



Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

OSCAR MAURICIO SANTAMARIA NIÑO

**EXPOSIÇÃO A UMA DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS
LEVA A ANORMALIDADES METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, SEMELHANTES A
CARACTERÍSTICAS DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E FALÊNCIA OVARIANA
EM RATAS**

Doutorado em Ciências Fisiológicas
Vitoria, janeiro 2022

OSCAR MAURICIO SANTAMARIA NIÑO

**EXPOSIÇÃO A UMA DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS
LEVA A ANORMALIDADES METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, SEMELHANTES A
CARACTERÍSTICAS DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E FALÊNCIA OVARIANA
EM RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial de obtenção de título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(PPGCF, CCS - UFES)

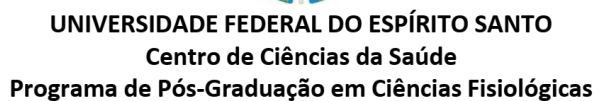
Vitória, janeiro 2022

S231e Santamaria Niño, Oscar Mauricio, 1983-
Exposição a uma dieta com alto teor de carboidratos refinados
leva a anormalidades metabólicas e reprodutivas, semelhantes a
características da síndrome do ovário policístico e falência
ovariana em ratas / Oscar Mauricio Santamaria Niño. - 2022.
69 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli .
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Dieta rica em carboidratos refinados. 2. Obesidade. 3.
Leptina. 4. Síndrome do ovário policístico. 5. Reserva ovariana.
6. Glândulas uterinas. I. , Jones Bernardes Graceli. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 612



A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “**EXPOSIÇÃO UMA DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS LEVA A ANORMALIDADES METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, SEMELHANTES A CARACTERÍSTICAS DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E FALÊNCIA OVARIANA EM RATAS**” elaborada por **OSCAR MAURICIO SANTAMARIA NIÑO**, candidato ao Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 17 de janeiro de 2022, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

(X) Aprovada

() Reprovada

Vitória, 17 de janeiro de 2022.

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(PPGCF-UFES) – Orientador

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Documento assinado digitalmente

LEANDRO MIRANDA ALVES

Data: 18/01/2022 20:50:37-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Prof. Dr. Leandro Miranda-Alves
Ciências Biomédicas/UFRJ) – Titular externo

Prof. Dr. Leandro Ceotto Freitas Lima

(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS) - Titular externo





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ROGER LYRIO DOS SANTOS - SIAPE 2531318
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 19/01/2022 às 11:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/345863?tipoArquivo=O>

Este documento foi assinado digitalmente por 
Para verificar o original visite: <https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/345863?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LEONARDO DOS SANTOS - SIAPE 1803126
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 19/01/2022 às 11:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/345873?tipoArquivo=O>

Este documento foi assinado digitalmente por **LEONARDO DOS SANTOS** CELI 7
Para verificar o original visite: <https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/345873?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JONES BERNARDES GRACELI - SIAPE 2630280
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 19/01/2022 às 11:57

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/345890?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por sempre mostrar-me o caminho, ainda que em terras estrangeiras, permitindo que eu conhecesse enigmas, cultura e me guiando por caminhos que eu não tinha certeza se dariam em algum lugar ou não. Por sempre estar presente (em todos os lugares e em algumas pessoas) para ouvir-me ou aconselhar-me.

À minha Família, especialmente a meus pais **Victor Julio Santamaria** e **Blanca Teresa Niño** e aos meus irmãos em terra, **Yesid e Sandra**; e minha irmã **Magda** que no Céu segue torcendo por todos nós. À **minha sobrinha e irmã Ana Maria**, por me apoiar mesmo à distância, por orar, acreditar e torcer por mim, tendo paciência e tranquilidade para atender minhas chamadas on-line, ou iniciando uma ligação por vídeo apenas para saber se estava tudo certo. Obrigado por todos vocês fazerem parte da minha vida, sendo minha base e por todo o apoio para que eu nunca desistisse de correr atrás dos meus sonhos, permitindo que chegasse até aqui, sempre em busca de sabedoria e felicidade.

À minha namorada **Cristiane**, por seu carinho e paciência nos momentos que precisei focar nos experimentos. Por ajudar-me a refletir, compreender e valorizar a companhia de uma verdadeira parceira. Com seu sorriso alto e abraço carinhoso contagiava-me de alegria nos momentos de desânimo. Obrigado por toda a sinceridade e por sempre estar por perto quando precisei, sempre acreditando em mim.

Ao meu amigo e irmão **Charles**, por me apoiar em tudo, desde que cheguei no Brasil, dentro e fora do laboratório, nos experimentos e no desenvolvimento do meu projeto doutoral. Por acreditar em mim, mesmo sendo de cultura diferente, por todos os conselhos e dicas do dia a dia e os incontáveis: “- não está fácil para ninguém, mas calma que vai dar certo!” Obrigado por toda a paciência que teve por mim e por sempre falar com sinceridade.

Aos outros amigos do **Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular (LETC)**, por me receberem tão bem e por me ajudarem em tudo, por todo o ensinamento pessoal e profissional, pelas risadas e conversas, experimentos realizados com sucesso ou nem tanto assim. Ao **Eduardo**, por seu respeito, confiança e amizade em todos os momentos do laboratório, sendo um exemplo

de pessoa, sempre disposto a ajudar e a contribuir com seus conhecimentos, obrigado por todo o apoio. À **Jordana**, que, com paciência e amizade sincera, foi importante apoio para o desenvolvimento de meu projeto de doutorado, além de ajudar no laboratório. Ao amigo **Tiago** (Tiagão), por estar sempre disposto a ajudar e pelo seu bom-humor que contagiava a todos. Ao amigo **Leandro**, que apesar de não estar mais no laboratório hoje, contribuiu muito enquanto esteve, me ajudando e ensinando no primeiro ano de doutorado. Obrigado pela paciência na recepção quando pisei pela primeira vez em Vitória, pelas dicas de aluguel e pelas demais coisas do dia a dia, também sendo uma referência de pessoa para mim. À **Júlia** e à **Priscila**, que apesar do pouco tempo de contato, contribuíram e sempre estiveram dispostas a ajudar, dentro do laboratório e também com conselhos do dia a dia. Obrigado pelo carinho na recepção e na adaptação no grupo do laboratório. À **Neuza**, por sempre estar por perto e ser nossa companheira do laboratório. À **Raquel**, pela experiência e pelo acompanhamento e ajuda no dia a dia do laboratório, permitindo trazer ordem e tranquilidade no desenvolvimento de nossos projetos. Aos antigos e atuais ICs **Flávia, Gabriela, Jeanini, Natalia, Thalita, Kayke, Karine**, por acreditarem no time LETC.

Aos colegas de **Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** dos cursos de mestrado e doutorado que sempre me trataram com respeito e contribuíram para meu desenvolvimento. Por todos os momentos de aprendizado e de diversão, como as reuniões que aconteciam depois dos **Cursos de Férias 2018 e 2019**. Aos amigos que, mesmo fora da UFES, fizeram parte desse projeto, sempre me animando e dando força, independentemente da distância.

A todos os professores do Programa em Ciências Fisiológicas, em especial aos professores Leonardo, Roger, Alessandra, pela recepção, confiança e conselhos dentro e fora da UFES. Obrigado por toda contribuição acadêmica, por todas as incríveis aulas teóricas, práticas e discussões construtivas que com certeza serão fundamentais para minha contínua aprendizagem como pesquisador e professor.

Ao **professor Jones** pelo acolhimento no **LETC** e fora dele, pela paciência e por ter depositado confiança em mim. Obrigado por todo o apoio acadêmico, na escrita da tese e dos artigos, por me fazer sentir em casa, abrindo espaço em sua residência para compartilhar cafés e feijoadas, e por se preocupar em manter uma boa harmonia e tranquilidade dentro e fora do LETC, permitindo que todos os integrantes do grupo se sentissem como família.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Aos **Laboratórios Multiusuários de Histotécnicas, Histologia Molecular e Imunohistoquímica e de Análises Biomoleculares**, à **Viviane** e aos técnicos envolvidos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Às **ratas Wistar**, que deram suas vidas para que o trabalho fosse executado, mas tenho consciência que as tratei com todo respeito.

À **UFES, UNILLANOS, CAPES, FAPES e CNPQ** pelo apoio financeiro e por todas as oportunidades acadêmicas proporcionadas.

RESUMO

A obesidade está associada a complicações reprodutivas femininas, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), que também está ligada à obesidade e à resistência à insulina (RI). O mecanismo exato dessa relação permanece obscuro. Foram realizados poucos estudos usando dieta com alto conteúdo em carboidratos refinados (HCD) que levam à obesidade foram realizados. Nesta investigação, avaliamos se a exposição subaguda ao HCD resulta em características semelhantes à SOP e outras irregularidades. Ratas foram alimentadas com HCD por 14 dias. Em seguida, foram avaliados o perfil metabólico e a morfofisiológica do trato reprodutivo. Ratas HCD apresentaram deficiências metabólicas, como aumento do peso corporal / adiposidade, hipertrofia de adipócitos, perfil lipídico anormal, tolerância à glicose e RI, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia. Foi observado funcionamento inadequado do trato reprodutivo do HCD. Especificamente, foi observada ciclo estral irregular, níveis elevados de LH e morfologia ovariana anormal, juntamente com redução no número de folículos primordiais e primários, sugerindo depleção das reservas ovarianas. Desenvolvimento folicular inadequado e redução da área dos folículos antrais, corpos lúteos e da camada granulosa, juntamente com um aumento dos folículos císticos eram aparentes. Foi observada atrofia uterina e redução no número da glândula endometrial (GE) em ratas HCD. Além disso, inflamação do trato reprodutivo, OS e fibrose foram observados em ratas HCD. Ademais, fortes correlações positivas foram observadas entre peso corporal / adiposidade e RI com a duração do ciclo estral, folículos císticos, reserva ovariana, GE e outras anormalidades reprodutivas. Assim, esses dados sugerem que a exposição subaguda de HCD leva a características semelhantes à SOP, reserva ovariana prejudicada, número de GE e outras anormalidades reprodutivas em ratas.

Palavras-chave: Dieta rica em carboidratos refinados; obesidade; leptina; síndrome do ovário policístico; reserva ovariana; glândulas uterinas.

ABSTRACT

Obesity is associated with female reproductive complications, such as polycystic ovary syndrome (SOP), is linked with obesity and insulin resistance (IR). The exact mechanism of this relationship remains unclear. We identified a Few studies that used refined carbohydrate (HCD) to lead to obesity. This investigation assessed whether subchronic HCD exposure results in SOP-like features and other irregularities. We fed the Female with HCD for 14 days, assessing metabolic outcome and reproductive tract morphophysiology. We further evaluated reproductive tract inflammation, oxidative stress (OS), and fibrosis. HCD rats displayed metabolic impairments, such as an increased body weight/adiposity, associated to a metabolic imbalance.

Moreover, we observed an improper functioning of the HCD reproductive tract. Specifically, irregular estrous cyclicity, high LH levels and abnormal ovarian morphology coupled with reduction in primordial and primary follicle numbers were observed, suggesting ovarian reserve depletion. Improper follicular development and a reduction in antral follicles, corpora lutea and granulosa layer area together with an increase in cystic follicles were apparent. Uterine atrophy and reduction in endometrial gland (GE) number were observed in HCD rats. In addition, we identified reproductive tract inflammation, OS, and fibrosis in HCD rats. Further, we observed strong positive correlations between body weight/adiposity and IR with estrous cycle length, cystic follicles, ovarian reserve, GE and other reproductive abnormalities. Thus, these data suggest that the subchronic HCD exposure led to SOP-like features, impaired ovarian reserve, GE number, and other reproductive abnormalities in female rats.

Keywords: High-refined carbohydrate diet; obesity; leptin; polycystic ovary syndrome; ovarian reserve; uterine glands.

LISTA DE SIGLAS

An	Folículo antrais
At	Folículo Atrésico
AUC	Area abaixo da curva
AUC	Area abaixo da curva
CL	Corpo Lúteo
CO	Células Cornificadas
Cys	Cístico
CYP19	Aromatase
DF1	Escore de diferenciação 1
DF2	Escore de diferenciação 2
DHE	Dihidroetídeo
DIO	Obesidade Induzida por dieta
DMSO	Dimetilssulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
E	Estro
E2	Estradiol
EDC	Endocrine disrupting chemical
EPM	Erro padrão da média
ERa	Receptor de estrogênio a
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESR1	Gene do receptor de estrogênio- α
FSH	Hormônio folículo estimulante
GCS	Células de granulosa escamosa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GE	Glândula Endometrial
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HCD	Dieta rica em carboidratos
HFD	Dieta rica em GORDURAS
HFHS	Dieta rica em gordura e alta em teor de açúcares
GSH	Glutathione reduzida
H2O2	Peróxido de hidrogênio
H2SO4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IgG	Imunoglobulina G
IR	Receptor de insulina
LH	Hormônio Luteinizante
M	Metaestro
MD	Metaestro-Diestro
MYO	Miometrial
NU	Nucleadas
OS	Estresse Oxidativo
P	Proestro
P	Polimorfonucleada
SOP	Síndrome do ovário policístico
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PTHrH	Proteína relacionada ao hormônio paratireoideano

TAP	Tecido adiposo parametrial
TARA	Tecido adiposo retro abdominal
TARP	Tecido adiposo retroperitoneal
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMB	Tetrametilbenzidina
TPT	Trifenilestanho
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esteroidogênese ovariana.....	26
Fig.2. Peso corporal e ingestão alimentar em ratas CON e HCD..	36
Fig.3. Parâmetros metabólicos em ratas.....	38
Fig.4. Perfil metabólico glicêmico e lipídico em ratas..	39
Fig.5 Ratas HCD apresentaram ciclo estral anormal..	40
Fig.6. Perfil dos hormônios em ratas.....	41
Fig.7. A exposição ao HCD leva ao desenvolvimento folicular ovariano anormal em ratas.....	42
Fig.8. A exposição à dieta rica em carboidratos (HCD) induz atrofia uterina em ratas.....	43
Fig.9. Inflamação no trato reprodutivo em ratas por exposição a dieta HCD..	44
Fig.10. A exposição ao HCD aumenta o estresse oxidativo do trato reprodutivo em ratas.....	45
Fig.11. Acúmulo de colágeno no trato reprodutivo em ratas.....	46
Fig.12: Esquema da ação da dieta HCD sobre o trato reprodutivo e tecido adiposo.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subclassificações da SOP e FOP de acordo com as características fisiopatológicas.....	27
Tabela 2– Peso dos órgãos corrigido para o peso corporal	37
Tabela 3- Correlação entre marcadores metabólicos da dieta HCD, características semelhantes à SOP e outras anormalidades reprodutivas.	49

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
Síndrome Metabólica	20
Dieta Hipercalórica	23
Sistema endócrino-reprodutivo feminino	24
Eixo hipotálamo-hipófise-ovários	25
Esteroidogênese ovariana	26
Fig.1. Esteroidogênese ovariana	26
Síndrome do Ovário Policístico (SOP)	27
JUSTIFICATIVA.....	28
OBJETIVO GERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MÉTODOS	30
Animais experimentais	30
Dieta	30
Avaliação dos pesos dos órgãos	30
Ensaio hormonal.....	31
Avaliação do Ciclo Estral das Ratas.....	31
Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica	32
Análise do perfil lipídico	32
Avaliação de inflamação	34
Avaliação do estresse oxidativo.....	34
Avaliação da densidade de colágeno.....	34
Análise estatística	34
RESULTADOS.....	36
Exposição à dieta HCD elevou o peso corporal e o consumo alimentar das	36
Fig.2. Peso corporal e ingestão alimentar em ratas CON e HCD.....	36
Exposição à Dieta HCD aumentou o peso das gorduras, adiposidades e dos ovários.....	36
Fig.3. Parâmetros metabólicos em ratas.	38
Ratas expostas a dieta HCD apresentaram alteração no perfil metabólico.	39
Fig.4. Perfil metabólico glicêmico e lipídico em ratas.....	39
Alteração no ciclo estral foi observado nas ratas expostas a Dieta HCD.....	40
Fig.5 Ratas HCD apresentaram ciclo estral anormal.	40
Ratas expostas à dieta HCD apresentaram aumento de LH, mas sem alteração em outros hormônios.	41
Fig.6. Perfil dos hormônios em ratas.	41
Exposição a dieta HCD reduziu a reserva folicular e alterou o desenvolvimento dos folículos ovarianos	41
Fig.7. A exposição ao HCD leva ao desenvolvimento folicular ovariano anormal em ratas.	42

HCD induz anormalidades da morfologia do útero em ratas	43
Fig.8. A exposição à dieta rica em carboidratos (HCD) induz atrofia uterina em ratas.	43
Exposição a dieta HCD levou a um processo inflamatório no trato reprodutivo	44
Fig.9. Inflamação no trato reprodutivo em ratas por exposição a dieta HCD.....	44
Exposição ao HCD alterou marcadores de estresse oxidativo no trato reprodutivo	45
Fig.10. A exposição ao HCD aumenta o estresse oxidativo do trato reprodutivo em ratas.	45
Ratas expostas ao HCD apresentam aumento na deposição de colágeno no trato reprodutivo	46
Fig.11. Acúmulo de colágeno no trato reprodutivo em ratas.	46
DISCUSSÃO.....	50
Fig.12: Esquema da ação da dieta HCD sobre o trato reprodutivo e tecido adiposo. Modificado de Niño et al., 2020.....	56
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
CRÉDITOS	68
PRODUÇÕES.....	69
ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS	!Error! Marcador no definido.

INTRODUÇÃO

Síndrome Metabólica

Pela primeira vez na história humana, há um predomínio maior na população de pessoas obesas e/ou com sobrepeso em detrimento da população desnutrida (Guh et al., 2009; Speakman & O'Rahilly, 2012). Em 2008, aproximadamente 1,5 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e, destes, mais de 200 milhões de homens e aproximadamente 300 milhões de mulheres eram obesas (Van De Sande-Lee & Velloso, 2012). Em comparação aos dados de 1980, o aumento na prevalência de obesidade foi de mais de duas vezes, sendo que as projeções para os próximos anos indicam que, em 2030, um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou seja, 57,8 % da população adulta mundial, terá sobrepeso ou obesidade (Adams et al., 2006; Kelly et al., 2008).

A obesidade é uma pandemia que afeta indivíduos de ambos os sexos e todas as idades (Kopelman, 2000). É uma condição metabólica anormal, na qual, os adipócitos se tornam hipertróficos e estão intimamente ligados à inflamação crônica de baixo grau (Hotamisligi, 2006, Zhang et al., 1994). A obesidade está associada a um risco aumentado de resistência à insulina (RI) e síndrome metabólica (SM). (Sheean et al., 2012, The Lancet Public Health, 2018).

No entanto, a patogênese exata da obesidade uma combinação multifatorial, que leva em conta o estilo de vida moderno, genética e outros fatores mais (Freitas-Lima et al., 2016). Recentemente, estudos mostraram que os fatores nutricionais, tais como carboidratos refinados e o consumo de dieta rica em gordura possuem papel importante na modulação do desenvolvimento da obesidade e na síndrome metabólica (Gao et al., 2017; Kjaergaard et al., 2018).

No Brasil, cerca de metade da população adulta apresenta sobrepeso, enquanto 12,5 % dos homens e 16,9 % das mulheres apresentam obesidade (Brasil. Ministério da Saúde, 2015). Desde 1974, observou-se aumento da incidência do sobrepeso de quase três vezes em homens adultos e de quase duas vezes em mulheres adultas. No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes no sexo masculino e em mais de duas vezes no sexo feminino (Brasil. Ministério da Saúde, 2015). O aumento dessa incidência afeta de forma significativa os indicadores de morbimortalidade,

e sem dúvida, os gastos com serviços de saúde, além de impactar negativamente a qualidade de vida e longevidade da população (Garcia-Jiménez et al., 2013; Kolotkin et al., 2001; Wadden & Phelan, 2002). Com a incorporação dos custos com fatores de risco da obesidade, como hipertensão e diabetes, os custos totais atribuíveis a essa doença chegaram a R\$ 669 milhões em hospitalizações e gastos ambulatoriais; e a R\$ 722 milhões em gastos com medicamentos, ou seja, um montante de R\$ 1,39 bilhão em 2018 (Augusto et al., n.d.; Bahia et al., 2012; Kopelman, 2000; Withrow & Alter, 2011),

O aumento de peso da população mundial se dá de maneira exponencial, como observado ao longo das décadas, e associado a isso, há a preocupação do aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, como SM e doenças reprodutivas. A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da SM, que representa um conjunto de anormalidades metabólicas, como dislipidemia, obesidade, resistência insulina, hipertensão arterial e diabetes *mellitus* tipo 2. Nos últimos anos, foi possível observar um aumento global da incidência de SM e suas consequências, caracterizando-a como uma pandemia do séc. XXI (Freitas-Lima et al., 2016; Go et al., 2013; Nandipati et al., 2016; Shishehgar et al., 2016).

As implicações da disfunção reprodutiva são um grande problema para a saúde pública global. Aumentou o número de mulheres com complicações metabólicas que tem procurado por técnicas de reprodução assistida (Bellver et al., 2010). Mesmo assim, a reprodução assistida tem sido menos eficaz em mulheres obesas e com excesso de peso, com menores taxas de gravidez e nascidos vivos, bem como uma maior incidência de perda de gravidez (Hohos & Skaznic Wikel, 2017 ;Bellver et al 2010 ;Rittenberg et al., 2011).

No mundo, existem diferentes tipos de dietas, as quais hoje em dia se encontram associadas a problemas metabólicos e reprodutivos, embora existam dietas como por exemplo as ricas em peixes, fibras, grãos, frutas e vegetais, como os modelos de dieta do Mediterrâneo, dietas nórdicas e abordagens dietéticas, para o tratamento da hipertensão apresentam eficácia comprovada para a redução de pressão arterial, SM e inflamação. Existem por outro lado, dietas ricas em gorduras que podem levar a prejuízos metabólicos,

cardiovasculares e reprodutivos (Bell et al., 2015; Calton et al., 2014; Hohos & Skaznik-Wikiel, 2017; Kastorini et al., 2011).

O estado nutricional adequado e função metabólica produzem um conjunto integrativo de fatores endócrinos que modulam diferentes eixos endócrinos, incluindo o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) (Hohos et al., 2018; Lainez & Coss, 2019). O eixo HPG é o principal modulador da função reprodutiva. Nos indivíduos do sexo feminino, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo estimula a produção/secreção de hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) pelos gonadotrofos da pituitária (Wildt, 1981). LH e FSH atuam em seus respectivos receptores para estimular a maturação do ovário, a ovulação e a produção de estrogênio (Legan & Karsch, 1975; Richards et al., 1980). Estudos têm relatado que anormalidades do eixo HPG em mulheres e/ou modelos experimentais estão associados à obesidade, RI e outras complicações metabólicas (Hohos et al., 2018; Jain et al., 2007; Roberts et al., 2017)

Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 60 % das mulheres em idade reprodutiva está acima do peso ou obesa (Flegal et al., 2010). Assim desfechos reprodutivos como disfunção do ciclo, anovulação, infertilidade, complicações da gravidez, e síndrome do ovário policístico (SOP) (Bellver et al., 2010; Ogden et al., 2015; Roberts et al., 2017)

A SOP é uma doença caracterizada por disfunção ovulatória, hiperandrogenismo e morfologia ovariana policística. Essa condição impacta aproximadamente 10 % das mulheres em idade reprodutiva (Dumesic et al., 2015; Fauser, 2004; Goodarzi et al., 2011).

Além das alterações reprodutivas, a SOP está associado a fatores de risco cardiometabólicos, incluindo IR, obesidade e dislipidemia (Álvarez-Blasco et al., 2006; Ehrmann et al., 2005). Estudos relatam que 40 %-80 % das pacientes com SOP são obesas (Sam, 2007). No entanto, devido a obesidade e a SOP compartilharem muitas comorbidades, incluindo RI e falha reprodutiva, permanece difícil determinar até que ponto a obesidade e SOP interagem para produzir disfuncionalidades. Assim, vários estudos investigaram as causas e/ou consequências da SOP utilizando diferentes modelos, como a obesidade induzida por dieta (DIO), como dieta rica em gordura (HFD) ou

hiperandrogenismo induzido por esteroides (Franks et al., 2002; Roberts et al., 2017).

Com o avanço populacional, apesar de haver estímulos para mudanças no estilo de vida com a finalidade de auxiliar na prevenção dessas doenças, o desenvolvimento industrial desenfreado, como por exemplo, aumento da produção de diferentes tipos de compostos químicos que são liberados no meio ambiente, pode comprometer a qualidade dos alimentos consumidos no mundo, além de contribuir com o agravamento e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (Hennig et al., 2007; Jeon et al., 2015).

Dentre os compostos químicos que podem comprometer a qualidade dos alimentos estão os xenobióticos, conhecidos como “desreguladores metabólicos” (C.J. Patel et al., 2012), alguns são conhecidos por “obesogênicos”, substâncias químicas (naturais e/ou sintéticas) que promovem o desenvolvimento da obesidade de maneira direta e/ou indireta. Outros fatores que também influenciam na síndrome metabólica são a dieta rica em gordura (High Fat Diet - HFD) e a dieta rica em carboidratos (High carbohydrate diet - HCD) que têm recebido atenção crescente nos últimos anos, tendo em vista sua relação com o aumento da incidência de distúrbios metabólicos, como obesidade e problemas reprodutivos (Lai et al., 2014; Volk et al., 2017; Zhang et al., 2012).

Dieta Hipercalórica

A maioria das mulheres americanas consomem HFD, com média de gordura de aproximadamente 35% da ingestão calórica, (*What We Eat in America, NHANES 2013-2014*, 2013), a gordura dietética para a população adulta saudável deve fornecer 20 % a 35 % de energia, (Vannice & Rasmussen, 2014), Uma dieta HFD no contexto de superalimentação leva a um aumento na deposição de lipídios nos tecidos adiposo e não adiposo (Wondisford et al., 2013).

Quando atingida a capacidade de armazenamento de lipídios dos tecidos não adiposos, há o aumento de lipotoxicidade e da função celular podendo levar à apoptose e outras anormalidades (Schaffer, 2003). A exposição à dieta hiperlipídica na idade pré-púbere induz sintomas de síndrome dos ovários policísticos (SOP) em ratas (R. Patel & Shah, 2018).

Em um estudo com HFD e alto teor de carboidratos (HFS) para induzir a obesidade em ratas foi mostrado o aparecimento de ovários policísticos e ciclo estral interrompido, ambos indicadores de comprometimento reprodutivo (Roberts et al., 2017). A deterioração dos resultados de fertilidade parece ser pior quando o fenótipo obeso está presente, além da exposição ao HFD, demonstrando que a função reprodutiva pode ainda ser pior em indivíduos obesos que continuam expostos uma dieta HFD (Skaznik-Wikiel et al., 2016).

Em camundongos fêmeas obesas alimentadas com HFD, foi observada menor fertilidade que os controles alimentadas com ração normal, este fenótipo é associado a uma regulação negativa da expressão do GnRH hipotalâmico (Tortoriello et al., 2004; van Leckwyck et al., 2016). Já em roedores pré-púberes, a exposição a curto prazo a uma dieta hiperlipídica (HFD), iniciada após o desmame, precipita a puberdade, observada pela abertura vaginal precoce. (Frisch et al., 1975; Lie et al., 2013; Zhou et al., 2014).

O consumo das dietas hipercalóricas, com ou sem o desenvolvimento da obesidade, prejudica a funcionalidade do eixo hipotalâmico-pituitário-ovariano (HPO), bem como seu controle na fertilidade. De acordo com as evidências atuais, parece que a disfunção reprodutiva resulta de um aumento na sinalização de leptina e insulina nos diferentes níveis do eixo HPO. (DiVall et al., 2015), Diferentes estudos demonstraram que a dieta *high-fat-high-sugar* (HFHS) pode afetar negativamente o ciclo estral, levando a aumento das taxas de anovulação (Volk et al., 2017).

Outros estudos mostram que, interessante, quando o receptor de insulina foi inibido nas células intersticiais da teca do ovário ou nos neurônios do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), os camundongos fêmeas foram protegidos do prejuízo no ciclo estral induzido pela dieta HFD (DiVall et al., 2015; Wu et al., 2014), demonstrando sua importância no controle metabólico da reprodução.

Sistema endócrino-reprodutivo feminino

O sistema reprodutivo de um indivíduo é normalmente caracterizado por suas gônadas e os órgãos acessórios. No caso do indivíduo do sexo feminino tem-se os ovários, que apresentam o importante papel de maturar e liberar por meio da ovulação, o gameta feminino, o oócito, o qual nas tubas uterinas pode ser fertilizado

e carregado até o útero, órgão que recebe o óvulo fecundado e onde ocorre a nidação e desenvolvimento do mesmo, permitindo assim, a perpetuação da espécie. Além de atuarem como gônadas, os ovários são glândulas endócrinas, ou seja, produzem e secretam hormônios, mais especificamente os esteroides. Esses por sua vez, são essenciais para reprodução e manutenção do embrião no útero, além de atuar em outros locais como no cérebro, hipófises, tubas uterinas, cérvix, vagina e glândulas mamárias. (HANNON; FLAWS, 2015).

O sistema reprodutivo tem caráter dinâmico, onde a cada ciclo reprodutivo o miométrio uterino passa por remodelamento (hipertrofia e involução), o ovário sofre reparo tecidual após a ovulação, e o útero ganha e perde a capacidade de receber ou não um novo embrião (EDDIE et al., 2014).

Cada órgão desse sistema se encontra harmonicamente conectado aos outros por meio de complexas vias de sinalização endócrina, envolvendo hormônios como os esteroides estrogênio e progesterona (YOUNG et al., 2017). E além destes, os não esteroides como FSH e LH, formando assim um eixo de comunicação que tem por função coordenar as modificações do trato reprodutivo como um todo, preparando-o para a reprodução. Essa rede de sinalização e regulação é denominado eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Song et al., 2012).

Eixo hipotálamo-hipófise-ovários

Entre as glândulas que compõem o sistema endócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-ovários, é o que controla diretamente a reprodução e a fertilidade de mulheres ou animais fêmeas. Esta regulação envolve a produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo núcleo arqueado do hipotálamo, que por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário atinge a hipófise anterior e regula a síntese e liberação das gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios atuam nos ovários, modulando o processo de maturação dos gametas (oogênese) e a produção dos hormônios sexuais (andrógenos, estrógenos e progestógenos). Eles também são responsáveis pela manutenção da estrutura glandular. O controle do eixo por meio do *feedback* negativo possibilita a modulação das etapas de síntese e liberação destes

hormônios e, conseqüentemente, suas ações locais e sistêmicas (Kronenberg et al., 2016)

Esteroidogênese ovariana

A síntese de hormônios nos ovários ocorre, predominantemente, nas camadas de células da teca e da granulosa dos folículos. A porção interna da teca é altamente vascularizada, e após estimulação pelo LH, converte colesterol em pregnenolona, que é convertida em progesterona, e por seguinte nos demais androgênios. Estes se difundem para a camada da granulosa adjacente, onde serão convertidos em estrogênio (Figura 1). Parte do estrogênio permanece no folículo, para a formação do antro ou para a estimulação da proliferação da granulosa, e outra parte do estrogênio é secretada na corrente sanguínea (BULUN; ADASHI, 2010)

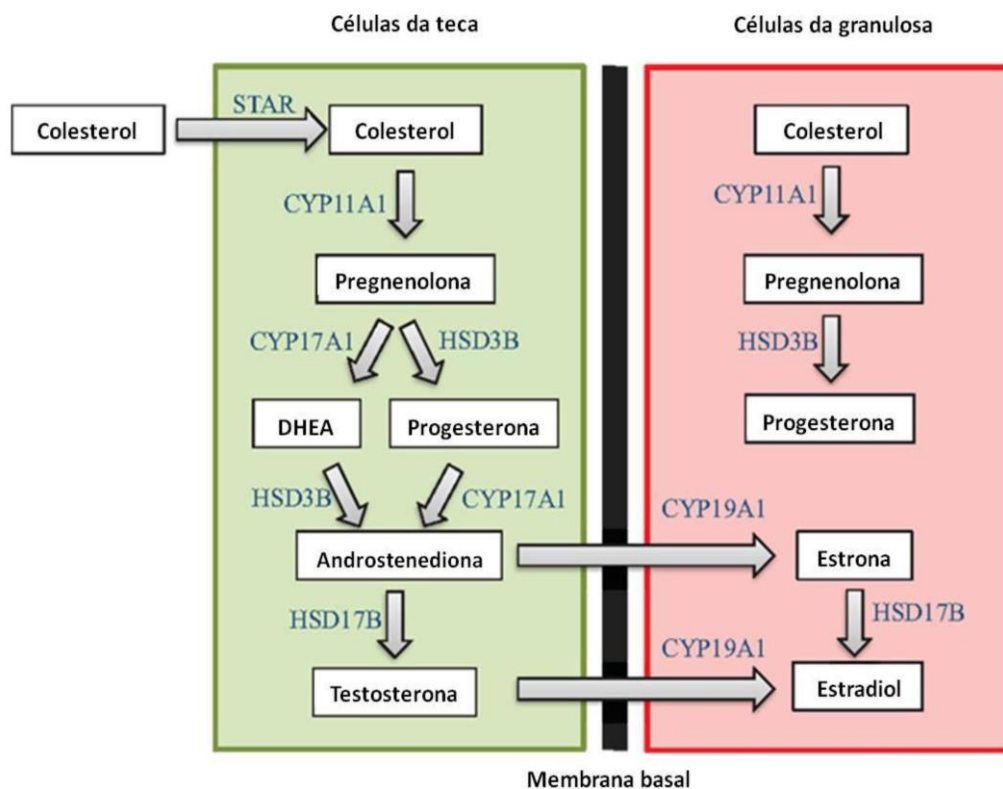


Fig.1. Esteroidogênese ovariana. O colesterol é transportado para a célula da teca pela StAR, onde se encontra a CYP11A1, que participa da conversão do colesterol em pregnenolona. Esta, por meio da CYP17A1 e HSD3B, será convertida em DHEA e progesterona, respectivamente, e, em seguida, em androstenediona, que seguirá duas vias: migrará para a célula da granulosa e será convertida em estrona por meio da CYP19A1 (e a estrona em estradiol, pela HSD17B) ou será convertida em testosterona pela HSD17B. A testosterona passará pela da camada celular da granulosa para que a CYP19A1 inicie o processo da conversão em estradiol. StAR: Proteína

reguladora aguda esteroideogênica; CYP11A1: colesterol desmolase; CYP17A1: 17 α -mono-oxigenase de esteroide ou 17 α -hidroxilase; HSD3B:3 β -hidroxiesteróide desidrogenase; HSD17B: 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase; CYP19A1: aromatase. Adaptado de (HANNON; FLAWS, 2015).

Síndrome do Ovário Policístico (SOP)

O primeiro consenso para o diagnóstico da SOP ocorreu em 1990, em uma reunião em Bethesda (EUA), onde o *National Institute of Health* (NIH) estabeleceu hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e anovulação como critérios diagnósticos, não levando em consideração os achados ecográficos (ZAWADSKI; DUNAIF, 1992).

Novas pesquisas de ultrassonografia foram realizadas no intuito de melhorar a eficácia do diagnóstico em 2003, em Rotterdam (Holanda), no encontro da *European Society for Human Reproduction* e da *American Society of Reproductive Medicine*, novas regras foram sugeridas.

Para confirmar o diagnóstico de SOP, dois destes três achados deveriam estar presentes: hiperandrogenismo (clínico ou laboratorial), anovulação crônica (oligo ou amenorréia) e ovários policísticos (presença ao exame ecográfico de 12 ou mais folículos entre 2 e 9 mm de diâmetro médio ou volume ovariano de 10 cm³ ou mais (apenas um ovário era suficiente para o diagnóstico)).

Tabela 1 – Subclassificações da SOP de acordo com as características fisiopatológicas.

Síndrome do ovário policístico (SOP)			
Severidade	Características		
	Hiperandrogenismo	Oligovulação	Ovário policístico
Baixa	X	✓	✓
Média	✓	X	✓
Alta	✓	✓	X
Muito alta	✓	✓	✓

SOP: Síndrome de ovário policístico. X: Característica não observada; ✓ : Característica observada. Baseado em (Nelson LM, 2009).

JUSTIFICATIVA

Existem investigações demonstrando os prejuízos das dietas ricas em carboidratos em diferentes partes do sistema reprodutivo, como peso dos órgãos sexuais e em diferentes fases do desenvolvimento. Sandovici et al. (2017) identificaram disfunção metabólica grave e alterações no tecido adiposo mesentérico, aumento no peso corporal, intolerância à glicose, disfunção renal e insuficiência cardíaca em ratas expostas à dieta HCD. Além de interromper o funcionamento normal do metabolismo, tem sido demonstrado que a dieta HCD rica em carboidratos prejudica a saúde reprodutiva e reduz a fertilidade em roedores (Balasubramanian et al., 2012; Volk et al., 2017).

Embora já tenham sido relatados os efeitos da exposição à dieta sobre o metabolismo, poucos se conhece sobre a ação de uma dieta HCD no sistema reprodutivo. Sabendo ainda, que a humanidade não se encontra exposta a somente um desses fatores. Portanto, abordagens utilizando diferentes dietas experimentais devem ser úteis para entender o comprometimento metabólico e inflamatório induzido pelo aumento da deposição de gordura, embora alguns estudos já tenham mostrado o efeito da obesidade induzida pela dieta rica em gordura. Nesse contexto, após pesquisas realizadas pouco foi observado na literatura sobre os prejuízos metabólicos e reprodutivos induzidos pela expansão do tecido adiposo em ratas alimentadas com dietas de alta contenção de carboidratos refinados.

O presente trabalho apresenta como hipótese que o consumo de uma dieta rica em carboidratos refinados de forma subaguda pode promover um aumento dos prejuízos de caráter inflamatório, oxidativo, obesogênico e atrófico no sistema reprodutor feminino.

OBJETIVO GERAL

Investigar os prejuízos metabólicos e reprodutivos induzido por dieta rica em carboidratos refinados (HCD).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A.** Avaliar os efeitos os da HCD sobre o peso corporal e dos órgãos de ratas.
- B.** Avaliar os efeitos da HCD sobre o perfil metabólico;
- C.** Verificar a ação da HCD sobre o ciclo estral.
- D.** Avaliar a ação da HCD sobre o perfil hormonal
- E.** Analisar os efeitos da HCD histomorfometria ovariana;
- F.** Analisar a ação da HCD histomorfometria uterina;
- G.** Avaliar a ação da HCD de estresse oxidativo no ovário.

MÉTODOS

Animais experimentais

Ratas Wistar adultas (8-10-semana de idade, $\pm$ 200 g) foram mantidas em temperatura controlada entre 23-25 °C, umidade controlada entre 50-60% e ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para cuidado e uso de animais de laboratório, como indicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (nº 03/2016). Os animais foram pesados e a ingestão de alimentos foi medida a cada três dias e anestesiados no último dia de exposição (dia 15) usando cetamina e xilazina (90 mg/kg e 4,5 mg/kg, intraperitoneal) antes da eutanásia. Amostras de sangue e pesos dos órgãos foram obtidos (Tabela 1, n=18 por grupo).

Dieta

Para analisar os parâmetros reprodutivos induzidos por dieta rica em carboidratos refinados elevados (HCD), os animais foram alimentados com ração regular de roedores e água filtrada fornecidos *ad libitum*. (dieta controle CON, n=18) ou HCD experimental (HCD, n=18) durante quinze dias. A composição macronutriente da dieta controle (4,0 kcal/g) foi de 65,8 % de carboidrato, 3,1 % de gordura e 31,1 % de proteína; a dieta HCD (4,4 kcal/g) foi de 74,2 % de carboidrato, 5,8 % de gordura e 20 % proteína. É importante notar que a dieta HCD contém pelo menos 30 % de açúcares refinados, principalmente sacarose (Oliveira et al., 2013; Gomes et al., 2020; Lacerda et al., 2019).

Avaliação dos pesos dos órgãos

Após o tratamento, as ratas foram anestesiadas e eutanasiadas por decapitação na fase de metaestro-diestro, para a coleta de sangue da região cervical para a dosagem de hormônios sexuais. Além disso, foram coletados: hipotálamo, hipófise, coração, pulmão, baço, timo, pâncreas, rins, adrenais, fígado, ovários, útero, gordura parametrial, gordura perirrenal, gordura perivesical e gordura retroperitoneal. Esses órgãos foram pesados em balança de alta precisão. Todo procedimento de pesagem foi realizado pela mesma pessoa.

Ensaaios hormonais

Amostras de soro foram obtidas pela manhã na fase de metaestro-diestro (MD), e os níveis de hormônios metabólicos, gonadotrofinas e esteroides sexuais ovarianos foram avaliados. Os níveis séricos de leptina e adiponectina em jejum foram determinados usando kits de ELISA (R&D systems Europe Ltd., Abington, UK- detalhes), de acordo com as instruções do fabricante. Hormônio luteinizante e folículo estimulante (LH e FSH, respectivamente) foram determinados usando kits de ELISA (#ENZ-KIT 107 -LH e #ENZ-KIT 108-0001- FSH, Enzo life Sciences In. Farmingdale,

NY, USA),(Sena et al ., 2017). Os níveis de estradiol (E₂) foram medidos usando o kit E₂ ELISA (EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Alemanha) (Podratz et al., 2015; Rossi et al., 2016). Os níveis de progesterona (P₄) foram medidos usando o kit P₄ ELISA (EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Alemanha) (Podratz et al., 2015; Rossi et al., 2016). Os níveis de testosterona foram medidos utilizando um kit de ELISA para testosterona (AIA-1559, DRG International, Inc., EUA). O limite de detecção do ensaio para testosterona foi 1,76 ng /mL. (Podratz et al., 2015; Rossi et al., 2016).

Avaliação do Ciclo Estral das Ratas

Foi coletada diariamente a secreção vaginal dos animais entre 8 e 9 horas da manhã, sendo obtida após injeção de 10 µL de salina (NaCl 0,9 %). Todas as ratas apresentavam ciclo estral regular, de quatro a cinco dias, sendo que o ciclo reprodutivo foi monitorado por análise do esfregaço vaginal recolhido diariamente durante por duas semanas consecutivas antes de iniciar os experimentos (Lisboa et al., 2001; Podratz et al., 2012). Este material foi depositado sobre lâminas, previamente limpas e secas, cada lâmina recebendo o esfregaço vaginal de 4 animais diferentes. Posteriormente, essas lâminas foram fixadas em metanol e coradas com eosina e hematoxilina. Depois de secas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) para avaliação dos esfregaços.

As fases do ciclo foram determinadas por citologia e pela consistência do muco vaginal: quando observamos muco pouco espesso com predominância de leucócitos, poucas células epiteliais nucleadas bem formadas, e pouca ou nenhuma célula cornificada, classificamos como transição de diestro-proestro (DP); muco de média consistência, predominância de células nucleadas, de nenhum a poucos

leucócitos degenerando e pouca a nenhuma célula cornificada, classificamos como proestro (P); se não observados leucócitos, presença de células nucleadas, predominância de células cornificadas e muco de média consistência, classificamos como transição proestro-estro (PE); muco com consistência média a muito denso e presença apenas de células cornificadas, classificamos o ciclo como estro (E); se o esfregaço apresentar de nenhum a poucos leucócitos e predominância de células cornificadas maiores do que em estro, além de muco com média densidade a muito denso, classificamos a fase como metaestro 1 (M1); na predominância de leucócitos, poucas células nucleadas e irregulares, poucas células cornificadas e muco com espessura de média para muito espesso, classificamos como metaestro 2 (M2); quando observamos predominância de leucócitos e pouquíssimas células nucleadas, muitas vezes irregulares, com muco pouco espesso, classificamos como diestro (D) (Nelson et al., 1982). A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração das fases de proestro, estro e metaestro- diestro (em dias), bem como a duração total do ciclo estral. Todas as quantificações foram realizadas por um único observador (Tanno & Marcondes, 2002).

Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica

O teste de sensibilidade insulínica foi realizado pela manhã, com os animais no estado alimentado, por meio da aplicação intraperitoneal (ip) de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. Com um pequeno corte na ponta da cauda do animal, para coleta de sangue e verificação da glicemia no momento anterior à aplicação de insulina e nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos. O teste de tolerância à glicose foi realizado pela tarde, com os animais em jejum de 6 horas, por meio da aplicação ip de 2g de glicose/kg. Os testes foram realizados em dias diferentes para permitir a recuperação dos animais, após um pequeno corte na ponta da cauda do animal, para coleta de sangue e verificação da glicemia no momento anterior à aplicação da glicose e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. O aparelho utilizado para leitura glicêmica nos testes foi o Accu-Chek® Advantage (Roche) (Freitas-Lima et al., 2016).

Análise do perfil lipídico

Para avaliar o efeito da dieta HCD sobre o metabolismo lipídico, os níveis de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa

densidade (LDL) e triglicerídeos foram medidos pelo método enzimático colorimétrico (Kits Bioclin-Quibasa, K083, K071, K088 e K117, respectivamente). Os níveis de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foram calculados conforme descrito em (Eleazu et al., 2018).

A análise morfológica dos ovários e úteros foi realizada. Esses órgãos foram coletados na fase de MD e fixados em solução salina tamponada com fosfato (PBS)-formalina (4 %) à temperatura ambiente. Secções dos ovários e útero foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e examinados para parâmetros morfológicos usando microscópio de luz (Podratz et al., 2015).

Nos ovários, os folículos ovarianos e corpos lúteos (CL) foram quantificados e expresso em unidades por área (mm²). Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com o método (Myers et al., 2004). Resumidamente, os folículos eram classificados como primordiais se contivessem um oócito rodeado por uma camada parcial ou completa de células da granulosa pavimentosas (GCs).

Folículos foram classificados como folículos primários se contivessem uma única camada de GCs cuboidais. Os folículos foram classificados como pré-antrais quando continham 2-4 camadas de GCs sem espaço antral. Folículos antrais (An) continha três ou mais camadas de GCs e um espaço antral claramente definido. Os folículos ovarianos atrésicos (At) e císticos (Cys) também foram avaliados conforme descrito anteriormente por (Shi et al., 2009).

O número total de folículos ovarianos saudáveis (a soma de folículos primordiais, primários, pré-antrais e folículos antrais) e folículos não saudáveis (a soma de atrésico e folículos císticos), espessura da granulosa e área teca do folículos antrais foram avaliados (Caldwell et al., 2014). Secções transversais uterinas foram utilizadas para avaliar as camadas endometrial (extremidade) e miometrial (Myo). Glândulas endometriais (GE) também foram avaliados (Richards et al., 1980) ovários e úteros foram analisados em múltiplas secções em diferentes planos histológicos ao longo de todos os órgãos (até 50 µm de distância entre as secções) com imagens de alta qualidade, resultando em um total de 15-20 medições / animal (n = 5-6), conforme descrito anteriormente (de Araújo et al., 2018; Sena et al., 2017). (Todas as avaliações foram realizadas com um microscópio Olympus (AX70; Center Valley, PA) e fotografado com câmera AxioCam.

Avaliação de inflamação

A quantificação de mastócitos foi realizada nos tecidos ovarianos e uterinos. Secções ovarianas e uterinas foram coradas com Alcian blue usando um protocolo padrão (Sigma). Cada uma das secções foi usada para obter 20 fotomicrografias sob microscopia de luz (objetiva 40X). Resumidamente, examinamos as fotomicrografias para a presença e número de núcleos em células que continham grânulos citoplasmáticos roxos. As áreas ovarianas e uterinas a serem analisadas foram selecionadas aleatoriamente com a exceção de que campos contendo vasos sanguíneos de médio porte foram cuidadosamente evitados. O número de células coradas positivamente foi expresso por unidade área (mm²) (Bertuloso et al., 2015).

Avaliação do estresse oxidativo

Após a eutanásia, os órgãos foram imersos em OCT (Tissue-Tek®, Compound, Sakura) para confecção do bloco histológico e congelado em freezer - 80 °C. Posteriormente, foram realizados cortes de 8 µm em micrótomo criostato e colocadas sobre lâminas de vidro identificadas. Os cortes foram incubados com solução Krebs contendo dihidroetídio 2 µM durante 30min a 37 °C. Ao final, as lâminas (5 fotos em cada lâmina) foram fotografadas para posterior medida de intensidade da fluorescência emitida nos cortes, o que indica a produção de ânion superóxido. A intensidade do sinal foi analisada em 20 secções por tecido (de Araújo et al., 2018; Merlo et al., 2016).

Avaliação da densidade de colágeno

As secções ovariana e uterina foram coradas com *Picrosirius Red* para obtenção de fotomicrografias sob objetiva de 10x com contraste de fase e analisadas com *ImageJ*. As imagens foram convertidas em imagens em preto e branco de alto contraste para visualizar as fibras de colágeno coradas. Os resultados representam a porcentagem de colágeno depositado no útero (Merlo et al., 2016).

Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM). Para identificar possíveis valores extremos nos dados, um de dois lados foi

utilizado o teste de Grubbs. Quando o teste de Grubbs identificou um outlier, usamos um método ROUT adaptado para detectar quaisquer outliers daquela coluna de dados e os removemos de acordo com a configuração Q em 1% ($\alpha = 0,01$). Os testes ômbus de D'Agostino e Pearson foram usados para avaliar a normalidade dos dados. As comparações entre dois grupos foram realizadas por teste Student t para dados de gaussianos. Além disso, para os dados não gaussianos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliar a relação entre os parâmetros avaliados, foi utilizada a correlação (Tabela 3) de Spearman ou de Pearson caso fosse detectada distribuição não gaussiana ou gaussiana, respectivamente. Todas as correlações (Tabela 3) foram obtidas a partir de valores de animais emparelhados. Por fim, quando a significância estatística foi identificada, testamos se a regressão linear ou não linear foi melhor ajustada. As análises estatísticas e a construção gráfica foram realizadas no GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

Exposição à dieta HCD elevou o peso corporal e o consumo alimentar das ratas

As ratas do grupo HCD apresentaram aumento do peso corporal, com diferença no dia 15 em comparação com as ratas do grupo CON ($p < 0,01$, $n=18$ por grupo, Fig.2A). Um pequeno aumento na comida diária a ingestão foi observada em ratas de HCD em comparação com ratas CON (8,9 %, Fig.2C, $p < 0,05$, $n=18$).

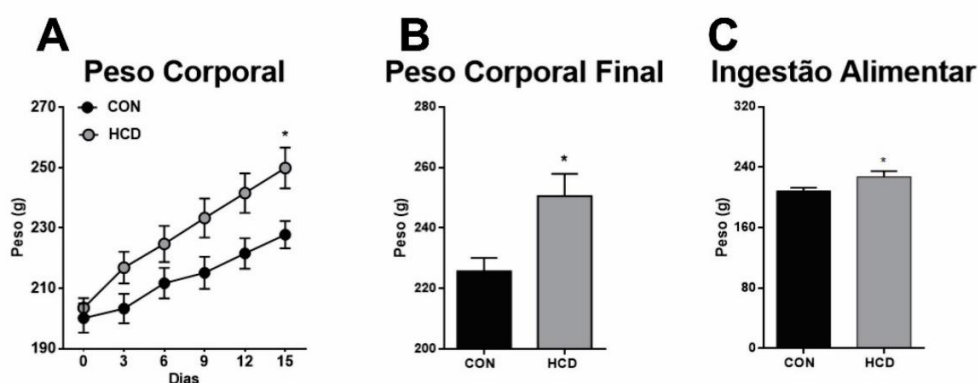


Fig.2. Peso corporal e ingestão alimentar em ratas CON e HCD. (A) *Peso corporal em ratas de dieta rica em carboidratos (HCD) ao longo de 15 dias*; (B) *(Peso corporal final de ratas HCD ao final de 15 dias (n=18)*; (C) *Ingestão de alimento pelas ratas HCD comparado ao grupo CON.* * $p < 0,05$.

Exposição à Dieta HCD aumentou o peso das gorduras, adiposidades e dos ovários

Não foram observadas alterações significativas nos pesos do tecido adiposo perirrenal, útero, fígado, baço, glândula suprarrenal, rim, coração e pâncreas entre ratas CON e HCD (Tabela 2, $p > 0,05$, $n = 5-18$), mas observamos aumento do peso corporal e dos ovários no HCD em comparação com as ratas CON (aumento do peso ovariano de 27,12 %, $p < 0,05$, $n=18$, Tabela 2).

A dissecação abdominal apresentou aumento aparente da gordura visceral em ratas HCD em comparação com ratas CON (Fig.3A). Observou-se aumento nos pesos e adiposidade dos tecidos adiposos parametrial (TAP), retro abdominal (TARA) e retroperitoneal (TARp) em ratas HCD (52,8; 130,7 e 80 %, respectivamente, $p < 0,05$, $n=18$, (Fig.3B-D). O tecido adiposo mesentérico (TAM) apresentou tendência ao aumento de ratas de HCD em comparação com ratas CON (50,0 %, $p=0,055$, $n=18$, Fig.3E). Como esperado, observou-se aumento da adiposidade em ratas de HCD em comparação com ratas CON (50,0 %, $n=18$, $p < 0,05$, Fig.3F). O tecido adiposo parametrial (TAP) corada de H&E sugeriu uma hipertrofia em adipócitos de HCD em

comparação com adipócitos CON (Fig.3G e H). Observou-se redução do número de adipócitos e aumento do tamanho do adipócito no TAP do grupo HCD em relação ao CON (37,35 e 35,7 %, $p < 0,05$, $n=5-6$, Fig.3I e J). Os níveis de leptina e adiponectina foram quantificados e observamos elevação nos níveis da leptina no grupo HCD, sem diferenças observadas quanto a adiponectina ($p < 0,05$ e $p > 0,05$ respectivamente; Fig.3K e L).

Tabela 2– Peso dos Órgãos corrigido pelo comprimento da Tíbia.

Órgãos	CON	HCD
Coração (mg/mm)	20 ± 1,06	21 ± 1,16
Baço (mg/mm)	14 ± 1,17	17 ± 1,43
Pâncreas(mg/mm)	14,3 ± 3,75	16 ± 2,34
Fígado (mg/mm)	246 ± 32	261 ± 28
Adrenal(mg/mm)	1,9 ± 0,16	1,7 ± 0,12
Rins (mg/mm)	42 ± 2,33	41 ± 2,62
Ovários (mg/mm)	2,2 ± 0,12	2,9 ± 0,22*
Útero (mg/mm)	9 ± 0,59	9 ± 0,61
TAB Perirenal (mg/mm)	27 ± 7,66	30 ± 6,15

TAB: Tecido adiposo branco; Os valores foram expressos como a média ± EPM ($n=5-18$). * $p < 0,05$ vs CON.

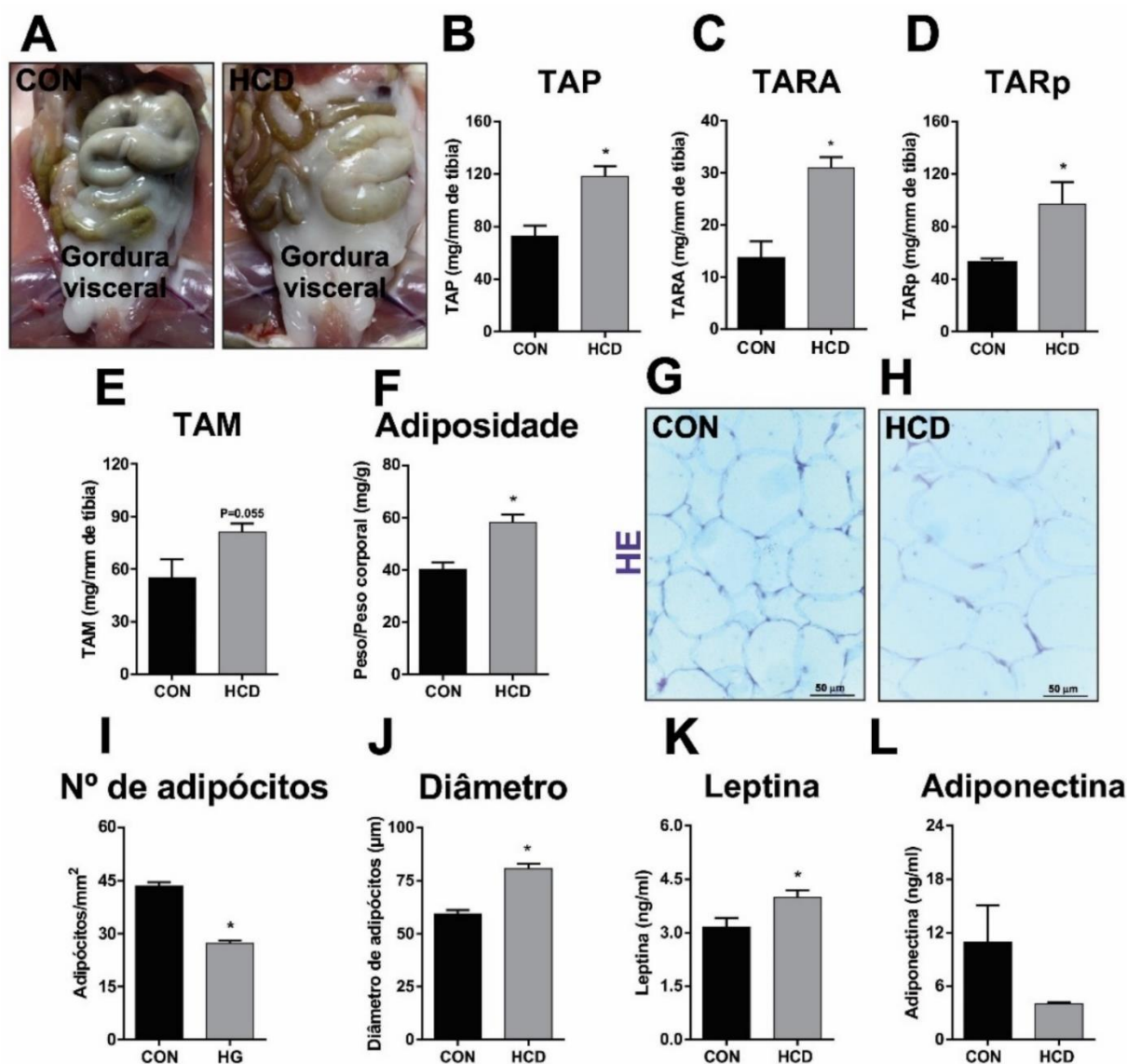


Fig.3. Parâmetros metabólicos em ratas. (A) Comparação da gordura visceral de ratas CON e HCD. (B) Aumento do peso da gordura parametrial (TAP) em ratas HCD. (C) Aumento do peso da gordura retroabdominal (TARA) em Ratas HCD. (D) Aumento do peso da gordura retroperitoneal (TARp) em ratas HCD. (E) Peso de gordura mesentérica (TAM) em ratas HCD. (F) Aumento da adiposidade em ratas HCD. (G) HE do tecido adiposo das ratas CON. (H, I e J) Aumento do diâmetro e redução da contagem de adipócitos das ratas HCD. (K) Níveis de leptina no grupo HCD. (L) Níveis de adiponectina. (M, O) Alteração metabólica com redução na tolerância à glicose e (N, P) da sensibilidade à insulina. * $p < 0,05$, $n=18$

Ratas expostas a dieta HCD apresentaram alteração no perfil metabólico.

Foram realizados testes de tolerância à glicose (TTG) e de sensibilidade à insulina (TSI), os quais indicaram respostas anormais em ratas HCD. Um aumento na glicemia durante o teste de TTG foi observado no tempo 15 min e 26 % da área sob curva em ratas de HCD em comparação com as ratas CON (Fig.4 A e B; $p < 0,05$, $n=6-8$). Também foi observado um aumento nos níveis de glicose no TSI, nos tempos 90 e 120 min, com 38 % de elevação observada na área sob curva (Fig.4 C e D; $p < 0,05$, $n=6-8$). Os níveis de insulina sérica foram dosados no sangue dos animais. Os níveis de insulina sérica se encontravam reduzidos no grupo HCD em comparação ao grupo CON (Fig.4E; $p < 0,05$; $n= 4$). O perfil lipídico foi avaliado com a quantificação de triglicerídeos, colesterol e suas frações no soro de ratas CON e HCD. Foi observado aumento nos níveis do colesterol sérico total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos em ratas que receberam a dieta HCD em comparação com o grupo CON. Contudo, não se observou redução nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em ratas HCD em comparação com ratas CON (Fig.4F-I; $p < 0,05$; $n= 9-10$).

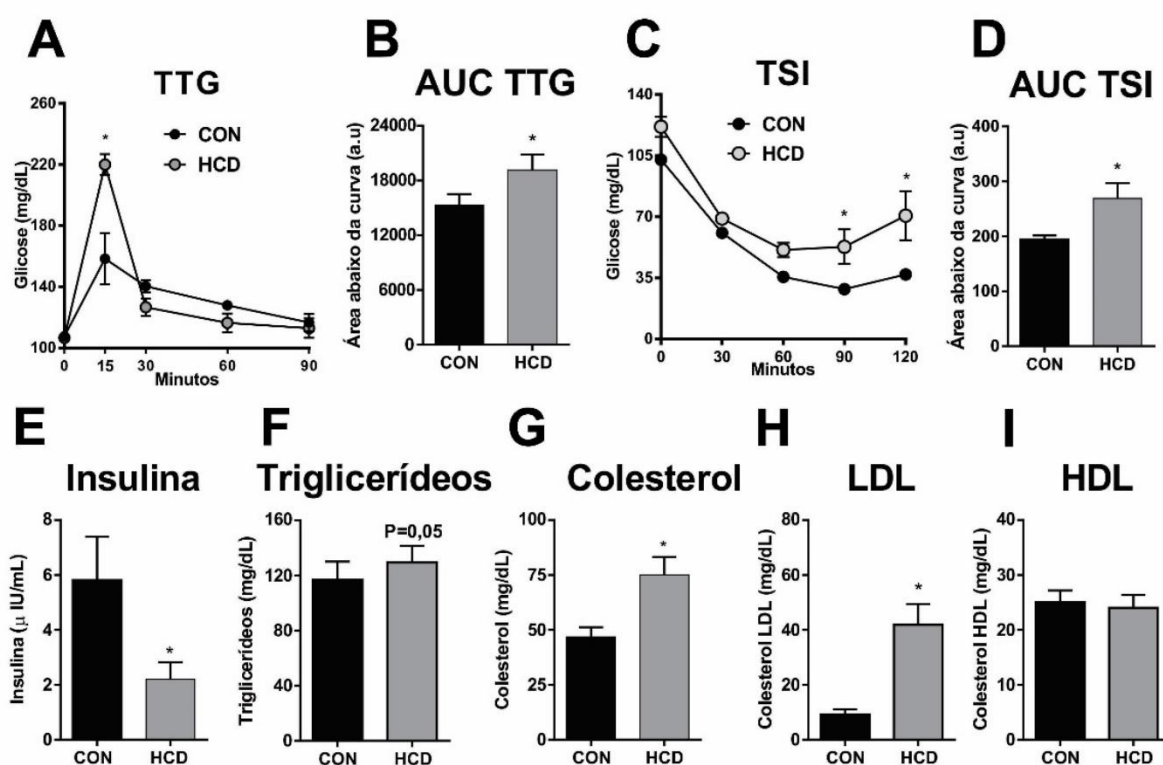


Fig.4. Perfil metabólico glicêmico e lipídico em ratas. (A) Teste de tolerância à glicose alterado no grupo HCD. (B) Área abaixo da curva do TTG. (C) Teste de tolerância à glicose alterado no grupo HCD. (D) Área abaixo da curva do TSI. (E) Redução dos níveis de insulina no grupo HCD. (F) Tendência à elevação dos níveis séricos de triglicerídeos no grupo HCD. (G e H) Níveis elevados de

colesterol total e fração LDL. (I) Nenhuma diferença observada nos níveis de HDL das ratas HCD comparados ao grupo HCD * $p < 0,05$; $n=18$.

Alteração no ciclo estral foi observado nas ratas expostas a Dieta HCD

O ciclo estral de ratas CON e HCD foi avaliado diariamente por meio de coleta e análise de esfregaço vaginal, de acordo com Nelson et al. (1982). Nas ratas expostas com HCD, os esfregaços vaginais continham uma mistura de células nucleadas e cornificadas, e leucócitos polimorfonucleares (PM), indicando uma fase de proestro anormal. Além disso, as ratas expostas ao HCD apresentaram ciclos irregulares e mais longos em comparação com ratas CON ($p < 0,01$, Fig.5A e B). As ratas expostas à dieta HCD passaram menos dias na fase estro e mais dias na fase metaestro-diestro em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$, Fig.5B; $n= 10$).

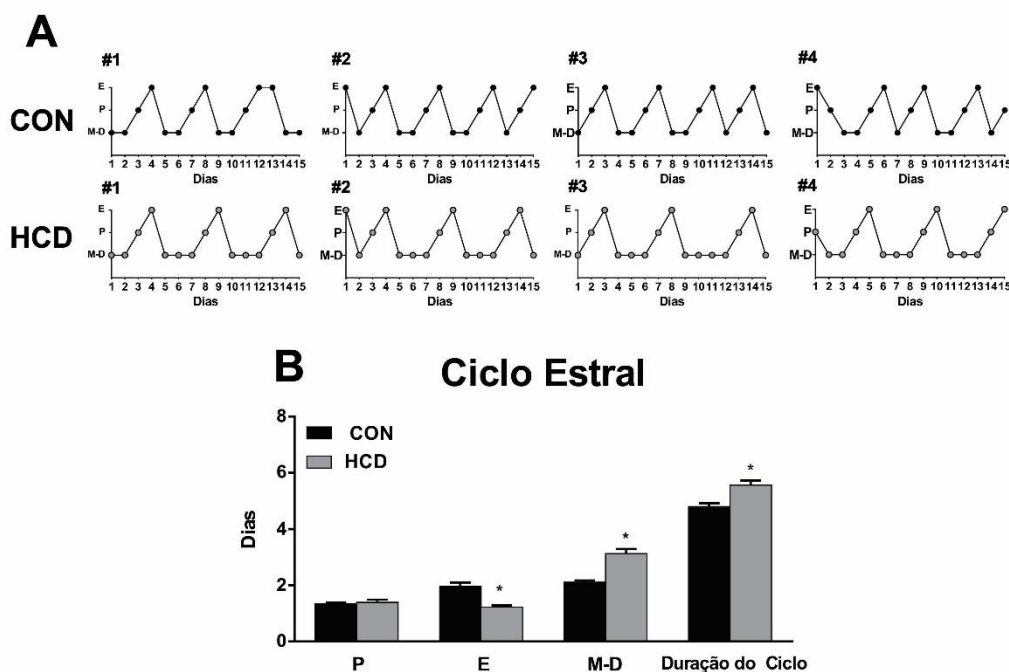


Fig.5.

Fig.5 Ratas HCD apresentaram ciclo estral anormal. (A) Representação gráfica do ciclo estral no grupo controle (CON) e em ratas HCD determinada por citologia vaginal por 15 dias. (B) Representação gráfica do número de dias em cada fase do ciclo estral e do comprimento total do ciclo. Proestro (P), Estro (E), Metaestro-diestro (M-D).

Ratas expostas à dieta HCD apresentaram aumento de LH, mas sem alteração em outros hormônios.

Os níveis séricos do LH basal estavam aumentados nas ratas expostas a dieta HCD em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$, Fig.6A). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de FSH do soro basal entre ratas expostas de CON e HCD ($p > 0,05$, Fig.6B). As expressões dos níveis séricos da progesterona, estrogênio e testosterona não apresentaram diferença entre ratas expostas às dietas CON e HCD ($p > 0,05$, Fig.6 C, D e E).

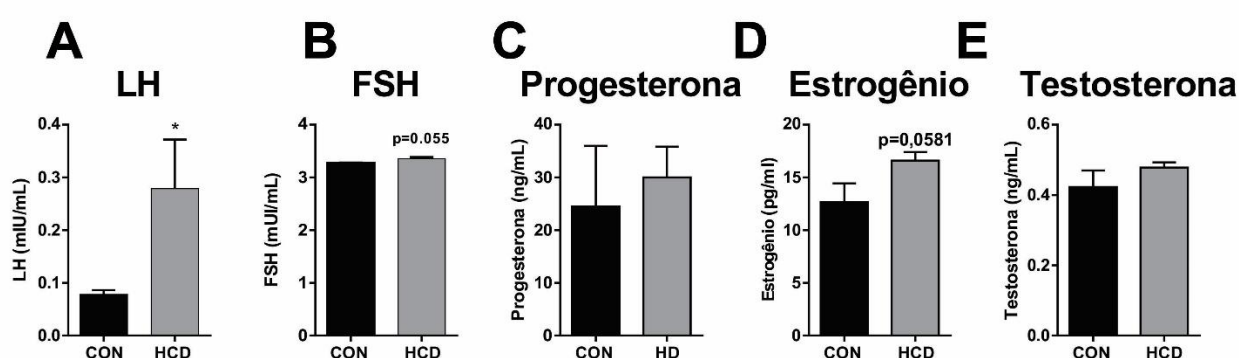


Fig.6. Perfil dos hormônios em ratas. (A) Hormônio luteinizante elevado em ratas HCD ($p < 0,05$; $n = 5-9$). (B-E) Nenhuma diferença observada nos níveis do hormônio folículo estimulante, progesterona, estrogênio e testosterona entre as ratas HCD e CON HCD ($p > 0,05$; $n = 5-9$).

Exposição a dieta HCD reduziu a reserva folicular e alterou o desenvolvimento dos folículos ovarianos

As secções histológicas ovarianas do grupo CON apresentaram folículos ovarianos em todos os estágios normais de desenvolvimento, (Fig.7A e A1) e continham corpos lúteos (CL, Fig.7A2). Contudo, os ovários do grupo HCD apresentaram morfologia irregular, (Fig.7B e B1), e número reduzido de CL (Fig.7B2 e). Especificamente, um menor números de folículos primordiais e primários foram observados em ratas HCD em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Fig.7C e D), sugerindo uma redução da reserva ovariana em ratas de HCD.

As secções ovarianas de ratas HCD tiveram um número reduzido de folículos ovarianos pré-antrais e antrais em comparação com ovários CON (38,6 e 33,3 %, $p < 0,01$, Fig.7E e F, $n = 5-6$). Além disso, os ovários HCD tinham um aumento no número de folículos ovarianos císticos (císticos) e atrésicos (At) em comparação com

o CON (134,4 e 93,3 %, $p < 0,01$, Fig.7G e H). Observou-se redução do número de CL e na espessura da granulosa nos ovários do HCD em comparação com ovários CON (65,7 %, $p < 0,01$ e 19,5 %, $p < 0,05$ Fig.7I e 8J). Não foram observadas alterações significativas na espessura da teca entre ratas CON e HCD Fig.7b. O número total de folículos ovarianos saudáveis também foi reduzido em ratas de HCD (63,6 %, $p < 0,05$; Fig 8k). Aumento de folículos ovarianos não saudáveis foram observados em ovários HCD em comparação com ovários CON (42,8 %, $p < 0,05$, Fig.7L).

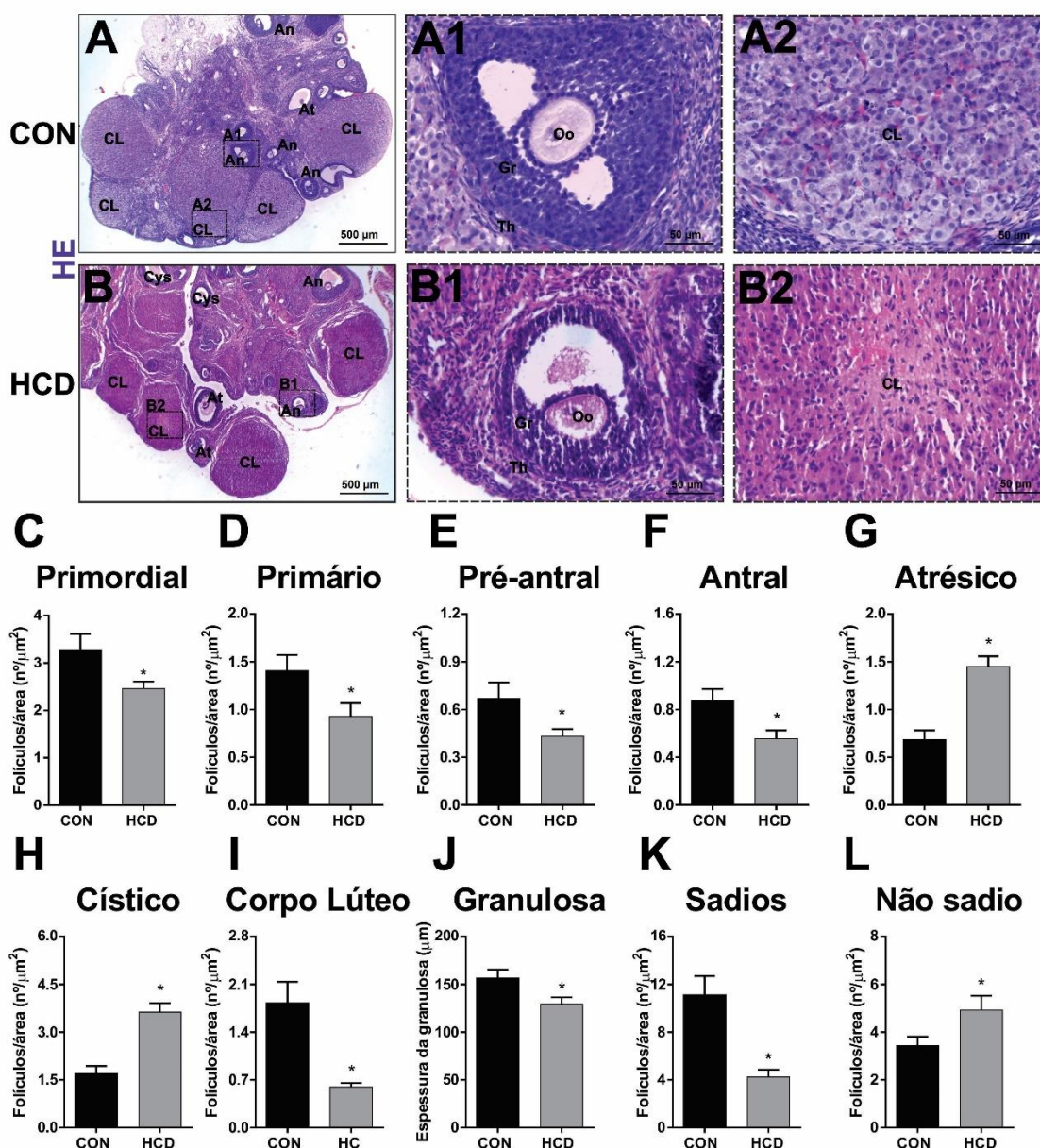


Fig.7. A exposição ao HCD leva ao desenvolvimento folicular ovariano anormal em ratas. Secções representativas de (A, A1, A2) controle (CON) e (B, B1, B2) ovários das ratas HCD foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para identificação das estruturas ovarianas. Corpo lúteo (CL), folículos císticos (Cis), folículos antrais (An), folículos atrésicos (At), folículos primordiais (C) e

(D) primários. Ovário HCD apresentaram redução em folículos (E) pré-antrais, (F) antrais e (I) CL número. Aumento de folículos (G) atresícos e (H) folículos císticos. Além de (J) espessura reduzida da camada de granulosa nos ovários antrais do grupo HCD. (K e L) Redução de folículos saudáveis e aumento de não saudáveis (soma de atresícos e císticos). (* $p < 0,05$ vs. CON; $n = 5-6$).

HCD induz anormalidades da morfologia do útero em ratas

O grupo exposto à dieta HCD (Fig.8D, E e F) apresentou úteros atrofícos em comparação ao CON (Fig.8A, B e C). A exposição à dieta HCD reduziu a área uterina total e a camada do miométrio (myo) em comparação com as ratas CON (18,2 e 47,7 %, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, Fig.3G e H). Além disso foi observada redução do número de glândulas uterinas endometriais (GE) em ratas HCD em comparação com ratas CON (64,2 %, $p < 0,05$, Fig.8I)

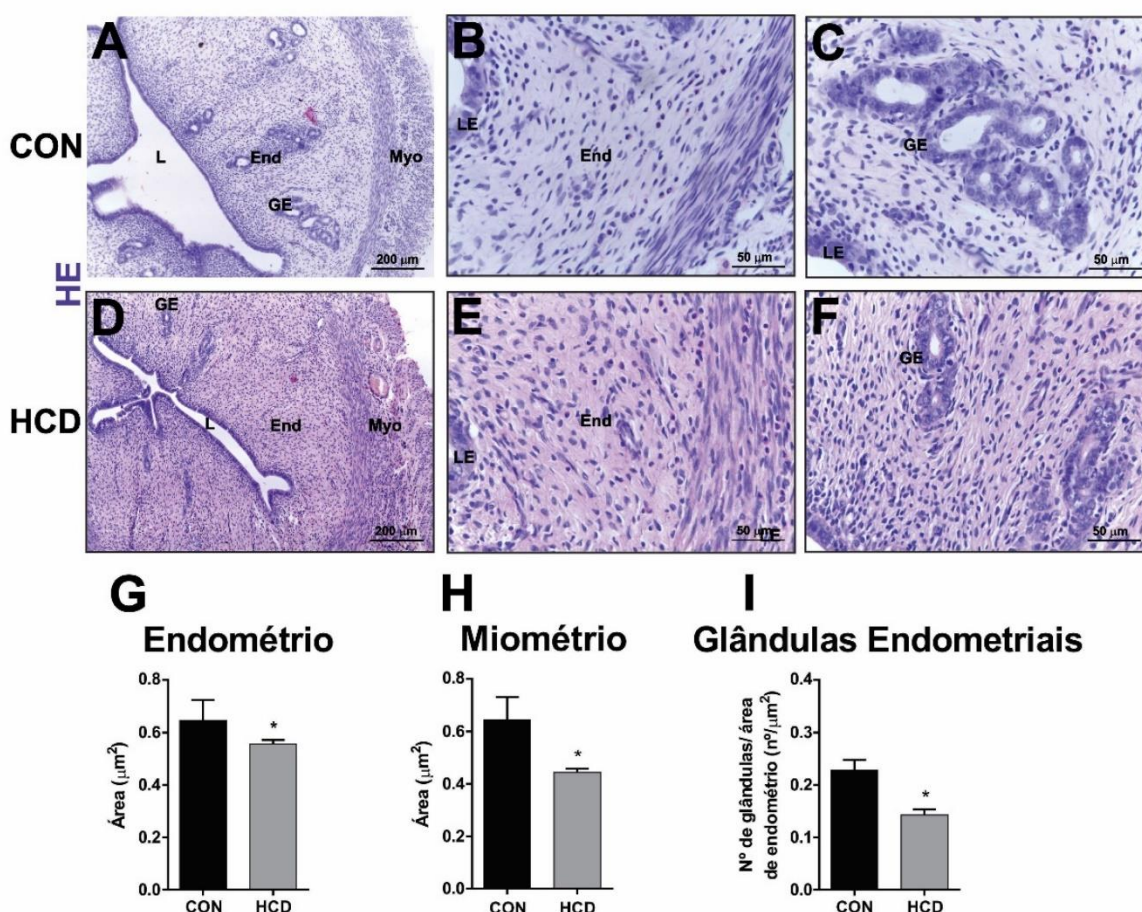


Fig.8. A exposição à dieta rica em carboidratos (HCD) induz atrofia uterina em ratas. Secções representativas dos úteros de ratas CON (A, B e C) e (D, E e F) úteros dos animais HCD foram corados com hematoxilina e eosina. (A, B e C). Aspecto regular do endométrio (End), glândulas endometriais (GE), miométrio (Mio) foram observados nos úteros CON. (E, G e H). Observou-se área de End e Mio reduzida nas ratas HCD. (I) Além disso, foi observado número de GE reduzido nas ratas HCD. L: Lúmen. Le: epitélio luminal. (* $p < 0,05$ vs. CON, $n = 5-6$).

Exposição a dieta HCD levou a um processo inflamatório no trato reprodutivo

Mastócitos foram marcados com a coloração de Alcian blue em cortes de ovários e útero de ratas CON (Fig.9A, A1, B e B1) e HCD (Fig.9C, C1, D e D1). Foi observado aumento de mastócitos nas ratas HCD em comparação com as ratas CON (205,8 %, $p < 0,05$ Fig.9 C, C1, E $p \leq 0,001$). Além disso, observou-se aumento do número de mastócitos nos úteros (Fig. D, D1, E 213,3 %, $p < 0,05$, F $p \leq 0,001$).

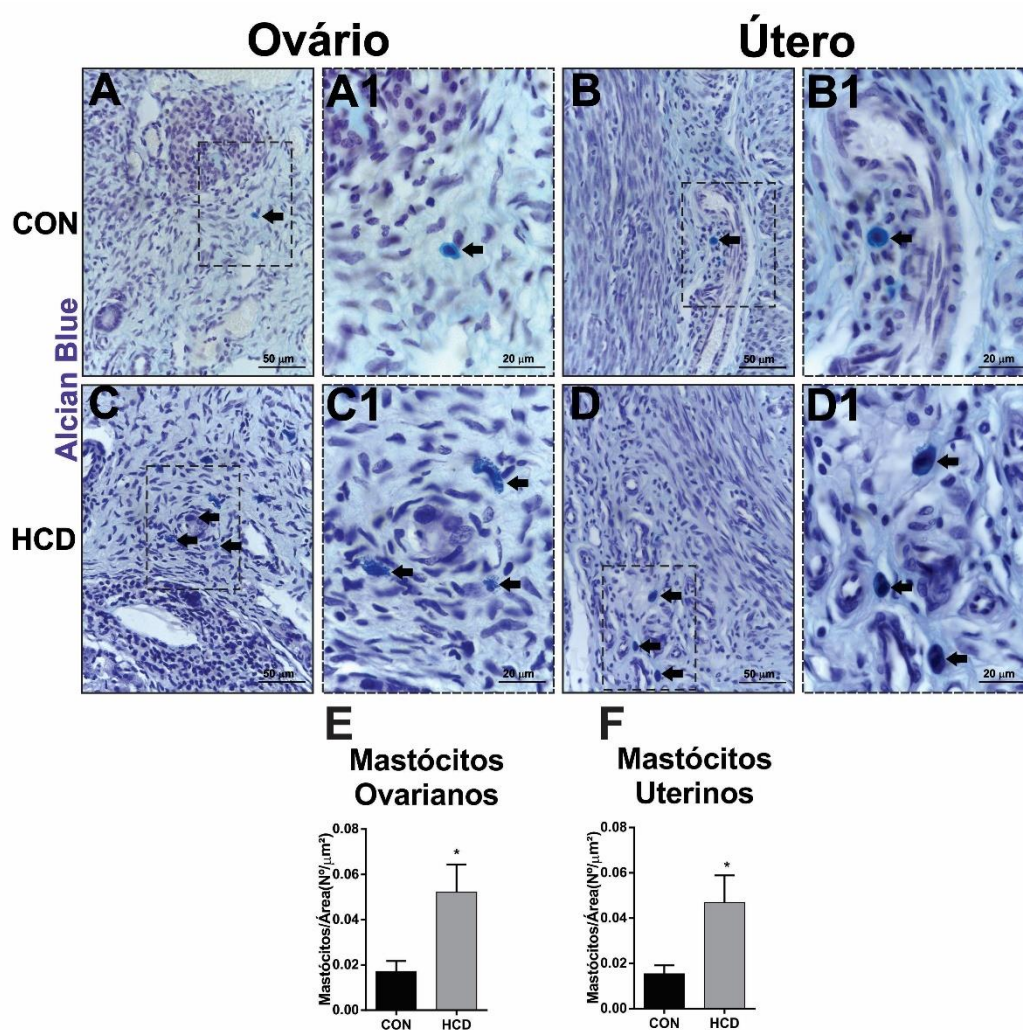


Fig.9. Inflamação no trato reprodutivo em ratas por exposição a dieta HCD. Cortes representativos com mastócitos marcados com coloração Alcian blue nos ovários CON (A, A1) e HCD (C, C1). A mesma marcação foi realizada em cortes do tecido uterino do grupo CON e HCD (B, B1) CON e (D, D1) foram observadas aumento de mastócitos nos ovários HCD (E) e útero (F). * $p < 0,05$ vs. CON ($n = 5-6$).

Exposição ao HCD alterou marcadores de estresse oxidativo no trato reprodutivo

Criosecções de ovários (Fig.10A e C) e útero (Fig.10B e D) do grupo HCD e CON foram incubadas com o marcador fluorescente dihidroetídeo que marca espécies reativas de oxigênio como $O_2^{\bullet-}$. Aumento na fluorescência de dihidroetídeo foi observado em ratas expostas a dieta HCD em comparação com ratas CON não foram observadas alterações significativas nos (33,3 %, $n = 5-6$, $p < 0,05$, Fig.5D, E e F) Um aumento nas substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico ovariano (TBARS) foram observados em ratas de HCD em comparação com ratas CON (78,5 %, $p < 0,05$, Fig.10G).

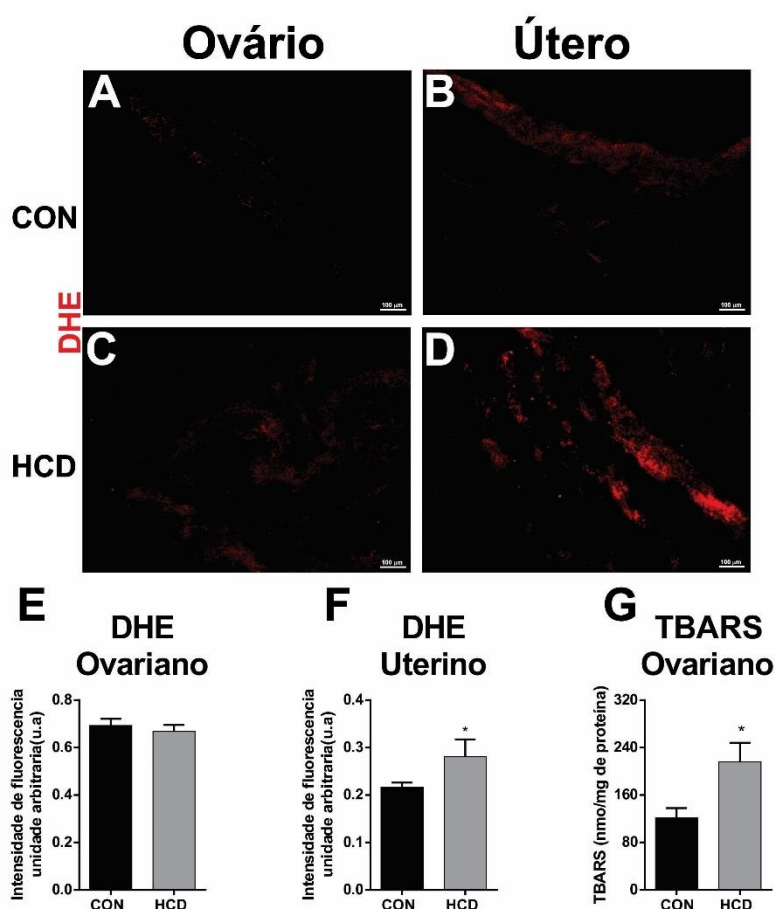


Fig.10. A exposição ao HCD aumenta o estresse oxidativo do trato reprodutivo em ratas. Representante (A e C) ovário e (B e D) dihidroetídium uterino (DHE) secções coradas obtidas a partir de ratas de controle (CON) e dieta rica em carboidratos (HCD). (E) Ovário $O_2^{\bullet-}$ níveis. Aumento (F) níveis de $O_2^{\bullet-}$ no útero das ratas HCD. * $p < 0,05$ vs. CON ($n = 5-6$).

Ratas expostas ao HCD apresentam aumento na deposição de colágeno no trato reprodutivo

Um aumento na deposição de colágeno nos ovários (Fig.11A, C e E) e no útero (Fig.11B, D e F) foi observado em ratas HCD em comparação com as ratas COM, sugerindo um processo de remodelamento tecidual. ($p < 0,05$).

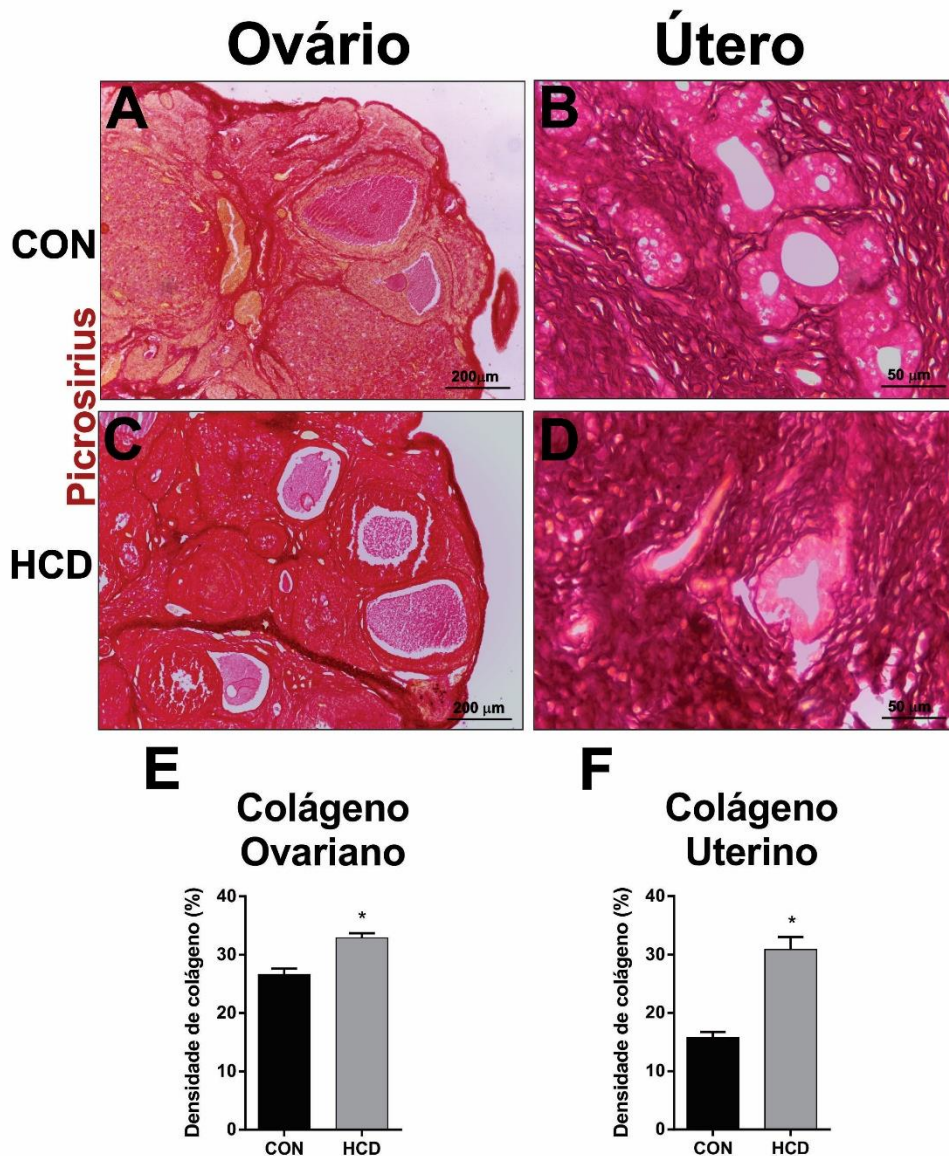


Fig.11. Acúmulo de colágeno no trato reprodutivo em ratas. Secções representativas do acúmulo de colágeno dos ovários de (A) CON e (C) HCD foram corados com Picrosirius red. Avaliação de acumulação de colágeno representativo uterino em (B) CON e (D) ratas HCD. Aumento do acúmulo de colágeno nos ovários (E) e útero (F) das ratas HCD. (* $p < 0,05$ vs. CON ($n = 5-6$))

Correlação entre marcadores metabólicos, características semelhantes à SOP e outras anormalidades reprodutivas (por exemplo, reserva folicular ovariana, inflamação, estresse oxidativo, fibrose, etc).

Para avaliar a relação entre marcadores metabólicos (peso corporal, adiposidade, TSI, LDL, leptina e adiponectina), características semelhantes à SOP [comprimento do ciclo estral, níveis de LH sérico, número de folículos ovarianos císticos e outras anormalidades reprodutivas (área de camada de granulosa reserva folicular ovariana, número de CL, número GE, número de célula de mastócito ovariano e uterino, estresse oxidativo ovariano e deposição de colágeno - fibrose)], foram realizadas análises de correlação pareadas, e um ajuste linear foi delineado (Tabela 3).

Vários marcadores metabólicos e anormalidades reprodutivas foram correlacionados entre si (Tabela 3). Observou-se correlação linear positiva entre o peso corporal e o folículo cístico ($p = 0,02$). Observou-se correlação linear negativa entre o peso corporal e o número de GE ($p = 0,01$). No entanto, não foi observada correlação linear significativa entre peso corporal e comprimento do ciclo estral ($p = 0,52$), níveis de LH ($p = 0,91$), área da camada de granulosa ($p = 0,51$), reserva ovariana ($p = 0,11$), CL ($p = 0,06$), número de células de mastócito ovariano e uterino ($p = 0,14$), estresse oxidativo ovariano ($p = 0,13$) e fibrose ($p = 0,45$).

A adiposidade foi positivamente correlacionada com o comprimento do ciclo estrous ($p = 0,02$), número de células de mastócito ovariano e uterino ($p = 0,01$) e fibrose ($p = 0,02$). Curiosamente, observou-se correlação linear negativa entre adiposidade e reserva ovariana ($p = 0,01$) e CL ($p = 0,01$). Não foi observada correlação significativa entre adiposidade e LH ($p = 0,21$), folículo cístico ($p = 0,12$), área da camada de granulosa ($p = 0,08$), número de GE ($p = 0,18$) e estresse oxidativo ovariano ($p = 0,12$). Os níveis de LDL foram positivamente correlacionados com o folículo cístico ($p = 0,01$). Os níveis de LDL foram negativamente correlacionados com CL ($p = 0,01$) e GE ($p = 0,02$). Não foi observada correlação significativa entre níveis de LDL e comprimento do ciclo estrous ($p = 0,17$), níveis de LH ($p = 0,81$), área da camada de granulosa ($p = 0,46$), reserva ovariana ($p = 0,12$), número de células de mastócito ovariano e uterino ($p = 0,12$), estresse oxidativo ovariano ($p = 0,23$) e fibrose ($p = 0,45$).

O IST correlaciona-se positivamente com o folículo cístico ($p = 0,01$), o estresse oxidativo ovariano ($p = 0,02$) e a fibrose ($p = 0,04$). O IST correlaciona-se negativamente com o CL ($p = 0,04$) e o GE ($p = 0,01$). Não foi observada correlação significativa entre IST e comprimento do ciclo estral ($p = 0,06$), níveis de LH ($p = 0,98$), área da camada de granulosa ($p = 0,75$), reserva ovariana ($p = 0,11$) e número de células de mastócito ovariano e uterino ($p = 0,36$). Observou-se apenas uma correlação positiva entre os níveis de leptina e o número de células de mastócito ovariano e uterino ($p = 0,02$). Não foi observada correlação significativa entre o nível de adiponectina e todos os parâmetros analisados ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3- Correlação entre marcadores metabólicos da dieta HCD, características semelhantes à SOP e outras anormalidades reprodutivas

	Características semelhantes à SOP						Outras anormalidades reprodutivas													
	Ciclo estral		Níveis de LH		Folículo cístico		Gr. área		Ov. reservar		C. Lúteo		GE		Inflamm		EROs		Colágeno	
	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P	Pearson	P
Marcadores metabólicos																				
Peso corporal	0.23	0.52	0.04	0.91	0.69	0.02	0.23	0.51	-0.54	0.11	-0.61	0.06	-0.72	0.01	0.49	0.14	0.54	0.13	0.28	0.45
Adiposidade	0.71	0.02	0.43	0.21	0.51	0.12	-0.58	0.08	-0.77	0.01	-0.91	0.01	-0.45	0.18	0.77	0.01	0.55	0.12	0.68	0.02
LDL	0.46	0.17	0.09	0.81	0.81	0.01	-0.26	0.46	-0.51	0.12	-0.79	0.01	-0.68	0.02	0.51	0.12	0.44	0.23	0.26	0.45
TSI	0.61	0.06	0.01	0.98	0.89	0.01	-0.11	0.75	-0.55	0.11	-0.66	0.04	-0.91	0.01	0.32	0.36	0.76	0.02	0.66	0.04
Leptina	0.55	0.09	0.19	0.58	0.22	0.54	-0.22	0.54	-0.32	0.10	-0.52	0.12	-0.29	0.41	0.71	0.02	0.61	0.07	0.08	0.81
Adiponectina	-0.02	0.85	-0.03	0.91	-0.35	0.31	-0.29	0.41	0.018	0.97	0.16	0.65	0.24	0.49	-0.1	0.71	-0.13	0.74	-0.07	0.83

HCD: Dieta rica em carboidratos; SOP: Síndrome do ovário policístico; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; TSI: Teste de sensibilidade à insulina; LH: Hormônio luteinizante; Área gr.: Área da granulosa; Ov. reserva: Reserva folicular ovariana; C. Lúteo: Corpo lúteo; GE: Glândulas endométrio; Inflamm: Número de mastócitos; EROs: Espécies reativas de oxigênio; P: valor de p; n= 4-5.

DISCUSSÃO

Nosso estudo fornece evidências de que a exposição subaguda à dieta HCD por 15 dias é responsável por prejuízos metabólicos, como aumento do peso corporal/adiposidade, hipertrofia de adipócitos, dislipidemia, intolerância à glicose e resistência à insulina (RI) e hiperleptinemia.

Essas disfuncionalidades metabólicas estão ligadas ao funcionamento inadequado do trato reprodutivo em ratas. Especificamente, a dieta HCD levou a um ciclo estral irregular e elevados níveis de LH sérico com redução no número de folículos ovarianos primordiais e primários, sugerindo que a exposição a HCD prejudica a reserva folicular ovariana em ratas. O HCD também causou desenvolvimento folicular ovariano anormal, com redução nos folículos ovarianos pré-antrais, antrais, sadios, número de CL, e um aumento nos folículos ovarianos císticos, atresícos e não sadios.

A exposição a HCD resultou em atrofia uterina com redução no número de GE, inflamação e estresse oxidativo trato reprodutivo. Além disso, correlações (Tabela 3) positivas foram observadas entre peso corporal/adiposidade e RI com comprimento de ciclo estral, folículos císticos, reserva ovariana, GE, trato reprodutivo com inflamação, OS e fibrose.

Coletivamente, esses dados sugerem que a alimentação rica em carboidratos refinados leva a características semelhantes a SOP, prejudica a reserva folicular ovariana, o número de GE e outras anormalidades reprodutivas em ratas, demonstrando que o excesso desse macronutriente proporciona leva a consequências metabólicas e reprodutivas.

Nossos dados sugerem que o modelo de HCD levou a importantes complicações da obesidade, mostrando a importância da composição de macronutrientes dietéticos e do estado nutricional no desenvolvimento de anormalidades metabólicas. Evidências emergentes apoiam a ideia de que a alimentação com HCD leva a consequências como obesidade, com aumento da adiposidade associada à inflamação crônica de baixo grau, intolerância à glicose, RI, hiperleptinemia, dislipidemia e outras disfunções fisiológicas em modelos de alimentação aguda e ou de longo prazo (Oliveira et al., 2013) Surpreendentemente, camundongos alimentadas com HCD por apenas 1, 3 ou

14 dias apresentam aumento na adiposidade, tamanho do adipócito, glicemia e metabolismo lipídico anormais, aumento nos níveis de leptina e resposta aumentada de células imunes. Como esperado, a alimentação a longo prazo com HCD (por 12 semanas) manteve alta e/ou aumentou adiposidade em outro grupo de animais (Oliveira et al., 2013). Nossos resultados são consistentes com esses dados, que demonstraram um aumento do peso/adiposidade corporal, adipócitos hipertróficos, perfil lipídico anormal, tolerância irregular à glicose e sensibilidade à insulina reduzida e hiperleptinemia em ratas alimentadas com HCD por 15 dias.

As consequências da obesidade na função reprodutiva feminina (irregularidades do ciclo reprodutivo, falha na ovulação, infertilidade, aborto, complicações da gravidez e SOP) são bem descritas por diversos estudos epidemiológicos e experimentais (Roberts et al., 2017; Goodarzi et al., 2011; Hartz et al., 1979). Embora o desfecho causado pela obesidade seja bem conhecido, as causas e mecanismos associados entre complicações da obesidade e características da SOP ainda não estão claras.

Embora vários modelos de DIO, como HFD tenham consequências semelhantes, ou seja, aumento do tecido adiposo associado a inflamação, hiperleptinemia, RI, hiperinsulinemia, hiperandrogenismo e dislipidemia, etc, (DiVall et al., 2015; Velasco et al., 2019) os efeitos do HCD sobre a função reprodutiva não são bem conhecidos. Além disso, ainda não fizemos um estudo semelhante utilizando exposição subaguda de HCD para avaliar a função reprodutiva. Por essa razão, comparamos as consequências encontradas em nosso modelo com outros estudos que utilizaram outros modelos obesidade induzida por dieta com consequências metabólicas ou reprodutivas semelhantes, como HFD ou dieta de alto teor de gordura e açúcar (HFHS).

Estudos anteriores relataram que roedores e mulheres obesas apresentam ciclo reprodutivo anormal (Lainez e Coss, 2019; Jain et al., 2007; Fernandez et al., 2017). Lainez et al. têm demonstrado ciclos anormais e mais longos, sem alterações significativas nos níveis de LH e FSH em camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 12 semanas (Lainez et al., 2018).

Ciclo estral irregular, com redução de estro (E) e aumento na fase metaestro-diestro (MD) e comprimento do ciclo estral, níveis elevados de LH, sem

alterações nos níveis de FSH foram observadas em camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 12 semanas (DiVall et al., 2015). O excesso de gordura da dieta levou a um estado nutricional anormal que contribuiu para as características toxicológicas reprodutivas (DiVall et al., 2015).

Nossos resultados são consistentes com esses encontrados, demonstramos que ratas alimentadas com HCD por 15 dias tinham ciclo estral anormal, passando cada vez menos tempo na fase estro e mais tempo na fase de MD, com um aumento geral no comprimento do ciclo. As ratas HCD também apresentaram um aumento nos níveis do LH sérico. Além disso, observou-se forte correlação (Tabela 3) positiva entre a adiposidade e o comprimento do ciclo estral. Assim, o ciclo estral anormal pode estar associado a uma complicação da obesidade induzida pela HCD na morfologia do ovário e/ou perfil dos hormônios sexuais.

A irregularidade na morfologia do ovário e/ou nos níveis dos hormônios sexuais são uma característica comum em vários modelos de DIO, como a exposição ao HFD e HFHS (Roberts et al., 2017; DiVall et al., 2015; Wu et al., 2014). Wu et al. observaram redução no número de CL associada a uma elevação da testosterona sérica, mas sem alterações nos níveis de estrogênio em camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 12 semanas (Wu et al., 2014). DiVall et al. observaram um aumento no número de CL com hiperandrogenismo usando modelo semelhante de camundongos fêmeas obesas (DiVall et al., 2015). Um aumento no número de folículos ovarianos, CL e císticos sem alterações nos níveis de testosterona sérica foram observados em ratas alimentadas com HFHS por 11 semanas (DiVall et al., 2015). Em nosso trabalho, observamos uma redução no quantitativo de folículos da reserva folicular, e dos demais folículos saudáveis em desenvolvimento, o que, consequentemente levou a uma redução dos folículos totais e dos corpos lúteos, e um aumento de folículos não saudáveis (atrésicos e císticos).

O estado metabólico anormal como resultado do excesso de dietas ricas em gordura, carboidrato ou ambos, mostrou a importância do equilíbrio de macronutrientes dietéticos para modular a função ovariana normal (Legan e Karsch, 1975; Hartz et al., 1979; Lainez et al., 2018). Recentemente, Hohos et al. relataram uma redução não significativa nos níveis de CL, folículos ovarianos primordiais e hormônio anti-Mülleriano (AMH) (36,5, 21,9 e 28,6 %,

respectivamente) em camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 10 semanas (Hohos et al., 2020).

Nossos dados são consistentes com esses estudos, no entanto, observamos que as ratas do grupo HCD tiveram uma redução nos folículos ovarianos primordiais, primários, pré-antrais, antrais e de saúde total, sugerindo que a exposição ao HCD prejudica a reserva e o desenvolvimento do ovário. O esgotamento dos folículos primordiais e/ou primários, levando a uma diminuição no número de folículos ovarianos pré-antrais e antrais e total, além do declínio acelerado pelo qual esses folículos primordiais são perdidos, é a hipótese de ser o principal mecanismo pelo qual as mulheres transitam para a menopausa ou outras anormalidades reprodutivas, como a insuficiência ovariana prematura (IOP) (Faddy et al., 1992; Gougeon et al., 1994; Tatone et al., 2008).

Além disso, observou-se uma redução do número de CL em ratas de HCD, indicando que essas ratas apresentaram menos eventos ovulatórios. Observou-se aumento de folículos atresícos, císticos e não sadios em ratas de HCD. Observou-se forte correlação (Tabela 3) positiva entre o peso corporal, LDL, RI e os folículos ovarianos císticos. Observou-se forte correlação (Tabela 3) negativa entre a adiposidade e a reserva folicular ovariana. Assim, a presença de folículos císticos e esgotamento na reserva ovariana estão associadas a complicações da obesidade induzida pela HCD na morfologia do ovário. Os critérios para o diagnóstico de SOP requerem a presença de pelo menos dois dos três principais sintomas: oligo ou anovulação, hiperandrogenismo e morfologia policística dos ovários (Fauser, 2004). Em nosso estudo, os animais sob exposição à HCD apresentaram fortemente os sintomas da anovulação e morfologia policística ovariana, que também foram corroborados com correlações (Tabela 3) negativas entre peso corporal, adiposidade, LDL, número de CL e folículo cístico e resistência à insulina.

Outros modelos de SOP, como di-hidrotestosterona de longo prazo (DHT, 90 dias a partir dos 21 dias de idade) também apresentaram aumento de folículos antrais não sadios, redução da espessura da camada de granulosa e hipercolesterolemia em camundongos fêmeas (Caldwell et al., 2014). Meninas obesas púberes e alguns modelos de obesidade induzida por dieta ou modelos SOP induzido por letrozole apresentaram maior secreção de LH, sugerindo que

o LH poderia ser um fator-chave nas consequências da SOP (McCartney et al., 2009; Esparza et al., 2020).

Observamos também uma redução na camada de granulosa de folículos antrais e um aumento nos níveis de LH em ratas HCD em comparação com ratas de controle. Assim, nosso modelo de HCD apresenta características metabólicas e reprodutivas que observadas em diferentes modelos de SOP, demonstrando que o excesso de carboidratos da dieta desempenhou um papel importante no desenvolvimento dessas consequências adversas.

Evidências crescentes implicam fortemente as consequências da obesidade e ou SOP na mediação de disfunções uterinas (Symons et al., 2018; Kuyucu et al., 2018; Oróstica et al., 2020). Oróstica et al. relataram que a função de endométrio anormal está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (como elevação dos níveis do fator de necrose tumoral-alfa - TNF- α) e sinalização irregular de insulina em mulheres obesas e obesa com SOP (Rhee et al., 2016). O comprometimento na decidualização de células endometriais foi observado em camundongos fêmeas alimentadas com HFD por 12 semanas, uma adaptação crítica necessária para a gravidez (Rhee et al., 2016). Em nosso estudo, observamos atrofia uterina com redução na área endometrial e miometrial, bem como um menor número de GE em ratas HCD. Estudos afirmam que o padrão endometrial adequado é um parâmetro importante no sucesso da implantação (Kuyucu et al., 2018; Sharara et al., 1999). No entanto, Fungfuang et al. relataram hipertrofia uterina apenas 5 dias depois que ratas alimentaram com HFD (Fungfuang et al., 2013). Da mesma forma, Kuyucu et al. relataram um aumento na espessura do endométrio em ratas após 7 dias com uma exposição de 6 mg/kg/dia de dehidroepiandrosterona (DHEA), como modela SOP (Kuyucu et al., 2018).

Além disso, observou-se forte correlação (Tabela 3) negativa entre peso corporal, LDL e TS e número GE. Assim, as consequências metabólicas do HCD são responsáveis pela morfologia uterina anormal. Estudos anteriores indicam que a obesidade e/ou a SOP podem prejudicar o trato reprodutivo por meio do estresse oxidativo (OS) (Blagojević et al., 2018; Yao et al., 2019). Antoniotti et al. demonstraram que citocinas inflamatórias se encontravam elevadas dentro da cavidade uterina de pacientes obesas, como peptídeo/proteína quimiotática

monocítica 1 (MCP-1) (Antoniotti et al., 2018). Skaznik-Wikiel et al., 2016) relatou que a exposição de 10 e de 32 semanas ao HFD resultou em depleção de folículos primordiais em camundongos fêmeas, e que essa complicação poderia ser mediada pelo aumento da inflamação dos ovários (Skaznik-Wikiel et al., 2016).

Nossos resultados são consistentes com estes dados, já que demonstraram um aumento da inflamação pelo aumento do número de mastócitos nos tecidos ovarianos e uterinos em ratas HCD. Nós ainda observamos uma forte correlação (Tabela 3) positiva entre adiposidade e TSI com inflamação do trato reprodutivo. Esses dados sugerem que a exposição à dieta HCD de forma subaguda pode levar a inflamação no trato reprodutivo de camundongos.

Aumento na expressão de mRNA da catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx) e aumento da apoptose dos ovários foram observados em camundongos obesas induzidos por HFD por 12 semanas (Yao et al., 2019). Observou-se aumento do estresse oxidativo no trato das ratas alimentadas com dieta de rica em sacarose por 8 semanas por elevada atividade uterina de GPx e níveis aumentados de malondialdeído (MDA), associados a baixa atividade de CAT uterino e ovariano (Sadowska et al., 2019). Pacientes com SOP apresentaram associação entre estresse oxidativo, dislipidemia e inflamação, que foi aumentada pela obesidade (Blagojević et al., 2018). Nossos resultados são consistentes com esses dados, já que demonstram aumento do estresse oxidativo por aumento dos níveis de TBARS ovariano e dos níveis de ânion de superóxido uterino em ratas HCD.

Também observamos forte correlação (Tabela 3) positiva entre TSI e estresse oxidativo do trato reprodutivo. Esses dados sugerem que a exposição ao HCD é capaz de levar a anormalidades do trato reprodutivo, pelo menos em parte, pelo desequilíbrio redox. Além disso, foi observada fibrose ovariana e uterina no trato reprodutivo do grupo HCD. A presença de apoptose, inflamação estresse oxidativo e outras consequências anormais observadas em obesas, SOP (Sena et al., 2017; Yao et al., 2019; Sadowska et al., 2019) e nosso modelo podem ser responsáveis por danos celulares que podem ser substituídos por tecido fibroso. Observou-se uma forte correlação (Tabela 3) positiva entre adiposidade, TSI e fibrose do trato reprodutivo.

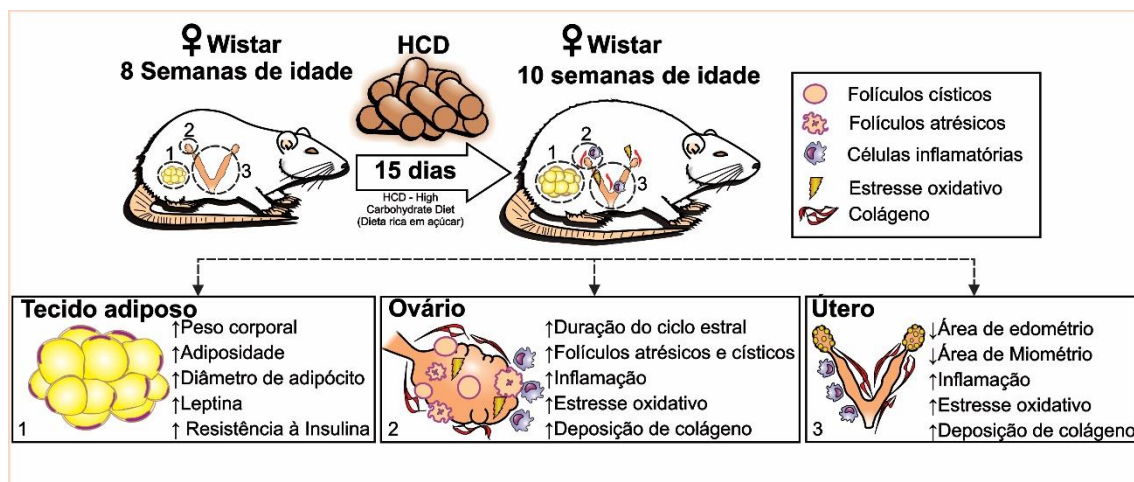


Fig.12: Esquema da ação da dieta HCD sobre o trato reprodutivo e tecido adiposo. Modificado de Niño et al., 2020.

CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo demonstra que a exposição subaguda à dieta HCD resulta em anormalidades metabólicas e reprodutivas em ratas, semelhantes às observadas nos modelos de SOP, mostrando a importância do equilíbrio de macronutrientes dietéticos e do estado nutricional no desenvolvimento dessas anormalidades. Portanto, este estudo aumenta a compreensão da importância do equilíbrio de macronutrientes dietéticos, estado nutricional e toxicologia e efeitos da dieta HCD sobre função reprodutiva em ratas adultas.

REFERÊNCIAS

- Adams, K. F., Schatzkin, A., Harris, T. B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-barbash, R., Hollenbeck, A., & Leitzmann, M. F. (2006). Overweight, Obesity, and Mortality in a Large Prospective Cohort of Persons 50 to 71 Years Old. *The New Engalando Journal of Medcine*, 355(8), 763–778.
- Álvarez-Blasco, F., Botella-Carretero, J. I., San Millán, J. L., & Escobar-Morreale, H. F. (2006). Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Archives of Internal Medicine*, 166(19), 2081–2086.
<https://doi.org/10.1001/archinte.166.19.2081>
- Augusto, E., Nilson, F., Da Costa, R., Andrade, S., Aquino De Brito, D., & Lessa De Oliveira, M. (n.d.). *Artigo original Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018*.
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.32>
- Bahia, L., Coutinho, E. S. F., Barufaldi, L. A., Abreu, G. D. A., Malhão, T. A., de Souza, C. P. R., & Araujo, D. V. (2012). The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*, 12(1), 440.
<https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-440>
- Balasubramanian, P., Jagannathan, L., Mahaley, R. E., Subramanian, M., Gilbreath, E. T., Mohankumar, P. S., & Mohankumar, S. M. J. (2012). High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(5), 748–755.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02276.x>
- Bell, L. K., Edwards, S., & Grieger, J. A. (2015). The relationship between dietary patterns and metabolic health in a representative sample of adult Australians. *Nutrients*, 7(8), 6491–6505. <https://doi.org/10.3390/nu7085295>
- Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohí, J., & Meseguer, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertility and Sterility*, 93(2), 447–454. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2008.12.032>

- Bertuloso, B. D., Podratz, P. L., Merlo, E., de Araújo, J. F. P., Lima, L. C. F., de Miguel, E. C., de Souza, L. N., Gava, A. L., de Oliveira, M., Miranda-Alves, L., Carneiro, M. T. W. D., Nogueira, C. R., & Graceli, J. B. (2015). Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. *Toxicology Letters*, 235(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.009>
- Brasil. Ministério da Saúde. (2015). *Saúde Brasil 2014 : uma análise da situação de saúde e das causas externas* (Ministério da Saúde (Ed.)).
- Caldwell, A. S. L., Middleton, L. J., Jimenez, M., Desai, R., McMahon, A. C., Allan, C. M., Handelsman, D. J., & Walters, K. A. (2014). Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*, 155(8), 3146–3159. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1196>
- Calton, E. K., James, A. P., Pannu, P. K., & Soares, M. J. (2014). Certain dietary patterns are beneficial for the metabolic syndrome: Reviewing the evidence. *Nutrition Research*, 34(7), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.06.012>
- CONCEA. (2016). *RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 33, DE 18 DE NOVEMBRO DE 2016 - Imprensa Nacional*. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453
- de Araújo, J. F. P., Podratz, P. L., Merlo, E., Sarmiento, I. V., da Costa, C. S., Niño, O. M. S., Faria, R. A., Freitas Lima, L. C., & Graceli, J. B. (2018). Organotin exposure and vertebrate reproduction: A review. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00064>
- DiVall, S. A., Herrera, D., Sklar, B., Wu, S., Wondisford, F., Radovick, S., & Wolfe, A. (2015). Insulin receptor signaling in the GnRH neuron plays a role in the abnormal GnRH pulsatility of obese female mice. *PloS One*, 10(3), e0119995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119995>
- Dumesic, D. A., Oberfield, S. E., Stener-Victorin, E., Marshall, J. C., Laven, J. S., & Legro, R. S. (2015). Scientific statement on the diagnostic criteria,

- epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocrine Reviews*, 36(5), 487–525.
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1018>
- Ehrmann, D. A., Kasza, K., Azziz, R., Legro, R. S., & Ghazzi, M. N. (2005). Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(1), 66–71. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0229>
- Eleazu, K., Maduabuchi, P., & Eleazu, C. (2018). Effect of ethanol extract of boiled breadfruit (*Treculia Africana*) seed on the oral glucose tolerance, lipid profile, and body weight of normoglycemic albino rats. *Food Science and Nutrition*, 6(4), 904–911. <https://doi.org/10.1002/fsn3.626>
- Fauser, B. C. J. M. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 81(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.004>
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., & Curtin, L. R. (2010). Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *Journal of the American Medical Association*, 303(3), 235–241.
- Franks, S., Abbott, D. H., & Dumesic, D. A. (2002). Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *Journal of Endocrinology*, 174, 1–5.
- Freitas-Lima, L. C., Saliba, S. W., Andrade, J. M. O., Cunha, M. L., Cassini-Vieira, P., Feltenberger, J. D., Barcelos, L. S., Guimarães, A. L. S., De-Paula, A. M. B., de Oliveira, A. C. P., & Santos, S. H. S. (2016). Neurodegeneration Alters Metabolic Profile and Sirt 1 Signaling in High-Fat-Induced Obese Mice. *Molecular Neurobiology*, May.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9927-x>
- Frisch, R. E., Hegstedt, D. M., & Yoshinaga, K. (1975). Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet (puberty/vaginal opening/caloric intake/weanling/critical fatness). In *Physiology* (Vol. 72, Issue 10).
- Gao, Y., Bielohuby, M., Fleming, T., Grabner, G. F., Foppen, E., Bernhard, W.,

- Guzmán-Ruiz, M., Layritz, C., Legutko, B., Zinser, E., García-Cáceres, C., Buijs, R. M., Woods, S. C., Kalsbeek, A., Seeley, R. J., Nawroth, P. P., Bidlingmaier, M., Tschöp, M. H., & Yi, C. X. (2017). Dietary sugars, not lipids, drive hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism*, 6(8), 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.008>
- Garcia-Jiménez, C., García-Jiménez, J. M., Chocarro-Calvo, A., & De la Vieja, A. (2013). A new link between diabetes and cancer: Enhanced wnt/beta-catenin signalling by high glucose. *JME*, September, 1–36.
- Go, a. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. a., Howard, V. J., Huffman, M. D., Kissela, B. M., Kittner, S. J., ... Turner, M. B. (2013). Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 127, e6–e245. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31828124ad>
- Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G., & Azziz, R. (2011). Polycystic ovary syndrome: Etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4), 219–231. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.217>
- Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9, 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88>
- Hennig, B., Ettinger, A. S., Jandacek, R. J., Koo, S., McClain, C., Seifried, H., Silverstone, A., Watkins, B., & Suk, W. A. (2007). Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environmental Health Perspectives*, 115(4), 493–495. <https://doi.org/10.1289/ehp.9549>
- Hohos, N. M., Cho, K. J., Swindle, D. C., & Skaznik-Wikiel, M. E. (2018). High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 470, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.016>

- Hohos, N. M., & Skaznik-Wikiel, M. E. (2017). High-fat diet and female fertility. *Endocrinology*, 158(8), 2407–2419. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00371>
- Hotamisligi, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(14), 860–867.
- Jain, A., Polotsky, A. J., Rochester, D., Berga, S. L., Loucks, T., Zeitlian, G., Gibbs, K., Polotsky, H. N., Feng, S., Isaac, B., & Santoro, N. (2007). Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(7), 2468–2473. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2274>
- Jeon, J. Y., Ha, K. H., & Kim, D. J. (2015). New risk factors for obesity and diabetes: Environmental chemicals. *Journal of Diabetes Investigation*, 6(2), 109–111. <https://doi.org/10.1111/jdi.12318>
- Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A., & Panagiotakos, D. B. (2011). The effect of mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: A meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(11), 1299–1313. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.09.073>
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C.-S., Reynolds, K., & He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity* (2005), 32(9), 1431–1437. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>
- Kjaergaard, M., Nilsson, C., Nielsen, M. O., Grove, K., & Raun, K. (2018). Hypothalamic oxidative stress and inflammation, and peripheral glucose homeostasis in Sprague-Dawley rat offspring exposed to maternal and postnatal chocolate and soft drink. *Nutrition and Diabetes*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0051-z>
- Kolotkin, R. L., Meter, K., & Williams, G. R. (2001). Quality of life and obesity. *Obesity Reviews*, 2(4), 219–229. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789X.2001.00040.x>
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(April), 635–643.
- Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S., & Larsen, P. R. (2016).

Williams - Tratado de Endocrinologia 11ªed.pdf (p. 1462).

- Lai, H., Jia, X., Yu, Q., Zhang, C., Qiao, J., Guan, Y., & Kang, J. (2014). High-Fat Diet Induces Significant Metabolic Disorders in a Mouse Model of Polycystic Ovary Syndrome1. *Biology of Reproduction*, 91(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120063>
- Lainez, N. M., & Coss, D. (2019). Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. *Endocrinology*, 160(11), 2719–2736. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00487>
- Legan, S. J., & Karsch, F. J. (1975). A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*, 96(1), 57–62. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-57>
- Lie, M. E. K., Overgaard, A., & Mikkelsen, J. D. (2013). Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats. *Reproductive Biology*, 13(4), 298–308. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2013.08.001>
- Merlo, E., Podratz, P. L., Sena, G. C., De Araújo, J. F. P., Lima, L. C. F., Alves, I. S. S., Gama-De-Souza, L. N., Pelição, R., Rodrigues, L. C. M., Brandão, P. A. A., Carneiro, M. T. W. D., Pires, R. G. W., Martins-Silva, C., Alarcon, T. A., Miranda-Alves, L., Silva, I. V., & Graceli, J. B. (2016). The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. *Endocrinology*, 157(8), 2978–2995. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1896>
- Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J. P., & Kerr, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), 569–580. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00095>
- Nandipati, K. C., Subramanian, S., & Agrawal, D. K. (2016). Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2878-8>
- Nelson, J. F., Felicio, L. S., Randall, P. K., Sims, C., & Finch, C. E. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology of Reproduction*, 27(2),

327–339. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.327>

Nelson LM. (2009). NIH Public Access - Primary Ovarian Insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(11), 606–614.

<https://doi.org/10.1056/NEJMcp0808697.Primary>

Ogden, C. L., Carroll, M. D., Fryar, C. D., & Flegal, K. M. (2015). Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief*, 219.

Oliveira, M. C., Menezes-Garcia, Z., Henriques, M. C. C., Soriani, F. M., Pinho, V., Faria, A. M. C., Santiago, A. F., Cara, D. C., Souza, D. G., Teixeira, M. M., & Ferreira, A. V. M. (2013). Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*, 21(9). <https://doi.org/10.1002/oby.20230>

Patel, C. J., Cullen, M. R., Ioannidis, J. P., & Butte, A. J. (2012). Systematic evaluation of environmental factors: Persistent pollutants and nutrients correlated with serum lipid levels. *International Journal of Epidemiology*, 41(3), 828–843. <https://doi.org/10.1093/ije/dys003>

Patel, R., & Shah, G. (2018). High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Reproduction*, 155(2), 141–151. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0584>

Richards, J. S., Jonassen, J. A., & Kersey, K. A. (1980). Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology*, 107(3), 641–648. <https://doi.org/10.1210/endo-107-3-641>

Rittenberg, V., Seshadri, S., Sunkara, S. K., Sobaleva, S., Oteng-Ntim, E., & El-Toukhy, T. (2011). Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(4), 421–439. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2011.06.018>

Roberts, J. S., Perets, R. A., Sarfert, K. S., Bowman, J. J., Ozark, P. A., Whitworth, G. B., Blythe, S. N., & Toporikova, N. (2017). High-fat high-sugar diet induces polycystic ovary syndrome in a rodent model†. *Biology of Reproduction*, 96(3), 551–562.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142786>

- Sam, S. (2007). Obesity and Polycystic Ovary Syndrome. *Obesity Management*, 3(2), 69–73. <https://doi.org/10.1089/obe.2007.0019>
- Sandovici, I., Domingues, V. F., Monteiro, R., Cooper, W. N., Correia-Sá, L., Meireles, M., Guimarães, J. T., Calhau, C., Marques, C., Guardão, L., Fernandes, V. C., Norberto, S., Sá, C., Faria, A., Delerue-Matos, C., Teixeira, D., Constância, M., & Pestana, D. (2017). Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02885-9>
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, 14(3), 281–287. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000073508.41685.7f>
- Sena, G. C., Freitas-Lima, L. C., Merlo, E., Podratz, P. L., de Araújo, J. F. P., Brandão, P. A. A., Carneiro, M. T. W. D., Zicker, M. C., Ferreira, A. V. M., Takiya, C. M., de Lemos Barbosa, C. M., Morales, M. M., Santos-Silva, A. P., Miranda-Alves, L., Silva, I. V., & Graceli, J. B. (2017). Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 319, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.021>
- Sheean et al., 2013. (2012). Body mass index and short-term weight change in relation to treatment outcomes in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Sterility*, 98(1), 109–116. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Shi, D., Dyck, M. K., Uwiera, R. R. E., Russell, J. C., Proctor, S. D., & Vine, D. F. (2009). A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 150(9), 4425–4436. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1612>
- Shishehgar, F., Ramezani Tehrani, F., Mirmiran, P., Hajian, S., Baghestani, A. R., & Moslehi, N. (2016). Comparison of Dietary Intake between Polycystic Ovary Syndrome Women and Controls. *Global Journal of Health Science*, 8(9), 54801. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n9p302>

- Skaznik-Wikiel, M. E., Swindle, D. C., Allshouse, A. A., Polotsky, A. J., & McManaman, J. L. (2016). High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice¹. *Biology of Reproduction*, 94(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137414>
- Song, L., Xia, W., Zhou, Z., Li, Y., Lin, Y., Wei, J., Wei, Z., Xu, B., Shen, J., Li, W., & Xu, S. (2012). Low-level phenolic estrogen pollutants impair islet morphology and β -cell function in isolated rat islets. *Journal of Endocrinology*, 215(2), 303–311. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0219>
- Speakman, J. R., & O'Rahilly, S. (2012). Fat: an evolving issue. *Disease Models & Mechanisms*, 5(5), 569–573. <https://doi.org/10.1242/dmm.010553>
- Tanno, A. P., & Marcondes, F. K. (2002). Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 273–289. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322002000300004>
- The Lancet Public Health. (2018). Tackling obesity seriously: the time has come. *The Lancet Public Health*, 3(4), e153. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30053-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30053-7)
- Tortoriello, D. V., McMinn, J., & Chua, S. C. (2004). Dietary-Induced Obesity and Hypothalamic Infertility in Female DBA/2J Mice. *Endocrinology*, 145(3), 1238–1247. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1406>
- Van De Sande-Lee, S., & Velloso, L. A. (2012). Disfunção hipotalâmica na obesidade Hypothalamic dysfunction in obesity. In *Arq Bras Endocrinol Metab* (Vol. 56, Issue 6).
- van Leckwyck, M., Kong, W., Burton, K. J., Amati, F., Vionnet, N., & Pralong, F. P. (2016). Decreasing Insulin Sensitivity in Women Induces Alterations in LH Pulsatility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(8), 3240–3249. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1727>
- Vannice, G., & Rasmussen, H. (2014). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Dietary Fatty Acids for Healthy Adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(1), 136–153.

<https://doi.org/10.1016/J.JAND.2013.11.001>

- Volk, K. M., Pogrebna, V. V, Roberts, J. A., Zachry, J. E., Blythe, S. N., & Toporikova, N. (2017). *High-Fat , High-Sugar Diet Disrupts the Preovulatory Hormone Surge and Induces Cystic Ovaries in Cycling Female Rats*. 1(December), 1488–1505. <https://doi.org/10.1210/js.2017-00305>
- Wadden, T. A., & Phelan, S. (2002). Assessment of Quality of Life in Obese Individuals. *Obesity Research*, 10(November).
- What We Eat in America, NHANES 2013-2014*. (2013).
- Wildt, L. (1981). Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Rhesus Monkey *. *Endocrinology*, 109(2), 376–385.
- Withrow, D., & Alter, D. a. (2011). The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12(2), 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00712.x>
- Wondisford, F., Wu, S., Ko, C., Nwaopara, A., Radovick, S., Divall, S., & Wolfe, A. (2013). Obesity-Induced Infertility and Hyperandrogenism Are Corrected by Deletion of the Insulin Receptor in the Ovarian Theca Cell. *Diabetes*, 63(4), 1270–1282. <https://doi.org/10.2337/db13-1514>
- Wu, S., Divall, S., Nwaopara, A., Radovick, S., Wondisford, F., Ko, C., & Wolfe, A. (2014). Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes*, 63(4), 1270–1282. <https://doi.org/10.2337/db13-1514>
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., & Zhao, L. (2012). Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *The ISME Journal*, 6(10), 1848–1857. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.27>
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, & Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(DECEMBER), 425–432.
- Zhou, Q., Chen, H., Yang, S., Li, Y., Wang, B., Chen, Y., & Wu, X. (2014). High-

fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats.

Reproductive Biology and Endocrinology : *RB&E*, 12, 127.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-127>

CRÉDITOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Histórico Escolar Parcial

Oscar Mauricio Santamaria Nino, matrícula nº 2017143089

Curso: *Doutorado em Ciências Fisiológicas*

Código	Período	Classif.	Disciplina: Título	Carga Horária	Nota	Créditos	Sit.
PCFI-8012	2017/1	OP	Fisiologia Endócrina	45	07.3	03	A
PCFI-9000	2017/1	OP	Tese de Doutorado	-	-	-	P
PCFI-8017	2017/2	OP	Estudos Independentes de Ciências Fisiológicas: Jones	60	10.0	02	A
PCFI-8004	2017/2	OP	Introdução a Biologia Molecular	45	07.6	03	A
PCFI-8003	2017/2	OP	Métodos Físico-Químico de Análise	30	07.5	02	A
PCFI-8008	2018/1	OP	Fisiologia da Circulação	45	08.1	03	A
PCFI-8001	2018/1	OP	Metodologia de Pesquisa	30	07.0	02	A
PCFI-8009	2018/1	OP	Regulação Cardiovascular	30	10.0	02	A
PCFI-8018	2018/1	OP	Tópicos Avançados I	15	10.0	01	A
PCFI-8019	2018/1	OP	Tópicos Avançados II	30	10.0	02	A
PCFI-8005	2018/2	OP	Bioestatística	60	01.0	-	R
PCFI-8010	2018/2	OP	Fisiologia e Farmacologia da Hipertensão Arterial	45	08.5	03	A
PCFI-8018	2019/1	OP	Tópicos Avançados I	15	10.0	01	A
PCFI-8005	2019/2	OP	Bioestatística	60	08.0	04	A
PCFI-8026	2019/2	OP	Estudos Independentes em Ciências Fisiológicas II	30	-	-	
PCFI-8014	2019/2	OP	Neurofisiologia	60	09.0	04	A
PCFI-8020	2019/2	OP	Tópicos Avançados III	60	-	-	
PCFI-8024	2019/2	OB	Estágio em Docência Superior	60	-	-	
PCFI-8022	2020/1	OP	Defesa de Tese de Doutorado	720	-	-	
PCFI-7001	2021/1	OP	Aproveitamento de Crédito Externo: BGA-DOHaD (Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença)	60	10.0	04	A
PCFI-8022	2021/1	OP	Defesa de Tese de Doutorado	720	-	-	
PCFI-8020	2021/2	OP	Tópicos Avançados III	60	10.0	04	A
			CRA			8.87	
			TOTAL DE CRÉDITOS CONCLUÍDOS			40	

frontiers
in Endocrinology

MINI REVIEW
published: 01 March 2018
doi: 10.3389/fendo.2018.00064

Check for updates

Organotin Exposure and Vertebrate Reproduction: A Review

Julia Fernandez Puñal de Araújo¹, Priscila Lang Podratz^{2*}, Eduardo Merlo, Isabela Valim Sarmiento, Charles Santos da Costa, Oscar Mauricio Santamaria Niño, Rodrigo Alves Faria, Leandro Ceotto Freitas Lima and Jones Bernardes Graceli

Cellular Physiology and Biochemistry Effects of Tributyltin (TBT) on Rat Bone and Mineral Metabolism

Ludmilla Carvalho Rangel Resgala^{a,b,c} Higor Scardini Santana^{a,d}
Bruna Souza Mendonça Portela^{a,c,e} Maria Victória Souza Zanovello^a
Charles Santos da Costa^{f,g} Oscar Mauricio Santamaria Niño^{f,g}
Nicolle Endlich Bicudo^a Diandra Zipinotti dos Santos^h Priscila Lang Podratz^{f,g}
Maura da Cunhaⁱ Andre Lacerda de Abreu Oliveiraⁱ
Leandro Ceotto Freitas Lima^{f,g} Neuza Felix Gomes-Rochette^a
Leticia Batista Azevedo Rangel^{b,d,h} Jones Bernardes Graceli^{f,g} Ian Victor Silva^{a,b,d}

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

ELSEVIER

Check for updates

High-refined carbohydrate diet leads to polycystic ovary syndrome-like features and reduced ovarian reserve in female rats

Oscar M.S. Niño^{a,b,1}, Charles S. da Costa^{a,1}, Karine M. Torres^a, Jordana F. Zanol^a, Leandro C. Freitas-Lima^a, Leandro Miranda-Alves^{c,d}, Jones B. Graceli^{a,*}

Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox

ELSEVIER

Check for updates

Tributyltin and high-refined carbohydrate diet lead to metabolic and reproductive abnormalities, exacerbating premature ovary failure features in the female rats

Jordana F. Zanol^{a,1}, Oscar M.S. Niño^{a,b,1}, Charles S. da Costa^{a,1}, Leandro C. Freitas-Lima^a, Leandro Miranda-Alves^{c,d}, Jones B. Graceli^{a,*}