

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
(BqBM)

LEONARDO FERNANDES ROSA CAUDURO

**Efeito da progesterona em dose baixa sobre o metabolismo glicêmico,
morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas**

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins

SÃO PAULO

2024

LEONARDO FERNANDES ROSA CAUDURO

Efeito da progesterona em dose baixa sobre o metabolismo glicêmico, morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 05/04/2024. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração: Bioquímica em estados patológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo-Martins.

SÃO PAULO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, com os dados inseridos pelo(a) autor(a)
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

FERNANDES ROSA CAUDURO, LEONARDO

Efeito da progesterona em dose baixa sobre o metabolismo glicêmico, morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas / LEONARDO FERNANDES ROSA CAUDURO; orientadora, Anna Karenina Azevedo Martins. -- São Paulo, 2024.

86 p: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2024.

Versão corrigida

1. fêmeas obesas. 2. progesterona. 3. metabolismo glicêmico. 4. tecido adiposo.. I. Martins, Anna Karenina Azevedo, orient. II. Título.

Nome: CAUDURO, L. F. R.

Título: Efeito da progesterona em dose baixa sobre o metabolismo glicêmico, morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Bioquímica em estados patológicos.

Aprovado em: 05/04/2024

Banca Examinadora

Profa. Dra. Nayara Soares Sena Aquino
Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Profa. Dra. Patricia Fiorino
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Profa. Dra. Lila Missae Oyama
Universidade Federal de São Paulo

DEDICATÓRIA

Ao longo da minha vida, meus pais e meu irmão sempre foram a base que possibilitou a realização dos meus sonhos. Portanto, dedico este trabalho a você, Cláudia, a você, Jefferson, e a você, Luigi. É difícil expressar completamente a gratidão que sinto pelo constante apoio e amor que sempre me proporcionaram. Sinto-me extremamente orgulhoso de tê-los como família. Este trabalho é dedicado a vocês, que são fontes inesgotáveis de amor e estímulo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por seu infinito amor e misericórdia sobre a minha vida, sem os quais eu não chegaria aonde cheguei, e nem seria quem sou.

À Dra. Anna Karenina, minha orientadora, quero expressar minha profunda gratidão pela incrível oportunidade concedida, assim como pela generosidade, carinho e dedicação ao projeto. Ela foi primordial para o sucesso dessa jornada, tornando-a uma experiência verdadeiramente enriquecedora e inspiradora.

Aos meus queridos pais, meu irmão e a minha amada avó Ermelinda expresso minha profunda gratidão por todo o apoio inestimável concedido ao longo desta jornada acadêmica. Suas constantes demonstrações de carinho, incentivo e compreensão foram fundamentais para que eu alcançasse os objetivos propostos nesta dissertação. Agradeço sinceramente pela presença constante, pelo suporte emocional e pela inspiração que cada um de vocês proporcionou.

Aos meus queridos amigos de pesquisa: Luís Felipe, Bruno, Thiago, Ingrid, Rafael, Renata, Marília, e, em especial, o Matheus Pedro que foi com quem dividi a maior parte das vivências e experiências de mestrado.

Às pesquisadoras Anna Laura e Eloísa, expresso meu agradecimento pela valiosa contribuição ao projeto e por serem fontes inspiradoras para o meu desenvolvimento acadêmico futuro.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia do Instituto do Coração (LGCM) e ao professor José Eduardo Krieger pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho em seu laboratório.

Às professoras: Fabiana S. Evangelista pelo suporte, disponibilidade e comprometimento com a realização do meu trabalho, atuando praticamente como uma coorientadora; e Patrícia Fiorino pela gentileza de disponibilizar o Laboratório de Histologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie para a realização de parte desse trabalho.

Aos profissionais técnicos da Escola de Artes, Ciências e Humanidades e do Instituto do Coração, Fernanda, Isabel e Solange, pela valiosa assistência, paciência e pelos

preciosos ensinamentos que contribuíram significativamente para aprimorar a qualidade do meu trabalho.

À agência de fomento FAPESP pelo financiamento do projeto (processo n. 2018/22631-9).

À comunidade da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, expresse minha gratidão por estabelecer o cenário propício à concretização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização deste projeto e para o meu desenvolvimento tanto pessoal quanto profissional!

“Mas como sabem pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

Alvo Dumbledore

RESUMO

CAUDURO, L. F. R. **Efeito da progesterona em dose baixa sobre o metabolismo glicêmico, morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas.** 2024. 86 páginas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024. Versão Corrigida.

A prevalência crescente e global da obesidade retrata mudanças nos hábitos alimentares e na atividade física da população mundial, gerando um impacto notável na saúde do indivíduo, e predispondo a diversas outras doenças. Em sua forma grave, a obesidade afeta aproximadamente o dobro de mulheres em comparação com homens, além de triplicar a chance de uma mulher desenvolver diabetes gestacional. Vários hormônios desempenham papéis importantes nas adaptações metabólicas e na instauração da resistência fisiológica à insulina durante a gestação, sendo a progesterona um desses hormônios. E apesar de seu envolvimento em diversos processos fisiológicos e patológicos, ainda há lacunas no entendimento do papel específico desse hormônio na obesidade feminina. Neste trabalho, foi investigado se o tratamento com progesterona em baixas doses pode agravar o prejuízo sobre o metabolismo da glicose, morfologia e função do tecido adiposo em camundongos fêmeas obesas. Utilizamos um protocolo de 10 semanas (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da instituição (CEUA-EACH), sob o número 003/2018), no qual camundongos C57Bl/6 foram distribuídos em 4 grupos experimentais: NO-CO (com dieta normocalórica controle); HFF-CO (dieta rica em gordura e frutose controle); NO-PG (dieta normocalórica + administração de progesterona) e HFF-PG (dieta rica em gordura e frutose + administração de progesterona). A progesterona foi infundida (0,25 mg/kg/d) durante 21 dias por uma minibomba osmótica implantada subcutaneamente na 7ª semana de protocolo. Durante o protocolo foram acompanhados o ganho de peso e os consumos de água e ração. Foram realizados testes glicêmicos, antes do início e no final do protocolo, e avaliados parâmetros metabólicos por meio de calorimetria indireta em repouso e em esforço máximo. Ainda avaliamos variáveis morfométricas do tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB), além da concentração sérica de adiponectina. Ao final do protocolo os animais dos grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram aumento do peso corporal ($p = 0,0001$). A dieta hipercalórica induziu prejuízo no metabolismo glicêmico dos grupos HFF-CO e HFF-PG, que apresentaram intolerância à glicose ($p = 0,001$) e hiperglicemia ($p = 0,03$). Contudo, no grupo HFF-PG a progesterona atenuou a intolerância à glicose ($p = 0,03$). Ademais, os grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram adipócitos hipertrofiados ($p = 0,0001$) com área, diâmetro e volume maiores, ao passo que a concentração sérica de adiponectina foi menor ($p = 0,001$), nesses animais. Em conclusão, podemos afirmar que em doses fisiológicas a progesterona isoladamente não agrava os efeitos obesogênicos da dieta hipercalórica sobre o metabolismo glicêmico e, tampouco, altera a morfologia ou a função endócrina do tecido adiposo de camundongos fêmeas obesas.

Palavras-chave: fêmeas obesas, progesterona, metabolismo glicêmico, tecido adiposo.

ABSTRACT

CAUDURO, L. F. R. **Effect of low-dose progesterone on glucose metabolism, morphology and function of adipose tissue in obese female mice.** 2024. 86 pages. Dissertation (Master of Science) - School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2024. Corrected Version.

The growing global prevalence of obesity reflects changes in the eating habits and physical activity of the world's population, having a notable impact on individual health and predisposing to various other diseases. In its severe form, obesity affects approximately twice as many women as men and triples a woman's chance of developing gestational diabetes. Several hormones play important roles in metabolic adaptations and the establishment of physiological insulin resistance during pregnancy, and progesterone is one of them. Despite its involvement in various physiological and pathological processes, there are still gaps in understanding the specific role of this hormone in female obesity. In this study, we investigated whether low-dose progesterone treatment can aggravate the impairment of glucose metabolism and adipose tissue morphology and function in obese female mice. We used a 10-week protocol (approved by the institution's Animal Research Ethics Committee (CEUA-EACH), under number 003/2018), in which C57Bl/6 mice were assigned to 4 experimental groups: NO-CO (normocaloric diet control); HFF-CO (high-fat, high-fructose diet control); NO-PG (normocaloric diet + progesterone administration) and HFF-PG (high-fat, high-fructose diet + progesterone administration). Progesterone was infused (0.25 mg/kg/d) over 21 days via a mini osmotic pump implanted subcutaneously in the 7th week of the protocol. During the protocol, weight gain and water and feed consumption were monitored. Glycemic tests were carried out before and at the end of the protocol, and metabolic parameters were assessed using indirect calorimetry at rest and during maximum effort. We also assessed morphometric variables of brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT), as well as serum adiponectin concentration. At the end of the protocol, the animals in the HFF-CO and HFF-PG groups showed an increase in body weight ($p = 0.0001$). The hypercaloric diet induced impaired glucose metabolism in the HFF-CO and HFF-PG groups, which showed glucose intolerance ($p = 0.001$) and hyperglycemia ($p = 0.03$). However, in the HFF-PG group, progesterone attenuated glucose intolerance ($p = 0.03$). In addition, the HFF-CO and HFF-PG groups had hypertrophied adipocytes ($p = 0.0001$) with greater area, diameter and volume, while the serum concentration of adiponectin was lower ($p = 0.001$) in these animals. In conclusion, we can state that in physiological doses, progesterone alone does not aggravate the obesogenic effects of the hypercaloric diet on glucose metabolism, nor does it alter the morphology or endocrine function of the adipose tissue of obese female mice.

Keywords: obese females, progesterone, glucose metabolism, adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos depósitos de tecido adiposo em camundongos e humanos.....	19
Figura 2: Representação da estrutura dos adipócitos.....	20
Figura 3: Representação da inflamação crônica no tecido adiposo obeso e um tecido adiposo saudável.....	21
Figura 4: Características de adipócitos saudáveis e de adipócitos hipertrofiados.....	22
Figura 5: O desenvolvimento do mau funcionamento das células β causado pela obesidade.....	23
Figura 6: Gestação saudável e suas adaptações.....	27
Figura 7: Hipótese do desenvolvimento de DMG em uma gestação com obesidade.....	30
Figura 8: Desenho experimental do trabalho.....	31
Figura 9: Esquema visual das 10 semanas de protocolo.....	34
Figura 10: Mini-bomba osmótica (Alzet).....	36
Figura 11: Representação dos depósitos adiposos coletados após o procedimento de morte.....	39
Figura 12: Registros de consumo.....	44
Figura 13: Evolução do peso corporal.....	45
Figura 14: Registro de massa	46
Figura 15: Metabolismo glicêmico pré-protocolo.....	47
Figura 16: Metabolismo glicêmico pós-protocolo.....	49

Figura 17: Morfometria de adipócitos do TAB-RP.....	53
Figura 18: Frequência de adipócitos por tamanho no TAB-RP.....	54
Figura 19: Morfometria de adipócitos do TAB-SC.....	55
Figura 20: Frequência de adipócitos por tamanho no TAB-SC.....	56
Figura 21: Morfometria de adipócitos do TAM.....	58
Figura 22: Concentração sérica de adiponectina.....	59
Figura 23: Correlações entre concentração de adiponectina e metabolismo da glicose.....	59
Figura 24: Imagens representativas das fases do ciclo estral em aumento de 400x.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valor calórico total das dietas.....	32
Tabela 2: Composição nutricional das dietas.....	33
Tabela 3: Descritivo do cálculo das variáveis.....	41
Tabela 4: Calorimetria indireta em repouso e teste de esforço físico máximo.....	51
Tabela 5: Pesos dos tecidos (mg/g)	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL** – ácidos graxos livres
- AUC** – *area under curve* (área sob a curva)
- DIO** – *diet-induced obesity* (obesidade induzida por dieta)
- DM2** – diabetes mellitus do tipo 2
- DMG** – diabetes mellitus gestacional
- EPM** – erro padrão da média
- EROs** – espécies reativas de oxigênio
- GE** – gasto energético
- GH** – hormônio do crescimento
- GTT** – teste de tolerância à glicose
- HFF** – dieta *high-fat and -fructose*
- HFF-CO** – *high-fat and -fructose*-controle
- HFF-PG** – *high-fat and -fructose*-progesterona
- IMC** – índice de massa corporal
- ITT** – teste de tolerância à insulina
- kITT** – taxa de desaparecimento da glicose plasmática
- NO** – dieta normocalórica
- NO-CO** – normocalórico-controle
- NO-PG** – normocalórico-progesterona
- PG** – progesterona
- QR** – coeficiente respiratório
- RI** – resistência à insulina
- TA** – tecido adiposo
- TAB** – tecido adiposo branco
- TAB-RP** – tecido adiposo branco retroperitoneal
- TAB-SC** – tecido adiposo branco subcutâneo
- TAM** – tecido adiposo marrom
- VCO₂** – produção de gás carbônico

VCO₂máx – produção de gás carbônico máximo

VCT – valor calórico total

VO₂ – consumo de oxigênio

VO₂máx – consumo de oxigênio máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Obesidade: definição, dados epidemiológicos e fatores de risco.....	17
1.2 Obesidade e Tecido Adiposo	19
1.3 Tecido adiposo e células beta	22
1.4 Obesidade e demandas fisiológicas femininas.....	25
1.5 Progesterona e tecido adiposo.....	28
2. HIPÓTESE DO TRABALHO	29
3. OBJETIVO GERAL	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Determinação de peso corporal, consumo de ração e água.....	34
4.3 Avaliações glicêmicas	35
4.4 Administração de progesterona e acompanhamento do ciclo estral.....	35
4.5 Calorimetria indireta em repouso e teste de esforço físico máximo.....	37
4.6 Procedimento de morte, coleta de sangue e tecidos.....	39
4.6.1 Análises morfométricas do tecido adiposo branco subcutâneo e retroperitoneal (TAB-SC e TAB-RP)	40
4.6.2 Análises morfométricas do tecido adiposo marrom (TAM).....	42
4.7 Quantificação sérica de adiponectina.....	42
4.8 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Consumo de ração e água durante o protocolo experimental.....	44
5.2 Acompanhamento do peso corporal.....	45
5.3 Metabolismo glicêmico.....	46
5.3.1 Pré-protocolo.....	46
5.3.2 Pós-protocolo.....	48

5.4 Parâmetros metabólicos em repouso e em teste de esforço físico máximo	50
5.5 Peso dos depósitos adiposos	52
5.6 Parâmetros morfométricos do TAB-RP	52
5.7 Parâmetros morfométricos do TAB-SC	54
5.8 Parâmetros morfométricos do TAM	57
5.9 Determinação da concentração sérica de adiponectina	59
5.10 Correlação entre adiponectina e metabolismo da glicose	59
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	68
8. ARTIGO PUBLICADO	68
9. REFERÊNCIAS	69
ANEXO I – Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação (CEUA)	83
ANEXO II - Caracterização das fases do ciclo estral	84
ANEXO III – Macro ImageJ TAB	85
ANEXO IV – Macro ImageJ TAM	86

1. INTRODUÇÃO

As atuais projeções globais indicam um aumento alarmante da taxa de obesidade entre mulheres em idade reprodutiva nas próximas décadas. Isso é especialmente preocupante porque a obesidade pode ser mais prejudicial em fases específicas da vida de uma mulher, como durante a gestação, tendo em vista a influência direta da obesidade no desenvolvimento da resistência à insulina e do diabetes mellitus gestacional. Além disso, essas condições não são apenas prejudiciais à saúde materna, mas também estão associadas a complicações para o feto. Então, nesse contexto, explorar a complexa interconexão entre o tecido adiposo na obesidade, metabolismo glicêmico e o hormônio progesterona em mulheres gestantes obesas é essencial para promover intervenções eficazes para prevenção e tratamento dos danos decorrentes do diabetes mellitus gestacional, tanto na mãe, quanto na prole. Assim, a fim de contribuir com novas peças que nos permitam compreender melhor essa interconexão, este trabalho buscou avaliar os efeitos da progesterona, em doses correspondentes às da gestação de camundongos, sobre o metabolismo glicêmico e a morfometria de adipócitos dos distintos depósitos adiposos presentes em camundongos fêmeas obesas.

1.1 Obesidade: definição, dados epidemiológicos e fatores de risco

A obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura corporal nos depósitos de tecido adiposo branco, acompanhado de uma condição de inflamação crônica caracterizada por alteração na produção de mediadores como as adipocinas (MOULIN et al., 2009). Em 2020 cerca de 2,6 bilhões de indivíduos apresentavam sobrepeso ou obesidade ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), e as estimativas indicam que até 2035 serão mais de 4 bilhões. Refletindo, em porcentagem, um aumento de pelo menos 12% na incidência global em 15 anos, saindo de 38% em 2020 para mais de 50% da população global em 2035 (WORLD OBESITY FEDERATION, 2023).

No Brasil, de acordo com estudo realizado pelo Ministério da Saúde em 2022, por meio da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Pesquisa VIGITEL), as estatísticas nacionais acompanham as estatísticas mundiais. Em 15 anos, de 2006 a 2021, o índice de brasileiros obesos quase dobrou (11,8% para 22,4%), tendo atualmente percentuais semelhantes entre mulheres (24,2%) e homens (24%) (BRASIL, 2022). Entre 2019 e

2021, quando a pandemia atingiu seu pico de intensidade e causou mudanças nas rotinas e hábitos de muitas pessoas, o número de pessoas com doenças endócrinas ligadas a maus hábitos, incluindo a obesidade, aumentou em mais de 10%, de acordo com o Mapa da Obesidade criado pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (Abeso) (ABESO,2021).

Embora a obesidade tenha uma etiologia multifatorial, sua causa fundamental reside no desequilíbrio energético entre calorias consumidas e calorias gastas. O consumo em excesso de alimentos densos em energia aliado a um aumento na inatividade física, estão na gênese dessa doença (ROSINI, SILVA e MORAES, 2012; MOULLÉ, GHISLAIN e POITOUT, 2017). Pereira et al. (2017) e Della Corte et al. (2018) demonstram uma relação entre a ingestão crônica de uma dieta rica em gordura e frutose e o aumento de peso, inflamação e resistência à insulina. Além disso, a urbanização crescente, os padrões de transporte e a natureza cada vez mais sedentária de muitas ocupações estão intimamente ligados à prevalência da obesidade no mundo (World Health Organization, 2018).

Estudos sugerem que a ingestão elevada de frutose, acima de 50g por dia, está intimamente associada ao aumento de peso, obesidade e riscos de desenvolvimento de diabetes e doenças cardíacas. (STEPHAN et al, 2010; JOHNSON & MURRAY, 2010; TAPPY et al., 2010). Além disso, há ampla evidência sugerindo que alimentos ricos em frutose também podem contribuir para a síndrome metabólica, caracterizada por obesidade, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina e estado pró-inflamatório, e probabilidade aumentada para demências, como a doença de Alzheimer (STEPHAN et al, 2010; JOHNSON & MURRAY, 2010). Outros autores sugerem que o excesso de frutose na dieta pode ser uma das principais causas da atual epidemia de obesidade e diabetes (PEREZ-POZO et al., 2010).

A obesidade é um fator de risco significativo para desenvolvimento de várias doenças, como: diabetes mellitus tipo 2 (ABDULLAH et al., 2010); resistência à insulina (YE, 2013); cânceres, como o câncer pancreático e hepatocelular (KUMAR et al., 2022); dislipidemia (QI et al., 2015); maior predisposição a uma série de anormalidades cardiometabólicas que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LI et al., 2021), e o desenvolvimento do diabetes mellitus

gestacional que tem sua chance triplicada em mulheres com obesidade em comparação a mulheres eutróficas (SIMJÁK et al., 2018).

Para compreender a obesidade de maneira abrangente é crucial examinar o papel do tecido adiposo em seu desenvolvimento e manutenção. O excesso de gordura corporal, característico dessa condição, modifica a fisiologia do tecido adiposo, não apenas no que diz respeito ao acúmulo exagerado de gordura intracelular, mas também no que concerne à função endócrina desse tecido e sua condição inflamatória. Dessa forma, é fundamental compreender o papel central desempenhado pelo tecido adiposo nesse processo.

1.2 Obesidade e Tecido Adiposo

O tecido adiposo (TA) é o tecido mais predominante no corpo humano, sendo composto de diversos depósitos regionais distintos dispersos por todo o corpo (Figura 1), chegando a representar entre 20 e 25% do peso corporal total de uma mulher adulta e de 15 a 20% em um homem adulto (VIEIRA- POTTER, 2014).

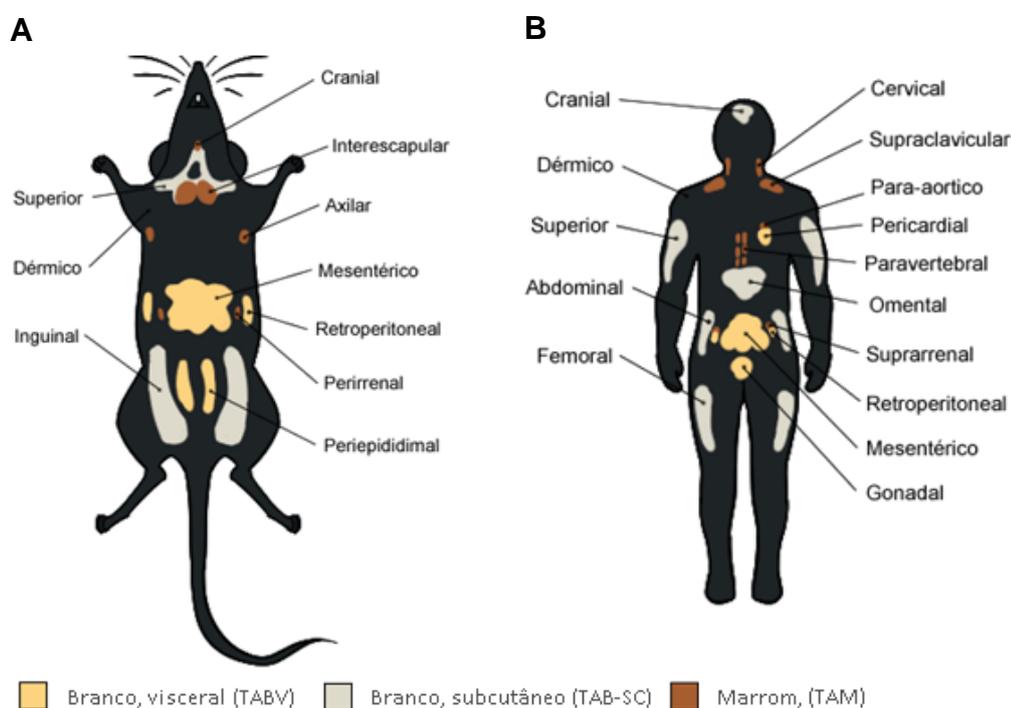


Figura 1: Localização dos depósitos de tecido adiposo em camundongos e humanos. (A) Distribuição do TA em camundongos adultos. (B) Distribuição do TA em humanos adultos. Fonte: Modificado de CHOE et al. (2016). Artista: Raquel Fraga.

O TA é um tipo de tecido conjuntivo de propriedades especiais, no qual há predominância de adipócitos maduros diferenciados, representando cerca de 50% da

população celular total do tecido (RADIN et al., 2009). Esses adipócitos maduros saudáveis acumulam lipídios em seu citoplasma, em sua maior parte triglicerídeos, e são responsáveis pela secreção de ácidos graxos, colesterol, retinol, hormônios esteroidais e, principalmente, adipocinas (PRADO et al.,2009). E são separados entre si por uma fina camada de matriz extracelular e a fração estroma-vascular, que é composta principalmente de uma rede de fibras reticulares finas de colágeno tipo III. Outros tipos de células, incluindo pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, células endoteliais, células nervosas e células imunocompetentes, incluindo monócitos e/ou macrófagos, linfócitos T e B e células dendríticas, estão presentes nesta região estroma-vascular e compõem o que chamamos de “tecido adiposo” (RADIN et al., 2009; VIEIRA-POTTER, 2014).

Em mamíferos há dois tipos principais de adipócitos que podem coexistir em todos os locais do TA (Figura 2): os adipócitos marrons (multiloculares), que caracterizam o tecido adiposo marrom (TAM), e os adipócitos brancos (uniloculares), que caracterizam o tecido adiposo branco (TAB) (OUCHI et al., 2011). Contudo, a localização do depósito de TA está mais estreitamente associada a processos fisiológicos e patológicos do que a quantidade total de TA no corpo (SHEN et al., 2007). Por exemplo, o TAB visceral, em humanos presente nos órgãos localizados dentro da cavidade abdominal, é considerado metabolicamente mais ativo do que o subcutâneo, que é distribuído por todo o corpo abaixo da superfície da pele (WINER et al.,2009; BUCCI et al.,2015).



Figura 2: Representação da estrutura dos adipócitos. A) Adipócito do tecido adiposo marrom (TAM). **B)** Adipócito do tecido adiposo branco (TAB). Fonte: Rosen & Spiegelman (2014).

De acordo com Vieira-Potter (2014), o equilíbrio entre os adipócitos e os outros tipos celulares do TA está diretamente correlacionado com: a preservação da homeostase energética, o tamanho dos adipócitos e a quantidade e polarização dos linfócitos, monócitos e/ou macrófagos infiltrados. Contudo, em indivíduos com

obesidade este equilíbrio é alterado, modificando as características do tecido em comparação a um tecido adiposo saudável, como representado na Figura 3.

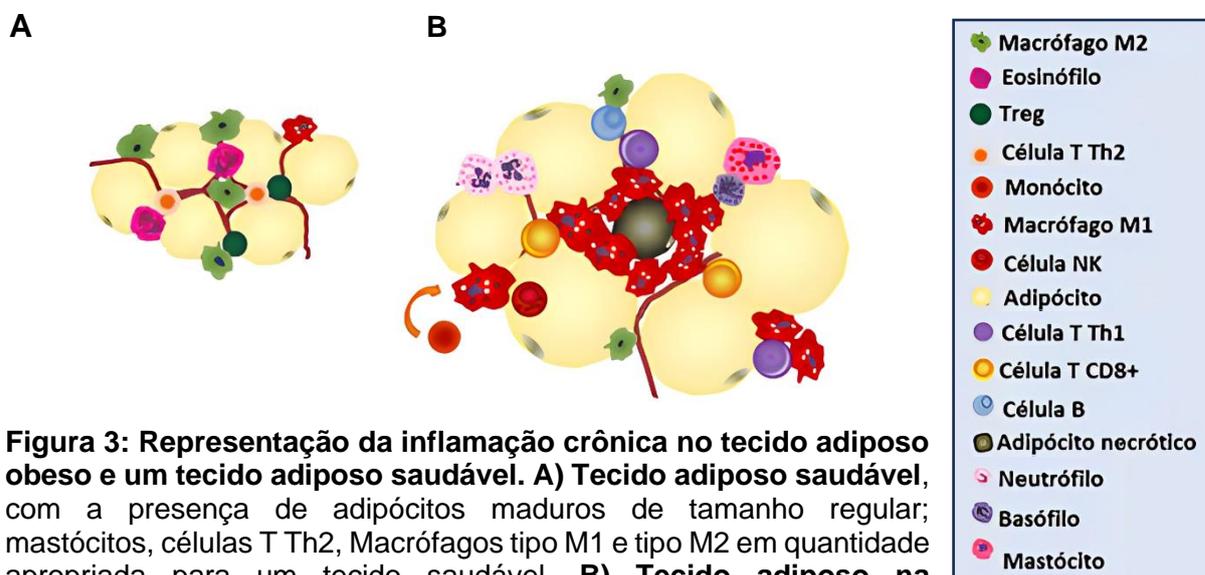


Figura 3: Representação da inflamação crônica no tecido adiposo obeso e um tecido adiposo saudável. A) Tecido adiposo saudável, com a presença de adipócitos maduros de tamanho regular; mastócitos, células T Th2, Macrófagos tipo M1 e tipo M2 em quantidade apropriada para um tecido saudável. **B) Tecido adiposo na obesidade,** com adipócitos hipertrofiados e desregulados; com infiltração de diversos tipos de células imunes no tecido, caracterizando a condição de inflamação do TA. Fonte: Adaptado de Johnson et al. (2012).

Em uma condição de obesidade, na qual os adipócitos se apresentam hipertrofiados (Figura 4B), as funções metabólicas e endócrinas desses adipócitos se apresentam alteradas em comparação ao tecido adiposo saudável, com adipócitos menores. Esses adipócitos hipertrofiados apresentam maior RI, maior suscetibilidade à apoptose e maior capacidade lipolítica (MARQUES et al., 2016; CLAYTON & COLLINS, 2014; GHABEN & SCHERER, 2019), resultante da maior liberação de AGL para a circulação, o que pode contribuir para instauração de uma disfunção metabólica e de maior risco cardiometabólico (GHOSH et al., 2019). Além de apresentarem maior capacidade pró-inflamatória, podendo secretar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que colaboram para o acúmulo de células inflamatórias (SIMON et al., 2013; FONTAINE & DAVIS, 2016).

Por sua vez, os adipócitos menores (Figura 4A) são mais sensíveis à insulina, apresentam taxas lipolíticas e de secreção de citocinas pró-inflamatórias menores, maior secreção de adiponectina e maior afinidade por AGL e triglicerídeos, agindo de forma protetora, prevenindo a deposição dessas moléculas no músculo esquelético, coração e fígado (IBRAHIM, 2010; SVENSSON et al., 2016; GHABEN & SCHERER, 2019). Essas características fazem com que o tamanho dos adipócitos seja um fator

de risco independente para o desenvolvimento de desarranjos metabólicos, como a RI. Tanto que estimular a maior frequência de adipócitos pequenos, por meio da adipogênese, é um dos tratamentos do DM2 (BOUSKILA et al., 2005; GHABEN et al., 2019).

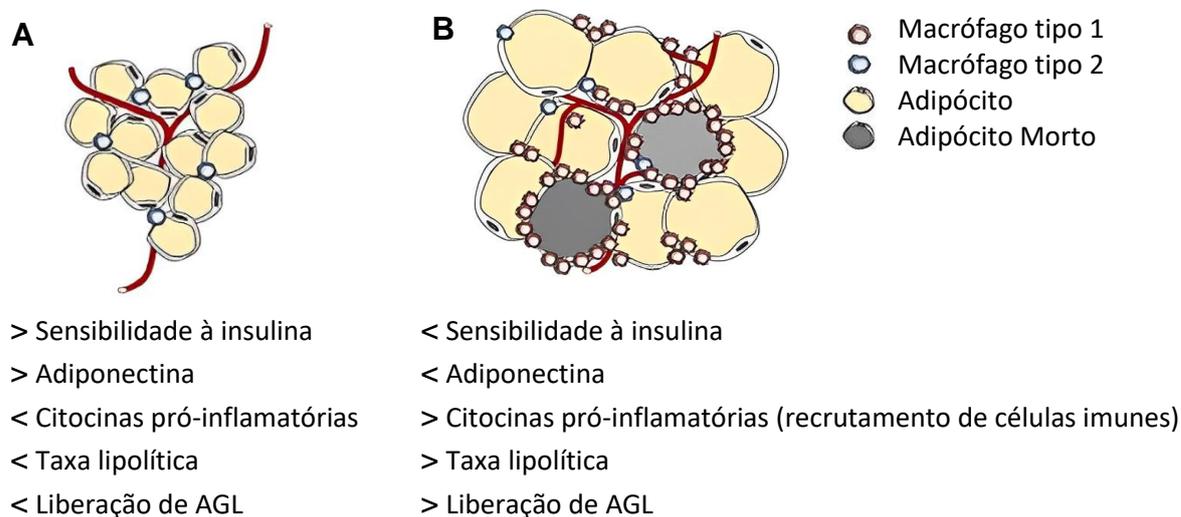


Figura 4: Características de adipócitos saudáveis e de adipócitos hipertrofiados. A) Adipócitos saudáveis. Ibrahim (2010); Svensson et al. (2016); Ghaben & Scherer (2019). **B) Adipócitos hipertrofiados.** Marques et al., (2016); Clayton & Collins (2014); Ghaben & Scherer (2019). Fonte: Modificado de Choe et al. (2016).

Em suma, ao analisarmos os efeitos da obesidade sobre o tecido adiposo, é evidente que as alterações em sua morfologia e função estão intrinsecamente ligadas às disfunções metabólicas associadas ao excesso de peso. Essas modificações, incluindo adipócitos hipertrofiados e uma resposta inflamatória crônica, têm implicações diretas na homeostase energética e na regulação hormonal. No entanto, a disfunção no TA, especialmente na condição de obesidade, não se limita apenas às suas manifestações locais no tecido, mas se estende além de seus próprios limites, podendo afetar outros órgãos e sistemas. Dentre essas interações sistêmicas, destaca-se a relação entre o tecido adiposo e as células beta pancreáticas, que possuem papel fundamental do controle glicêmico.

1.3 Tecido adiposo e células beta

Por meio de sua atuação como um órgão endócrino (KERSHAW & FLIER, 2004), o TA desempenha um papel ativo no metabolismo energético, recebendo informações de órgãos como o cérebro, fígado e músculos, e produzindo adipocinas que afetam a capacidade do corpo de regular o equilíbrio de nutrientes local e

sistemicamente (DISPIRITO & MATHIS, 2015). Em indivíduos com excesso de peso ou com obesidade, existe um conjunto de fatores (Figura 5) provenientes do TA que podem prejudicar a função de ilhotas pancreáticas, induzindo apoptose e desarranjos em suas células e, uma subsequente, instauração de RI (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Dentre os fatores envolvidos na instauração dessa RI estão a alteração quantitativa na produção e secreção de adipocinas pelos adipócitos, a maior liberação de ácidos graxos não esterificados, glicerol e citocinas pró-inflamatórias (comuns na condição de obesidade) (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; BOSCHETTI et al., 2021).

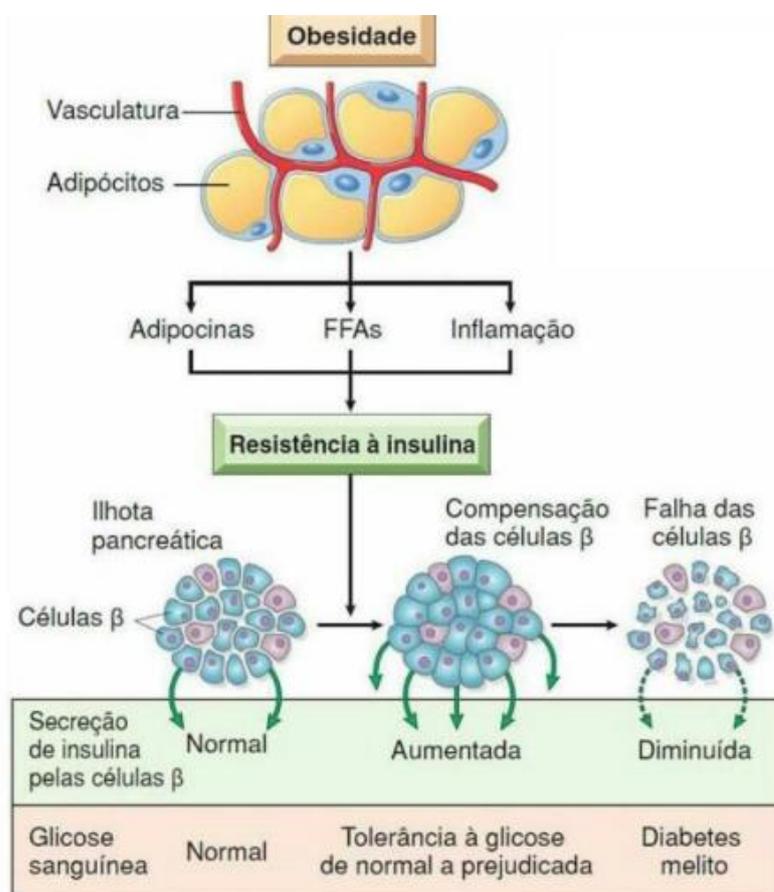


Figura 5: O desenvolvimento do mau funcionamento das células β causado pela obesidade. Fonte: Modificado de Robbins & Coltran (2010).

As adipocinas participam da regulação da função das células β pancreáticas, incluindo da expressão gênica, da secreção da insulina e da apoptose dessas células; além de participarem da sinalização da insulina e da regulação da sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo desse hormônio (ZHAO & CHEN, 2007). Então, com a produção e secreção de adipocinas alterada pela obesidade, o bom funcionamento das células beta é prejudicado. Somando-se a isto, temos o fato de que altos níveis

crônicos de glicose e lipídeos no sangue causam uma condição conhecida como glicolipototoxicidade, que contribui para o mau funcionamento e a morte das células beta (AZEVEDO-MARTINS et al., 2006; CERF, 2020). Ainda, algumas adipocinas também podem participar tanto da regulação do metabolismo de glicose e lipídios (TORRES-LEAL et al., 2012) e oxidação de ácidos graxos, como da modulação do apetite (MINHANE et al., 2015) e de processos metabólicos relacionados à produção e gasto de energia (AHIMA & LAZAR, 2008). Mostrando assim a relevância das adipocinas quando abordamos a relação obesidade-células beta.

Nos últimos anos, a adipocina adiponectina tem sido bastante investigada e segundo a American Diabetes Association (2014) ela desempenha um importante papel no que se refere a sensibilização à insulina na gestação normal, bem como em complicações na gestação, incluindo o diabetes mellitus gestacional (DMG). Essa adipocina tem a capacidade de estimular a expressão do gene da insulina, facilitar a exocitose dos grânulos de insulina e apresentar propriedades anti-apoptóticas em relação às células beta (LEE et al., 2011). Além disso, alterações no metabolismo da glicose podem afetar os níveis de adiponectina circulante, estabelecendo uma correlação negativa entre glicose e adiponectina no sangue (DORUK et al., 2014). Ainda, os níveis circulantes de adiponectina tendem a diminuir à medida que a adiposidade aumenta (NIGRO et al., 2014). Por isso, baixos níveis desta adipocina durante a gravidez estão ligados a disfunções das células β e diminuição na compensação da RI em mulheres com DMG (YANG; WANG; GUAN, 2010).

Ademais, existe a possibilidade da exposição prolongada à AGL desencadear o surgimento de estresse oxidativo, estresse no retículo endoplasmático e inflamação nas ilhotas pancreáticas. Comprometendo a capacidade de secreção de insulina e induzindo a apoptose das células beta (YE; ONODERA; SCHERER, 2019). O quadro inflamatório nas ilhotas é potencializado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, pelo TA de pessoas com obesidade, que apresentam uma condição de inflamação sistêmica prolongada denominada metainflamação (KAWAI; AUTIERPI; SCALIA, 2021). Analogamente, ao expor a célula β a esses agentes inflamatórios, há um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ativação das caspases, resultando na inibição da secreção de insulina e na promoção de apoptose (YANG; WANG; GUAN, 2010).

De forma semelhante, quando os marcadores inflamatórios como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α se apresentam aumentados, como na inflamação crônica presente na obesidade, eles também exercem um papel na disfunção da célula β , interferindo na secreção de insulina e até mesmo levando à apoptose dessas células, contribuindo para a patogênese da DM2 (YANG; WANG; GUAN, 2010). Contudo, além das diversas vias de disfunção no tecido adiposo que resultam na instauração da RI, outros fatores fisiológicos podem que ser levados em consideração quando falamos de desequilíbrio entre a resistência à insulina e secreção de insulina.

1.4 Obesidade e demandas fisiológicas femininas

Segundo Kautzky-Willer e colaboradores (2016), as mulheres sofrem duas vezes mais de obesidade grave que os homens, mostrando que existem diferenças entre os sexos na prevalência da obesidade. Neste sentido, existem situações que podem ocorrer na vida de uma mulher obesa, que podem ser bastante desafiadoras para o organismo, como por exemplo, uma gestação. Isso agrava ainda mais a RI, exigindo maior produção de insulina. No entanto, é importante ressaltar que a presença de uma RI significativa nos tecidos periféricos não implica automaticamente que um indivíduo irá desenvolver hiperglicemia. Isso ocorre porque, em situações como a gravidez, é esperado que a RI seja compensada pelo aumento na liberação de insulina. O problema surge quando há exaustão das células β em resposta à alta glicemia, resultando na progressão para uma hiperglicemia (YE; ONODERA; SCHERER, 2019), como ocorre no DMG.

Chu e colaboradores (2007) relataram a existência de uma correlação positiva entre um elevado IMC no primeiro trimestre de gravidez e o início do DMG. Na mesma linha, Lain e colaboradores (2008) mostraram que modificações nos mecanismos de adaptação materna, como a maior produção de mediadores inflamatórios devido ao sobrepeso ou obesidade desde o início da gestação, podem resultar no desenvolvimento do DMG. Portanto, ao combinar obesidade e gestação, cria-se um cenário metabólico que favorece o desenvolvimento do DMG e de complicações materno-fetais (MOULIN et al., 2009). Estudo recente envolvendo 531 mulheres mostrou que 63,7% das gestantes diagnosticadas com DMG eram obesas, e que 66,7% das mulheres obesas tiveram diabetes durante a gravidez (ALFADHLI, 2021).

De fato, a obesidade aumenta em 3 vezes a probabilidade de uma gestante obesa desenvolver DMG em comparação a uma gestante eutrófica (ŠIMJÁK et al., 2018).

O DMG é caracterizado pela ocorrência de hiperglicemia materna, identificada pela primeira vez durante o segundo ou terceiro trimestre da gestação (MACHADO e VASCONCELLOS, 2022). Dentre os riscos maternos do DMG, durante a gestação, estão a pré-eclâmpsia, o polidrâmnio, parto prematuro e/ou maior risco de complicações no parto (FARRAR et al., 2017). Já para o feto os riscos são de abortamento, malformações, óbito intrauterino e prematuridade (FARRAR et al., 2016). Em relação aos riscos depois do nascimento, há evidências de que o DMG está associado a um risco aumentado para a prole de desenvolver sobrepeso e obesidade (BENDOR et al., 2022), síndrome metabólica, diabetes mellitus, hipertensão e problemas neurológicos na vida adulta (MOHAMMADZADEH et al., 2022). Na mãe, o DMG está associado a um risco aumentado de desenvolver DM2, doenças cardiovasculares e obesidade após a gravidez. Existe também uma maior probabilidade de recorrência do DMG e complicações em gestações futuras (MOHAMMADZADEH et al., 2022).

Nos últimos anos, 12 a 18% de todas as gestações no mundo foram complicadas pelo DMG, variando dependendo da população estudada, do grupo étnico e da estratégia de diagnóstico empregada (ALEJANDRO et al., 2020; DALFRÀ et al., 2020; CHOUDHURY & RAJESWARI, 2021). No Brasil, a prevalência de DMG no ano de 2021 entre mulheres de 20 a 49 anos foi de 10,6%, segundo o *IDF Diabetes Atlas* (2021). Nesse mesmo ano, o número de nascidos vivos afetados por hiperglicemia durante a gestação de mulheres de 20 a 49 anos, chegou a cerca de 298.237, enquanto os gastos totais com saúde relacionados ao diabetes, neste período, foram cerca de 77 milhões de dólares. Estima-se que em 2045, os gastos cheguem a 92 milhões de dólares no Brasil (IDF, 2021).

Em uma gestação saudável, a sensibilidade periférica à insulina diminui de 50 a 60%, podendo, ao final da gravidez, ser comparável àquela observada em pacientes intolerantes à glicose, ou recém diagnosticados com DM2 (LACROIX; KINA; HIVERT, 2013). No decorrer da gestação, as demandas por nutrientes da unidade feto-placentária e a preparação do organismo materno para o parto e a amamentação são acompanhadas de adaptações endócrino-metabólicas maternas como o aumento na

massa de células beta pancreática e a discreta elevação da glicemia (principalmente após as refeições) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018). Assim, o equilíbrio entre RI e a capacidade da massa de células beta pancreáticas compensar esta situação mantém homeostasia da glicemia durante a gestação (Figura 6). Entretanto, se este equilíbrio for perturbado, a hiperglicemia materna passa a ser observada (SZLAPINSKI & HILL, 2020).

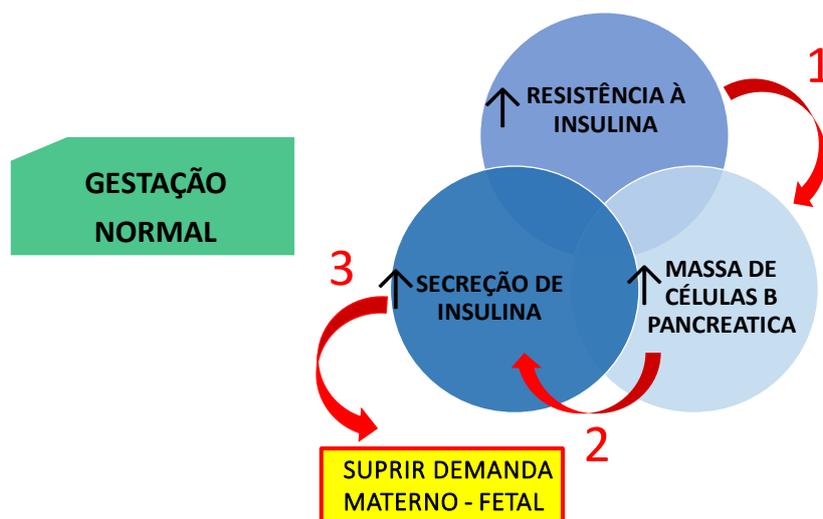


Figura 6: Gestação saudável e suas adaptações. O aumento da resistência à insulina no corpo materno durante a gravidez é seguido por aumento da massa de células beta, e uma subsequente maior secreção de insulina, visando suprir as demandas metabólicas maternas e fetais. Fonte: O autor

Um estudo de caso controle conduzido por Saini et al. (2015) com 90 gestantes diagnosticadas com DMG e 60 controles sem DMG, identificou correlação negativa entre glicose e adiponectina no sangue das gestantes, o que sugere que a inflamação crônica ocasionada pela obesidade pode diminuir a concentração de adiponectina no sangue e assim desempenhar um papel no desenvolvimento de DMG. Em outro estudo, Plows et al. (2018) mostram que, os níveis de adiponectina circulante são baixos em indivíduos obesos e mulheres com DMG, sendo, portanto, inversamente proporcional à massa adiposa. Já Pala et al. (2015) e Mohammadi & Paknahad (2017) mostraram que em mulheres com DMG os níveis séricos de adiponectina foram significativamente menores do que em mulheres com tolerância normal à glicose entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, corroborando o estudo de Saini et al. (2015).

Muito embora os mecanismos específicos da RI não estejam completamente entendidos, sabe-se que com o decorrer da gestação o crescimento placentário é acompanhado com um aumento na secreção de hormônios gestacionais que têm sido

associados à evolução da RI na gravidez por seus efeitos contrarreguladores (NAPSO, YONG, LOPEZ-TELLO et al., 2018), dentre eles destacam-se: a progesterona (PG), principalmente; o estradiol (E3); o hormônio do crescimento (GH), lactogênio placentário e prolactina.

1.5 Progesterona e tecido adiposo

A progesterona é um hormônio esteroide essencial para o manejo dos processos reprodutivos femininos porque controla o ciclo menstrual, auxilia na implantação do embrião e mantém a gravidez ao preservar a integridade do endométrio. Os níveis de PG em uma gravidez humana saudável começam a subir constantemente desde o início da gravidez até cerca da trigésima primeira semana e exercem funções importantes para a manutenção da gestação como: modular a imunidade materna e reduzir a resposta inflamatória para proteger o feto de possíveis rejeições imunológicas, além de melhorar a circulação entre útero e placenta (DI RENZO et al., 2016). Por volta da trigésima primeira semana o aumento dos níveis de PG começa a desacelerar ao passo que os níveis de estrógenos continuam a aumentar (SPEROFF et al., 1995). Essa desaceleração do aumento dos níveis de PG é significativamente importante para que os efeitos da PG no relaxamento dos músculos uterinos, que evitam contrações que podem prejudicar o crescimento fetal (NICE, 2020), sejam cessados. Isso corre devido a sobreposição fisiológica dos efeitos dos estrógenos, principalmente do estriol, sobre os níveis de PG, possibilitando e promovendo, assim, as contrações no trabalho de parto (SPEROFF et al., 1995; NICE, 2020).

O estudo de González et al. (2000) revelou que o complexo processo de desenvolvimento de resistência à insulina durante uma gestação eutrófica em ratas estava associado a níveis séricos maternos elevados de PG. Devido ao fato de que a PG aumenta a resistência à insulina por meio de reduções na expressão do transportador de glicose e na captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo de camundongos fêmeas (PICARD et al., 2002). Nesse sentido, o estudo de Wada et al. (2010) reforçou que a PG pode inibir a captação de glicose e afetar a sinalização da insulina, contribuindo para a resistência à insulina durante a gravidez. Além disso, *in vivo*, já foi constatado que o tratamento com PG em ratas e grávidas estimula a proliferação de células alfa e beta pancreáticas (NIEUWENHUIZEN et al.,

1999). E *in vitro*, a PG mostrou potencial para neutralizar os efeitos dos hormônios lactogênicos na secreção de insulina e na divisão das células β das ilhotas (SHAO et al., 2004), além de poder induzir apoptose das células β (NOLAN & PROIETTO, 1995) implicando ainda mais seu papel no desenvolvimento da resistência à insulina. Além disso, Zhang et al. (2020) evidenciaram que níveis elevados de PG na gravidez contribuem para o aumento da resistência à insulina, atuando como um agente potencialmente importante para o desenvolvimento do DMG.

Os adipócitos também são suscetíveis aos efeitos da PG e de outros hormônios gestacionais devido à presença de receptores (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1990; O'BRIEN et al., 1998). Enquanto o estrogênio é responsável por alterações vasculares nesse tecido e por aumentar sua quantidade, especialmente na região abdominal, estudos demonstraram que a progesterona tem efeitos diretos no tecido adiposo, incluindo modulação da expressão gênica, diferenciação e acúmulo de lipídios nos adipócitos (MONJO et al., 2003; MONJO et al., 2005), além de também estimular a produção de mediadores da inflamação por eles (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2011). Ademais, a progesterona desempenha um papel na indução da resistência à insulina nos adipócitos, como evidenciado pelo estudo de Wada et al. (2010) em cultura *in vitro* de adipócitos isolados. Isto é particularmente relevante no contexto das disfunções dos adipócitos que ligam a obesidade à resistência à insulina e ao DM2 (GUILHERME et al., 2008).

Nesse contexto, a compreensão do papel desempenhado pela progesterona nos intrincados mecanismos fisiopatológicos associados à disfunção do metabolismo glicêmico e ao possível agravamento da disfuncionalidade do tecido adiposo durante gestações com DMG, especialmente em mulheres obesas, é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes na prevenção de potenciais riscos à saúde tanto da gestante quanto de seus filhos.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

A fim de desenvolver conhecimento e medidas para reduzir os riscos à saúde tanto para as mulheres grávidas quanto para seus filhos, é crucial compreender os processos fisiopatológicos por trás da resistência à insulina observada durante gestações com DMG, especialmente em mulheres obesas. Desse modo, utilizamos como premissa a hipótese de que a infusão de progesterona em concentrações

observadas na gravidez, em fêmeas obesas, contribui suplementarmente para o prejuízo no metabolismo glicêmico e na morfometria de adipócitos de diferentes depósitos adiposos, como esquematizado na Figura 7.

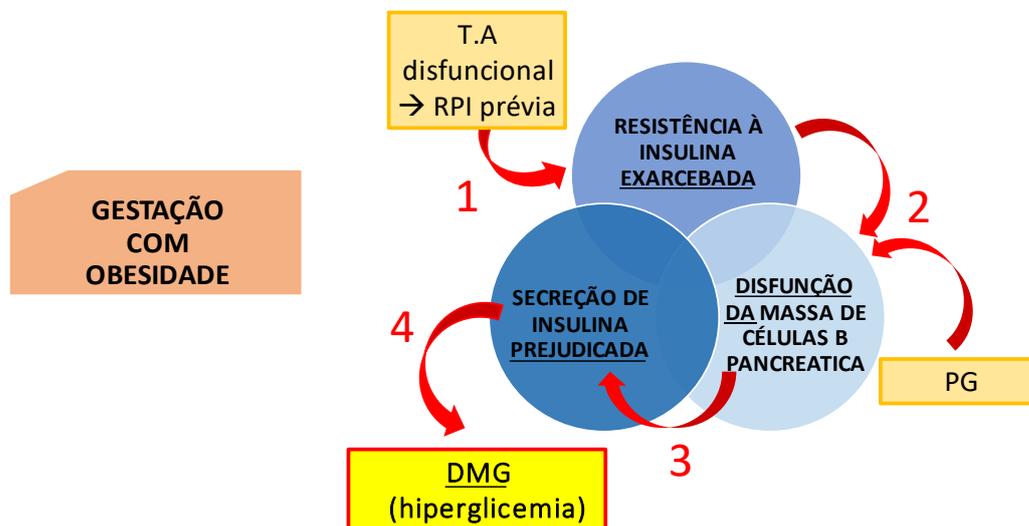


Figura 7: Hipótese do desenvolvimento de DMG em uma gestação com obesidade.
Fonte: O autor.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da progesterona, em doses correspondentes às da gestação, sobre o metabolismo glicêmico e a morfometria de adipócitos dos distintos depósitos adiposos presentes em camundongos fêmeas obesas.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da progesterona sobre o controle glicêmico, ganho de peso e consumo de ração de camundongos fêmeas obesas;
- Avaliar os efeitos da progesterona sobre parâmetros metabólicos de repouso e em teste de esforço físico máximo para avaliar disfunção metabólica;
- Estudar os efeitos da progesterona sobre a morfometria e função de adipócitos de TAB-RP, TAB-SC e TAM de camundongos fêmeas obesas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

O desenho experimental (Figura 8) consistiu na manutenção de quatro grupos experimentais de camundongos-fêmeas C57BL/6 (NO-CO, NO-PG, HFF-CO, HFF-PG), divididos de acordo com a alimentação (dieta padrão AIN93G ou dieta hipercalórica AIN93G Modificada) e administração de progesterona. Os quatro grupos foram acompanhados para o controle de peso, consumo de água e ração, avaliações glicêmicas (GTT e ITT), parâmetros metabólicos em repouso (calorimetria indireta) e em teste de esforço físico máximo, análises histológicas (coloração com hematoxilina e eosina).

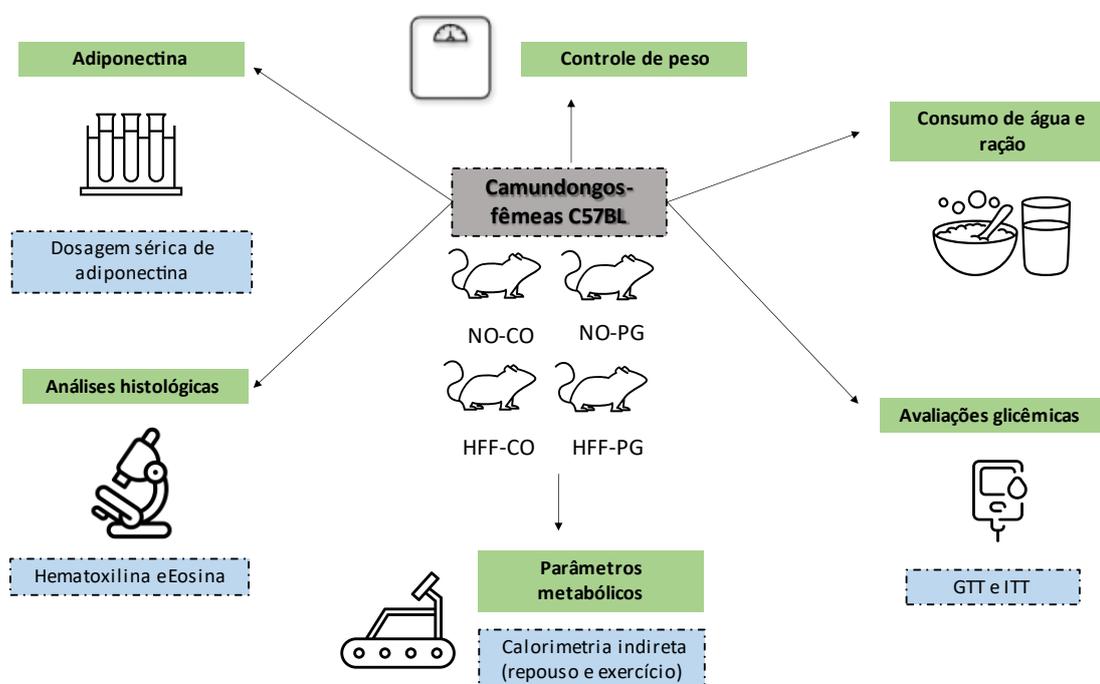


Figura 8: Desenho experimental do trabalho. Fonte: O autor.

4.1 Animais

Foram utilizados 53 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, saudáveis, recém-desmamadas (21 a 23 dias), oriundas do Biotério da Faculdade de Medicina da USP. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da instituição (CEUA-EACH), sob o número 003/2018 (Anexo 1), conforme normas e procedimentos definidos pelo CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal) na DBCA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos).

Após período adaptativo ao ambiente de uma semana, os animais foram divididos em 4 grupos, respeitando-se o pareamento por peso. Os grupos receberam dieta normocalórica ou hipercalórica, cuja composição está descrita nas Tabelas 1 e 2. Os grupos foram denominados como:

- **NO-CO (n=16):** normocalórico-controle. Animais controle alimentados com ração normocalórica;
- **HFF-CO (n=16):** *high-fat and fructose*-controle. Animais alimentados com ração hiperlipídica acrescida com frutose;
- **NO-PG (n=8):** normocalórico-progesterona. Animais alimentados com ração normocalórica e com administração de progesterona a partir da 7^a semana de protocolo;
- **HFF-PG (n=13):** *high-fat and fructose*-progesterona. Animais alimentados com ração hiperlipídica acrescida com frutose, com administração de progesterona a partir da 7^a semana de protocolo.

Tabela 1: Valor calórico total das dietas

<u>Componentes das dietas</u>	<u>Dieta normocalórica (AIN93 G)</u>	<u>Dieta rica em gordura e frutose (AIN93 G Modificada)</u>
	% Valor Calórico Total	
Lipídios	16,11	60,23
Carboidratos	66,19	26,84
Proteínas	17,70	12,94

Fonte: O autor.

Tabela 2: Composição nutricional das dietas

<u>Componentes das dietas</u>	<u>Dieta normocalórica (AIN93 G)</u>	<u>Dieta rica em gordura e frutose (AIN93 G Modificada)</u>
	g/kg de dieta	
Amido de milho	397.5	20
Caseína	200	200
Amido de milho dextrinizado	132	20
Sacarose	100	62.5
Óleo de soja	70	50
Fibra	50	50
Mistura de minerais	35	35
Mistura de vitaminas	10	10
L-cistina	3	3
Bitartarato de colina (41.1% colina)	2.5	2.5
Frutose	0.0	239
Banha	0.0	308
tert-Butilhidroquinona	0.014	0.014
Kcal/g	3.90	5.34

Fonte: O autor.

Segundo Heydemann (2016), uma dieta hiperlipídica com alta proporção de gordura (30 a 40%), especialmente saturada e alto teor de carboidratos é suficiente para favorecer o quadro obesogênico. O valor calórico total (VCT) da ração AIN93G é de 16,11% de lipídios e 390,98 Kcal/100g, contra 60,23% de lipídios e 534,98 Kcal/100g da AIN93G Modificada. Dessa forma, a dieta hipercalórica utilizada encontra-se dentro da faixa de 45–60% das calorias provenientes de gordura (MORRISON et al., 2020). Já a escolha da adição de uma alta proporção de frutose à composição da dieta objetivou aproximar a composição da ração à dieta ocidental média, tendo em vista o aumento do consumo de produtos industrializados adoçados com frutose por países ocidentais desde o início da sua utilização na década de 60 (DE ANGELIS et al., 2007).

Os animais foram mantidos em caixas com água e alimentação “*ad libitum*” e ambiente controlado (ciclo de claro/escuro de 12:12 horas invertido e temperatura na faixa de 23 ± 2°C). O protocolo experimental com duração de 10 semanas está apresentado no esquema da Figura 9.

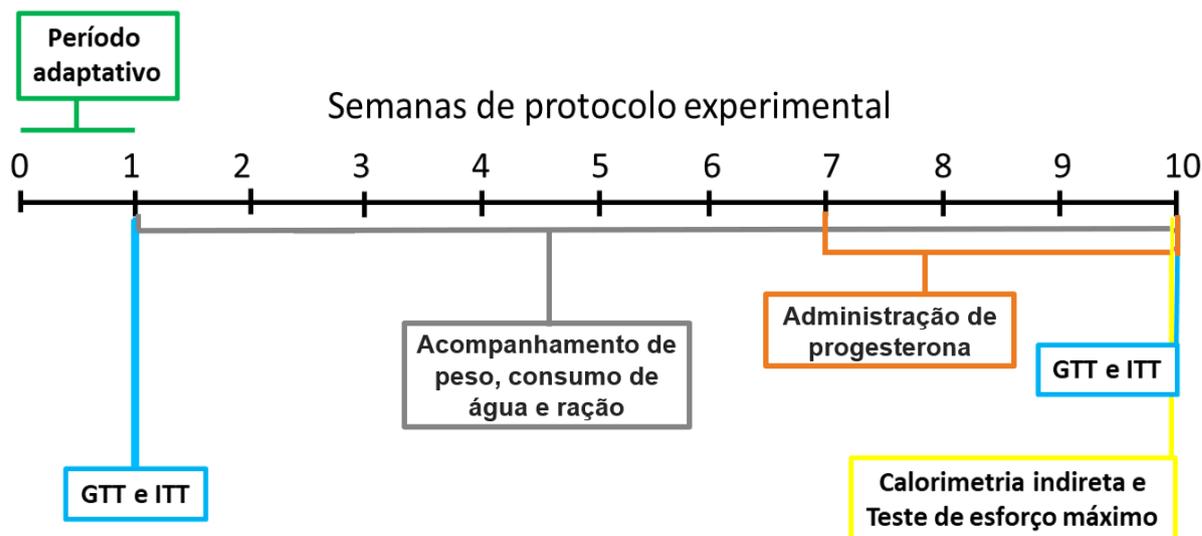


Figura 9: Esquema visual das 10 semanas de protocolo. A Semana 0 representa o período de aclimação dos animais, antes do início do protocolo. Período no qual foi realizado o primeiro GTT e ITT, marcado pela cor azul. Marcada pela cor cinza, as Semanas 1 a 10 foram marcadas pela avaliação do peso corporal e controle de consumo de água e ração. A Semana 7, marcada pela cor laranja, foi o ponto do protocolo no qual realizamos o implante subcutâneo de uma mini-bomba que infundiu uma taxa constante de progesterona até o final da Semana 10. E, por fim, na Semana 10 foi realizado o segundo GTT e ITT (cor azul), além da Calorimetria indireta em repouso e em esforço máximo (cor amarela). Fonte: O autor.

4.2 Determinação de peso corporal, consumo de ração e água

Ao longo das 10 semanas de protocolo, os animais foram pesados três vezes por semana, nos mesmos dias consecutivos e horários, a fim de acompanhar a evolução do peso corporal e calcular o ganho de peso. O consumo de ração dos animais, de uma mesma caixa, também foi avaliado através da pesagem das rações (g) em três dias consecutivos da semana, e depois divididos pelo número de animais na caixa para estimar o consumo individual (g/animal). Conhecendo o valor calórico das rações, foi possível calcular o consumo calórico por animal (kcal/animal), multiplicando-se o valor de seu consumo individual pelo valor calórico da ração. Além disso, o consumo de água também foi mensurado com medições de volume em três dias consecutivos e posterior divisão do volume (mL) pela quantidade de animais na caixa para avaliar o consumo individual (mL/animal), da mesma maneira que o consumo de ração. Foi utilizada a média dos três dias avaliados para determinar o consumo semanal, como descrito em Fonseca-Alaniz, et. al. (2017).

4.3 Avaliações glicêmicas

As avaliações glicêmicas foram realizadas através de teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT), em dois momentos diferentes: antes e depois de nosso protocolo experimental. O teste pré-protocolo foi realizado na semana 0, na qual os animais não tinham qualquer distinção de tratamento em relação à dieta ou à progesterona. Existiam apenas dois grandes grupos que corresponderiam, ao início do protocolo (semana 1), aos grupos NO e HFF. Já o teste pós-protocolo, foi realizado ao final da 10^a, e última, semana protocolo. A glicemia de jejum foi avaliada pelas medições de glicemia inicial nos testes de GTT. Em ambos os testes, a glicemia foi determinada através de glicosímetro (AccuChek Advantage Roche Diagnostics®) em fitas reativas a partir de amostras de sangue retiradas da cauda dos animais em jejum de 6h (BENEDÉ-UBIETO et al., 2020).

No GTT, a glicemia foi monitorada nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose (2 g/kg de peso corporal). Os resultados obtidos foram plotados em gráficos para observação da curva glicêmica e os valores obtidos entre 15 e 120 min foram utilizados para calcular a área sob a curva (AUC). Já o ITT foi realizado 72h após o GTT, com medições da glicemia nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração intraperitoneal de 0,75 U/kg de insulina (Novo Nordisk®, Paraná, Brasil). Os valores obtidos entre os tempos de 5 e 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (kITT), a partir da equação: $0,693/T_{1/2}$, em que $T_{1/2}$ é o tempo necessário para reduzir pela metade a glicemia inicial, mediante análise da curva de decaimento segundo Bonora et al. (1989).

4.4 Administração de progesterona e acompanhamento do ciclo estral

A administração de progesterona foi feita nos grupos NO-PG e HFF-PG através de mini-bombas osmóticas (Alzet, Cupertino, CA, USA). Para o procedimento de implante das mini-bombas, os animais foram anestesiados com quetamina (100mg/kg de peso) e xilazina (10mg/kg de peso), posicionados em mesa cirúrgica em decúbito ventral. Após a tricotomia, uma pequena incisão foi feita no dorso no animal, o suficiente para inserir a mini-bomba subcutaneamente (WONG, et. al., 2012). Em seguida, foi realizada a sutura da pele e encerrado o procedimento. Os animais foram colocados em caixas limpas e permaneceram em ambiente aquecido até a total recuperação da anestesia. Os animais dos grupos NO-CO e HFF-CO foram

submetidos à cirurgia *sham* realizada com os mesmos procedimentos, porém sem a inserção da mini-bomba.

A Figura 10 apresenta uma representação simplificada da bomba osmótica. Ela possui um compartimento interno onde é mantida a solução que será dispensada (neste caso, solução de progesterona), uma camada osmótica, uma membrana parcialmente permeável e um regulador de fluxo que permite a liberação da solução. O funcionamento da bomba depende da entrada de água que flui através da membrana permeável e, conforme a água é incorporada na camada osmótica, ela exerce pressão sobre o reservatório, resultando na liberação da solução da bomba em uma velocidade controlada e pré-estabelecida.

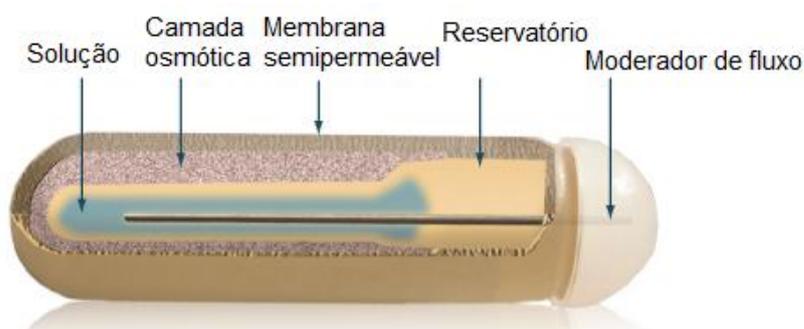


Figura 10: Mini-bomba osmótica (Alzet). Fonte: Adaptado de Alzet (2022).

A fim de mimetizar a concentração de progesterona no sangue de camundongos fêmeas grávidas, foi infundida uma quantidade de 0,25 mg/kg/dia de progesterona, diluída em DMSO 100%, considerando a taxa constante de liberação da mini-bomba osmótica (modelo 1004) de 0,1 μ L/hora (ROSEN et al., 2017). Dessa forma, pretendeu-se isolar os efeitos da progesterona em concentração fisiológica de todos os demais fatores presentes na gestação.

A bomba foi implantada na sétima semana do protocolo, assim os animais permaneceram com a bomba liberando progesterona por um período de 21 dias, a fim de simular a duração da gestação em camundongos que pode ser de 18 a 22 dias (MURRAY et al., 2010). Nesse ponto os animais estavam com aproximadamente 70 dias de vida, tempo em que os animais já atingem a maturidade sexual (MURRAY et al., 2010).

Porém, a confirmação da maturidade sexual de fato foi feita pelo acompanhamento das fases do ciclo estral através de lavados vaginais a partir da

sexta semana de protocolo, quando já se identificava a abertura do canal vaginal. Para tanto, a secreção vaginal foi coletada, delicadamente, com uma ponteira de plástico, após a introdução superficial de um pequeno volume de água deionizada na vagina do camundongo. O fluido vaginal foi então colocado em uma lâmina de vidro, que posteriormente foi corada com cristal violeta (1 min.) para observação do material em microscópio óptico, em aumentos de 100x e 400x. A caracterização da fase do ciclo estral foi baseada na proporção de células epiteliais, células corneificadas e leucócitos, conforme descrito por McLean et al. (2012):

- Proestro: presença de leucócitos e células epiteliais conificadas e nucleadas.
- Estro: presença de células epiteliais conificadas sem núcleo e disformes.
- Metaestro: presença de células conificadas em pouca quantidade e aumento de leucócitos.
- Diestro: presença majoritária de leucócitos.

Imagens representativas dos esfregaços vaginais realizados, das quatro fases do ciclo estral, podem ser visualizadas no Anexo II.

4.5 Calorimetria indireta em repouso e teste de esforço físico máximo

A taxa metabólica em repouso e em esforço físico máximo dos animais foi determinada por calorimetria indireta (Panlab, Barcelona, Espanha). Para tanto, dois dias antes do teste, os animais foram colocados por 5 minutos na esteira rolante como forma de adaptação ao sistema. Para a avaliação em repouso, o animal foi submetido a jejum de 2 horas e, posteriormente, mantido no sistema durante 30 minutos para registro do consumo de oxigênio (VO_2 , mL/min/kg), produção de gás carbônico (VCO_2 , mL/min/kg), o coeficiente respiratório (QR), gasto energético (GE, kcal/dia/kg) e taxa de oxidação de carboidratos e lipídios (mg/kg/min) (EVANGELISTA et al., 2015). Os dados foram coletados e avaliados através do programa Metabolism® (Oxylet System, Panlab, Barcelona, Espanha). Os valores absolutos de VO_2 , VCO_2 , QR e GE foram calculados de acordo com as seguintes equações a cada minuto:

- $VO_2 = (F \times [O_2]_e) - [O_2]_s \times F \times (1 - [O_2]_e / 100) (1 [O_2]_s / 100 - [CO_2]_s / 100)$
- $VCO_2 = F \times [O_2]_e / 100 [CO_2]_s - [CO_2]_e \times F (1 - [O_2]_s / 100 - [CO_2]_s / 100)$
- $QR = VCO_2 / VO_2$
- $GE = [3,815 + (1,232 \times RQ)] \times VO_2 \times 1,44$

Onde:

- $[O_2]_e$ = concentração de oxigênio inicial
- $[O_2]_s$ = concentração de oxigênio dentro da caixa
- $[CO_2]_e$ = concentração de dióxido de carbono inicial
- $[CO_2]_s$ = concentração de dióxido de carbono dentro da caixa
- F = fluxo de ar

Os valores de VO_2 , VCO_2 , QR e GE finais foram calculados a partir da média dos 3 menores valores durante o teste. Já as taxas de oxidação de carboidratos e lipídeos foram calculadas de acordo com as seguintes equações (FERRANNINI, 1988):

- Oxidação de carboidratos = $(VO_2 * 4,55) - (VCO_2 * 3,21)$
- Oxidação de lipídeos = $(VO_2 * 1,67) - (VCO_2 * 1,67)$

A capacidade de esforço físico máximo foi avaliada ao final do protocolo através de um teste progressivo escalonado até a exaustão, sem inclinação da esteira. O estímulo para a corrida na esteira é dado por choque elétricos, de modo que se o animal parar a corrida ele irá receber os choques no fim da esteira. A velocidade inicial da esteira foi de 0,8 cm/s, com aumento em 3cm/s a cada 2 minutos, até atingir a exaustão do animal quando ele não conseguiu manter do padrão da corrida e permaneceu recebendo choques por 5 segundos (PETROSINO et al., 2016).

No teste de esforço físico máximo, também foram registrados o VO_2 , o VCO_2 , QR e GE. Após a obtenção dos resultados, foram calculados o VO_2 máximo e VCO_2 máximo a partir dos valores médios obtidos durante o último estágio do teste de esforço. A intensidade associada ao consumo máximo de oxigênio (iVO_2 (cm/s)) foi definida como a intensidade de exercício correspondente ao VO_2 máximo e calculado utilizando a seguinte fórmula adaptada de Machado et al. (2004):

- $iVO_2 = \text{velcon} + (t/120) \times 0,1 \text{ km/h}$

Onde:

- velcon= velocidade do último estágio concluído.
- t = tempo que permaneceu no último estágio não-concluído.
- 120 = Tempo de duração de cada estágio.
- 0,1 = Taxa de incremento da velocidade a cada estágio.

4.6 Procedimento de morte, coleta de sangue e tecidos

Quarenta e oito horas após a última avaliação glicêmica, os animais foram separados para o procedimento de morte. Foi feita, então, a pesagem dos animais em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil) e a retirada da ração para que os animais permanecessem seis horas em jejum. Após esse período os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental de sódio (3 mg/g de peso corporal). Foi feita, então, a pesagem em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil). Quando o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a coleta do sangue através de punção na veia cava inferior. Após a coleta, o sangue foi deixado em gelo para coagulação até o momento de sua centrifugação. A centrifugação foi feita a 380 G por 15 minutos, refrigerada a 4°C. Posteriormente, alíquotas do soro foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise das concentrações séricas de adiponectina, por ELISA, utilizando-se kit comercial (Merck Millipore Corp., EUA e Wuhan Eiaab Science, China) seguindo-se instruções do fabricante.

Para as análises histológicas, os depósitos de TAB (SC e RP) e do TAM interescapular foram coletados e pesados (Figura 11). Foram, então, fixados em PFA 4% durante 76 horas e, logo após, mantidos em álcool 90% por 24 horas para posterior processamento e inclusão em parafina no Instituto do Coração (InCor) da FMUSP.

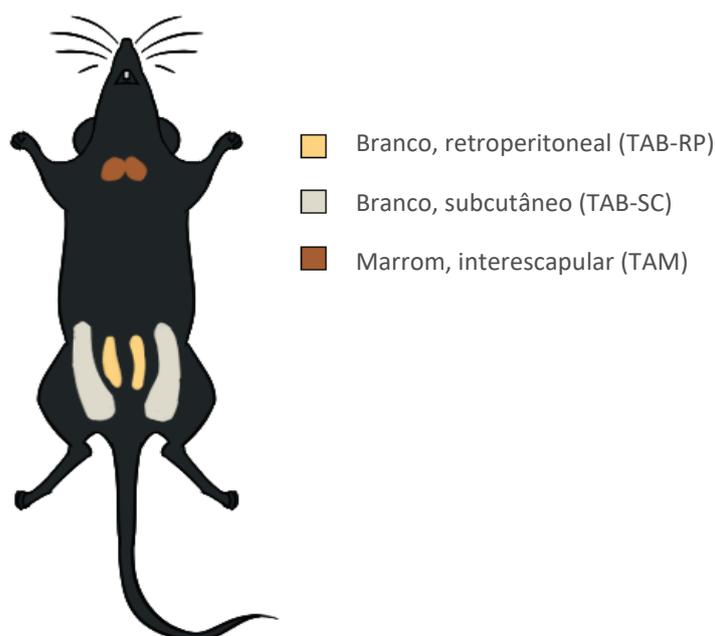


Figura 11: Representação dos depósitos adiposos coletados após o procedimento de morte. Artista: Raquel Fraga.

Encerrado o procedimento de coleta, as carcaças foram congeladas e armazenadas no biotério para posterior incineração realizada por uma empresa especializada.

4.6.1 Análises morfométricas do tecido adiposo branco subcutâneo e retroperitoneal (TAB-SC e TAB-RP)

Logo após a coleta, os depósitos do tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo passaram pelo processo descrito no item acima e, em seguida, foram processados numa sequência de desidratação e diafanização e incluídos em parafina. Para a análise histológica, os cortes com 3 μm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. Após a coloração foram obtidas fotos digitalizadas das lâminas, pelo programa Leica Q Win Plus (V. 3.5.1).

O estudo dos parâmetros morfológicos foi realizado por meio de microscopia ótica com o auxílio do software Image J (V. 1.53k), no aumento de 400X. No qual a macro utilizada para facilitar e padronizar as análises pode ser observada no Anexo 3.

Para os cortes de TAB-SC e TAB-RP foram quantificadas a área (μm^2) de todas os adipócitos (≥ 50 adipócitos por animal), exceto aqueles localizados na borda do campo de imagem, de acordo com metodologia adaptada de Heinonen et al. (2014). A área dos adipócitos foi distribuída em quartis, de forma que os adipócitos que ficaram no quartil 1 foram classificados como pequenos; no intervalo interquartil 1 e 2, médios; no intervalo interquartil 2 e 3, grandes; e acima do quartil 3, muito grandes.

A partir da área (A) dos adipócitos e assumindo um formato esférico, foi calculado o diâmetro (d) dos adipócitos utilizando-se a seguinte equação (PARLEE et al., 2014):

$$d=2 \left(\sqrt{\frac{A}{\pi}} \right)$$

Com o diâmetro dos adipócitos, foi calculado o volume (V) em picolitros (pL) deles (DI GIROLAMO et al., 1971):

$$V= \frac{\left(\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2} \right)^3 \right)}{1000}$$

A massa (m) dos adipócitos foi calculada considerando que os adipócitos são compostos de um material com a densidade da trioleína ($\rho=9,15 \mu\text{g}/\text{pL}10$) (HEINONEN et al., 2014; SPALDING et al., 2008):

$$m=V \cdot \rho$$

O número de adipócitos (n) em cada depósito foi estimado dividindo a massa do tecido pela massa média dos adipócitos para cada animal (HEINONEN et al., 2014):

$$n= \frac{\text{massa do depósito } (\mu\text{g})}{\text{Massa média dos adipócitos } (\mu\text{g})}$$

A Tabela 3 resume a metodologia de Heinonen (2014). Os dados de cada grupo foram representados pela média de, pelo menos, 50 adipócitos calculados para cada animal de cada grupo, cada variável em sua respectiva unidade.

Tabela 3: Descritivo do cálculo das variáveis

Variáveis	Equações	Unidade em que são retratadas
Área	Calculada automaticamente via macro pelo programa Image J	μm^2
Diâmetro	$=2 \cdot (\text{RAIZ}(\text{ÁREA}/\text{PI}))$	μm
Volume	$=(\text{DIÂMETRO}/2)^3 \cdot 4/3 \cdot (\text{PI})/1000$	pL
Massa	$=9,15 \cdot 10^{-4} \cdot \text{VOLUME}$	μg
Número de adipócitos no tecido	$=\text{MASSA DO TECIDO EM } \mu\text{g}/\text{MASSA MÉDIA DE CADA ADIPÓCITO}$	Sem unidade (número de adipócitos no tecido coletado)
Distribuição dos adipócitos por tamanho	$=\text{QUARTIL.INC (TODAS AS ÁREAS REGISTRADAS)}$	%

Fonte: O autor

4.6.2 Análises morfométricas do tecido adiposo marrom (TAM)

Logo após a coleta, os depósitos do TAM passaram pelo processo descrito no item anterior, diferindo apenas no ponto de transferência dos tecidos para o álcool 90%; nesse caso eles permaneceram no PFA 4% até serem incluídos em parafina. Para a análise histológica, os cortes com 3 μm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. Após a coloração foram obtidas fotos digitalizadas das lâminas, pelo programa Leica Q Win Plus (V. 3.5.1).

A análise histológica do TAM foi feita de forma similar à do TAB, contudo o método de quantificação foi adaptado, pois utilizou-se uma macro do software Image J específica para o TAM que pode ser conferida no Anexo 4. Para os cortes de TAM foram mensuradas 10.000 gotículas de lipídio por animal exceto aquelas localizadas na borda do campo de imagem, de acordo com a metodologia adaptada de Heinonen et al (2014). Contudo, foram utilizadas no cálculo de todas as variáveis apenas as gotículas de lipídio com área igual ou superior a 50 μm^2 conforme proposto por Shimizu e colaboradores (2014).

As variáveis calculadas para o TAM foram as mesmas que as do TAB, com exceção da distribuição das gotículas por tamanho que não foi possível o cálculo devido ao método (SHIMIZU et al., 2014) optado para este tecido. No lugar do cálculo de distribuição foi calculado o número de gotículas de lipídios por campo, utilizando a média de gotículas com área igual ou superior a 50 μm^2 advindas dos 10 campos analisados. Sendo os resultados apresentados pela média de gotículas de lipídio com área igual ou superior a 50 μm^2 , para cada uma das variáveis (representadas em suas respectivas unidades).

4.7 Quantificação sérica de adiponectina

A concentração sérica de adiponectina foi determinada por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando-se kit comercial (RAB1115 – Sigma, St Louis, EUA). Neste ensaio, o anticorpo específico para adiponectina está previamente fixado à placa de 96 poços. A adiponectina presente nas amostras se liga ao anticorpo de captura e é detectada, na sequência, por um anticorpo primário. Os padrões e amostras (diluídas 1:20000) foram pipetados nos poços, em duplicata, e incubados por 2 h 30 min. Após a remoção

de quaisquer substâncias não ligadas ao anticorpo imobilizado, adicionou-se aos poços o anticorpo com biotina e incubou-se por mais 1 hora.

Após a lavagem, a peroxidase conjugada com avidina (HRP) foi adicionada, incubando-se por mais 45 min, nova lavagem foi realizada para remover qualquer resquício de avidina não ligada, uma solução de substrato foi adicionada aos poços. Após 30 min de incubação no escuro, as amostras apresentaram uma coloração azulada que é proporcional à quantidade presente do peptídeo de interesse. Após 30 min interrompeu-se a reação enzimática e a intensidade da cor amarelada foi determinada pela leitura da absorbância em 450 nm.

O resultado foi normalizado pela quantidade de proteínas totais, através da utilização de parte do soro para determinar a concentração de proteína pelo kit de ensaio proteico BCATM (PIERCE Biotechnology). Sendo os resultados apresentados em (ug/ml)/ug proteína.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 8.0, com dados apresentados em média \pm erro padrão da média. Após confirmar que os resultados apresentam distribuição gaussiana com o teste de normalidade Shapiro-Wilk, as análises estatísticas foram realizadas com teste ANOVA de duas vias, e posterior teste de Tukey para comparações entre grupos no caso de diferenças significantes. O teste de correlação de Pearson foi usado para analisar a associação entre as variáveis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Consumo de ração e água durante o protocolo experimental

A média do consumo diário de ração por animal calculada a partir dos dados das dez semanas não foi diferente entre os grupos (Figura 12A). Cada animal do grupo NO-CO consumiu em média 2,50g diariamente, os animais do grupo NO-PG consumiram 2,45g por dia, o grupo HFF-CO 2,43g e o grupo HFF-PG consumiu 2,21g por dia. No entanto, com os resultados expressos em kcal/animal, nota-se um consumo calórico maior nos animais dos grupos HFF-CO e HFF-PG em comparação com os animais mantidos com alimentação normocalórica (Figura 12B; $p < 0.0001$). Além disso, no consumo diário de água por animal, realizado em paralelo ao consumo de ração e com o mesmo padrão de avaliação, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, que exibiram valores próximos a 3 ml/animal como consumo (Figura 12C).

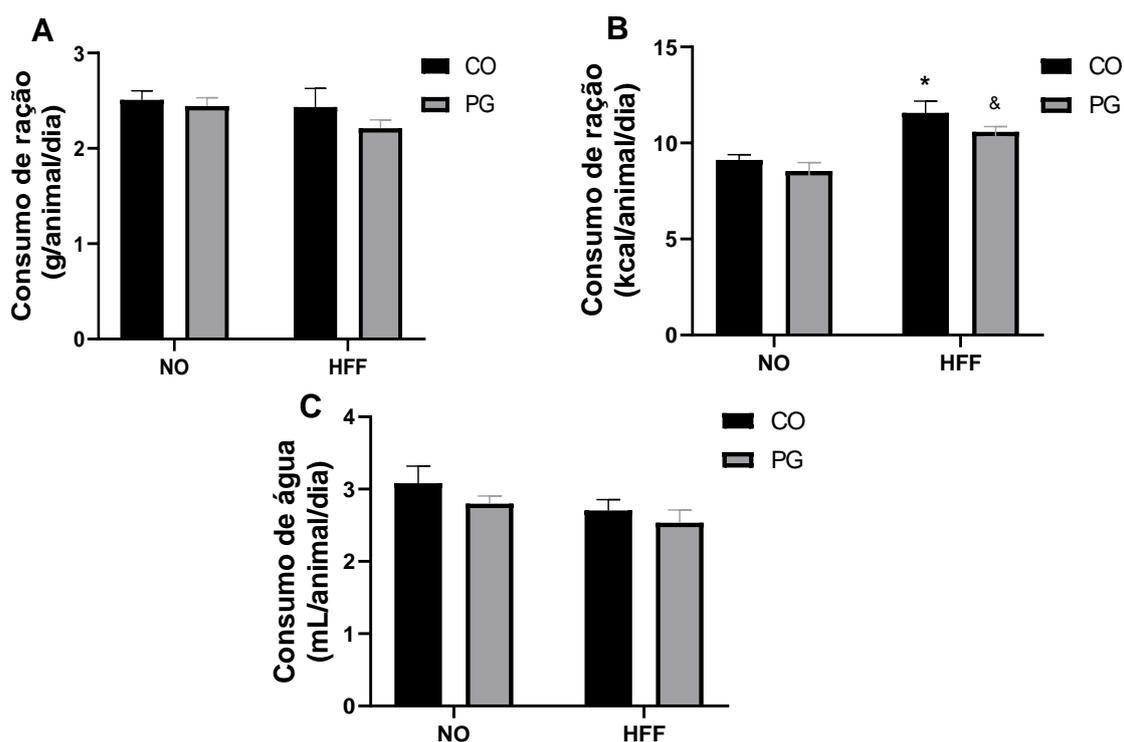


Figura 12: Registros de consumo. (A) Média do consumo de ração diário. **(B)** Média do consumo calórico diário. **(C)** Média do consumo de água diário. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG, # $p \leq 0,05$ vs. NO-PG. NO-CO (n=11), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=10), HFF (n=13).

5.2 Acompanhamento do peso corporal

A Figura 13 mostra a evolução do peso corporal dos animais ao longo de todo o protocolo experimental. É possível observar que os animais iniciaram o protocolo com o peso por volta de 16 g em todos os grupos, e a partir da quarta semana foi notável a diferença estatística dada pela alimentação, uma vez que os animais que consumiram ração rica em gordura passaram a apresentar peso maior do que os alimentados com ração normocalórica.

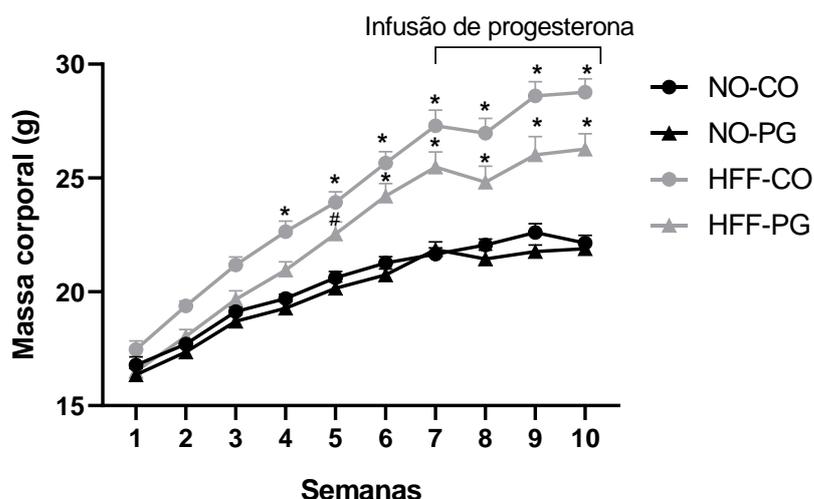


Figura 13: Evolução do peso corporal. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG; # $p \leq 0,05$ vs. NO-CO. NO-CO (n=11), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=10), HFF (n=13).

Inicialmente essa diferença foi identificada apenas no grupo HFF-CO em relação aos grupos normocalóricos (NO-CO e NO-PG), enquanto a evolução de peso no grupo HFF-PG ocorreu paulatinamente, exibindo primeiro diferença estatística em relação ao grupo NO-CO na semana 5, e finalmente em relação aos dois grupos normocalóricos na semana 6. Note-se que um possível efeito da progesterona só pode ser observado a partir da sétima semana quando foram implantadas as mini-bombas osmóticas e, embora o peso dos animais tenha reduzido levemente da sétima semana para a oitava, devido à cirurgia, nenhuma diferença estatística foi induzida pelo hormônio. É importante ressaltar que o peso dessas bombas não foi considerado para tais análises, pois subtraiu-se o peso da bomba implantada no animal do peso aferido na balança.

Observando o peso final dos animais (Figura 14A), determinado no momento da eutanásia, evidencia-se o fator da alimentação hipercalórica contribuindo com o aumento do peso final dos animais em relação aos dois grupos normocalóricos. Em

concordância, a análise estatística (Figura 14B, $p < 0.0001$) também mostra esse mesmo papel da ração hipercalórica sobre o ganho de peso total dos animais, calculado pela diferença entre o peso na hora da eutanásia e no início do protocolo. Nessa análise, os animais dos grupos HFF-CO e HFF-PG acumularam um ganho de peso de 12,21g e 10,53g respectivamente, enquanto os grupos NO-CO e NO-PG ganharam, em média, 6,74g e 7,39g de peso corporal, respectivamente.

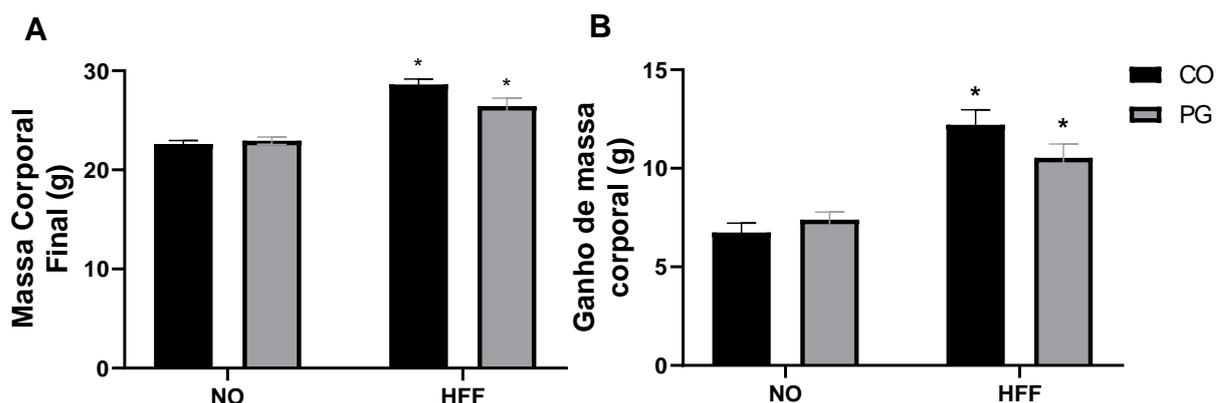


Figura 14: Registro de massa. (A) Massa Corporal Final. (B) Ganho de Massa Corporal. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: $*p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG. NO-CO (n=11), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=10), HFF (n=13).

5.3 Metabolismo glicêmico

5.3.1 Pré-protocolo

Antes do início do protocolo, quando não havia nenhuma diferença de tratamento entre os grupos, seja de dieta ou de progesterona, os animais foram separados em dois grandes grupos que corresponderiam, ao início do protocolo, aos grupos NO e HFF. E, ao verificarmos a glicemia de jejum destes, não observamos diferenças estatísticas entre eles (NO: $106 \pm 3,75$ mg/dL e HFF: $109,66 \pm 2,42$ mg/dL) (Figura 15A). De modo semelhante, o teste de tolerância à glicose realizado neste período também não revelou diferenças significativas entre os grupos tanto na curva glicêmica (Figura 15B) quanto no gráfico da área sob a curva (Figura 15C), como esperado. Contudo, no teste de tolerância à insulina podemos observar que apesar das atuações dos grupos representadas na curva glicêmica não terem diferido significativamente (Figura 15D), o gráfico da constante de decaimento da glicose apresentou uma diferença significativa no grupo HFF em contraponto ao grupo NO (Figura 15E).

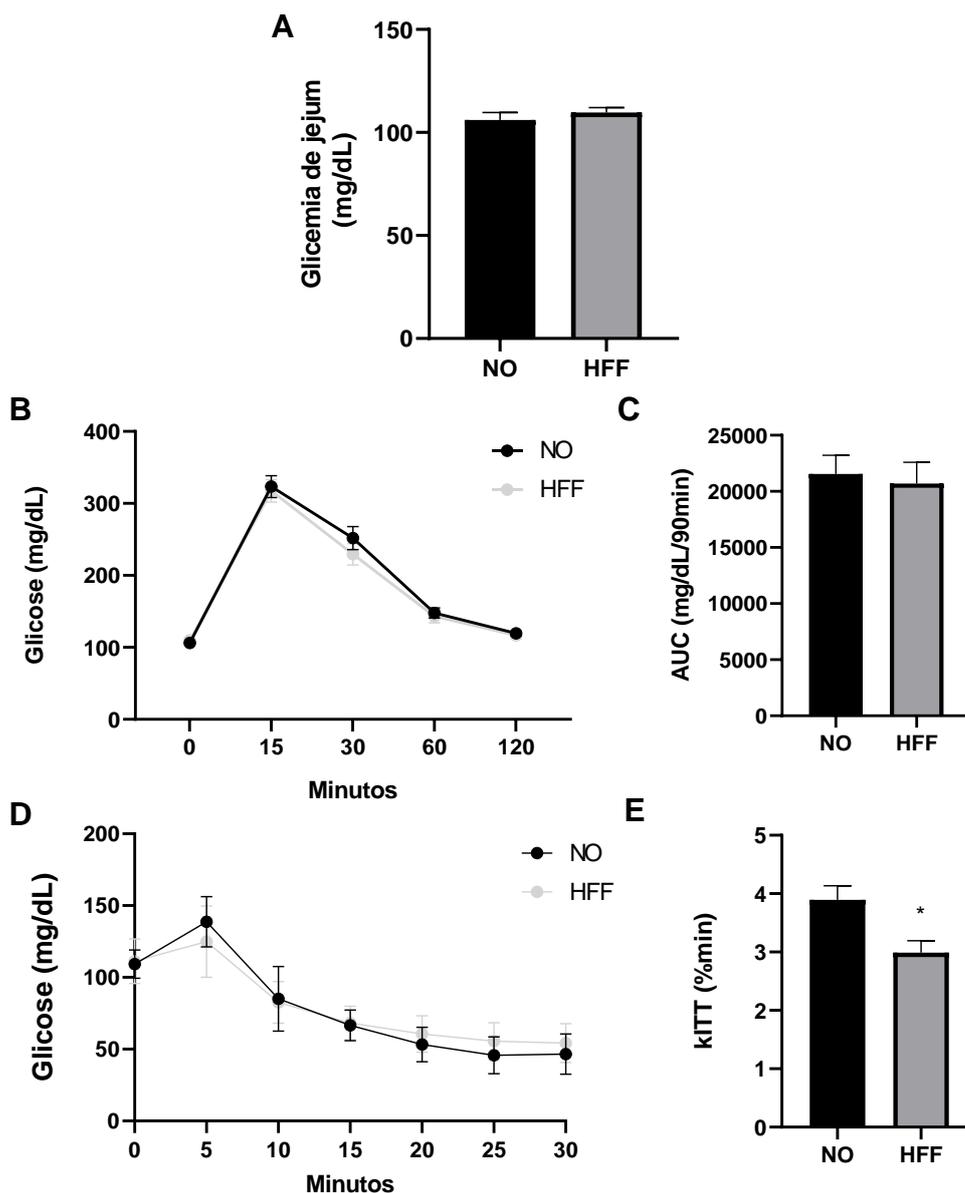


Figura 15: Metabolismo glicêmico pré-protocolo. (A) Glicemia de jejum. **(B)** Curva glicêmica obtida de teste de tolerância à glicose (GTT). **(C)** Área sob a curva. **(D)** Curva glicêmica obtida de teste de tolerância à insulina (ITT). **(E)** kITT. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO. NO (n=17) e HFF (n=18).

5.3.2 Pós-protocolo

No fim da última semana do protocolo (10^a semana), ao verificarmos a glicemia de jejum, observamos que a dieta hipercalórica (HFF-CO = $143,1 \pm 6,47$ mg/dL; HFF-PG = $141,89 \pm 4,68$ mg/dL) levou a um aumento na glicemia em jejum em comparação com a dieta normocalórica (NO-CO = $131,5 \pm 4,4$ mg/dL; NO-PG = $127,88 \pm 6,93$ mg/dL). (Figura 16A; $p = 0.03$). Semelhantemente, o GTT revelou por meio da curva glicêmica que os animais dos grupos hipercalóricos permaneceram acima da curva observada nos animais dos grupos normocalóricos. Observou-se diferença significativa ($p = 0.001$) no minuto 15 entre HFF-CO e o grupo NO-CO, e no minuto 30 diferença entre o grupo HFF-CO contra os grupos NO-CO ($p = 0.0001$), NO-PG ($p = 0.0001$) e HFF-PG ($p = 0.03$) (Figura 16B). Esses resultados refletiram na área sob a curva, que foi estatisticamente maior em animais dos grupos HFF-CO e HFF-PG comparados aos animais NO-CO e NO-PG (Figura 16C; $p = 0.0005$). Já no ITT apesar de a constante de decaimento da glicose registrada no final do protocolo não diferir entre os grupos (Figura 16E), observamos que a curva glicêmica dos grupos HFF-CO ($p = 0.03$) e HFF-PG ($p = 0.0001$) no minuto 5 foram mais elevadas que no grupo NO-CO, e no minuto 10 o grupo HFF-PG manteve a diferença ($p = 0.004$) com o grupo NO-CO (Figura 16D).

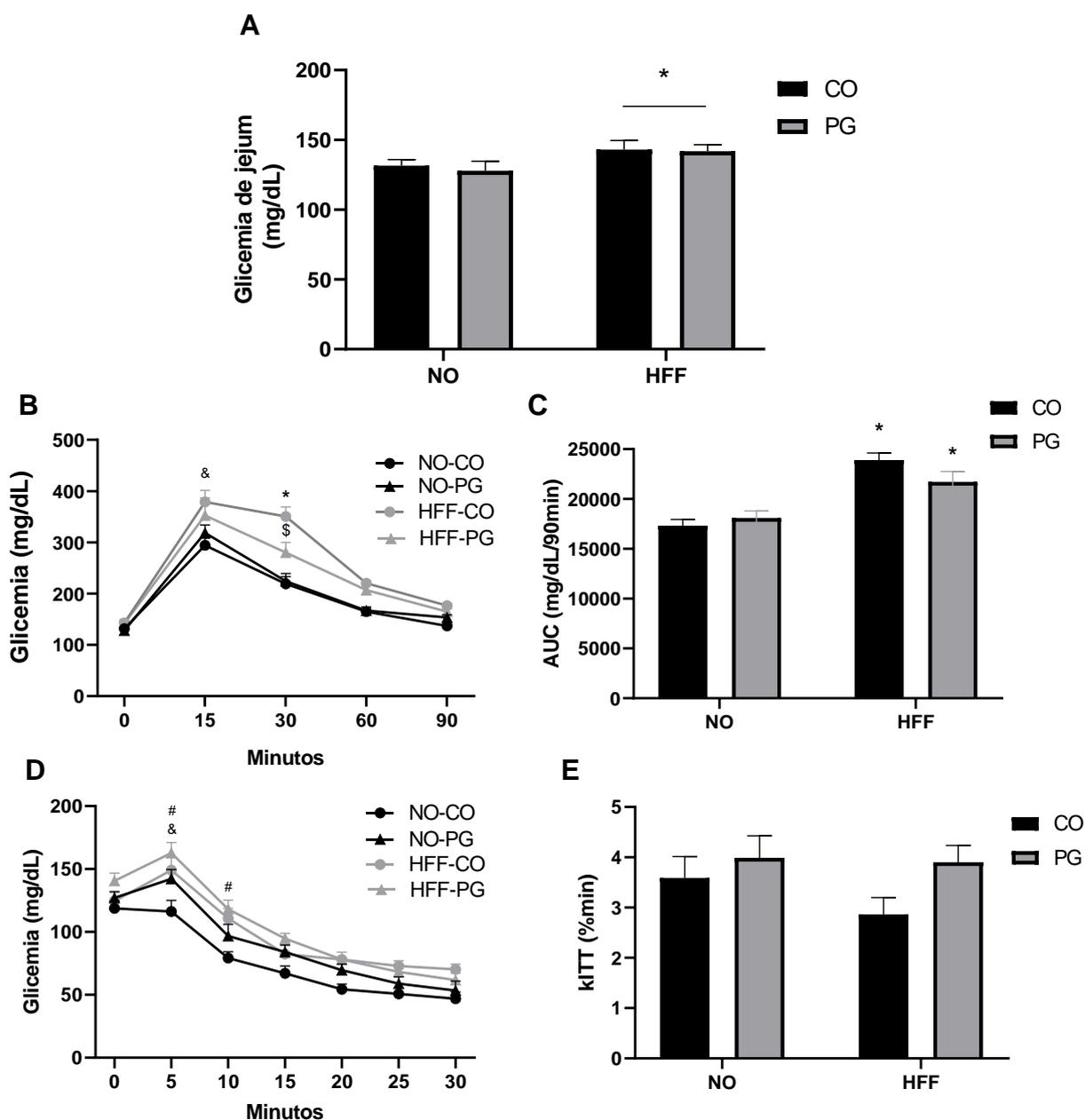


Figura 16: Metabolismo glicêmico pós-protocolo. (A) Glicemia de jejum. **(B)** Curva glicêmica obtida de teste de tolerância à glicose (GTT). **(C)** Área sob a curva. **(D)** Curva glicêmica obtida de teste de tolerância à insulina (ITT). **(E)** kITT. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: $*p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG, $\&p \leq 0,05$ HFF-CO vs. NO-CO, $\$p \leq 0,05$ vs. HFF-PG, $\#p \leq 0,05$ NO-CO vs. HFF-PG. NO-CO (n=11), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=10), HFF-PG (n=9).

5.4 Parâmetros metabólicos em repouso e em teste de esforço físico máximo

Através da técnica de calorimetria indireta pudemos avaliar alguns parâmetros metabólicos dos animais, durante o estado de repouso e durante o teste de esforço físico máximo. Pode-se observar na Tabela 4 os resultados de todos os parâmetros avaliados durante o teste de repouso, no qual o consumo de oxigênio (VO_2) e a produção de gás carbônico (VCO_2) não diferiram significativamente entre os grupos. O coeficiente respiratório (QR), calculado a partir da razão VCO_2 e VO_2 , também não diferiu entre os grupos. Além disso, os outros parâmetros, calculados a partir do VO_2 , como o gasto energético, as taxas de oxidação de carboidratos e de lipídios, também não foram diferentes.

No intuito de identificar se a dieta hipercalórica e/ou PG provocaria alteração na capacidade aeróbia dos animais, verificamos os parâmetros metabólicos durante o teste de esforço físico máximo. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos quando os animais foram desafiados com o esforço físico em esteira, em que os grupos alimentados com dieta hipercalórica apresentaram redução significativa do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx.}$; $p = 0.02$), da produção máxima de gás carbônico ($VCO_{2máx.}$; $p = 0.001$) e do gasto energético (GE; $p = 0.03$) em relação aos animais alimentados com dieta normocalórica.

Tabela 4: Calorimetria indireta em repouso e em teste de esforço físico máximo

	Em repouso			
	NO-CO	NO-PG	HFF-CO	HFF-PG
VO ₂ (ml/min/kg)	34,77 ± 5,59	35,16 ± 3,45	37,28 ± 3,32	32,59 ± 2,94
VCO ₂ (ml/min/kg)	27,15 ± 3,48	28,33 ± 2,62	23,90 ± 2,09	27,01 ± 1,50
QR	0,78 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,71 ± 0,05	0,85 ± 0,03
GE (kcal/kg/dia)	244,43 ± 36,54	246,80 ± 23,09	234,21 ± 27,42	226,38 ± 18,84
Oxidação de carboidratos	75,61 ± 15,42	69,06 ± 9,78	110,01 ± 21,39	61,60 ± 8,88
Oxidação de lipídios	14,40 ± 4,35	11,42 ± 3,17	22,35 ± 3,50	9,33 ± 2,62
	Em teste de esforço físico máximo			
	NO-CO	NO-PG	HFF-CO	HFF-PG
Tempo (min)	24,25 ± 1,25	27,25 ± 0,92	23 ± 1,71	23,43 ± 1,02
Vel. máx. (cm/s)	31,25 ± 2,1	36,13 ± 1,6	29,75 ± 2,64	29,86 ± 1,56
VO ₂ máx. (ml/min/kg)	53,03 ± 2,82	47,95 ± 4,40	43,57 ± 1,63*	42,83 ± 3,09*
VCO ₂ máx. (ml/min/kg)	47,23 ± 3,35	47,20 ± 0,77	39,56 ± 2,26*	38,53 ± 1,86*
QR	0,89 ± 0,04	1,05 ± 0,10	0,93 ± 0,03	0,91 ± 0,05
iVO ₂ (cm/s)	29,86 ± 1,87	34,44 ± 1,47	28,29 ± 2,50	29,46 ± 1,27
GE (kcal/kg/dia)	375,12 ± 20,17	345,73 ± 23,57	326,40 ± 16,79*	303,67 ± 19,42*
Oxidação de carboidratos	89,70 ± 9,20	66,66 ± 19,92	71,25 ± 6,49	71,21 ± 3,71
Oxidação de lipídios	9,69 ± 4,01	1,25 ± 7,33	6,69 ± 3,03	7,18 ± 3,71

VO₂= consumo de oxigênio; VCO₂= produção de gás carbônico; QR= quociente respiratório; GE= Gasto energético; VO₂máx= Consumo de oxigênio máximo; VCO₂máx= produção de gás carbônico máximo; iVO₂= Intensidade associada ao consumo máximo de oxigênio. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: **p* ≤ 0,05 vs. NO-CO e NO-PG. NO-CO (n=8), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=8), HFF-PG (n=7).

5.5 Peso dos depósitos adiposos

Na Tabela 5 estão apresentados os valores do peso dos tecidos corrigidos pelo peso corporal registrado no momento do procedimento de morte. Os depósitos de TAB-SC e TAB-RP aumentaram significativamente ($p < 0.0001$) nos grupos HFF-CO e HFF-PG comparados aos grupos NO-CO e NO-PG. Por outro lado, o TAM não exibiu nenhuma diferença significativa em relação à dieta e nem ao tratamento de progesterona.

Tabela 5: Pesos dos tecidos (mg/g)

Tecido (mg/g)	NO-CO	NO-PG	HFF-CO	HFF-PG
TAB-SC	19,41 + 1,55	17,95 + 1,95	37,56 ± 1,91*	30,25 ± 3,33*
TAB-RP	4,63 ± 0,58	4,55 ± 0,46	12,47 ± 1,01*	12,79 ± 1,79*
TAM	2,91 ± 0,33	3,33 ± 0,42	2,58 ± 0,24	2,22 ± 0,24

Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG. NO-CO (n=11), NO-PG (n=8), HFF-CO (n=10), HFF-PG (n=13).

5.6 Parâmetros morfométricos do TAB-RP

Os parâmetros morfométricos dos adipócitos TAB-RP de camundongos alimentados com dieta hipercalórica, representados na Figura 17A, diferiram estatisticamente na área ($p < 0.0001$), diâmetro ($p < 0.0001$), volume ($p < 0.006$) e massa ($p < 0.0003$) dos adipócitos (Figura 17B, C, D e E, respectivamente), em comparação aos grupos que receberam dieta normocalórica. Os animais que receberam dieta hipercalórica apresentaram adipócitos com área, diâmetro, volume e massa maiores do que os animais com dieta normocalórica. No entanto, o número de adipócitos (Figura 17F) não foi diferente entre os grupos experimentais.

A

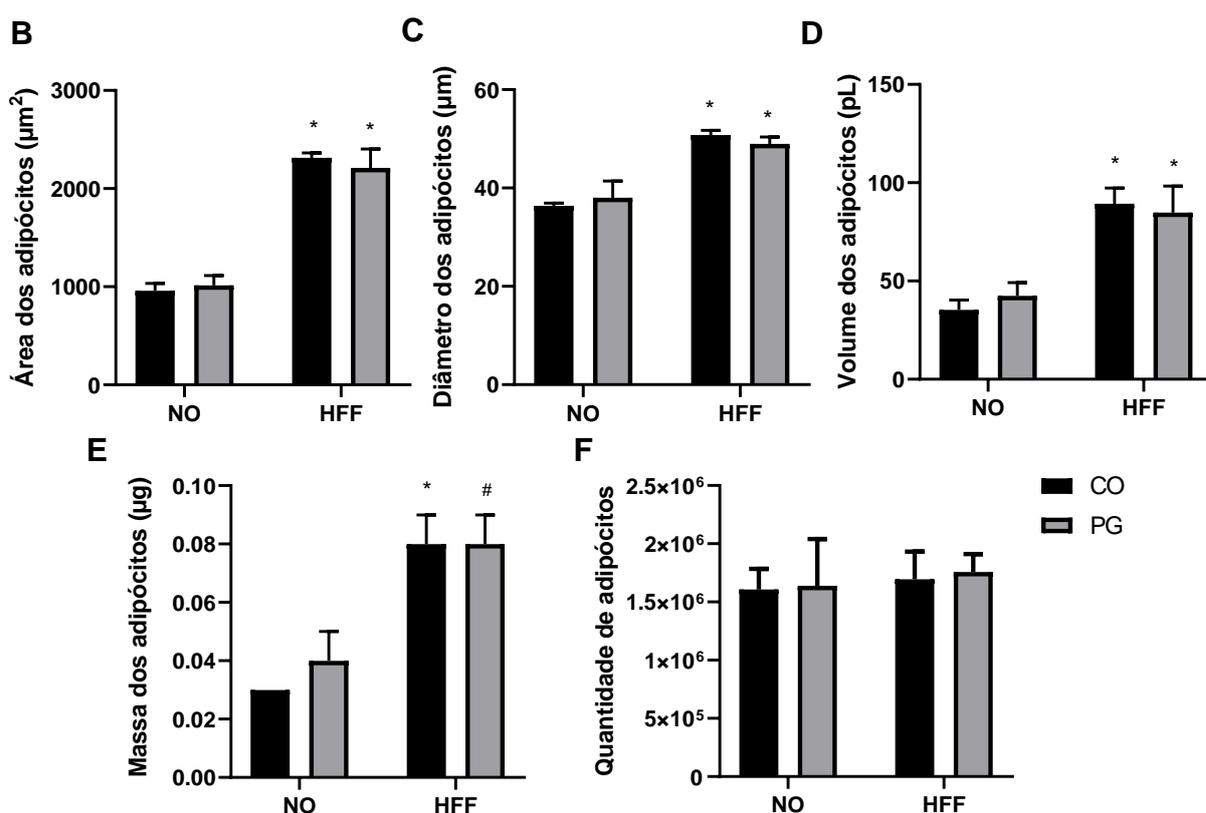
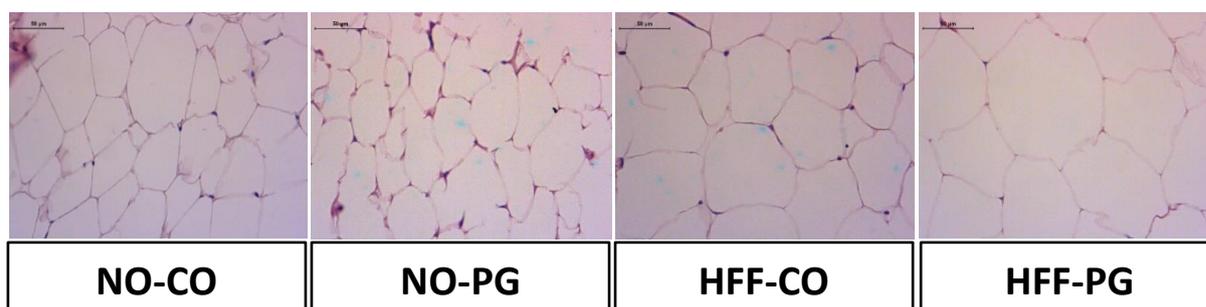


Figura 17: Morfometria de adipócitos do TAB-RP. (A) Imagens representativas do TAB-RP de animais dos grupos NO-CO, NO-PG, HFF-CO e HFF-PG com aumento de 400X. **(B)** Área dos adipócitos. **(C)** Diâmetro dos adipócitos. **(D)** Volume dos adipócitos. **(E)** Massa dos adipócitos. **(F)** Quantidade de adipócitos no depósito. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG, # $p \leq 0,05$ vs. NO-CO. NO-CO (n=7), NO-PG (n=5), HFF-CO (n=8), HFF-PG (n=8).

- **Distribuição da frequência de adipócitos do TAB-RP por tamanho**

Quando observamos a frequência do tamanho dos adipócitos (em porcentagem) no tecido adiposo branco retroperitoneal (Figura 18), vemos que os dois grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram, em relação aos grupos NO-CO e NO-PG, maior porcentagem de adipócitos muito grandes em detrimento dos adipócitos pequenos e médios. Nesse sentido, obtivemos diferenças significativas na porcentagem de adipócitos médios do grupo HFF-CO em relação aos adipócitos médios dos grupos NO-CO e NO-PG. Já o percentual de adipócitos muito grandes do grupo HFF-CO diferiu significativamente do percentual desses adipócitos nos grupos NO-CO e NO-PG. No grupo HFF-PG, similarmente ao grupo HFF-CO, foi possível observar diferença significativa nos adipócitos médios em relação ao grupo NO-CO. E os adipócitos muito grandes do grupo HFF-PG também diferiram do grupo NO-CO.

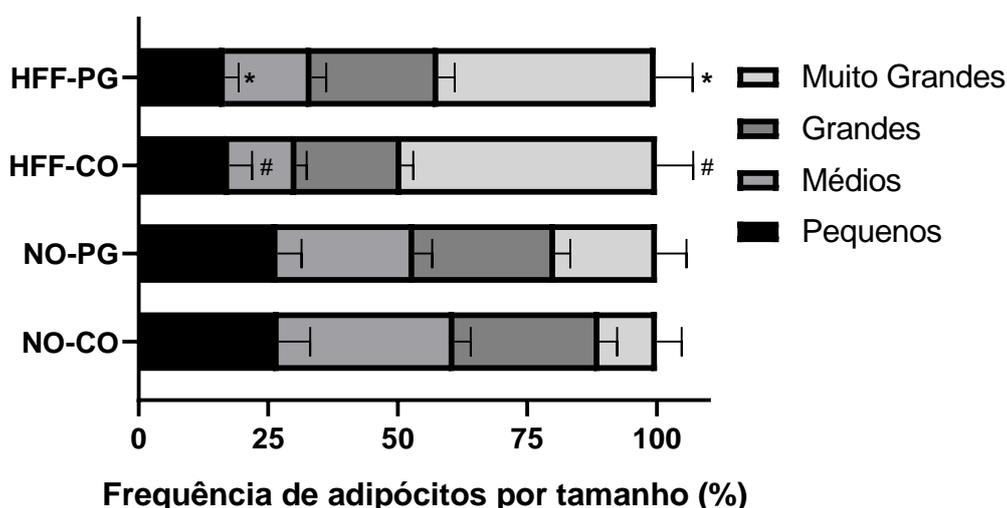


Figura 18: Frequência de adipócitos por tamanho no TAB-RP. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG; # $p \leq 0,05$ vs. NO-CO. NO-CO (n=7), NO-PG (n=5), HFF-CO (n=8), HFF-PG (n=8).

5.7 Parâmetros morfométricos do TAB-SC

As análises morfométricas dos adipócitos do TAB-SC, apresentadas na Figura 19A, indicam que os grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos NO-CO e NO-PG, tanto na área quanto no diâmetro dos adipócitos, com aumento de 90,40% e 60,1% na área (Figura 19B; $p < 0.0001$) e de 38,36% e 26,43% no diâmetro (Figura 19C; $p < 0.0001$). No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas no volume dos adipócitos (Figura 19D).

Quanto à massa dos adipócitos, foi constatada diferença significativa na média de massa entre os grupos HFF-CO e NO-CO, com um aumento de 150% na massa dos adipócitos do grupo HFF-CO (Figura 19E; $p < 0.001$). Por fim, em relação ao número de adipócitos, as médias dos grupos foram similares, indicando que não houve diferença quantitativa entre eles (Figura 19F).

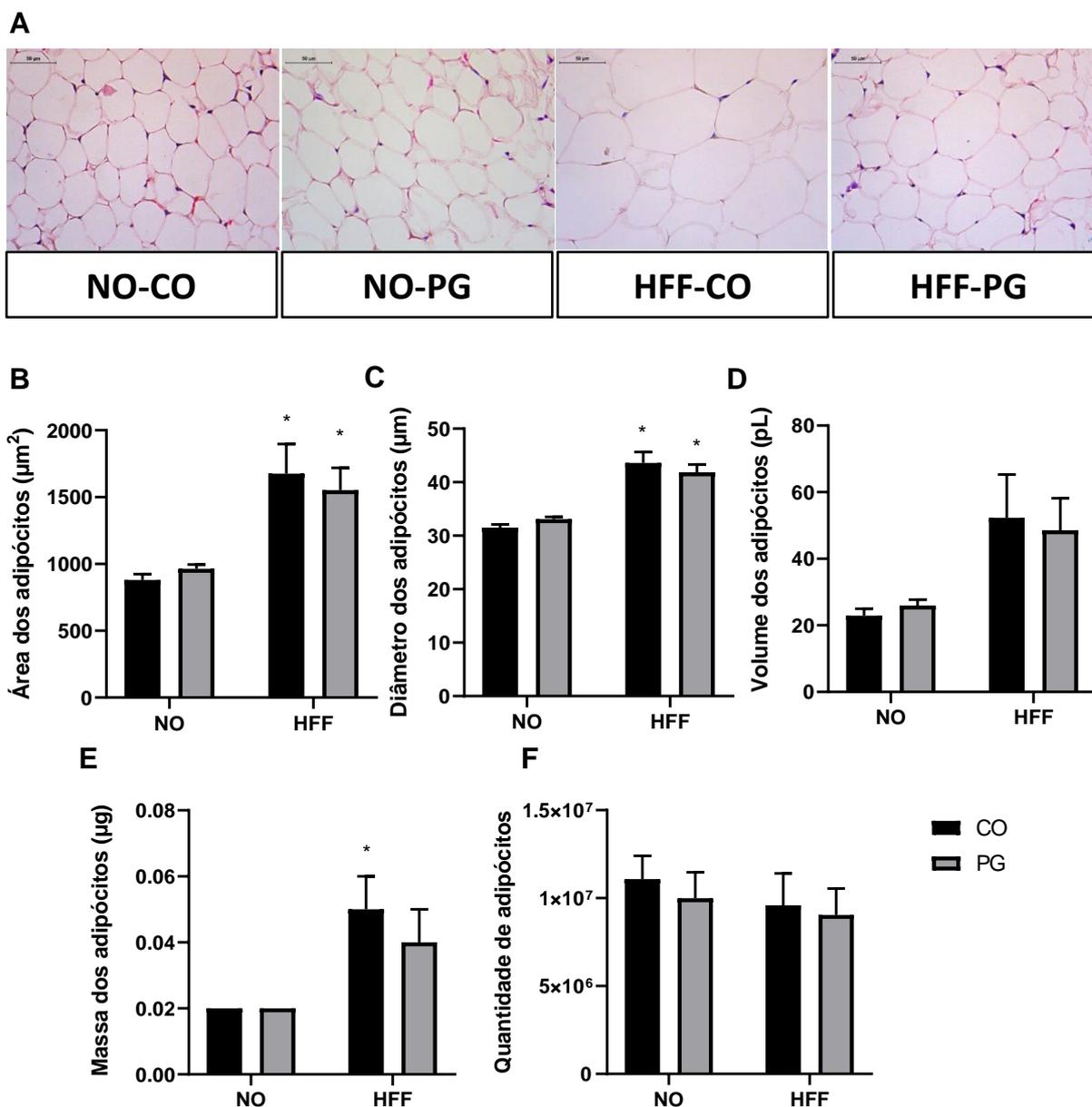


Figura 19: Morfometria de adipócitos do TAB-SC. (A) Imagens representativas do TAB-SC de animais dos grupos NO-CO, NO-PG, HFF-CO e HFF-PG com aumento de 400X. **(B)** Área dos adipócitos. **(C)** Diâmetro dos adipócitos. **(D)** Volume dos adipócitos. **(E)** Massa dos adipócitos. **(F)** Quantidade de adipócitos no depósito. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG, # $p \leq 0,05$ vs. NO-CO. NO-CO (n=8), NO-PG (n=6), HFF-CO (n=5), HFF-PG (n=8).

- **Distribuição da frequência de adipócitos do TAB-SC por tamanho**

Quando observamos a frequência do tamanho dos adipócitos (em porcentagem) no tecido adiposo branco subcutâneo (Figura 20), vemos que, assim como nas análises do TAB-RP, os dois grupos HFF apresentaram, em relação aos grupos NO, maior porcentagem de adipócitos Muito Grandes em detrimento dos outros três tamanhos. Nesse sentido, obtivemos diferenças significativas na porcentagem de adipócitos muito grandes do grupo HFF-CO, diferindo dos adipócitos muito grandes dos grupos NO-CO e NO-PG. No grupo HFF-PG, similarmente ao grupo HFF-CO, foi possível observar diferença significativa no percentual de adipócitos muito grandes em relação ao percentual dos grupos NO-CO e NO-PG.

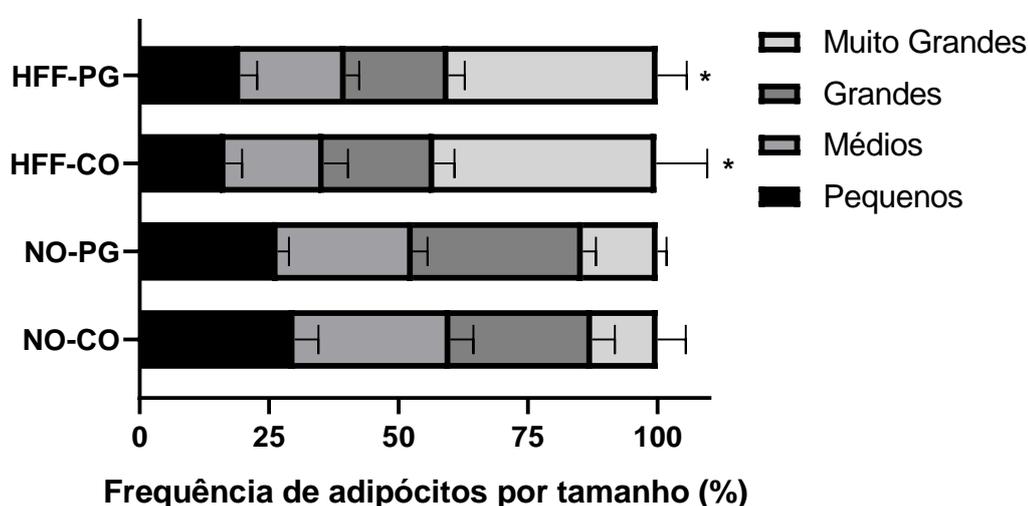


Figura 20: Frequência de adipócitos por tamanho no TAB-SC. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey: NO-CO (n=8), NO-PG (n=6), HFF-CO (n=5), HFF-PG (n=8). * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG.

5.8 Parâmetros morfométricos do TAM

As análises morfométricas das gotículas de lipídeos do TAM, mostraram médias similares nos quatro grupos em todas as variáveis analisadas: área (Figura 22B), diâmetro (Figura 22C), volume (Figura 22D), massa (Figura 22E) e quantidade total de gotículas (Figura 22F) no depósito TAM. Já a análise do número de gotículas de lipídeos por campo (Figura 22F) mostrou que, apesar do grupo NO-CO apresentar o número de gotículas levemente aumentado em relação aos outros grupos, não obtivemos diferenças significativas nesse quesito. Vale comentar que os cálculos de frequência por tamanho não foram realizados neste tecido devido a metodologia optada de se considerar apenas os adipócitos com área maiores que 50 μm para os cálculos de todas as variáveis.

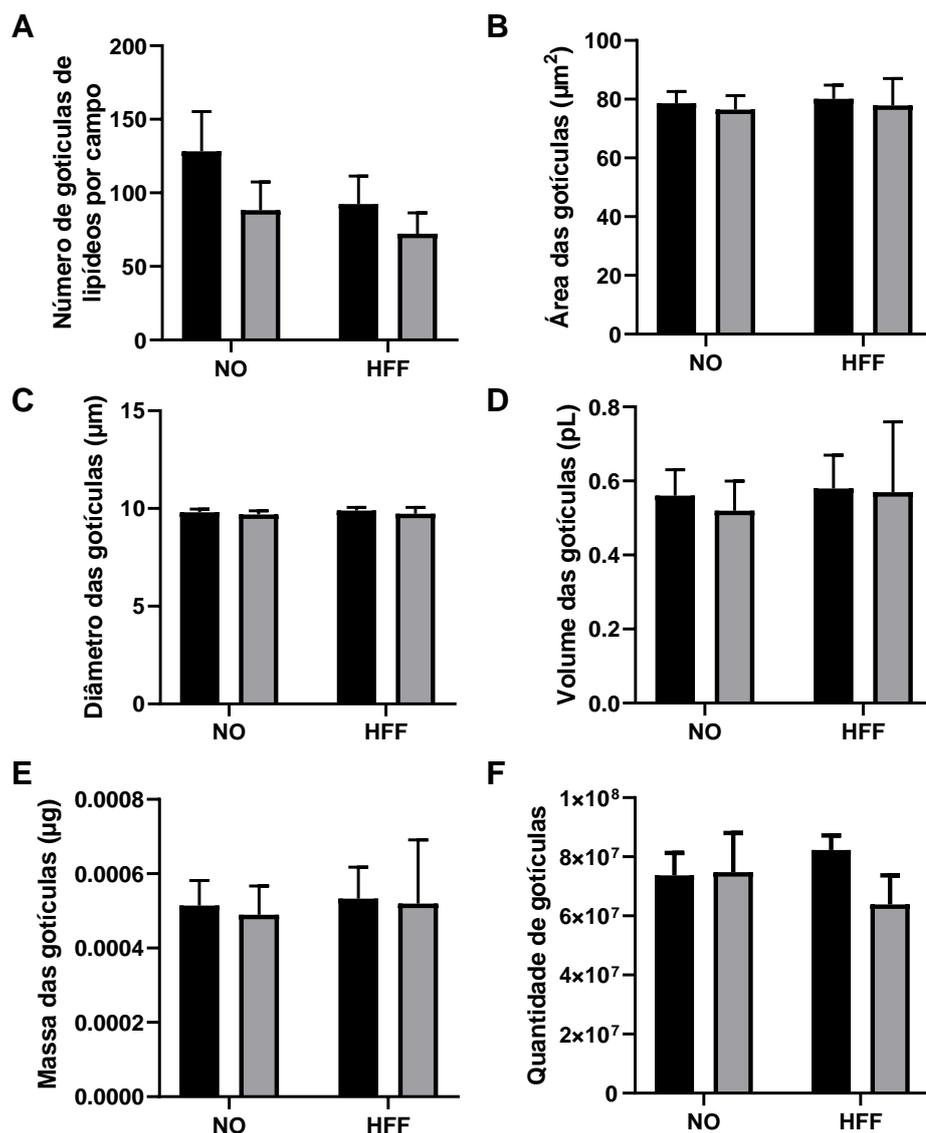


Figura 21: Morfometria de adipócitos do TAM. (A) Número de gotículas de lipídeos por campo de análise. (B) Área das gotículas. (C) Diâmetro das gotículas. (D) Volume das gotículas. (E) Massa das gotículas. (F) Quantidade de gotículas no depósito. Os resultados estão apresentados como média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey. NO-CO (n=8), NO-PG (n=6), HFF-CO (n=7), HFF-PG (n=6).

5.9 Determinação da concentração sérica de adiponectina

A concentração de adiponectina no grupo HFF-CO foi significativamente menor do que nos grupos NO-CO ($p = 0.002$) e NO-PG ($p = 0.0004$) (Figura 22). Além disso, a média do grupo HFF-PG também foi significativamente menor que a do grupo NO-PG ($p = 0.04$).

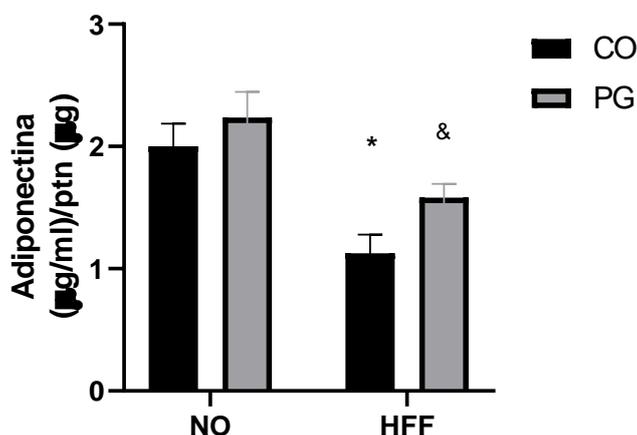


Figura 22: Concentração sérica de adiponectina. Valores representam a média + EPM após teste estatístico ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey para comparações múltiplas: * $p \leq 0,05$ vs. NO-CO e NO-PG; & $p \leq 0,05$ vs. NO-PG. NO-CO (n=10), NO-PG (n=7), HFF-CO (n=10), HFF-PG (n=11).

5.10 Correlação entre adiponectina e metabolismo da glicose

Ao correlacionarmos os valores de todos os grupos, verificamos que a concentração sérica de adiponectina foi positivamente correlacionada com o kITT ($r=0,67$) (Figura 23A) e negativamente com a AUC ($r=-0,69$) (Figura 23B).

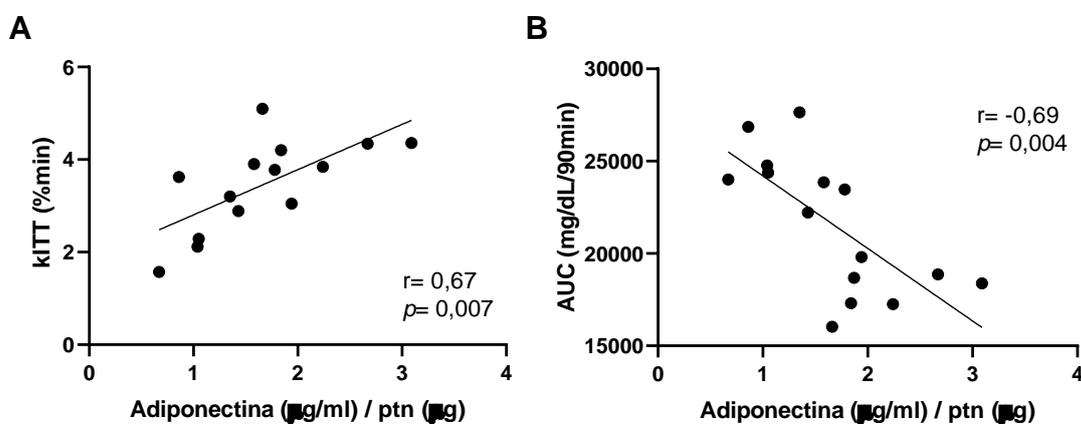


Figura 23: Correlações entre concentração de adiponectina e metabolismo da glicose. (A) Correlação de adiponectina e kITT. (B) Correlação de adiponectina e AUC. Os dados foram analisados por teste de correlação de Pearson.

6. DISCUSSÃO

A prevalência crescente da obesidade entre mulheres em idade reprodutiva pode ser particularmente prejudicial em fases específicas da vida, como durante a gestação. Neste trabalho estudamos o metabolismo glicêmico e as características morfofuncionais do tecido adiposo em camundongos C57BL/6 fêmeas obesas, submetidos a tratamento com progesterona em concentrações semelhantes às observadas durante a gestação. Para atingir os objetivos deste trabalho utilizamos um modelo de obesidade induzido por dieta (diet-induced obesity – DIO). Este modelo possui diversas formulações de dietas ricas em gordura e tem sido amplamente utilizado para induzir a obesidade em modelos animais, levando a alterações no ganho de peso, na composição corporal e nas células do tecido adiposo (HARIRI & THIBAUT, 2010), visando estudar a homeostase atípica responsável pela obesidade humana (SPEAKMAN, 2019). Além da gordura em si, devido ao seu amplo uso comercial e sua presença em diversos alimentos e bebidas, a frutose também tem sido amplamente usada em modelos animais de obesidade para estudar a síndrome metabólica, inflamação induzida pela obesidade e resistência à insulina (AMRI et al., 2020), hora com a frutose adicionada à água dos animais, outra incorporada à dieta.

Mesmo que a dieta rica em frutose não necessariamente leve à obesidade (ZAMAN et al., 2011), seu consumo prolongado pode resultar em um aumento na ingestão calórica, contribuindo para o ganho de peso e o desenvolvimento da obesidade (SHAPIRO et al., 2008). Neste estudo, utilizamos uma dieta hiperlipídica e hiperfrutosídica de formulação própria, contendo aproximadamente 31 g/kg de gordura saturada, 24 g/kg de frutose. O valor calórico total (VCT) de 60,23% de lipídios está dentro da faixa de dietas (45-60% kcal de gorduras) comumente utilizadas para induzir o fenótipo de obesidade (MORRISON et al., 2020). Contudo, apesar de Heydemann (2016) relatar que dietas com teor de gordura acima de 45% interferem em sua palatabilidade, não identificamos diferenças nas médias de consumo (em gramas por animal) entre os grupos que receberam a dieta normocalórica e os que receberam a hipercalórica. Podemos dizer então que a alta porcentagem de gordura não ofereceu dificuldade no consumo da dieta pelos grupos HFF, podendo a adição de frutose na ração ter favorecido a manutenção desse consumo.

Falando sobre o ganho de peso durante o protocolo, vimos que os grupos HFF apresentaram maior ganho de peso a partir da 4ª semana, e essa diferença persistiu até o fim da 10ª semana do protocolo. Esse ganho foi devido unicamente à maior ingestão de calorias proporcionada pela dieta HFF, o que se comprova com o fato de que o gasto energético (GE) em repouso, mensurado na calorimetria, não ter diferido entre os 4 grupos experimentais. Somando-se a isso, ao término do protocolo, foi constatado que os animais dos grupos HFF apresentaram maior adiposidade, ou seja, os depósitos de gordura subcutâneos e retroperitoneais se apresentaram em maior quantidade, que nos grupos NO-CO e NO-PG, caracterizando o modelo de obesidade.

No contexto da infusão de progesterona nesses animais, sabemos que há uma associação significativa entre ela e a regulação do peso corporal em modelos de roedores. Como vemos no trabalho de Hervey & Hervey, (1967) no qual ratas fêmeas foram injetadas com 5 mg/dia de progesterona e apresentaram um maior ganho de peso do que o grupo controle. Enquanto os controles ganharam 0,4 g por dia, as ratas tratadas com PG ganharam 2 g de peso no mesmo período. Indo ao encontro do trabalho de Krotkiewski & Björntorp (1976), no qual foram utilizadas ratas tratadas com 2mg/kg de PG intravenosamente. O protocolo durou 10 semanas e as injeções de PG foram repetidas a cada duas semanas, totalizando 5 injeções de progesterona que resultaram em um aumento do peso corporal refletido, principalmente, em um aumento do peso do tecido adiposo branco, bem como aumento no tamanho dos seus adipócitos. Contudo, neste presente trabalho, provavelmente devido a menor concentração de PG utilizada (0,25 mg/kg/dia), esse hormônio não teve efeito agravante sobre o ganho de peso corporal e nem sobre a adiposidade induzidos pela dieta HFF.

Em relação ao metabolismo glicêmico dos animais, avaliado neste trabalho, ao olharmos os testes glicêmicos feitos na última semana do protocolo, observamos uma maior glicemia de jejum nos grupos HFF-CO e HFF-PG. Somando-se isso ao resultado da área sob a curva (AUC), medida crucial para avaliar o metabolismo da glicose e a sensibilidade do indivíduo à insulina (LIAO et al., 2023), que foi estatisticamente maior nos animais dos dois grupos HFF, constatamos que um quadro de intolerância à glicose foi instaurado nos grupos HFF em relação aos animais que receberam a dieta normocalórica. Esses dados corroboram os dados de outros grupos (MIR et al., 2012; KIM et al., 2012; GORRES-MARTENS et al., 2018), nos

quais a dieta hipercalórica prejudicou o metabolismo glicêmico dos camundongos, tendo em vista que ela dificulta o transporte de glicose nos tecidos sensíveis à insulina gerando RI, e ocasionando uma hiperglicemia de jejum nesses animais (BURCELIN, 2002; YADIKAR, 2022). Esses resultados se alinham com outros da literatura (MELO et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2013) que mostram que indivíduos obesos alimentados com uma dieta hiperlipídica tendem a apresentar um menor GE em repouso e glicemia de jejum mais elevada se comparados a indivíduos não obesos.

No teste de tolerância à insulina feito antes do início do protocolo, o grupo HFF revelou uma menor constante de decaimento da glicose (kITT) se comparado ao grupo NO. Entretanto, neste ponto do protocolo não havia nenhuma distinção no tratamento dos dois grupos experimentais, portanto não podemos atribuir esse resultado nem à dieta, nem à progesterona. Então é provável que esta diferença encontrada tenha sido devida ao estresse dos animais durante o teste. Ao passo que, no ITT realizado no final do protocolo, verificamos diferenças na curva de decaimento da glicose nos minutos 5 e 10. No minuto 5 os grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram o kITT mais elevado que o grupo NO-CO, e no minuto 10 somente o grupo HFF-PG manteve essa diferença do grupo NO-CO. Em concordância com o estudo promovido por Van Herck e colaboradores (2020) com camundongos machos C57BL/6J alimentados com ração rica em gordura e frutose por 10 a 32 semanas, que apresentou nos testes de GTT e ITT uma diminuição da tolerância à glicose no período da 10^a até a 15^a semana e diminuição da sensibilidade à insulina no período da 20^a até a 25^a semana. Além disso, este estudo obteve resultados gerais bem próximos dos obtidos por nós como o aumento progressivo do peso corporal total, da massa de tecido adiposo e da glicemia em jejum.

A progesterona atenuou a intolerância à glicose causada pela dieta hipercalórica no grupo HFF-PG, embora a glicemia de jejum não tenha diferido entre os grupos HFF-CO e HFF-PG. Isso foi demonstrado pelos resultados da curva glicêmica durante o GTT e a AUC. Entretanto, esses resultados vão na contramão de outros estudos como o de Kunju & Fousia (2019), que utilizaram 5, 10 e 20 mg semanais de progesterona em camundongos. Bem como o estudo de Masuyama & Hiramatsu (2011) que utilizou uma combinação de 3 mg/kg de PG acrescida de 50 µg/kg de estradiol. Ambos os estudos obtiveram a instauração de resistência à insulina

como resultante do tratamento com altas concentrações de progesterona, se comparadas à concentração utilizada neste trabalho.

Como já citado, utilizamos uma taxa de infusão de progesterona de 0,25 mg/kg/dia, com base no estudo de Rosen e colaboradores (2017) que mimetiza a concentração fisiológica de PG durante uma gestação padrão de camundongos. Entretanto dois fatos importantes sobre esse tratamento com PG devem ser pontuados, primeiro: ao optarmos por utilizar uma minibomba para infundir uma concentração constante de PG nós não pudemos mimetizar o aumento gradual da concentração de PG que ocorre durante o período gestacional; e segundo: nós não podemos afirmar com certeza qual foi, de fato, a concentração de PG que estava circulando nos animais que receberam o tratamento com a PG, pois não determinamos estes valores durante o protocolo e nem ao término da última semana dele.

O estudo promovido por Ordóñez e colaboradores (2007) utilizando ratas diabéticas ovariectomizadas, retrata a perda progressiva de sensibilidade à insulina nos animais sem nenhum tratamento hormonal. Entretanto, quando tratados com a concentração de 70ng/ml de progesterona, a sensibilidade à insulina foi maior do que nos grupos não tratados com o hormônio. Já quando utilizaram uma dosagem de 120 ng/ml de progesterona a sensibilidade foi reduzida drasticamente nas ratas diabéticas. Por isso podemos dizer que a taxa de infusão de progesterona utilizada em nosso protocolo foi incapaz de agravar a RI induzida pela dieta, e acabou por demonstrar justamente o efeito contrário, análogo ao que foi observado por Ordóñez et al. (2007).

Em síntese, nossos resultados em contraste com a literatura mostram que é primordial, ao discutirmos os efeitos da progesterona sobre o metabolismo glicêmico, levar em consideração a concentração desse hormônio em cada protocolo experimental. E, além da concentração deste hormônio, deve-se pontuar que a progesterona é apenas um dos fatores da equação quando falamos de resistência à insulina durante uma gestação. Diversos hormônios participam da regulação da sensibilidade à insulina durante o período gestacional como: cortisol, lactogênio placentário, GH e estrogênio; além das adipocinas adiponectina, leptina e fator de necrose tumoral alfa. E, tanto a própria interação destes hormônios, como suas

atuações individuais, estão envolvidas no desenvolvimento da resistência à insulina gestacional por meio de complexos processos fisiológicos (KAMPMANN et al., 2019).

No que diz respeito ao metabolismo energético dos animais, avaliado neste trabalho, e tendo em mente que existe uma associação negativa entre obesidade e VO_2 máx. (STOLZMAN et al., 2015), observamos que os grupos HFF-CO e HFF-PG apresentaram uma significativa redução na capacidade aeróbica durante o teste de esforço máximo em comparação aos grupos que receberam a dieta normocalórica. Estudos têm demonstrado consistentemente que camundongos obesos apresentam VO_2 máx. mais baixo em comparação com camundongos não obesos (MAXWELL et al., 2001). Essa redução no VO_2 máx. foi atribuída a vários fatores, incluindo capacidade aeróbica prejudicada (MAXWELL et al., 2009) e diminuição da resistência cardiorrespiratória (ĐOŠIĆ et al., 2020).

A correlação entre obesidade e diminuição do VO_2 máx. também é observada em humanos, pois pessoas com sobrepeso ou obesidade apresentam pior capacidade aeróbica do que não obesas (SCHJERVE et al., 2008). Tendo associação com o aumento de diversos riscos à saúde, como de morbidade e mortalidade cardiovascular, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (YOKOTA et al., 2011; MORALES-SUÁREZ-VARELA, 2013; KOH et al., 2018) E, apesar do fato de a progesterona afetar diretamente a capacidade aeróbica por meio de seus efeitos sobre o metabolismo energético e a função cardiorrespiratória (CONSTANTINI et al., 2005), ela não aliviou a diminuição da capacidade aeróbica associada à obesidade em animais HFF-PG.

Com relação aos resultados obtidos no TAM, é necessário conceituar o fenômeno chamado de “*whitening*” que pode ocorrer no TAM e está muito associado a condição de obesidade (SASS et al., 2021). O *whitening* é caracterizado pelo aumento da deposição de lipídios, disfunção mitocondrial (associada à rarefação vascular e inflamação) e redução da oxidação de gordura no TAM (KUIPERS et al., 2019; SASS et al., 2021). Assim, prejudicando o bom funcionamento da termogênese, propiciando a inflamação do tecido e RI (SHIMIZU et al., 2014). Justificando a correlação inversa já constatada (CYPESS et al., 2012) entre a atividade do TAM e a obesidade, e sugerindo que a ativação do TAM pode ser um meio terapêutico viável para tratar a obesidade e a diabetes.

Embora neste trabalho não tenham sido averiguadas expressões gênicas de proteínas ou adipocinas no TAM que pudessem caracterizar, ou não, a ocorrência do *whitening* no TAM, as variáveis que poderiam indicar algum indicio de sua ocorrência, não o fizeram. Não sendo verificadas diferenças significativas entre os grupos que receberam a dieta HFF e a dieta NO em nenhuma das variáveis morfométricas estudadas. Além disso, a dieta HFF não foi capaz de promover aumento no peso do depósito do TAM nos grupos HFF como fez com os depósitos de TAB, e tampouco de aumentar a média do número de gotículas superiores a $50 \mu\text{m}^2$ por campo analisado nos grupos HFF.

Apesar de não existirem muitos estudos sobre esse tema em camundongos fêmeas recém desmamadas, esse resultado é intrigante, tendo em vista que existem estudos com camundongos C57BL/6 machos adultos alimentados com dieta rica em gordura que tem resultados opostos aos deste trabalho. Como o de Rangel-Azevedo et al. (2022) que testou o aparecimento de *whitening* em diferentes duração de tempo: 12, 16 ou 20 semanas, no qual foi constatado a presença de *whitening* no TAM dos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica nos 3 tempos testados. De forma similar Miranda et al. (2020), que também utilizou dieta hiperlipídica em seu protocolo de 17 semanas com camundongos C57BL/6 machos de três meses de idade, constatou a presença de *whitening* no TAM dos animais que consumiram a dieta ao término do protocolo.

Já o estudo de Liu et al. (2015) expõe o impacto sistêmico positivo que um TAM saudável tem no indivíduo, em contraste com um TAM comprometido com disfunção devido a obesidade. No estudo em questão foram transplantados os TAMs de camundongos C57BL/6 saudáveis na região subcutânea dorsal de camundongos Ob/Ob. Este estudo revelou que o transplante gerou uma redução significativa no ganho de peso corporal, acompanhado de aumento do consumo de oxigênio e de diminuição da massa gorda corporal total, resultando na melhora da resistência à insulina dos camundongos obesos. Além disso, foi verificado um aumento no nível de adiponectina circulante e uma maior oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo branco subcutâneo e epididimal nos animais que receberam o transplante de TAM. Complementarmente, outros estudos (STANFORD et al., 2012; LIU et al., 2013) com metodologia similar, evidenciaram que o transplante de TAM saudável melhorou o gasto energético e a homeostase da glicose dos animais transplantados. Além disso,

o transplante de TAM saudável de camundongos doadores de mesma linhagem, sexo e idade, não apenas evitou o ganho de peso induzido pela dieta rica em gordura durante 20 semanas após o transplante, como também reverteu a obesidade preexistente (LIU et al., 2013), evidenciando o crítico papel do TAM como regulador metabólico.

Outros aspectos investigados neste trabalho foram os efeitos da DIO e da administração de progesterona sobre a morfometria dos adipócitos do TAB, em especial sobre o tamanho deles. Adipócitos grandes e muito grandes apresentam taxas mais elevadas de lipólise, maior resistência à insulina e maior propensão à apoptose (GHABEN & SCHERER, 2019), assim como os verificados no TAB-RP e TAB-SC dos grupos HFF-CO e HFF-PG por influência da dieta hipercalórica. Por outro lado, foi verificada uma redução na quantidade de adipócitos pequenos, que são mais sensíveis à insulina e possuem maior afinidade por ácidos graxos livres e triglicerídeos, especificamente nos grupos HFF-CO e HFF-PG do TAB-RP. Em maior número estes adipócitos atuam de forma protetora, impedindo a deposição desses lipídios em locais fora do tecido adiposo, como músculo esquelético, coração e fígado (IBRAHIM, 2010; GHABEN & SCHERER, 2019). Adicionalmente, estudos de Svensson et al. (2016) e Ghaben et al. (2019) indicam que, em comparação com os adipócitos hipertrofiados, os adipócitos pequenos exibem taxas menores de lipólise e secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de uma maior secreção de adiponectina.

Nesse contexto, qual seria o impacto na fisiologia do TA ao apresentar uma menor quantidade de adipócitos pequenos em contraste com um aumento na frequência de adipócitos muito grandes, conforme evidenciado nos grupos TAB-RP e TAB-SC? Fisiologicamente, várias hipóteses abordam a relação entre adipócitos aumentados (hipertrofiados) e disfunção metabólica, sendo a mais destacada a que sugere que adipócitos maiores apresentam funções metabólicas e endócrinas alteradas em comparação com os menores. Essa alteração inclui maior resistência à insulina e maior capacidade lipolítica, resultando na liberação aumentada de ácidos graxos não esterificados para a circulação, o que pode contribuir para disfunção metabólica e risco cardiometabólico (MARQUES et al., 2016; CLAYTON & COLLINS, 2014; GHOSH et al., 2019).

Além disso, adipócitos hipertrofiados exibem uma capacidade pró-inflamatória elevada, podendo secretar citocinas e quimiocinas que favorecem o acúmulo de células inflamatórias (SIMON et al., 2013; FONTAINE & DAVIS, 2016). Essas características tornam o tamanho dos adipócitos um fator de risco independente para o desenvolvimento de desarranjos metabólicos, como resistência à insulina. Como já pontuado anteriormente, o estímulo da maior frequência de adipócitos pequenos, por meio da adipogênese, é considerado um tratamento para o DM2 (BOUSKILA et al., 2005; GHABEN et al., 2019). Reforçando a ideia de que esse menor número de adipócitos saudáveis e maior número de adipócitos disfuncionais obtidos neste trabalho favoreceu instauração da resistência à insulina nos animais dos grupos HFF-CO e HFF-PG.

Como relatado no estudo de Schoettl et al. (2018) a condição metabolicamente disfuncional causada pela hipertrofia dos adipócitos impacta também a síntese de adipocinas. Acarretando um aumento da síntese da leptina e de citocinas pró-inflamatórias, e em uma redução da síntese como no caso da adiponectina, fato este que leva a prejuízos na via de sinalização da insulina (SCHOETTL et al., 2018). Essa diminuição da circulação de adiponectina pode contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina, tendo em vista que a adiponectina é capaz de aumentar, por meio de seus receptores expressos abundantemente em células β , a secreção de insulina e protegê-las contra apoptose (KHARROUBI et al., 2003; LEE et al., 2011).

Neste sentido, verificamos que neste trabalho a concentração sérica de adiponectina se mostrou diminuída nos grupos HFF-CO e HFF-PG, sendo no grupo HFF-CO significativamente menor do que NO-CO e NO-PG, o grupo HFF-PG menor que o a do grupo NO-PG. Podemos atribuir esse resultado a alta ingestão calórica da dieta experimental, que contribui para o aumento da RI. Em concordância com os estudos de Plows et al. (2018) e Doruk et al. (2014), nos quais é demonstrado que alterações no metabolismo da glicose podem afetar os níveis de adiponectina circulante. Neste contexto, foi estabelecida neste trabalho uma correlação inversa entre a concentração plasmática de adiponectina e a AUC, e positiva dessa com o KITT. Similarmente ao estudo promovido por Saini et al. (2015), no qual foi constatado que quanto maior glicemia de jejum e AUC, menores os níveis circulantes de adiponectina em mulheres com DMG.

Por fim, as correlações obtidas sugerem que a alta adiposidade e o estado inflamatório do TA, causados pela dieta HFF e a hipertrofia dos adipócitos, impactaram negativamente na síntese de adiponectina, e provavelmente causaram prejuízos na via de sinalização da insulina, desempenhando um papel no desenvolvimento da resistência à insulina nos animais.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de achados no presente trabalho, ao contrário do esperado, demonstrou que a ação isolada e em dose fisiológica, do período gestacional, de progesterona em camundongos fêmeas obesas:

- Atenuou os prejuízos que a obesidade traz ao metabolismo glicêmico, embora não tenha afetado o ganho de peso nem o consumo de água e ração dos animais;
- Não agravou o prejuízo no metabolismo energético que a obesidade acarreta, tanto em repouso, quanto em teste de esforço físico máximo;
- Não influenciou nem negativamente, nem positivamente, a morfometria de adipócitos do TAB-RP, TAB-SC e TAM, tampouco influenciou na secreção de adiponectina feita por eles.

8. ARTIGO PUBLICADO

A maior parte dos resultados deste trabalho foram publicados em forma de artigo científico na revista *Frontiers in Bioscience Landmark* sob o DOI: [10.31083/j.fbl2811312](https://doi.org/10.31083/j.fbl2811312), em 28 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.imrpess.com/journal/FBL/28/11/10.31083/j.fbl2811312>.

9. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A., STOELWINDER, J., SHORTREED, S., WOLFE, R., STEVENSON, C., WALLS, H., ... & PEETERS, A. The duration of obesity and the risk of type 2 diabetes. **Public health nutrition**, v. 14, n. 1, p. 119-126, 2011. DOI: [10.1017/S1368980010001813](https://doi.org/10.1017/S1368980010001813)
- ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade. Mapa da obesidade. São Paulo: ABESO, 2021.
- AHIMA, R. S., & LAZAR, M. A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. **Molecular endocrinology**, v. 22, n. 5, p. 1023-1031, 2008. DOI: [10.1210/me.2007-0529](https://doi.org/10.1210/me.2007-0529)
- ALEJANDRO, E. U., MAMERTO, T. P., CHUNG, G., VILLAVIEJA, A., GAUS, N. L., MORGAN, E., & PINEDA-CORTEZ, M. R. B. Gestational diabetes mellitus: A harbinger of the vicious cycle of diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–21, 2020. DOI: [10.3390/ijms21145003](https://doi.org/10.3390/ijms21145003)
- ALFADHLI, E. M. Maternal obesity influences Birth Weight more than gestational Diabetes author: **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 21, n. 1, p. 5–11, 2021. DOI: [10.1186/s12884-021-03571-5](https://doi.org/10.1186/s12884-021-03571-5)
- ALZET. **How Does It Works?**, 2022. Disponível em: https://www.alzet.com/products/alzet_pumps/how-does-it-work/. Acesso em: 25 de maio de 2022.
- AMRI, Z., BEN KHEDHER, M. R., ZAIBI, M. S., KHARROUBI, W., TURKI, M., AYADI, F., & HAMMAMI, M. Anti-diabetic effects of pomegranate extracts in long-term high fructose-fat fed rats. **Clinical Phytoscience**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI: [10.1186/s40816-020-00202-y](https://doi.org/10.1186/s40816-020-00202-y)
- AZEVEDO-MARTINS, A. K., MONTEIRO, A. P., LIMA, C. L., LENZEN, S., & CURI, R. Fatty acid-induced toxicity and neutral lipid accumulation in insulin-producing RINm5F cells. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 7, p. 1106-1113, 2006. DOI: [10.1016/j.tiv.2006.02.007](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.02.007)
- BENDOR, C. D., BARDUGO, A., ROTEM, R. S., DERAZNE, E., GERSTEIN, H. C., TZUR, D., ... & TWIG, G. Glucose intolerance in pregnancy and offspring obesity in late adolescence. **Diabetes Care**, v. 45, n. 7, p. 1540-1548, 2022. DOI: [10.2337/dc21-2634](https://doi.org/10.2337/dc21-2634)
- BENEDÉ-UBIETO, R., ESTÉVEZ-VÁZQUEZ, O., RAMADORI, P., CUBERO, F. J., & NEVZOROVA, Y. A. Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. Diabetes, **Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 439–450, 2020. DOI: [10.2147/DMSO.S234665](https://doi.org/10.2147/DMSO.S234665)
- BONORA, E., MOGHETTI, P., ZANCANARO, C., CIGOLINI, M., QUERENA, M., CACCIATORI, V., ... & MUGGEO, M. Estimates of In Vivo Insulin Action in Man: Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose

Clamp Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989. DOI: [10.1210/jcem-68-2-374](https://doi.org/10.1210/jcem-68-2-374)

BOSCHETTI, D., MULLER, C. R., AMÉRICO, A. L. V., VECCHIATTO, B., MARTUCCI, L. F., PEREIRA, R. O., ... & AZEVEDO-MARTINS, A. K. Aerobic Physical Exercise Improves Exercise Tolerance and Fasting Glycemia Independent of Body Weight Change in Obese Females. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, n. December, p. 1–9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.772914>

BOUSKILA, M.; PAJVANI, U. B.; SCHERER, P. E. Adiponectin: a relevant player in PPAR γ -agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity?. *International journal of obesity*, v. 29, n. 1, p. S17-S23, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2022: Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BUCCI, M., KARMI, A. C., IOZZO, P., FIELDING, B. A., VILJANEN, A., BADEAU, R. M., ... & NUUTILA, P. Enhanced fatty acid uptake in visceral adipose tissue is not reversed by weight loss in obese individuals with the metabolic syndrome. *Diabetologia*, v. 58, p. 158-164, 2015. DOI: [10.1007/s00125-014-3402-x](https://doi.org/10.1007/s00125-014-3402-x)

BURCELIN, R., CRIVELLI, V., DACOSTA, A., ROY-TIRELLI, A., & THORENS, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 282, n. 4, p. E834-E842, 2002. DOI: [10.1152/ajpendo.00332.2001](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00332.2001)

CEASER, T., & HUNTER, G. Black and White race differences in aerobic capacity, muscle fiber type, and their influence on metabolic processes. *Sports medicine*, v. 45, p. 615-623, 2015. DOI: [10.1007/s40279-015-0318-7](https://doi.org/10.1007/s40279-015-0318-7)

CERF M. E. Beta Cell Physiological Dynamics and Dysfunctional Transitions in Response to Islet Inflammation in Obesity and Diabetes. *Metabolites*. 2020; 10: 452. DOI: [10.3390/metabo10110452](https://doi.org/10.3390/metabo10110452)

CHOE, S. S., HUH, J. Y., HWANG, I. J., KIM, J. I., & KIM, J. B. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in endocrinology*, v. 7, 2016. DOI: [10.3389/fendo.2016.00030](https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030)

CHOUDHURY, A. A., & RAJESWARI, V. D. Gestational diabetes mellitus-A metabolic and reproductive disorder. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 143, p. 112183, 2021. DOI: [10.1016/j.biopha.2021.112183](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183)

CHU, S. Y., CALLAGHAN, W. M., KIM, S. Y., SCHMID, C. H., LAU, J., ENGLAND, L. J., & DIETZ, P. M. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, v. 30, n. 8, p. 2070-2076, 2007. DOI: [10.2337/dc06-2559a](https://doi.org/10.2337/dc06-2559a)

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*, v. 509, n. 7500, p. 282-283, 2014. DOI: [10.1038/509282a](https://doi.org/10.1038/509282a)

CONSTANTINI, N. W., DUBNOV, G., & LEBRUN, C. M. The menstrual cycle and sport performance. **Clinics in sports medicine**, v. 24, n. 2, p. e51-e82, 2005. DOI: [10.1016/j.csm.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.csm.2005.01.003)

CYPESS, A. M., CHEN, Y. C., SZE, C., WANG, K., ENGLISH, J., CHAN, O., ... & KAHN, C. R. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 25, p. 10001-10005, 2012. DOI: [10.1073/pnas.1207911109](https://doi.org/10.1073/pnas.1207911109)

DALFRÀ, M. G., BURLINA, S., DEL VESCOVO, G. G., & LAPOLLA, A. Genetics and epigenetics: new insight on gestational diabetes mellitus. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 602477, 2020. DOI: [10.3389/fendo.2020.602477](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.602477)

DE ANGELIS, K., SCHAAN, B. D. A., RODRIGUES, B., MALFITANO, C., & IRIGOYEN, M. C. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 185-194, 2007. DOI: [10.1590/S0004-27302007000200007](https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000200007)

DELLA CORTE KW, PERRAR I, PENCZYNSKI KJ, SCHWINGSHACKI L, HERDER C, BUYKEN AE. Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. **Nutrients**, v.10, p.606, 2018. DOI: [10.3390/nu10050606](https://doi.org/10.3390/nu10050606)

DI GIROLAMO, M; MENDLINGER, S; FERTIG, J. W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 221, n. 3, p. 850-858, 1971.

DI RENZO, G. C., GIARDINA, I., CLERICI, G., BRILLO, E., & GERLI, S. Progesterone in normal and pathological pregnancy. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 27, n. 1, p. 35-48, 2016. DOI: [10.1515/hmbci-2016-0038](https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0038)

DISPIRITO, J. R.; MATHIS, D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 315-321, 2015. DOI: [10.1016/j.smim.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.005)

DORUK, M., UĞUR, M., ORUÇ, A. S., DEMIREL, N., & YILDIZ, Y. Serum adiponectin in gestational diabetes and its relation to pregnancy outcome. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 34, n. 6, p. 471-475, 2014.

ĐOŠIĆ, A., BRATIĆ, M., JEZDIMIROVIĆ, M., PURENOVIĆ-IVANOVIĆ, T., ŽIVKOVIĆ, D., & BRATIĆ, M. Fitness parameters and morphological characteristics of overweight and obese children aged seven. **Facta Universitatis, Series: Physical Education and Sport**, p. 549-558, 2020. DOI: [10.22190/FUPES190315049D](https://doi.org/10.22190/FUPES190315049D)

EVANGELISTA, F. S., MARTUCHI, S. E. D., NEGRÃO, C. E., & BRUM, P. C. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, p. 1141-1146, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700018>

FARRAR, D., SIMMONDS, M., BRYANT, M., SHELDON, T. A., TUFFNELL, D., GOLDER, S., ... & LAWLOR, D. A. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: systematic review and meta-analysis. **bmj**, v. 354, 2016. DOI: [10.1136/bmj.i4694](https://doi.org/10.1136/bmj.i4694)

FARRAR, Diane et al. Risk factor screening to identify women requiring oral glucose tolerance testing to diagnose gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis and analysis of two pregnancy cohorts. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175288, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0175288](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175288)

FERRANNINI, E. The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. **Metabolism**, v. 37, n. 3, p. 287–301, 1988. DOI: [10.1016/0026-0495\(88\)90110-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(88)90110-2)

FONSECA-ALANIZ, M. H., HIGA, T. S., FERRAZ-DE-CAMPOS, T. B., TAKADA, J., TORRES-LEAL, F. L., EVANGELISTA, F. S. A., ... & KRIEGER, J. E. ACE-modulated adiposity is related to higher energy expenditure and independent of lipolysis and glucose incorporation into lipids in adipocytes. **Physiological genomics**, v. 49, n. 12, p. 712-721, 2017. DOI: [10.1152/fisiolgenômica.00056.2017](https://doi.org/10.1152/fisiolgenômica.00056.2017).

FONTAINE, D. A., & DAVIS, D. B. Attention to background strain is essential for metabolic research: C57BL/6 and the international knockout mouse consortium. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 25-33, 2016. DOI: [10.2337/db15-0982](https://doi.org/10.2337/db15-0982)

GHABEN, A. L., & SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 4, p. 242-258, 2019. DOI: [10.1038/s41580-018-0093-z](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z)

GHOSH, S., TAYLOR, J. L., MENDOZA, T. M., DANG, T., BURK, D. H., YU, Y., ... & FLOYD, Z. E. Siah2 modulates sex-dependent metabolic and inflammatory responses in adipose tissue to a high-fat diet challenge. **Biology of sex Differences**, v. 10, p. 1-16, 2019. DOI: [10.1186/s13293-019-0233-y](https://doi.org/10.1186/s13293-019-0233-y)

GONZALEZ, C., ALONSO, A., ALVAREZ, N., DIAZ, F., MARTINEZ, M., FERNANDEZ, S., & PATTERSON, A. M. Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 283-291, 2000. DOI: [10.1677/joe.0.1660283](https://doi.org/10.1677/joe.0.1660283)

GORRES-MARTENS, B. K., FIELD, T. J., SCHMIDT, E. R., & MUNGER, K. A. Exercise prevents HFD-and OVX-induced type 2 diabetes risk factors by decreasing fat storage and improving fuel utilization. **Physiological Reports**, v. 6, n. 13, p. e13783, 2018. DOI: [10.14814/phy2.13783](https://doi.org/10.14814/phy2.13783)

GUILHERME, A., VIRBASCIUS, J. V., PURI, V., & CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, 2008. DOI: [10.1038/nrm2391](https://doi.org/10.1038/nrm2391)

HARIRI, N., & THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0954422410000168>

HASHIMOTO, Y., YAMADA, K., TSUSHIMA, H., MIYAZAWA, D., MORI, M., NISHIO, K., ... & OKUYAMA, H. Three dissimilar high fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resistant Slc: Wistar/ST rats. **Lipids**, v. 48, p. 803-815, 2013. DOI: [10.1007/s11745-013-3805-3](https://doi.org/10.1007/s11745-013-3805-3)

HEINONEN, S., SAARINEN, L., NAUKKARINEN, J., RODRÍGUEZ, A., FRÜHBECK, G., HAKKARAINEN, A., ... & PIETILÄINEN, K. H. Adipocyte morphology and implications for metabolic derangements in acquired obesity. **International journal of obesity**, v. 38, n. 11, p. 1423-1431, 2014. DOI: [10.1038/ijo.2014.31](https://doi.org/10.1038/ijo.2014.31)

HERVEY, E., & HERVEY, G. R. The effects of progesterone on body weight and composition in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 37, n. 4, p. 361-384, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.0.0370361>

HEYDEMANN, A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016. DOI: [10.1155/2016/2902351](https://doi.org/10.1155/2016/2902351)

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010. DOI: [10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x)

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF. Diabetes Atlas. 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021.

JOHNSON, A. R., JUSTIN MILNER, J., & MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological reviews**, v. 249, n. 1, p. 218-238, 2012. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x)

JOHNSON, R. J.; MURRAY, R. Fructose, exercise, and health. **Current Sports Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 253-258, 2010. DOI: [10.1249/JSR.0b013e3181e7def4](https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e3181e7def4)

KAHN, S. E., HULL, R. L., & UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n.7121, p. 840–846, 2006. DOI: [10.1038/nature05482](https://doi.org/10.1038/nature05482)

KAMPMANN, U., KNORR, S., FUGLSANG, J., & OVESEN, P. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, n. Figure 1, 2019. DOI: [10.1155/2019/5320156](https://doi.org/10.1155/2019/5320156)

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021. DOI: [10.1152/ajpcell.00379.2020](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020)

KERSHAW, E. E., & FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004. DOI: [10.1210/jc.2004-0395](https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395)

KHARROUBI, I., RASSCHAERT, J., EIZIRIK, D. L., & CNOP, M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic β cells. **Biochemical and Biophysical**

Research Communications, v. 312, n. 4, p. 1118–1122, 2003.

DOI: [10.1016/j.bbrc.2003.11.042](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.042)

KIM, H., BARTLEY, G. E., YOUNG, S. A., DAVIS, P. A., & YOKOYAMA, W. HPMC supplementation reduces abdominal fat content, intestinal permeability, inflammation, and insulin resistance in diet-induced obese mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 9, p. 1464-1476, 2012. DOI: [10.1002/mnfr.201200082](https://doi.org/10.1002/mnfr.201200082)

KOH, A. S., GAO, F., TAN, R. S., ZHONG, L., LENG, S., ZHAO, X., ... & KOVALIK, J. P. Metabolomic correlates of aerobic capacity among elderly adults. **Clinical cardiology**, v. 41, n. 10, p. 1300-1307, 2018. DOI: [10.1002/clc.23016](https://doi.org/10.1002/clc.23016)

KROTKIEWSKI, M; BJÖRNTORP, P. The effect of progesterone and of insulin administration on regional adipose tissue cellularity in the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 96, n. 1, p. 122-127, 1976. DOI: [10.1111/j.1748-1716.1976.tb10177.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1976.tb10177.x)

KUIPERS, E. N., HELD, N. M., IN HET PANHUIS, W., MODDER, M., RUPPERT, P. M., KERSTEN, S., ... & BOON, M. R. A single day of high-fat diet feeding induces lipid accumulation and insulin resistance in brown adipose tissue in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 317, n. 5, p. E820-E830, 2019. DOI: [10.1152/ajpendo.00123.2019](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00123.2019)

KUMAR, S., MOGHADDAM, S., GOLDBERG, D. S., MANTERO, A., & CRANE, T. E. Increasing Rates of Pancreatic and Hepatocellular Cancers Parallel Increasing Obesity Rates. **Pancreas**, v. 51, n. 9, p. 1116-1117, 2022. DOI: [10.1097/MPA.0000000000002153](https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000002153)

KUNJU, S. M.; FOUSIA, L. Progesterone Induced Insulin Resistance- an Animal Study. **Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare**, v. 6, n. 11, p. 922–928, 2019. DOI: [10.18410/jebmh/2019/194](https://doi.org/10.18410/jebmh/2019/194)

LACROIX, M., KINA, E., & HIVERT, M. F. Maternal/fetal determinants of insulin resistance in women during pregnancy and in offspring over life. **Current diabetes reports**, v. 13, p. 238-244, 2013. DOI: [10.1007/s11892-012-0360-x](https://doi.org/10.1007/s11892-012-0360-x)

LAIN, K. Y., DAFTARY, A. R., NESS, R. B., & ROBERTS, J. M. First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. **Clinical endocrinology**, v. 69, n. 3, p. 407-411, 2008. DOI: [10.1111/j.1365-2265.2008.03198.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03198.x)

LEE, Y. H., MAGKOS, F., MANTZOROS, C. S., & KANG, E. S. Effects of leptin and adiponectin on pancreatic β -cell function. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 12, p. 1664–1672, 2011. DOI: [10.1016/j.metabol.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.04.008)

LEE, Y. H., MAGKOS, F., MANTZOROS, C. S., & KANG, E. S. Effects of leptin and adiponectin on pancreatic β -cell function. **Metabolism**, v. 60, n. 12, p. 1664-1672, 2011. DOI: [10.1016/j.metabol.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.04.008)

- LI, M., QIAN, M., KYLER, K., & XU, J. Adipose tissue-endothelial cell interactions in obesity-induced endothelial dysfunction. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 681581, 2021. DOI: [10.3389/fcvm.2021.681581](https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.681581)
- LIAO, X., ZOU, J., WU, M., DENG, Y., SHI, J., HAO, Y., ... & LIAO, W. Hypoglycemic Effect of Nobiletin via Gut Microbiota-Metabolism Axis on Hyperglycemic Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 2200289, 2023. DOI: [10.1002/mnfr.202200289](https://doi.org/10.1002/mnfr.202200289)
- LIU, X., WANG, S., YOU, Y., MENG, M., ZHENG, Z., DONG, M., ... & JIN, W. Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 7, p. 2461-2469, 2015. DOI: [10.1210/en.2014-1598](https://doi.org/10.1210/en.2014-1598)
- LIU, X., ZHENG, Z., ZHU, X., MENG, M., LI, L., SHEN, Y., ... & JIN, W. Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. **Cell research**, v. 23, n. 6, p. 851-854, 2013. DOI: [10.1038/cr.2013.64](https://doi.org/10.1038/cr.2013.64)
- MACHADO, C. E. P., CAPUTO, F., & DENADAI, B. S. Intensidade de exercício correspondente ao VO₂max durante o ciclismo: análise de diferentes critérios em indivíduos treinados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 4, p. 333-341, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1807-55092004000400003>
- MACHADO, L. F. S., & DO AMARAL VASCONCELLOS, M. J. Atualidades no Diabetes gestacional: Updates on gestational Diabetes. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 6, p. 22170-22187, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n6-029>
- MARQUES, C., MEIRELES, M., NORBERTO, S., LEITE, J., FREITAS, J., PESTANA, D., ... & CALHAU, C. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. **Adipocyte**, v. 5, n. 1, p. 11-21, 2016. DOI: [10.1080/21623945.2015.1061723](https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723)
- MASUYAMA, H., & HIRAMATSU, Y. Potential role of estradiol and progesterone in insulin resistance through constitutive androstane receptor. **Journal of molecular endocrinology**, v. 47, n. 2, p. 229, 2011. DOI: [10.1530/JME-11-0046](https://doi.org/10.1530/JME-11-0046)
- MAXWELL, A. J., HO, H. K. V., LE, C. Q., LIN, P. S., BERNSTEIN, D., & COOKE, J. P. L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. **Journal of applied physiology**, v. 90, n. 3, p. 933-938, 2001. DOI: [10.1152/jappl.2001.90.3.933](https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.933)
- MAXWELL, A. J., NIEBAUER, J., LIN, P. S., TSAO, P. S., BERNSTEIN, D., & COOKE, J. P. Hypercholesterolemia impairs exercise capacity in mice. **Vascular medicine**, v. 14, n. 3, p. 249-257, 2009. DOI: [10.1177/1358863X08100040](https://doi.org/10.1177/1358863X08100040)
- MCLEAN, A. C., VALENZUELA, N., FAI, S., & BENNETT, S. A. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, p. e4389, 2012. DOI: [10.3791/4389](https://doi.org/10.3791/4389)
- MELO, C. M. D., TIRAPEGUI, J., & RIBEIRO, S. M. L. Gasto energético corporal: conceitos, formas de avaliação e sua relação com a obesidade. **Arquivos**

Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 52, p. 452-464, 2008.

DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000300005>

MIR, P. S., HE, M. L., TRAVIS, G., ENTZ, T., MCALLISTER, T., MARCHAND, S., ... & DODSON, M. V. Periodic 48 h feed withdrawal improves glucose tolerance in growing pigs by enhancing adipogenesis and lipogenesis. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, p. 1-12, 2012. DOI: [10.1186/1743-7075-9-10](https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-10)

MIRANDA, C. S., SILVA-VEIGA, F., MARTINS, F. F., RACHID, T. L., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., & SOUZA-MELLO, V. PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: A comparative study between high-fat–and high-fructose–fed mice. **Nutrition**, v. 78, p. 110791, 2020.

DOI: [10.1016/j.nut.2020.110791](https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110791)

MOHAMMADI, T., & PAKNAHAD, Z. Adiponectin concentration in gestational diabetic women: a case-control study. **Clinical nutrition research**, v. 6, n. 4, p. 267-276, 2017. DOI: [10.7762/cnr.2017.6.4.267](https://doi.org/10.7762/cnr.2017.6.4.267)

MOHAMMADZADEH, S., HAMIDI, S., RASOULI, M. A., SAHADATMAND, B., & ZAREIE, B. Association of maternal diabetes during pregnancy with attention deficit hyperactivity disorder in offspring in an Iranian population: A case-control study. **Journal of Shahrekord University of Medical Sciences**, v. 25, n. 1, 2023.

DOI: [10.34172/jsums.2023.724](https://doi.org/10.34172/jsums.2023.724)

MONJO, M., PUJOL, E., & ROCA, P. α 2-to β 3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17 β -estradiol, and progesterone. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 1, p. E145-E150, 2005. DOI: [10.1152/ajpendo.00563.2004](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00563.2004)

MONJO, M., RODRIGUEZ, A. M., PALOU, A., & ROCA, P. Direct effects of testosterone, 17 β -estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 4923-4930, 2003.

DOI: [10.1210/en.2003-0537](https://doi.org/10.1210/en.2003-0537)

MORALES-SUÁREZ-VARELA, M. M., CLEMENTE-BOSCH, E., & LLOPIS-GONZÁLEZ, A. Relationship between the level of physical activity and markers of cardiovascular health in Valencian adolescents (Spain). **Arch Argent Pediatr**, v. 111, n. 5, p. 398-404, 2013. DOI: [10.5546/aap.2013.eng.398](https://doi.org/10.5546/aap.2013.eng.398)

MORRISON, K. E., JAŠAREVIĆ, E., HOWARD, C. D., & BALE, T. L. It's the fiber, not the fat: significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. **Microbiome**, v. 8, p. 1-11, 2020. DOI: [10.1186/S40168-020-0791-6](https://doi.org/10.1186/S40168-020-0791-6)

MOULIN, C. M., MARGUTI, I., PERON, J. P. S., RIZZO, L. V., & HALPERN, A. Impact of adiposity on immunological parameters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 183-189, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000200010>

MOULLÉ, V. S., GHISLAIN, J., & POITOUT, V. Nutrient regulation of pancreatic β -cell proliferation. **Biochimie**, v. 143, p. 10-17, 2017.

DOI: [10.1016/j.biochi.2017.09.017](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.017)

MURRAY, S. A., MORGAN, J. L., KANE, C., SHARMA, Y., HEFFNER, C. S., LAKE, J., & DONAHUE, L. R. Mouse gestation length is genetically determined. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010. DOI: [10.1371/journal.pone.0012418](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012418)

NAPSO, T., YONG, H. E., LOPEZ-TELLO, J., & SFERRUZZI-PERRI, A. N. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1091, 2018.

DOI: [10.3389/fphys.2018.01091](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01091)

NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Intrapartum care for healthy women and babies. Clinical guideline CG190, 2017.

NIEUWENHUIZEN, A. G., SCHUILING, G. A., LIEM, S. M., MOES, H., KOITER, T. R., & UILENBROEK, J. T. Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo. **European journal of endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 256-263, 1999.

DOI: [10.1530/eje.0.1400256](https://doi.org/10.1530/eje.0.1400256)

NIGRO, E., SCUDIERO, O., MONACO, M. L., PALMIERI, A., MAZZARELLA, G., COSTAGLIOLA, C., ... & DANIELE, A. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DOI: [10.1155/2014/658913](https://doi.org/10.1155/2014/658913)

NOLAN, C., & PROIETTO, J. The effects of oophorectomy and female sex steroids on glucose kinetics in the rat. **Diabetes research and clinical practice**, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1995. DOI: [10.1016/0168-8227\(95\)01193-5](https://doi.org/10.1016/0168-8227(95)01193-5)

O'BRIEN, S. N., WELTER, B. H., MANTZKE, K. A., & PRICE, T. M. Identification of progesterone receptor in human subcutaneous adipose tissue. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 2, p. 509-513, 1998.

DOI: [10.1210/jcem.83.2.4561](https://doi.org/10.1210/jcem.83.2.4561)

OLIVEIRA, L. K., & OLIVEIRA, L. M. B. A influência das alterações endócrinas e do estresse durante o ciclo menstrual sobre o periodonto. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 284-289, 2011.

DOI: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v10i3.5891>

ORDÓNÉZ, P., MORENO, M., ALONSO, A., FERNÁNDEZ, R., DÍAZ, F., & GONZÁLEZ, C. Insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats treated with different doses of 17β -oestradiol or progesterone. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 241-249, 2007. DOI: [10.1113/expphysiol.2006.035006](https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.035006)

OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J., & WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

DOI: [10.1038/nri2921](https://doi.org/10.1038/nri2921)

PALA, H. G., OZALP, Y., YENER, A. S., GERCEKLIOGLU, G., UYSAL, S., & ONVURAL, A. Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant

women without glucose intolerance. **Advances in clinical and experimental medicine**, v. 24, n. 1, p. 85-92, 2015. DOI: [10.17219/acem/38141](https://doi.org/10.17219/acem/38141)

PARLEE, S. D., LENTZ, S. I., MORI, H., & MACDOUGALD, O. A. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 2014. p. 93-122. DOI: [10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9)

PEREIRA, R. M., BOTEZELLI, J. D., DA CRUZ RODRIGUES, K. C., MEKARY, R. A., CINTRA, D. E., PAULI, J. R., ... & DE MOURA, L. P. Fructose Consumption in the Development of Obesity and the Effects of Different Protocols of Physical Exercise on the Hepatic Metabolism. **Nutrients**, v.9, p.405, 2017. DOI: [10.3390/nu9040405](https://doi.org/10.3390/nu9040405)

PEREZ-POZO, S. E.; SCHOLD, J., NAKAGAWA, T.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; JOHNSON, R. J.; & LILLO, J. L. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. **International journal of obesity**, v. 34, n. 3, p. 454-461, 2010. DOI: [10.1038/ijo.2009.259](https://doi.org/10.1038/ijo.2009.259)

PETROSINO, J. M., HEISS, V. J., MAURYA, S. K., KALYANASUNDARAM, A., PERIASAMY, M., LAFOUNTAIN, R. A., ... & ZIOUZENKOVA, O. Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. e0148010, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148010>

PICARD, F., WANATABE, M., SCHOONJANS, K., LYDON, J., O'MALLEY, B. W., & AUWERX, J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to β -cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15644–15648, 2002. DOI: [10.1073/pnas.202612199](https://doi.org/10.1073/pnas.202612199)

PLOWS, J. F., STANLEY, J. L., BAKER, P. N., REYNOLDS, C. M., & VICKERS, M. H. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3342, 2018. DOI: [10.3390/ijms19113342](https://doi.org/10.3390/ijms19113342)

PRADO, W. L. D., LOFRANO, M. C., OYAMA, L. M., & DÂMASO, A. R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 15, p. 378-383, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922009000600012>

QI, L., DING, X., TANG, W., LI, Q., MAO, D., & WANG, Y. Prevalence and risk factors associated with dyslipidemia in Chongqing, China. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 10, p. 13455-13465, 2015. DOI: [10.3390/ijerph121013455](https://doi.org/10.3390/ijerph121013455)

RADIN, M. J., SHARKEY, L. C., & HOLYCROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary clinical pathology**, v. 38, n. 2, p. 136-156, 2009. DOI: [10.1111/j.1939-165X.2009.00133.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00133.x)

RANGEL-AZEVEDO, C., SANTANA-OLIVEIRA, D. A., MIRANDA, C. S., MARTINS, F. F., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., & SOUZA-MELLO, V. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-

term obesity complications. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 105, p. 109002, 2022. DOI: [10.1016/j.jnutbio.2022.109002](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109002)

REBUFFÉ-SCRIVE, M., BRÖNNEGARD, M., NILSSON, A., ELDH, J., GUSTAFSSON, J. A., & BJÖRNTORP, P. Steroid hormone receptors in human adipose tissues. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 71, n. 5, p. 1215-1219, 1990. DOI: [10.1210/jcem-71-5-1215](https://doi.org/10.1210/jcem-71-5-1215)

ROBBINS & COTRAN - **Patologia** - Bases Patológicas das Doenças, 8ª ed., Elsevier/Medicina Nacionais, Rio de Janeiro, 2010.

ROSEN, S. F., HAM, B., DROUIN, S., BOACHIE, N., CHABOT-DORE, A. J., AUSTIN, J. S., ... & MOGIL, J. S.T-cell mediation of pregnancy analgesia affecting chronic pain in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9819-9827, 2017. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2053-17.2017](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2053-17.2017)

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

SAINI, V., KATARIA, M., YADAV, A., & JAIN, A. Role of leptin and adiponectin in gestational diabetes mellitus: a study in a North Indian tertiary care hospital. **Internet Journal of Medical Update-EJOURNAL**, v. 10, n. 1, p. 11-14, 2015. DOI: [10.4314/ijmu.v10i1.3](https://doi.org/10.4314/ijmu.v10i1.3)

SASS, F., SCHLEIN, C., JAECKSTEIN, M. Y., PERTZBORN, P., SCHWEIZER, M., SCHINKE, T., ... & FISCHER, A. W. TFEB deficiency attenuates mitochondrial degradation upon brown adipose tissue whitening at thermoneutrality. **Molecular Metabolism**, v. 47, p. 101173, 2021. DOI: [10.1016/j.molmet.2021.101173](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101173)

SCHJERVE, I. E., TYLDUM, G. A., TJØNNA, A. E., STØLEN, T., LOENNECHEN, J. P., HANSEN, H. E., ... & WISLØFF, U. Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. **Clinical science**, v. 115, n. 9, p. 283-293, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1042/cs20070332>

SCHOETTL, T., FISCHER, I. P., & USSAR, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. Suppl_1, p. jeb162958, 2018. DOI: [10.1242/jeb.162958](https://doi.org/10.1242/jeb.162958)

SHAO, J., QIAO, L., & FRIEDMAN, J. E. Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 β -cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 2, p. E304-E310, 2004. DOI: [10.1152/ajpendo.00210.2003](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00210.2003)

SHAPIRO, A., MU, W., RONCAL, C., CHENG, K. Y., JOHNSON, R. J., & SCARPACE, P. J. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. **American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology**, 2008. DOI: [10.1152/ajpregu.00195.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00195.2008)

SHEN, W., CHEN, J., PUNYANITYA, M., SHAPSES, S., HESHKA, S., & HEYMSFIELD, S. B. MRI-measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. **Osteoporosis international**, v. 18, p. 641-647, 2007. DOI: [10.1007/s00198-006-0285-9](https://doi.org/10.1007/s00198-006-0285-9)

SHIMIZU, I., APRAHAMIAN, T., KIKUCHI, R., SHIMIZU, A., PAPANICOLAOU, K. N., MACLAUHLAN, S., ... & WALSH, K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2099-2112, 2014. DOI: [10.1172/JCI71643](https://doi.org/10.1172/JCI71643)

ŠIMJÁK, P., CINKAJZLOVÁ, A., ANDERLOVÁ, K., PAŘÍZEK, A., MRÁZ, M., KRŠEK, M., & HALUZÍK, M. The role of obesity and adipose tissue dysfunction in gestational diabetes mellitus. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 2, p. R63–R77, 2018. DOI: [10.1530/JOE-18-0032](https://doi.org/10.1530/JOE-18-0032)

SIMON, M. M., GREENAWAY, S., WHITE, J. K., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., WELLS, S., ... & BROWN, S. D. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. **Genome biology**, v. 14, n. 7, p. 1-22, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. Acesso em 28 de março de 2022. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>>.

SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P. O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B. A., BERGMANN, O., ... & ARNER, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 783-787, 2008. DOI: [10.1038/nature06902](https://doi.org/10.1038/nature06902)

SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International journal of obesity**, v. 43, n. 8, p. 1491-1492, 2019. DOI: [10.1038/s41366-019-0363-7](https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7)

SPEROFF, L., GLASS, R.H., KASE NG. **A endocrinologia da gestação**. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG. 5ª ed. São Paulo: Manole; 1995. p. 259-99.

STANFORD, K. I., MIDDELBECK, R. J., TOWNSEND, K. L., AN, D., NYGAARD, E. B., HITCHCOX, K. M., ... & GOODYEAR, L. J. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 1, 2012. DOI: [10.1172/JCI62308](https://doi.org/10.1172/JCI62308)

STEPHAN, B. C. M., WELLS, J. C. K., BRAYNE, C., ALBANESE, E., & SIERVO, M. Increased fructose intake as a risk factor for dementia. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 8, p. 809-814, 2010. DOI: [10.1093/gerona/gdq079](https://doi.org/10.1093/gerona/gdq079)

SVENSSON, H., WETTERLING, L., BOSAEUS, M., ODÉN, B., ODÉN, A., JENNISCHE, E., ... & LÖNN, M. Body fat mass and the proportion of very large adipocytes in pregnant women are associated with gestational insulin resistance. **International journal of obesity**, v. 40, n. 4, p. 646-653, 2016. DOI: [10.1038/ijo.2015.232](https://doi.org/10.1038/ijo.2015.232)

SZLAPINSKI, S. K., & HILL, D. J. Metabolic adaptations to pregnancy in healthy and gestational diabetic pregnancies: The pancreas-placenta axis. **Current vascular pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 141-153, 2021.

DOI: [10.2174/1570161118666200320111209](https://doi.org/10.2174/1570161118666200320111209)

TAPPY, L., LÊ, K. A.; TRAN, C.; & PAQUOT, N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1044-1049, 2010.

DOI: [10.1016/j.nut.2010.02.014](https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014)

TORRES-LEAL, F. L., FONSECA-ALANIZ, M. H., DE OLIVEIRA, A. C., & ALONSO-VALE, M. I. C. Adipose tissue inflammation and insulin resistance. **InTech Open**, p. 137-156, 2012. DOI: [10.5772/53974](https://doi.org/10.5772/53974)

VAN HERCK, M. A., VONGHIA, L., KWANTEN, W. J., JULÉ, Y., VANWOLLEGHEM, T., EBO, D. G., ... & FRANQUE, S. M. Diet reversal and immune modulation show key role for liver and adipose tissue T cells in murine nonalcoholic steatohepatitis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 3, p. 467-490, 2020. DOI: [10.1016/j.jcmgh.2020.04.010](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.04.010)

VIEIRA-POTTER, V. J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1484-1492, 2014.

DOI: [10.1111/cmi.12336](https://doi.org/10.1111/cmi.12336)

WADA, T., HORI, S., SUGIYAMA, M., FUJISAWA, E., NAKANO, T., TSUNEKI, H., ... & SASAOKA, T. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 4, p. 881-888, 2010.

DOI: [10.1152/ajpendo.00649.2009](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00649.2009)

WINER, S., CHAN, Y., PALTSER, G., TRUONG, D., TSUI, H., BAHRAMI, J., ... & DOSCH, H. M. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 921-929, 2009.

DOI: [10.1038/nm.2001](https://doi.org/10.1038/nm.2001)

WONG, R., RAY, D. AND KENDALL, D.A. Progesterone pharmacokinetics in the mouse: implications for potential stroke therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1614-1620, 2012. DOI: [10.1111/j.2042-7158.2012.01537.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01537.x)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 15 de mar. 2021>.

WORLD OBESITY FEDERATION. World Obesity Atlas 2023: Global overweight and obesity, 2023.

YADIKAR, N., AHMET, A., ZHU, J., BAO, X., YANG, X., HAN, H., & ROZI, P. Exploring the mechanism of citric acid for treating glucose metabolism disorder induced by hyperlipidemia. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. e14404, 2022. DOI: [10.1111/jfbc.14404](https://doi.org/10.1111/jfbc.14404)

YANG, J WANG, C., & GUAN, Y. Cytokines in the progression of pancreatic β -cell dysfunction. **International journal of endocrinology**, v. 2010, 2010.

DOI: [10.1155/2010/515136](https://doi.org/10.1155/2010/515136)

YE, R.; ONODERA, T.; SCHERER, P. E. Lipotoxicity and B cell maintenance in obesity and type 2 diabetes. **Journal of the Endocrine Society**, v. 3, n. 3, p. 617–631, 2019. DOI: [10.1210/js.2018-00372](https://doi.org/10.1210/js.2018-00372)

YOKOTA, T., KINUGAWA, S., OKITA, K., HIRABAYASHI, K., SUGA, T., HATTORI, M., ... & TSUTSUI, H. Lower aerobic capacity was associated with abnormal intramuscular energetics in patients with metabolic syndrome. **Hypertension Research**, v. 34, n. 9, p. 1029-1034, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/hr.2011.78>

ZAMAN, M. Q., LERAY, V., LE BLOC'H, J., THORIN, C., OUGUERRAM, K., & NGUYEN, P. Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. **British journal of nutrition**, v. 106, n. S1, p. S206-S210, 2011.

DOI: <https://doi.org/10.1017/s0007114511004454>

ZHANG, Z., KANG, X., GUO, Y., ZHANG, J., XIE, J., SHAO, S., ... & YU, X. Association of circulating galectin-3 with gestational diabetes mellitus, progesterone, and insulin resistance. **Journal of Diabetes**, v. 13, n. 1, p. 54-62, 2021.

DOI: [10.1111/1753-0407.13088](https://doi.org/10.1111/1753-0407.13088)

ZHAO, Y. F., & CHEN, C. Regulation of pancreatic beta-cell function by adipocytes. **ACTA PHYSIOLOGICA SINICA-CHINESE EDITION**-, v. 59, n. 3, p. 247, 2007. PMID: [17579776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17579776/)

ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO (CEUA)



Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação (CEUA)

Certificamos que a projeto intitulado **"Estudo dos efeitos da progesterona e da dieta hipercalórica sobre as interações entre célula beta pancreática e tecido adiposo"**, registrada com o n. **003/2018**, sob responsabilidade da **Prof.ª Dr.ª Anna Karenina Azevedo Martins**, apresentado ao Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, foi **APROVADO** em reunião de **31/05/2019**. Este projeto envolverá a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho de Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O período de validade desta autorização será equivalente ao período de realização da pesquisa. Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar ao CEUA-EACH/USP, o relatório final sobre a pesquisa.

Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / C57
Número de animais	50
Peso/idade	18g / 23 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério do Instituto Butantã

São Paulo, 07 de agosto de 2019.

Prof.ª Dr.ª Michele Schultz
Vice-Coordenadora
Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação
EACH/USP

ANEXO II - CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

A fim de exemplificar as quatro fases do ciclo estral, lâminas de lavado vaginal foram coradas com cristal violeta e fotografadas com aumento de 400X em microscópio óptico, com a utilização do programa Motic Images Plus 3.0 (Figura 24).

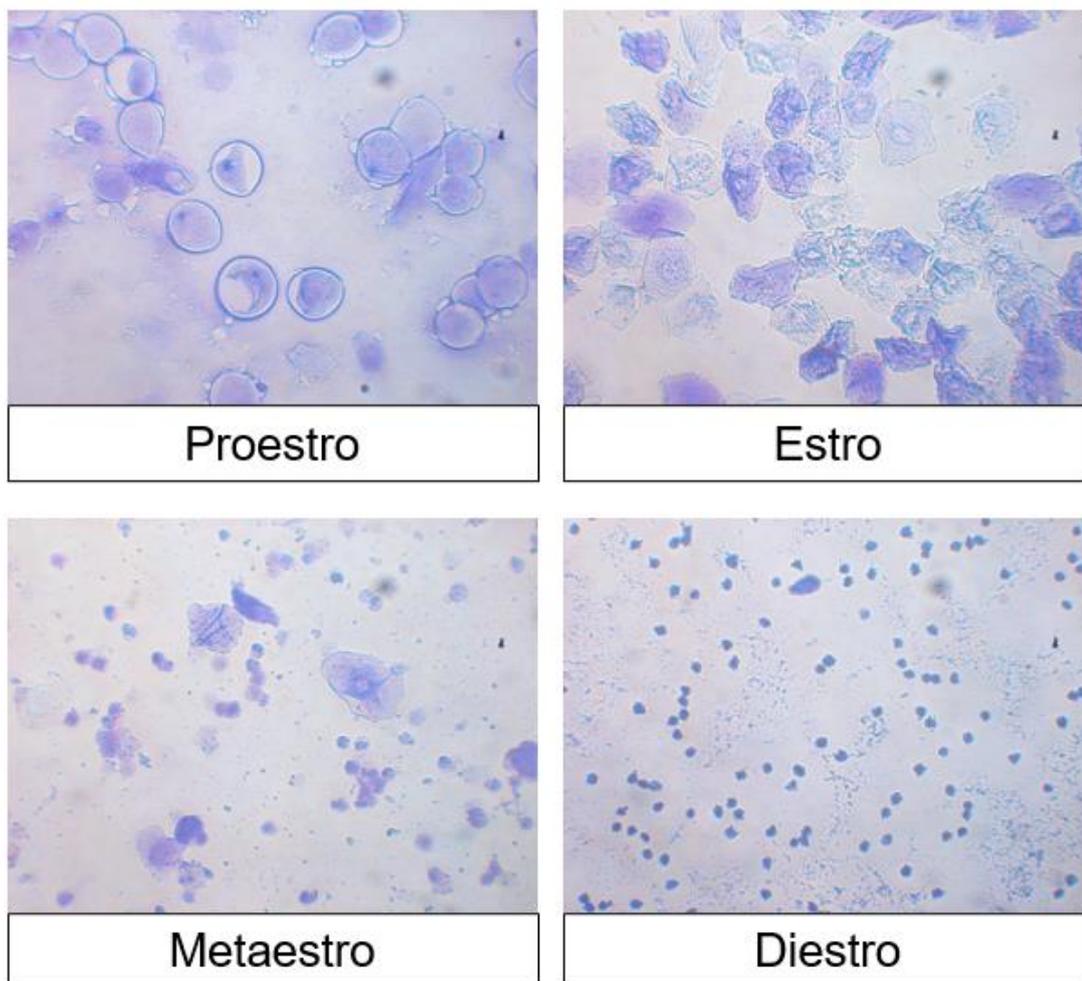


Figura 24: Imagens representativas das fases do ciclo estral em aumento de 400x. Fonte: O autor.

ANEXO III – MACRO IMAGEJ TAB

```
// TAB
run("Set Measurements...", "area
area_fraction display add redirect=None
decimal=2");
run("Colors...", "foreground=white
background=black selection=magenta");
id = getImageID();
title = getTitle();
path= getInfo("image.directory");
name=getInfo("image.filename");
run("8-bit");
run("Replace value", "pattern=0
replacement=255");
getLocationAndSize(locX, locY, sizeW, sizeH);
width = getWidth();
height = getHeight();
tileWidth = width / 6;
tileHeight = height / 6;
for (y = 0; y < 6; y++) {
offsetY = y * height / 6;
for (x = 0; x < 6; x++) {
offsetX = x * width / 6;
selectImage(id);
call("ij.gui.ImageWindow.setNextLocation",
locX + offsetX, locY + offsetY);
tileTitle = title + " [" + x + ", " + y + "]";
run("Duplicate...", "title=" + tileTitle);
makeRectangle(offsetX, offsetY, tileWidth,
tileHeight);
run("Crop"); }
selectImage(id);
close();
run("Images to Stack", "name=Stack title=[]
use");
run("Convert to Mask", "method=Mean
background=Dark calculate");
run("Despeckle", "stack");
run("Close-", "stack");
for (i = 0; i < 3; i++) {
run("Dilate", "stack");
}
run("Close-", "stack");
run("Make Montage...", "columns=6 rows=6
scale=0.25");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Invert");
run("Median...", "radius=.1");
close("\\Others");

run("Scale...", "x=- y=- width=width
height=height interpolation=Bilinear average
create");
run("Convert to Mask");
run("Invert");
segment=getImageID();
open(path+name);
og=getImageID();
selectImage(segment);
run("Adjustable Watershed");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
selectImage(og);
roiManager("Show All");
run("Tile");
selectImage(segment);
run("Select None");
run("Synchronize Windows");
setTool("line");
run("Line Width...", "line=9");
waitForUser("Para corrigir a imagem", "Clicar
em Sync All\nCorrigir a imagem com a
linha:\n- Apertar DEL para remover bordas\n-
Apertar F para desenhar bordas");
selectWindow("Synchronize Windows");
selectImage(segment);
rename(replace(title, ".tif", ""));
close("\\Others");
run("Convert to Mask");
run("Invert");
//Se a imagem não estiver calibrada remover
pixel da próxima linha
run("Analyze Particles...", "size=1-Infinity pixel
show=Outlines display exclude clear add");
rename(replace(title, ".tif", "")+"_Mask");
close("\\Others");
open(path+name);
rename(replace(title, ".tif", "")+"_Analyzed");
closeimg=getTitle();
roiManager("Show All");
run("Flatten");
roiManager("reset");
close(closeimg); }
* É importante ressaltar que quando o
processo de WaterShed, que segmenta
as gotículas de lipídios, separou
inadequadamente alguma gotícula, ela
foi desconsiderada da análise e
analisada
```

ANEXO IV – MACRO IMAGEJ TAM

```
//TAM
setTool("Paintbrush Tool");
run("Colors...", "foreground=black background=white selection=pink");
setForegroundColor(0, 0, 0);
setTool("Paintbrush Tool");
waitForUser("Corrigir imagem", "Usar o pincel para destacar o que deverá ser desconsiderado");
run("Set Scale...", "distance=346 known=50 pixel=1.037 unit=um");
original = getTitle();
string1= substring(original, 0,7);
run("Duplicate...", " ");
run("RGB Stack");
close1 = getTitle();
run("Next Slice [>]");
run("Duplicate...", "use");
close2= getTitle()
run("Despeckle");
run("Unsharp Mask...", "radius=3 mask=0.90");
run("Mexican Hat Filter", "radius=17");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Invert");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=open"); Transformar a imagem em preto e branco
run("EDM Binary Operations", "iterations=6 operation=close");
run("Invert");
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Adjustable Watershed", "tolerance=2"); Separar partículas
close(close1);
run("Analyze Particles...", " circularity=0.00-1.00 show=[Bare Outlines] display exclude clear");
Quantificar partículas esféricas que sejam maiores que 25µm2
rename(string1 + "_analyzed");
outlines= getTitle();
run("Create Selection");
selectWindow(original);
run("Restore Selection");
close(close2);
selectWindow(outlines);
run("Select None");
setForegroundColor(255, 255, 255);
setTool("Paintbrush Tool");
}
```

* **É importante ressaltar que quando o processo de WaterShed, que segmenta as gotículas de lipídios, separou inadequadamente alguma gotícula, ela foi desconsiderada da análise e analisada manualmente. Assim, a partir da área das gotículas de lipídios quantificadas, foi feita a estratificação delas de acordo com o tamanho.**