7	276,3	351,0	316,0	383,3	223,7	393,1	208,1	674,3	370,2	280,6	
Adip.9	287,7	415,3	343,2	551,8	332,3	298,5	323,7	378,8	318,4	261,7	243,8	426,2	685,5	301,1	274,7	
Adip.10	281,9	489,8	336,0	203,7	216,1	287,8	426,1	345,9	321,4	350,2	369,9	316,6	497,7	240,6	245,0	
Adip.11	239,8	506,8	149,4	280,3	288,2	253,1	317,6	295,9	335,4	271,7	376,5	274,9	409,9	375,1	318,5	
Adip.12	250,0	384,5	357,8	417,7	429,5	333,4	303,9	458,9	715,6	431,0	390,7	229,5	513,8	397,9	397,2	
Adip.13	305,3	450,5	233,1	274,7	524,5	296,4	353,9	219,5	642,9	350,8	349,8	310,6	653,9	629,4	530,3	
Adip.14	366,8	340,9	229,5	332,0	265,9	257,4	374,0	330,1	473,7	350,2	331,5	234,1	483,1	283,4	362,9	
Adip.15	405,0	788,6	177,1	456,9	294,2	320,1	431,9	415,9	455,8	333,7	300,8	480,2	488,2	348,4	419,1	
Adip.16	356,2	614,2	321,4	328,6	434,7	320,3	559,2	299,0	378,2	192,4	471,2	353,8	339,2	320,8	488,9	
Adip.17	319,4	490,7	483,1	366,0	378,1	263,4	561,8	194,5	420,8	297,2	326,7	355,6	348,0	471,3	425,2	
Adip.18	543,1	364,3	382,0	275,9	272,8	188,5	505,3	315,7	405,8	172,5	362,4	264,8	386,4	438,4	472,3	
Adip.19	292,0	454,3	335,1	440,2	710,9	205,8	886,8	217,5	286,3	238,3	359,0	401,8	345,3	167,4	429,5	
Adip.20	480,9	542,5	322,5	486,2	323,2	385,2	282,4	588,0	315,6	228,0	396,3	454,6	483,1	502,7	682,6	

Adip.21	306,7	656,5	383,0	342,8	250,2	451,0	472,5	473,2	419,9	324,4	361,9	488,7	382,0	316,4	495,3	
Adip.22	445,2	313,1	524,2	335,6	356,8	366,5	541,0	362,3	340,0	361,9	221,6	318,3	335,1	364,6	685,8	
Adip.23	280,7	580,8	212,5	304,8	383,6	574,5	391,2	595,3	324,8	246,9	445,6	417,0	322,5	444,0	300,9	
Adip.24	461,6	407,3	254,6	317,1	595,9	326,5	373,6	430,9	368,7	346,1	360,2	437,6	349,0	421,0	531,6	
Adip.25	398,5	169,4	421,9	375,5	292,8	457,7	423,6	301,1	278,0	348,6			423,2	216,3		
Adip.26	364,2	506,4	521,9		276,2	319,3				308,4				395,4		
(Continuação)																
Adip.27	358,1	255,6	556,1				346,6									
Adip.28	258,3						422,0									
Adip.29	223,3															
Adip.30	510,5															
Adip.31	162,8															
Média	340,6	416,4	358,9	337,6	353,3	325,0	403,5	345,4	387,5	311,4	348,0	332,9	426,7	383,1	418,5	365,9
SD	85,4	147,8	121,6	87,1	115,4	84,9	141,1	104,0	108,0	79,0	61,1	85,4	119,3	114,5		

N3.06																
Foto/Adipócito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Média fina
Adip.1	409,8	457,3	429,9	444,1	432,6	379,4	350,3	327,6	333,3	298,5	264,5	244,6	246,9	478,5	670,6	
Adip.2	284,3	388,5	385,8	253,9	396,8	413,0	267,7	366,0	282,9	287,8	415,3	317,0	343,2	366,5	311,2	
Adip.3	246,0	338,4	364,1	389,6	370,7	417,3	439,9	428,4	313,9	253,1	489,8	224,0	336,0	420,2	406,0	
Adip.4	265,5	481,4	528,6	209,8	345,9	388,3	364,3	240,5	392,8	333,4	506,8	295,5	349,4	223,7	387,3	
Adip.5	287,9	339,2	372,1	284,3	295,9	286,1	261,3	218,4	439,3	296,4	384,5	423,5	357,8	484,5	328,8	
Adip.6	232,6	286,8	292,7	246,0	318,6	269,7	493,7	265,1	355,5	257,4	450,5	244,1	233,1	398,2	501,1	
Adip.7	296,8	339,2	332,9	265,5	329,3	351,8	425,2	269,0	310,2	338,4	340,9	471,4	284,3	386,6	454,0	
Adip.8	270,7	295,9	364,0	295,9	623,8	427,1	373,6	208,1	352,9	481,4	788,6	353,0	246,0	315,2	297,7	
Adip.9	345,9	267,6	232,9	232,6	474,9	689,8	377,3	267,2	304,5	339,2	372,1	271,6	256,4	230,0	627,4	
Adip.10	295,9	292,7	362,8	396,8	213,8	355,6	223,9	259,6	240,3	393,7	423,8	372,5	338,4	364,1	318,9	
Adip.11	299,5	332,9	318,9	370,7	332,5	380,5	220,3	392,3	410,2	290,8	246,7	510,1	481,4	528,6	273,1	
Adip.12	244,9	364,0	273,1	345,9	513,8	370,7	339,9	287,7	454,4	402,9	264,8	290,2	339,2	372,1	287,8	
Adip.13	365,5	216,1	287,8	426,1	353,2	475,0	255,9	246,7	291,1	610,4	221,4	493,1	393,7	423,8	325,5	
Adip.14	280,3	249,8	317,8	333,0	329,6	392,0	200,3	344,9	307,0	292,4	238,7	557,1	290,8	246,7	450,6	
Adip.15	254,7	256,4	349,6	336,1	269,6	537,7	343,5	253,2	370,8	392,0	378,6	418,7	368,2	323,7	275,4	
Adip.16	320,9	260,5	362,4	298,2	265,6	456,7	398,0	342,0	347,0	537,7	257,7	480,5	395,0	405,6	216,4	
Adip.17	361,4	383,3	223,7	248,2	249,4	374,0	268,5	459,1	231,4	456,7	334,2	371,3	392,0	360,2	372,3	
Adip.18	327,9	318,4	261,7	304,9	204,7	318,6	265,5	241,7	318,3	374,0	402,2	396,4	379,2	392,7	278,6	
Adip.19	327,0	321,4	350,2	317,5	360,3	329,3	271,5	226,4	5289,7	350,3	440,4	317,5	327,3	277,8	337,3	

Adip.20	310,1	335,4	271,7	255,6	382,7	623,8	341,9	365,9	338,9	267,7	248,1	353,9	498,4	532,1	495,5	
Adip.21	235,2	331,3	484,0	478,5	323,5	474,9	316,7	216,0	318,0	439,9	441,6	324,1	314,0	282,2	639,5	
Adip.22	266,0	216,1	332,7	366,5	556,9	513,8	442,8	541,2	348,5	364,3	443,6	376,6	301,0	356,4	449,8	
Adip.23	266,2	362,7	473,3	319,6	386,0	332,5	336,0	313,2	329,3	261,3	385,5	352,2	482,4	392,7	424,2	
Adip.24	345,6	222,3	537,2	488,4	251,0	513,8	344,2	232,0	292,2	493,7	508,6	315,2	563,0	387,8	322,9	
Adip.25	503,7	324,6	317,5	301,0	463,6	353,2	397,9	395,1	214,0	320,1	431,9	415,9	247,3	270,8	348,5	
Adip.26	269,8	366,2	339,1	472,6	479,8	329,6	227,5	337,1	226,7	320,3	559,2	299,0	298,7	350,3	329,3	
Adip.27	330,9	337,7	267,0	229,5	410,2	269,6	209,0	253,4	268,9	263,4	561,8	394,5	348,2	283,0	292,2	
Adip.28	336,0	252,1	296,3	377,1	596,3	265,6		376,0	187,2	388,5	505,3	315,7	273,7	439,6	214,0	
Adip.29	3149,4	245,8	447,0	321,4	465,1	249,4		371,7	261,7	205,8	886,8	217,5	235,7	481,5		
Adip.30	357,8	346,1	422,8	376,1	455,3	204,7		266,9	217,8	235,6	521,2	207,1	306,9	291,9		
Adip.31	233,1	229,5	367,4	398,6	324,2	273,9		335,1	222,6	397,9	439,0	255,4	362,7	337,7		
Adip.32		377,1	356,1	226,9	325,7			267,2	346,3	372,2	350,0	282,6				
Adip.33		321,4		244,1	274,7			235,3	233,1	338,1	464,7	342,4				
Adip.34		376,1		253,9	245,0											
Adip.35		398,6		389,6	318,5											
Adip.36		226,9		209,8	250,2											
Média	397,5	318,3	353,8	325,2	366,4	387,7	324,3	307,6	459,1	353,2	423,3	348,6	341,6	367,9	379,9	363,6
SD	114,0	65,6	79,1	79,4	105,4	109,8	80,0	79,1	169,7	90,9	144,4	88,6	81,1	82,8	120,5	

Na primeira linha é identificado o grupo experimental a qual os animais pertencem, seguida pela segunda linha que identifica o animal. Em seguida são identificados as fotos de cada animal. Na primeira coluna são apresentadas o número dos adipócitos de cada foto de cada animal, variando para cada animal. Ao final de cada grupo experimental é expresso a média dos valores da área dos adipócitos de cada animal. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 15 – Determinação do teor de lipídios pelo método de FOLCH dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	Lipídios	% lipídios	Teor de lipídios no tecido
Dieta padrão- NC	N1.01	0,0553	5,5294	0,0001
	N2.01	0,2696	26,9565	0,0007
	N3.01	0,0450	4,4969	0,0001
	N4.01	0,2059	20,5920	0,0002
	N4.02	0,3387	33,8695	0,0005
Média	-	0,283	28,349	0,001
SD	-	0,057	5,743	0,000
Dieta HSD- NC	N1.04	0,1769	17,6950	0,0005
	N2.04	0,1703	17,0330	0,0005
	N3.04	0,4073	40,7348	0,0012
	N4.03	0,4896	48,9598	0,0010
	N4.04	0,4802	48,0198	0,0007
	N4.05	0,1444	14,4401	0,0003
Média	-	0,437	43,694	0,001
SD	-	0,046	4,566	0,000
Dieta padrão- NR	N1.03	0,2717	27,1707	0,0005
	N2.02	0,3802	38,0208	0,0010
	N2.03	0,0423	4,2342	0,0000
	N3.02	0,1897	18,9729	0,0003
	N3.03	0,0336	3,3584	0,0001
Média	-	0,526	52,578	0,001
SD	-	0,201	20,109	0,000

(Continuação)				
Dieta HSD -NR	N1.05	0,4558	45,5836	0,0005
	N1.06	0,0123	1,2271	0,0000
	N2.05	0,2891	28,9100	0,0005
	N2.06	0,0381	3,8104	0,0000
	N3.05	0,1920	19,1977	0,0003
	N3.06	0,1920	19,1977	0,0003
Média	-	0,342	34,222	0,001
SD	-	0,077	7,736	0,000

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a quantidade de lipídios obtida em gramas, pela extração de lipídios no TAM pelo método FOLCH. Seguido pela porcentagem de lipídios no tecido analisado. E por fim é apresentado o teor de lipídios no peso relativo do TAM Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE 16– Dosagem bioquímica de triacilglicerol (TAG) do soro dos animais, por grupo, após as 8 semanas de experimento

Grupos	Animais	TAG (mg/dl)	Média das duplicatas
Dieta padrão-NC	N1.01	117,209	115,348
	N1.01	113,488	
	N2.01	117,209	119,069
	N2.01	120,930	
	N3.01	121,274	143,572
	N3.01	165,870	
	N4.01	112,628	97,610
	N4.01	82,593	
	N4.02	84,869	102,616
	N4.02	120,364	
Média	-	115,643	115,643
SD	-	22,761	17,935
Dieta HSD-NC	N1.04	81,860	79,069
	N1.04	76,279	
	N2.04	122,790	118,139
	N2.04	113,488	
	N3.04	153,128	131,513
	N3.04	109,897	
	N4.03	249,146	202,730
	N4.03	156,314	
	N4.04	129,010	120,364
	N4.04	111,717	
	N4.05	130,232	126,511
	N4.05	122,790	
Média	-	129,721	129,721
SD	-	44,458	40,326

(Continuação)			
Dieta padrão-NR	N1.02	241,860	
	N1.02	238,139	240,000
	N1.03	306,976	
	N1.03	303,255	305,116
	N2.02	128,372	
	N2.02	133,953	131,162
	N2.03	160,000	
	N2.03	167,441	163,720
	N3.02	165,581	
	N3.02	158,139	161,860
	N3.03	176,744	
	N3.03	173,0233	174,883
Média	-	196,124	196,124
SD	-	61,416	64,342
Dieta HSD-NR	N1.05	87,441	
	N1.05	91,162	89,302
	N1.06	120,932	
	N1.06	126,516	123,729
	N2.05	111,629	
	N2.05	98,607	105,113
	N2.06	40,932	
	N2.06	42,797	41,865
	N3.05	120,902	
	N3.05	124,612	122,707
Média	-	95,349	95,349
SD	-	29,074	30,290

Na primeira coluna estão apresentados os grupos experimentais, seguida pela segunda coluna que apresenta os animais utilizados no estudos. São apresentados a concentração de triacilglicerol no soro de cada animal em duplicata, seguida pela média desses valores. Ao final de cada grupo são apresentados a média e o desvio padrão(SD).

NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; HSD: dieta rica em carboidratos simples; SD: desvio padrão.

Fonte: elaboração própria.

8.ANEXOS

**ANEXO 1 – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do sobrepeso neonatal induzido por aleitamento materno sobre a resistência à insulina em modelo experimental induzido por dieta rica em carboidratos simples (high sugar diet)", protocolada sob o CEUA nº 2245040518 (ID 000070), sob a responsabilidade de **Karina Barbosa de Queiroz e equipe; Daniela Costa Caldeira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 13/07/2018.

We certify that the proposal "Effects of neonatal breast overfeeding on the insulin resistance in a high-sugar diet model.", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 2245040518 (ID 000070), under the responsibility of **Karina Barbosa de Queiroz and team; Daniela Costa Caldeira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/13/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2018](#) a [12/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Centro de Ciência Animal		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos
		idade:	21 a 28 dias
		N:	60
Linhagem:	Wistar	Peso:	45 a 55 g

Local do experimento: Os experimentos de manipulação do tamanho das ninhadas serão realizados no CCA. Após os desmame, os animais serão levados para o Biotério de Nutrição experimental da Escola de Nutrição, onde será realizada a manutenção com dieta rica em carboidratos simples e, após as oito semanas de experimento, será realizada a eutanásia.

Ouro Preto, 23 de julho de 2018



Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO 2 – Trabalho apresentado do CONAN IV Congresso Nacional de Alimentos e
Nutrição, Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019



IV CONAN
Congresso Nacional de
Alimentos e Nutrição

I CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
VI CONGRESSO NINHEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
I SIMPÓSIO DE GASTROGOMIA
I SIMPÓSIO NACIONAL DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

27 a 31 maio 2019

"Alimentação: eficiência,
cultura e modernidade"

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Efeito do imprinting metabólico decorrente de aleitamento em livre demanda (overfeeding neonatal) e dieta rica em carboidratos simples sobre a termogênese adaptativa e o metabolismo de ratos jovens de autoria de Isabela Jesus de Deus, Thais Araújo Barud, Tatiane Maria dos Santos, Ângela Antunes Silva, Miliane Martins de Andrade Fagundes e KARINA BARBOSA DE QUEIROZ**, foi apresentado por Isabela Jesus de Deus no IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, realizado entre os dias 27 e 31 de maio de 2019, na modalidade **Apresentação Oral**.

Ouro Preto, 31 de maio de 2019.

Verifique o código de autenticidade 149643.8327097.827765.8.5875131046843044793 em
<https://www.eventos3.com.br//documentos>

Prof. Dra. Renata Nascimento de Freitas
Coordenadora do IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição



ANEXO 3 – Trabalho publicado nos anais do IV CONAN Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição, Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019

RESUMO CONAN - CONAN - NUTRIÇÃO BÁSICA E EXPERIMENTAL

EFEITO DO IMPRINTING METABÓLICO DECORRENTE DE ALEITAMENTO EM LIVRE DEMANDA (OVERFEEDING NEONATAL) E DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES SOBRE A TERMOGÊNESE ADAPTATIVA E O METABOLISMO DE RATOS JOVENS

Isabela Jesus De Deus (isabelajdeus@yahoo.com)

Thaís Araújo Barud (thaisaraujob.taj@gmail.com)

Tatiane Maria Dos Santos (tatiane.maria@aluno.ufop.edu.br)

Ângela Antunes Silva (angelaeeef@yahoo.com.br)

Miliane Martins De Andrade Fagundes (milianefagundes@yahoo.com.br)

Karina Barbosa De Queiroz (karina.queiroz@ufop.edu.br)

INTRODUÇÃO: A prevalência da obesidade na infância tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas. O consumo excessivo de carboidratos simples durante a infância afeta as respostas adaptativas que descrevem as relações entre as primeiras experiências nutricionais e o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta, caracterizando um imprinting metabólico. O modelo experimental de aleitamento em livre demanda (overfeeding neonatal) resulta em um efeito protetor contra obesidade e diabetes na vida adulta. Associado a isso, a termogênese adaptativa tem sido descrita como um fator modulador de doenças metabólicas, tomando-se fundamental compreender os mecanismos decorrentes do efeito protetor do aleitamento materno (modelo de overfeeding neonatal) sobre tecido adiposo marrom (TAM). Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do aleitamento em livre demanda

(overfeeding neonatal) e da dieta rica em carboidratos simples (HSD) sobre o TAM e o metabolismo de ratos jovens.

METODOLOGIA: O modelo de overfeeding neonatal (OF) foi estabelecido através da manipulação do tamanho das ninhadas, conforme previamente publicado. Ratos Wistar machos foram distribuídos após o nascimento, de forma aleatória, em duas ninhadas: 8 animais por ninhada [controle (NF), n=11] ou 4 animais por ninhada [(OF, n=12]. Após o desmame (21 dias), os animais (n=23) foram novamente divididos em quatro grupos: Grupo STD-NF (n=5), animais alimentados com dieta padrão (STD) da ninhada NF; Grupo HSD-NF (n=6), animais alimentados com HSD da ninhada NF; Grupo STD-OF (n=6), animais alimentados com STD da ninhada OF; Grupo HSD-OF (n=6), animais alimentados com HSD da ninhada OF. O grupo STD foi alimentado com ração comercial Nuvilab® e o grupo HSD foi alimentado com uma dieta "palatável" a base de leite condensado. Os efeitos da HSD foram avaliados durante 8 semanas. Após eutanásia, foram coletados o soro para análises bioquímicas [glicose, colesterol total e triacilglicerol (TAG)], o TAM e foram realizadas análises biométricas (índices de Lee e de adiposidade - IA). Os efeitos do overfeeding e da dieta foram determinados pela ANOVA TWO-WAY, seguidos do pós-teste de Bonferroni.

RESULTADOS: A manipulação do tamanho das ninhadas foi eficiente em induzir sobrepeso neonatal, resultando em aumento de peso dos animais da ninhada OF em relação à NF. O IA foi influenciado pela dieta ($p < 0,05$), aumentando ~80% no grupo HSD-NF em relação ao respectivo controle após 8 semanas. Além do mais, o TAM teve o seu peso relativo reduzido pelo aleitamento ($p < 0,05$). Os níveis de glicose foram alterados pela interação entre as duas variáveis ($p < 0,05$), enquanto a HSD aumentou os níveis de TAG independentemente do aleitamento ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO: Os resultados obtidos até o momento mostraram que o aleitamento em livre demanda (overfeeding neonatal) altera os níveis de glicose e o tamanho do TAM, sugerindo um papel na modulação do perfil glicêmico e da termogênese adaptativa. Entretanto, futuros experimentos

(como a análise da expressão gênica de Ucp1) são necessários para confirmar a nossa hipótese.

ANEXO 4 – Trabalho apresentado no XXVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP – ENCONTRO DE SABERES, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 2019



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Pró-reitoria de Graduação
Pró-reitoria de Extensão

CERTIFICADO

Certificamos que ISABELA JESUS DE DEUS participou do XXVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP – ENCONTRO DE SABERES, realizado de 05 a 07 de novembro de 2019, na qualidade de Apresentador(a), na categoria pôster, do trabalho: Efeito do imprinting metabólico decorrente de overfeeding neonatal e dieta rica em carboidratos simples sobre a termogênese adaptativa e o metabolismo de ratos jovens, de autoria de: ISABELA JESUS DE DEUS, THAIS ARAUJO BARUD, DANIEL MUNIZ OKUSHIMA ALVES, MILIANE MARTINS DE ANDRADE FAGUNDES, ANGELA ANTUNES SILVA, CLAUDIA MARTINS CARNEIRO, DANIELA CALDEIRA COSTA CALSAVARA, KARINA BARBOSA DE QUEIROZ.

Autenticidade



Código: 15730622355dc3065b906a0

Ouro Preto, 07 de novembro de 2019

Marcelo Knupp
Prof. Marcos Eduardo Cavahá G. Knupp
Pró-Reitor de Extensão

Rosalia Guerra de Sa Costa
Rosalia Guerra de Sa Costa
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados