

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAROLINE CASTRO VALE

**PERFIL METABÓLICO E REPRODUTIVO DE RATAS OBESAS
TRATADAS COM *Syzygium cumini* (L.) SKEELS**

Orientador: Prof^o Dr^o Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Selma do Nascimento Silva

São Luís-MA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL METABÓLICO E REPRODUTIVO DE RATAS OBESAS
TRATADAS COM *Syzygium cumini* (L.) SKEELS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^o Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientadora: Prof^a Dra. Selma do Nascimento Silva

São Luís-MA

2016

**Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA**

VALE, CAROLINE CASTRO.
PERFIL METABÓLICO E REPRODUTIVO DE RATAS OBESAS
TRATADAS COM *Syzygium cumini* L. SKEELS / CAROLINE CASTRO
VALE. - 2016.
63 p.

Coorientador(a): SELMA DO NASCIMENTO SILVA.
Orientador(a): ANTONIO MARCUS DE ANDRADE PAES.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, 2016.

1. FERTILIDADE. 2. JAMBOLÃO. 3. L- GLUTAMATO
MONOSSÓDICO. 4. MEDICINA ALTERNATIVA. 5. SÍNDROME
METABÓLICA. I. DO NASCIMENTO SILVA, SELMA. II. DE ANDRADE PAES,
ANTONIO MARCUS.III. Título

CAROLINE CASTRO VALE

**PERFIL METABÓLICO E REPRODUTIVO DE RATAS OBESAS
TRATADAS COM *Syzygium cumini* (L.) SKEELS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública, realizada em ____/____/____, considerou a candidata Caroline Castro Vale

() APROVADA () REPROVADA

BANCA EXAMINADORA:

Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

A Deus, Pai, fonte de amor, vida, salvação e refúgio em todos os momentos.

Aos meus queridos e amados pais, Delmi e Emília, por toda dedicação, carinho, apoio, amor e palavras de incentivo. A eles dedico todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois vem Dele tudo o que sou, o que tenho e o que espero.

Ao meu orientador, prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, sou infinitamente grata pela oportunidade concedida em fazer parte da família LeFisio (Laboratório Experimental em Fisiologia). És um exemplo de competência profissional e orientação segura, obrigada por tudo.

À minha querida co-orientadora, prof. Dra. Selma do Nascimento Silva, que acompanha meus passos desde a iniciação científica, muito obrigada por toda orientação e ajuda que só uma verdadeira mestre e amiga poderia me fornecer.

À minha família, especialmente ao meu pai Delmi, que mesmo com poucas palavras me incentivou desde pequena a buscar, acreditar e realizar as minhas idealizações e a minha mãe Emília, por ser uma mulher guerreira, que sonha comigo os meus sonhos e vibra também a realização dos mesmos. Me espelho todos os dias na sua força e determinação. Ambos, meus maiores mestres e exemplos na escola da vida, a quem dedico todo meu esforço pelo apoio, amor, cuidado e conselhos seguros em todos os momentos.

A todos que compõe a família LeFisio, muito obrigada pelo incentivo, amizade e colaboração para a execução dos experimentos. Ao grupo de pós-graduandos: Lucas, Karla, Nathalee, Danylo, Hiran, Samira, Perla, Rosângela, Jonas, Vinycius e Bruno, sou grata por todos os momentos de descontração, apoio e ensinamentos valiosos que vocês me proporcionaram. Agradecimento especial aos meus policísticos, Renato e João Lucas, com vocês aprendo todos os dias sobre a importância da dedicação à pesquisa científica.

Ao Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia (LPPF), pelo auxílio no desenvolvimento de atividades experimentais desta dissertação, além de ser o local em que tive a oportunidade de conhecer esse maravilhoso mundo da pesquisa científica e aprendi a dar meus primeiros passos.

Ao Laboratório Gaspar® e ao técnico Marco Antonio Sales dos Santos pelo auxílio na aquisição de dados desta dissertação e de outros trabalhos vinculados ao grupo.

A minha grande amiga Renata, amiga no sentido mais bonito desta palavra, muito obrigada por sua companhia, alegria, compreensão e apoio em tudo. Quero tê-la em meu ciclo de amizade todos os dias da minha vida, mesmo com seu jeitinho meio espevitado de ser conquistou um lugar super especial em meu coração. Da mesma forma, agradeço ao meu amigo Wermerson, que apesar da distância sempre me dedicou palavras de encorajamento e conforto.

As minhas amigas, Cristianne e Layne, amizade conquistada da graduação para a vida. Sou grata por entenderem minhas faltas constantes, por adequarem seus horários aos meus, por alegrar meus dias e tornar esta caminhada mais leve com as mais singelas e precisas palavras de encorajamento. E para completar o nosso trio, da mesma forma agradeço à Raiane, Priscila e Thaíssa, pois a alegria se completa quando formamos nosso sexteto. Amo vocês.

Aos animais, que carinhosamente as chamo de “minhas filhas”, parte essencial para o desenvolvimento desta pesquisa, meu sincero agradecimento

A UFMA, PPGCS, CAPES, ao CNPq e a FAPEMA pela estrutura disponível, bolsa concedida e auxílio financeiro ao projeto.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização e desenvolvimento desta dissertação, meu sincero agradecimento!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

José de Alencar

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura1. Interrelação entre os fatores de risco e as desordens reprodutivas.....	15
Figura2. Distúrbios das ações metabólicas sobre o fígado, tecido adiposo, músculo e pâncreas.....	18
Figura3. Representação esquemática do controle hormonal no sistema reprodutor.....	22
Figura4. Folhas da espécie <i>Syzygium cumini</i> Linee Skeels	30
Figura5. Fluxograma do Desenho Experimental.....	34
Figura6. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> sobre a evolução ponderal e índice de Lee de ratas obesas MSG.....	38
Figura7. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> (EHSyz) sobre os parâmetros bioquímicos de ratas obesas MSG.....	40
Figura8. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> (EHSyz) sobre a insulinemia e resistência à insulina de ratas obesas MSG....	40
Figura9. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> (EHSyz) sobre a homeostase glicídica de ratas obesas MSG.....	41
Figura10. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> (EHSyz) sobre a ciclicidade estral de ratas obesas MSG.....	43
Figura11. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i> (EHSyz) sobre o perfil hormonal de ratas obesas MSG.....	44
Tabela 1. Desempenho reprodutivo de ratas controles e obesas tratadas ou não com extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (EHSyz).	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	ácidos graxos livres
AUC	área sob à curva
Akt2	proteína quinase B
CTRL	grupo controle
CYP450c17	citocromo P450c17
DCV	doenças cardiovasculares
DM2	diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
E2	estradiol
EHSyz	extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i>
epm	erro padrão das médias
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FDA	Administração de Comidas e Remédios
GLUT-4	transportador de glicose
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GPX	glutaciona peroxidase
GTT	teste oral de tolerância à glicose
HDL	lipoproteína de alta densidade
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	índice de Lee
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corpórea
IRS-1	substrato 1 do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
MTP	proteína microsomal de transporte dos triglicerídeos
MSG	L- glutamato monossódico
NF- κ B	fator nuclear kappa β
NCEP-ATP	Programa de Educação do Colesterol Nacional- III

<i>ob</i>	gene obeso
OH [•]	radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	radical ânion superóxido
PI3K	fosfoinositídeo 3- quinase
PCR	proteína C reativa
RI	resistência à insulina
RELM	moléculas resistina
RL	radicais livres
SHBG	proteína ligadora de hormônios sexuais
SM	síndrome metabólica
SOD	superóxido dismutase
SOP	síndrome de ovários policísticos
SYZ	<i>Syzygium cumini</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral
TRI	triglicerídeos
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	Organização Mundial de Saúde

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é definida como um conjunto de fatores de risco interrelacionados que contribuem para o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV). A SM também provoca efeitos deletérios sobre o sistema reprodutor, especialmente feminino, com redução de taxas ovulatórias, aumento do número de abortos, complicações tardias da gravidez, que elevam o risco de infertilidade. Como forma de tratamento, são adotadas abordagens tanto não farmacológicas quanto farmacológicas. Nesse contexto, o uso de terapias alternativas com produtos naturais tem se destacado como uma forma menos associada ao agravamento dos fatores de risco da SM. *Syzygium cumini* (jambolão) é uma espécie vegetal de origem asiática, porém cultivada e utilizada em todo o mundo por suas propriedades anti-hiperglicemiantes, anti-hiperlipemiantes e antioxidantes. Mediante tais ações, buscamos investigar se o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* (EHSyz) melhora as alterações metabólicas e, conseqüentemente, as alterações da função reprodutiva de ratas com obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG) na dose 4g/Kg/dia. Fêmeas Wistar foram divididas nos seguintes grupos: grupo CTRL (tratado com NaCl 0,9% 0,1mL/100g/dia v.o.); grupo MSG (tratado com NaCl 0,9% 0,1mL/100g/dia v.o.); grupo obeso EHSyz (tratado com EHSyz na dose de 500mg/kg/dia, v.o.), todos durante 60 dias. A administração com EHSyz promoveu manutenção do ganho de peso, redução do índice de Lee e melhora do perfil glicolipídico, com redução dos níveis séricos de triglicérides em 60,7 % e 29,7 % em relação ao colesterol total. O EHSyz evitou ainda a instauração do quadro de resistência nas ratas tratadas. Entretanto apesar da melhora na oligociclicidade, o extrato não foi capaz de melhorar o comprometimento reprodutivo das ratas tratadas. Desta forma, concluímos que o tratamento com EHSyz produziu efeitos acentuados sobre parâmetros metabólicos de ratas obesas sem interferir na capacidade reprodutiva das mesmas.

Palavras-chave: Fertilidade; Síndrome metabólica; L-glutamato monossódico; Medicina alternativa; Jambolão.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is defined as a set of interrelated risk factors that contribute to type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular disease (CVD). MS also causes harmful effects on the reproductive system, especially for women, as it reduces ovulatory rates, increases the number of abortions and late pregnancy complications, which increase the risk of infertility. As a form of treatment approaches are adopted both non-pharmacologic and pharmacologic. In this context, the use of alternative therapies with natural products has emerged as a safer and less associated with worsening of MS risk factors. *Syzygium cumini* (jambolan) is a species of Asian origin, but cultivated and used throughout the world for its anti-hyperglycemic, anti-hyperlipemic and antioxidant. Through these actions, we sought to investigate whether the hydroalcoholic extract of the leaves of *S. cumini* (EHSyz) improves the metabolic changes and consequently, changes in reproductive function in rats with induced obesity L-monosodium glutamate (MSG) a dose 4g/Kg/day. Wistar female rats were divided into the following groups: CTRL group (treated with NaCl 0.9% 0.1 ml / 100g / day v.o.); MSG group (treated with NaCl 0.9% 0.1 ml / 100g / day V.O.); EHSyz obese group (treated with EHSyz at a dose of 500mg / kg / day, V.O.), each for 60 days. The administration EHSyz promoted with retention of weight gain, reduction Lee index and improved glycolipid profile, with reduced serum triglyceride levels by 60.7% and 29.7% compared to cholesterol total. EHSyz even avoided introduction resistance table in the treated rats. However, despite the improvement in oligociclicidade, the extract was not able to improve reproductive impairment of the treated rats. Thus, we conclude that treatment with EHSyz produced marked effects on metabolic parameters in obese rats without interfering with the reproductive capacity of the same

Keywords: Fertility; Metabolic syndrome; L-glutamate monossodic; Alternative medicine; Jambolan

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
Apresentação.....	14
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1 Obesidade e resistência insulínica.....	17
1.1.1 <i>Consequência da RI sobre os tecidos metabólicos sensíveis à insulina.....</i>	<i>17</i>
1.2. <i>Desordens ovulatórias.....</i>	<i>22</i>
1.2.1 <i>Distúrbios no ciclo menstrual</i>	<i>23</i>
1.2.2 <i>Oligo/Anovulação.....</i>	<i>24</i>
1.2.3 <i>Síndrome de ovários policísticos.....</i>	<i>25</i>
1.3 Modelos experimentais de obesidade para verificação das desordens reprodutivas....	26
1.4 Tratamento metabólico relacionado às desordens reprodutivas	28
1.4.1 <i>Tratamento alternativo.....</i>	<i>30</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos.....	32
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material botânico.....	33
4.2 Preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Syzygium cumini</i>	33
4.3 Animais experimentais.....	33
4.4 Indução da Obesidade e Desenho experimental.....	33
4.5 Determinação do peso corporal e consumo de ração.....	34
4.6 Índice de Lee.....	35

4.7 Determinação do Ciclo Estral.....	35
4.8 Teste oral de tolerância à glicose.....	35
4.9 Teste de tolerância à insulina.....	36
4.10 Análise bioquímica sérica.....	36
4.11 Avaliação de resistência à insulina	36
4.12 Análise hormonal sérica.....	36
4.13 Avaliação do desempenho reprodutivo.....	37
4.14 Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Efeito do EHSyz sobre a evolução da obesidade induzida por MSG.....	38
5.2 Efeito do EHSyz sobre a homeostase glicolipídica.....	39
5.3 Efeito do EHSyz sobre o perfil reprodutivo.....	42
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	49
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50

ANEXOS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APRESENTAÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada por um conjunto de fatores de risco e devem ser diagnosticados pelo menos três desses fatores para caracterizar o indivíduo como portador de síndrome metabólica, tais como: disglícemia, resistência à insulina (RI), dislipidemia, obesidade e aumento da pressão arterial que contribuem para o aumento da prevalência de doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (WU, S. H.; LIU; HO, 2010). De acordo com consenso estabelecido pela *International Diabetes Federation* (IDF), o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) e a *World Health Organization* (WHO), (ALBERTI et al., 2009) Estima-se que a SM acomete cerca de 20-25% da população mundial, sendo que a maior prevalência ocorre entre as mulheres (BELTRAN-SANCHEZ et al., 2013). No Brasil, dados sistematizados de dez estudos mostraram que a média ponderal de prevalência da SM foi de 29,6%, de acordo com os critérios de diagnóstico clínico e as características da população de estudo (DE CARVALHO VIDIGAL et al., 2013).

O aumento da prevalência da SM tem sido atribuído a alterações de estilo de vida, dentre as quais se destacam o sedentarismo, estresse e alimentação hipercalórica e de alto teor glicídico, contribuindo para o aumento do tecido adiposo (LEITÃO, 2012). Além disso, o excesso de peso também desempenha um papel significativo nas desordens reprodutivas, estando associado a anovulações, subfecundidade e infertilidade (VAN DER et al., 2008). As alterações sistêmicas, tais como dislipidemia e respostas inflamatórias, também são prejudiciais ao microambiente folicular (ROBKER et al., 2009). Há uma diminuição da atividade dos componentes da sinalização insulínica, o que indica resistência a esse hormônio em órgãos-alvo como o fígado, tecido adiposo e músculo, ocasionando aumento da produção hepática de glicose, redução da atividade da lipase proteica, com consequente dislipidemia caracterizada pela presença de hipertrigliceridemia e diminuição dos níveis de HDL (CIVELEK; LUSIS, 2011). A proteína C-reativa, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral são encontrados em níveis elevados em pacientes obesos, o que também pode contribuir para um efeito prejudicial sobre o ciclo reprodutivo (TALMOR; DUNPHY, 2015).

Porém, a obesidade pode não ser o fator causal proeminente em distúrbios reprodutivos como hiperandrogenemia e anovulações, pois mulheres obesas podem

apresentarem-se férteis e sem hiperandrogenismo. Tanto a hiperinsulinemia quanto a resistência insulínica são causas subjacentes que levam à obesidade e à piora do quadro de SM acompanhada de alterações na esteroidogênese (DAG; DILBAZ, 2015) (**Figura 1**).

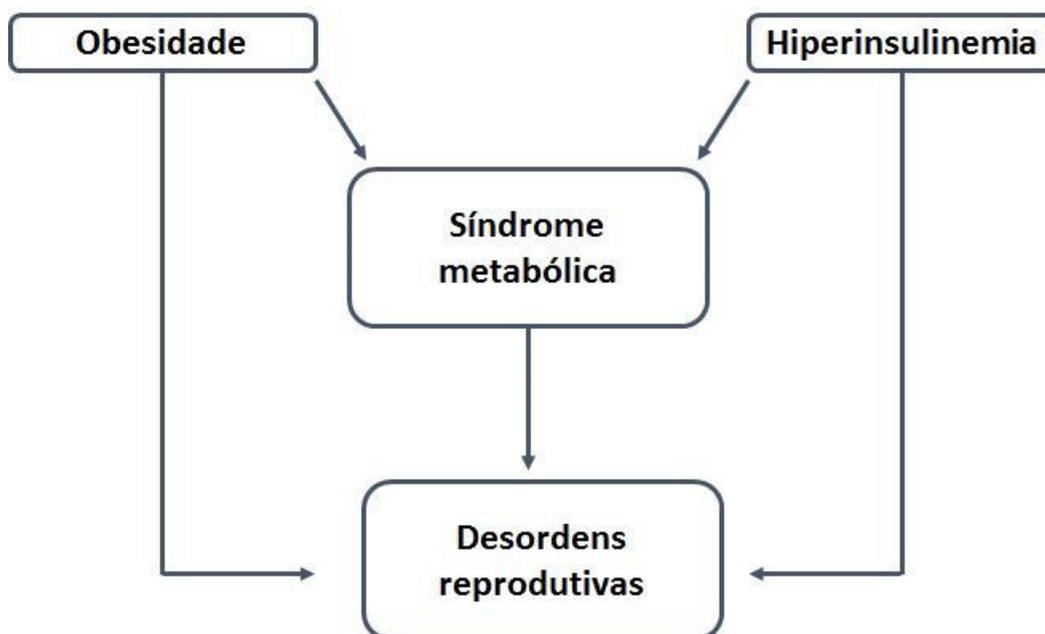


Figura 1. Interrelação entre os fatores de risco e as desordens reprodutivas

Dentre os vários métodos utilizados para tratamento dos distúrbios reprodutivos, encontram-se a mudança de estilo de vida com dieta e prática de exercícios físicos, bem como administração de várias drogas como indutores de ovulação e uso de sensibilizadores de insulina (MESSINIS et al., 2015). Entretanto, tem sido relatado alguns efeitos colaterais a estes fármacos após uso prolongado, como por exemplo maior incidência de carcinoma ovariano (GADDUCCI; GUERRIERI; GENAZZANI, 2013), cefaleia, ciclos irregulares e diminuição da densidade óssea (PANDEY et al., 2010). Nesse contexto, destaca-se também o uso de plantas medicinais com ação anti-hiperglicemiante, como por exemplo, a espécie *Syzygium cumini* Linee Skeels (*S. cumini*).

Com o objetivo de avaliar suas propriedades e devido ao enorme potencial terapêutico desta planta, nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito anti-obesidade, anti-hiperlipidêmico e anti-hiperglicêmico do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini*. Sendo assim, esse trabalho se propôs a verificar os efeitos do extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *Syzygium cumini* (EHSyz) sobre parâmetros endócrinos- metabólicos em ratas com obesidade induzida por L- glutamato monossódico

(MSG), cujo modelo é referencialmente utilizado para estudos de obesidade e alterações metabólicas.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade e resistência insulínica

A prevalência de obesidade em todo o mundo está aumentando, com projeções futuras prevendo que mais de 1 bilhão de pessoas, ou cerca de 20% de toda a população adulta do mundo, serão obesos até 2030 (KELLY et al., 2008).

Considerada atualmente um problema de saúde em todo o mundo, a obesidade é caracterizada pelo aumento excessivo de tecido adiposo, o que pode ocasionar sérios danos à saúde (WHO, 2015), devido a sua associação com maior risco de desenvolvimento da SM, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e doença cardiovascular (DCV), entre outras condições crônicas (OUCHI et al., 2011; PHILLIPS, 2013; SCARPELLINI; TACK, 2012). Por consequência de tais distúrbios, ocorre aumento na liberação de insulina (COMNINOS; JAYASENA; DHILLO, 2014).

A secreção de insulina é mediada pelo nível plasmático de glicose, que estimula as células beta pancreáticas a produzirem e secretarem maior quantidade desse hormônio. Uma vez liberada, atua de modo a estimular a captação de glicose nos tecidos alvo e suspender a produção hepática de glicose (KNIGHTS et al., 2014)). A sensibilidade a este hormônio ocorre através da ligação a seus receptores, cuja ativação resulta na translocação da proteína transportadora de glicose (GLUT 4) para a membrana celular, o que permite entrada de glicose na célula (LETO; SALTIEL, 2012; TEIXEIRA, 2016). Quando há comprometimento da resposta aos estímulos da insulina, caracteriza-se a chamada resistência insulínica (RI), que resulta em hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

1.1.1 Consequência da RI sobre os tecidos metabólicos sensíveis à insulina

A sinalização insulínica inicia-se quando a insulina liga-se a seu receptor na membrana celular, que conduz à fosforilação / ativação do substrato do receptor da insulina (IRS) proteínas que estão associadas com a ativação de duas vias de sinalização principais: o fosfatidilinositol 3 - quinase (PI3K) -Akt / proteína quinase B (PKB) e a via de proteína quinase (MAPK) ativado por mitógeno. A PI3K - AKT / PKB via é importante para ações mais metabólicas da insulina. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos proteicos em resíduos de tirosina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em resíduos de serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após

estímulo com insulina. Essas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (JUNG; CHOI, 2014). Por consequência, a resistência insulínica instaura-se em tecidos metabólicos (fígado, tecido adiposo e músculo) sensíveis a este hormônio comprometendo suas funções (DE LUCA; OLEFSKY, 2008) (**Figura 2**).

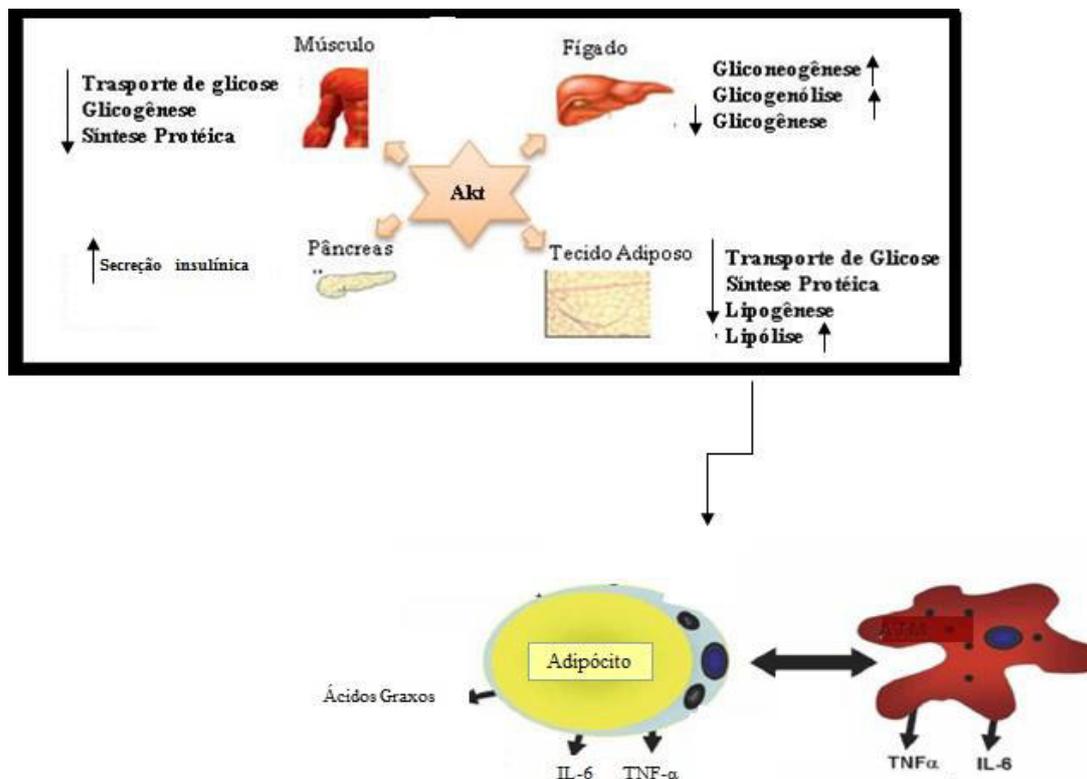


Figura 2. Distúrbios sobre ações metabólicas sobre o fígado, tecido adiposo, músculo e pâncreas na RI. No fígado, ocorre aumento da produção de glicose (gliconeogênese), degradação de glicogênio (glicogenólise) e diminuição na síntese de glicogênio (glicogênese). No tecido adiposo, com o aumento da lipólise há maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) que contribui para a hiperprodução de triglicérides e instauração do quadro inflamatório, com aumento da produção de TNF- α devido recrutamento de macrófagos, culminando com maior produção de interleucina-6 (IL-6). No músculo esquelético, ocorre redução da sensibilidade a insulina com conseqüente inibição da captação de glicose e síntese proteica. Esse conjunto de fatores culmina em hipersecreção de insulina pelas células β pancreáticas, contribuindo para distúrbios no sistema reprodutivo. Adaptado de (CAPURSO; CAPURSO, 2012; QATANANI; LAZAR, 2007).

Os eventos fisiopatológicos da RI levam ao início de uma resposta inflamatória no tecido adiposo e o aumento da lipólise ocasiona excesso de ácidos graxos livres (AGL) circulantes (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). Os AGL em excesso são transportados para o fígado, ocasionando aumento da transferência de triglicérides para as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) nascente através da proteína

microssomal de transporte dos triglicerídeos (MTP) no retículo endoplasmático (BERRIOT-VAROQUEAUX et al., 2000). A este efeito, associa-se a diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ocasionando dislipidemia (JUNG; CHOI, 2014).

Por ser um tecido metabólico altamente ativo, o tecido adiposo libera substâncias chamadas adipocinas, tais como adiponectina, leptina e resistina que regulam a inflamação e função imunológica, assim como os componentes da síndrome metabólica, influenciando a sensibilidade a insulina e a homeostase da pressão arterial, bem como glicemia e metabolismo lipídico (SPITE; CLARIA; SERHAN, 2014). Estudos demonstram que um excesso ou deficiência de tecido adiposo resulta em distúrbios sexuais, puberais de maturação, anovulações, produção de hormônios reprodutivos e gametas (MIRCEA; LUJAN; PIERSON, 2007; ZHAI et al., 2012).

A adiponectina é a adipocina sintetizada em maior quantidade pelos adipócitos e modula uma série de processos metabólicos, incluindo oxidação de ácidos graxos e regulação da glicose (DIEZ; IGLESIAS, 2003). Seus níveis circulantes são inversamente proporcionais ao percentual de gordura corporal (LI et al., 2009). Por consequência os baixos níveis de adiponectina ocasionam aumento dos níveis do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que ativam cinases intracelulares, levando ao aumento da fosforilação de serina no receptor insulínico ao invés da fosforilação de tirosina (UKKOLA; SANTANIEMI, 2002).

Com isso, ocorre diminuição da ativação da PI3K, ocasionando inibição da Akt2 que catalisa translocação do GLUT 4 para a membrana plasmática, inibindo transporte de glicose para as células (DONATH; SHOELSON, 2011). Além disso, ocasiona também o aumento da produção de IL-6 por macrófagos, e diminuição dos níveis das citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1, agindo em conjunto para a instauração do quadro de resistência insulínica em órgãos como músculo, fígado e outros tecidos (**Figura 2**) (GLASS; OLEFSKY, 2012).

Outro hormônio secretado pelo tecido adiposo é a leptina, é um hormônio peptídico codificada pelo gene obeso (*ob*) que apresenta estrutura terciária semelhante às citocinas, cujo efeito biológico principal é o controle da saciedade e homeostasia energética. Seus níveis séricos estão associados com o índice de massa corporal, e são proporcionais ao total de tecido adiposo (KAJIKAWA et al., 2011). A leptina promove maior sensibilidade à insulina, resultando em redução da lipogênese associada ao aumento de oxidação de ácidos graxos (RABE et al., 2008).

Mediante o quadro de RI, os níveis de leptina estão aumentados tanto em animais obesos quanto em seres humanos obesos, sugerindo que o excesso de tecido adiposo leva a instauração da resistência a leptina, com queda da taxa metabólica basal, contribuindo para o agravamento das consequências promovidas pela obesidade (MUOIO; NEWGARD, 2008). A leptina inibe a esteroidogênese ovariana induzida pela insulina, agindo sobre os receptores celulares da teca e granulosa, assim como inibe a produção de estradiol estimulada por hormônio luteinizante pelas células da granulosa (MOSCHOS; CHAN; MANTZOROS, 2002).

Estudo realizado em camundongos induzidos à obesidade por dieta, demonstrou que a leptina encontra-se aumentada 5 vezes mais em camundongos obesos do que em camundongos magros. Desta forma, o elevado nível de leptina, diminuiu em 5 vezes o índice de fertilidade nesses animais; além de promover uma menor regulação dos receptores de leptina localizados nos testículos, indicando que a resistência à leptina poderia desempenhar um papel na infertilidade masculina (GHANAYEM et al., 2010).

A resistina é uma adipocina pertencente à família RELM de proteínas ricas em cisteína. Ela foi primeiramente descrita em roedores, apresentando associação direta com obesidade e diabetes (STEPPAN et al., 2001). Em seres humanos, a resistina é expressa principalmente em macrófagos e parece estar envolvida no recrutamento de outras células do sistema imunológico, bem como na secreção de fatores pró inflamatórios (HEILBRONN et al., 2004). GHARRIBEH et al. (2010) ao avaliar os níveis de resistina no a relação entre os níveis de resistina soro, obesidade e resistência à insulina entre 125 pacientes com DM2 jordanianos, verificou que os níveis de resistina séricos foram maiores em pacientes obesos com DM2 comparados com os controles obesos não diabéticos. Mais evidente do que sua atuação no perfil metabólico é o seu papel nos processos inflamatórios, pois tem sua expressão estimulada por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 e é capaz de induzir a expressão dessas citocinas no tecido adiposo e nas células mononucleares do sangue periférico. Assim, sugere-se que essa adipocina representa o elo entre inflamação e sinalização metabólica (RABE et al., 2008).

Além da ação das adipocinas, também há participação dos ácidos graxos (AG) armazenados tanto em adipócitos quanto no músculo esquelético em forma de triglicerídeos (GUILHERME et al., 2008). Estes participam ativamente nas vias de sinalização da regulação de glicose, gordura, metabolismo lipídico e inflamação (DENISON et al., 2010). Pois, os AG são capazes de ativar receptores Toll- like, com

ativação de cinases intracelulares culminando em fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e inibição da sinalização insulínica (GLASS; OLEFSKY, 2012). No músculo esquelético ocorre redução da sensibilidade a insulina com consequente inibição da captação de glicose. Assim, com o aumento de glicose circulante e maior liberação de AGL, no pâncreas ocorre hipersecreção de insulina pelas células β , caracterizando a hiperinsulinemia e que com o tempo pode evoluir para uma deficiência absoluta da insulina, por exaustão destas células (HICKMAN; MACDONALD, 2007). No fígado, por exemplo, o aumento da gliconeogênese conduz ao aumento da secreção pancreática de insulina (XAVIER, 2005).

Sendo assim, além dos efeitos diretos sobre os órgãos responsivos às ações insulínicas e sua consequência para a síndrome metabólica, a resistência à insulina e hiperinsulinemia também estão ligadas aos distúrbios hormonais que afetam o sistema reprodutivo, podendo promover mudanças hormonais que interfiram nas taxas ovulatórias, promova o aumento do número de abortos, além de irregularidades menstruais e complicações na gravidez.

O bom funcionamento do ciclo reprodutivo depende essencialmente da ação de um mecanismo complexo coordenado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (RANG&DALE, 2012). Inicialmente, o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é liberado de forma pulsátil pelo hipotálamo para a adeno-hipófise com o intuito de estimular a liberação de dois hormônios gonadotróficos: o hormônio estimulador do folículo (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Em seguida, esses hormônios são lançados na corrente sanguínea, dirigindo-se para os ovários, especificamente células da teca e da granulosa, afim de estimular a produção hormonal ovariana de estrógeno e progesterona, seguindo um mecanismo de *feedback* (GUYTON, 2011). Ao atuar nos ovários, as gonadotrofinas promovem o desenvolvimento de pequenos grupos de folículos, cada um contendo um óvulo que ao não ser fecundado é expulso caracterizando o período menstrual. Segue o aumento da produção de progesterona e diminuição pulsátil de GnRH diminuindo a produção de LH e aumentando a de FSH para estimular a próxima rodada da ovulação (TSILCHOROZIDOU; OVERTON; CONWAY, 2004).

No homem, o FSH e LH ligam-se a receptores na membrana plasmática de células alvo específicas no testículo, estimulando a produção de testosterona através das células de Leyding. Uma vez liberada, a testosterona inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo e assim a secreção de LH, as células de Sertoli por sua vez, produzem a inibina B peptídeo

que atua por mecanismo de retroalimentação negativa na hipófise diminuindo as concentrações de FSH (**Figura 3**) (GUYTON, 2011).

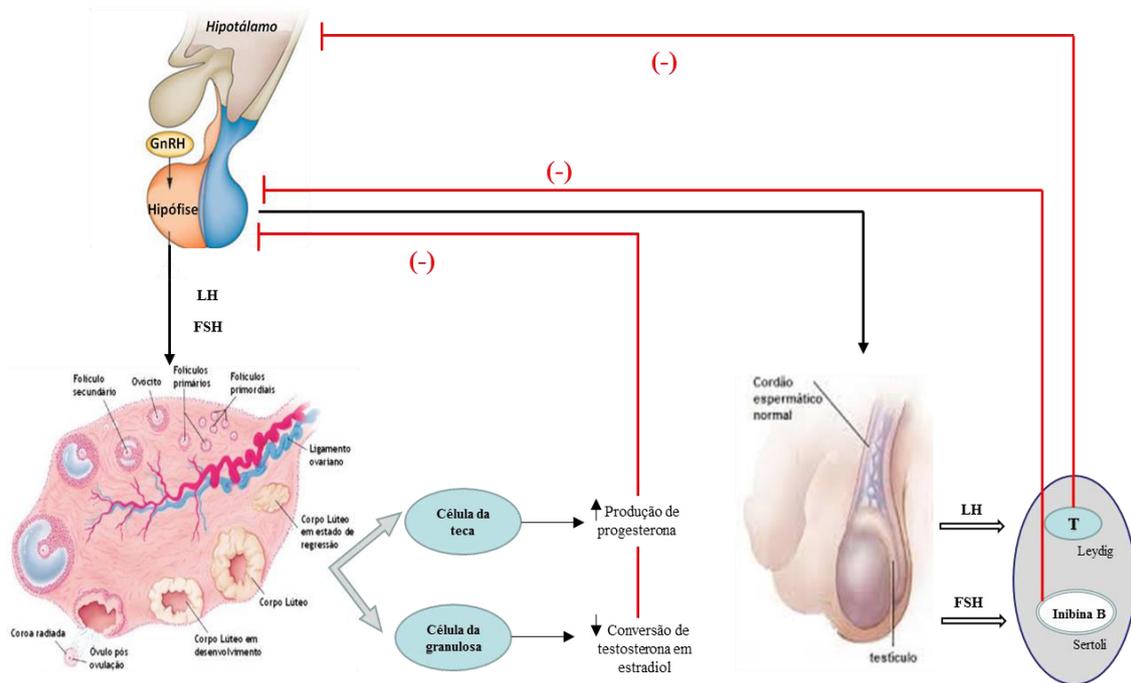


Figura 3. Representação esquemática do controle hormonal no sistema reprodutor. O hipotálamo desempenha um papel fundamental no controle da função reprodutora tanto na mulher quanto no homem. Ele secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que por sua vez, estimula a adeno-hipófise a liberar dois hormônios gonadotróficos: o hormônio estimulador do folículo (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Ao atuar nos ovários, especificamente nas células da teca e da granulosa, promovem o desenvolvimento de pequenos grupos de folículos, cada um contendo um óvulo que ao não ser fecundado é expulso caracterizando o período menstrual. Através de mecanismo de *feedback*, com o aumento da produção de progesterona e diminuição pulsátil de GnRH, há diminuição liberação das gonadotrofinas pela adeno-hipófise, estimulando a próxima rodada de ovulação. No homem, o LH age positivamente sobre as células de Leydig estimulando a produção de testosterona que em altas concentrações inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo. O FSH se liga a receptores específicos nas células de Sertoli para favorecer a espermatogênese e, essas células secretam ainda inibina, peptídeo que atua por mecanismo de retroalimentação negativa na hipófise diminuindo as concentrações de FSH. Linhas pretas representam ação dos hormônios gonadotróficos no ovário e testículos. Linhas vermelhas mecanismo de *feedback* negativo.

1.2. Desordens ovulatórias

Os distúrbios de fertilidade surgem mediante defeitos na função reprodutiva e incluem a diminuição no desenvolvimento de folículos, anormalidade na secreção de esteróides ou ainda desregularização na comunicação entre as gonadotrofinas e seus respectivos receptores (AITTOMAKI et al., 1995). A função reprodutiva envolve mecanismos tanto de controle central, quanto periférico (ESHRE, 2006). A interação entre hormônios metabólicos e sinais neuronais hipotalâmicos, impacta o tipo e a quantidade de substrato metabólico disponíveis para os órgãos periféricos, inclusive os

ovários (SELI et al., 2014). Mediante alterações metabólicas, a resistência à insulina e consequente hiperinsulinemia estão ligadas aos distúrbios hormonais que afetam o sistema reprodutor (SINGLA; BARDOLOI; PARKASH, 2010; SLIWOWSKA et al., 2014).

Em nível periférico, a insulina estimula a produção androgênica ovariana. Ao interagir com receptores ovarianos na célula da teca aumenta a atividade da enzima 17-hidroxiase, seguido do aumento da atividade da 17,20-liase ocasionando a hiperprodução de andrógenos, especialmente, androstenediona e testosterona. A insulina também aumenta a produção de fator de crescimento insulínico (IGF-1), que por sua vez, também estimula a síntese de andrógenos e inibe a enzima aromatase, responsável pela conversão de andrógenos em estradiol. Por conseguinte, ocorre diminuição da conversão de andrógenos a estradiol (EHRMANN, 2005). Esse defeito neuroendócrino ocasiona desregularização da sinalização hipotalâmica e hipofisária, com aumento da frequência de pulso e amplitude do LH (EHRMANN, 2005; PARIHAR, 2003).

Esse processo pode resultar nas chamadas desordens ovulatórias, uma vez que essa luteinização prematura com consequente influência no crescimento de folículos ovarianos levam a distúrbios no ciclo menstrual e oligo/anovulação (FRANKS; STARK; HARDY, 2008).

1.2.1. Distúrbios no ciclo menstrual

Diversos fatores de risco estão intimamente relacionados com os distúrbios menstruais, dentre eles diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial e dislipidemia (REAVEN, 1993), portanto, a irregularidade menstrual também está associada à síndrome metabólica. Tal associação foi demonstrada em estudo realizado entre 2010-2012, no qual mulheres portadoras da SM e seus componentes também apresentaram distúrbios menstruais em idade reprodutiva (LEE et al., 2016). Tais distúrbios podem ser classificados em amenorreia e oligomenorréia (HIRATA et al., 1997).

A falência ovariana inicialmente apresenta-se com um quadro de amenorreia e hipogonadismo, em geral precedido em meses ou anos por período de irregularidade menstrual (GOSWAMI; CONWAY, 2007). A amenorreia é definida como a ausência de menstruação espontânea em mulheres na idade reprodutiva e classificada em amenorreia primária e secundária (GOLDEN; CARLSON, 2008). A primária corresponde à ausência da menarca até os 15 anos de idade na presença de características sexuais secundárias normais e a secundária caracterizada pela ausência de menstruação por mais de 3 meses,

quando precedido por ciclos menstruais regulares uma vez que os ciclos menstruais regulares ocorrem a cada 21 a 35 dias (MONTROYA et al., 2012). A maioria dos casos patológicos atribuídos a amenorreia secundária estão correlacionados a síndrome de ovário policístico, hiperprolactinemia, amenorreia hipotalâmica ou insuficiência ovariana primária (YILDIZ; KNOCHENHAUER; AZZIZ, 2008). Sendo esta última uma condição caracterizada por depleção do folículo devido menor atividade da função ovariana (NELSON, 2009) que pode resultar em infertilidade em 10% dos casos (VAN KASTEREN; SCHOEMAKER, 1999).

Por sua vez, a oligomenorréia é caracterizada pelo intervalo entre dois ciclos menstruais superior a 45 dias (RODRIGUES; CASTEDO, 2011), sendo este distúrbio utilizado como um dos critérios de triagem para detecção da síndrome de ovários policísticos que está intimamente relacionado à SM (VILLARROEL et al., 2015).

As consequências relacionadas aos fatores interligados aos distúrbios menstruais são demonstradas através de pesquisas, nas quais a prevalência da obesidade torna-se um fator agravante para a ocorrência dos mesmos (SEIF; DIAMOND; NICKKHO-AMIRY, 2015). Estudo de coorte realizado em adolescentes pós cirurgia bariátrica com obesidade grave (IMC de 54,5 kg/m²), mostrou elevada prevalência de ciclos menstruais irregulares, sendo que 32% apresentavam oligomenorréia (HILLMAN et al., 2011).

RADIVOJEC et al. (2014), ao realizarem um estudo do tipo transversal em 835 pacientes pós menarca, constatou que, as que apresentavam ciclos menstruais irregulares possuíam IMC e percentual de gordura elevado, bem como aumento de volume ovariano e predisposição a desenvolver síndrome de ovários policísticos ou ciclos irregulares na idade adulta. Devido a esses agravantes, a perda de peso pode levar a diminuição do tecido adiposo periférico resultando em normalização da SHBG, insulina, a melhora da função menstrual regular e normalização da testosterona e outras alterações hormonais (SEIF et al., 2015).

1.2.2 Oligo/Anovulação

A anovulação consiste na falha de ovulação em mulheres na idade reprodutiva, uma vez que o ovário delonga um período geralmente superior a 3 meses para liberação do óvulo, consistindo em períodos menstruais irregulares ou ausentes (BRASSARD; AINMELK; BAILLARGEON, 2008). Em mulheres com idade entre 16-40, este fenômeno é considerado anormal e responsável pela diminuição em 30% da fertilidade. Além dos fatores metabólicos com consequências hormonais, fatores externos como

estresse e nutrição também podem causar anovulação, afetando o hipotálamo e o sistema nervoso central (DAVIS; SEGARIS, 2008). A maioria dos pacientes com anovulação apresentam obesidade, hiperandrogenismo e resistência à insulina (NADIR, 2012).

O desequilíbrio hormonal apresenta-se como a causa mais comum (70%), uma vez que um mau funcionamento no hipotálamo ou hipófise ocasiona alterações na produção de folículos ovarianos, tornando-os insuficiente para garantir o desenvolvimento do óvulo (ALEXANDER; COTANCH, 1980). Em geral os padrões hormonais durante os ciclos anovulatórios são mais baixos do que os ciclos ovulatórios (BUCKLER et al., 1991). As concentrações de LH tendem a ser maiores em ciclos anovulatórios devido a falha no *feedback* negativo, normalmente exercido por mudanças cíclicas no estradiol e progesterona (FRANKS et al., 2008).

Entre as mulheres que apresentam tal disfunção ovariana, cerca de 40% serão diagnosticadas com síndrome de ovários policísticos (SOP) (AZZIZ et al., 2009). Estudo de coorte com 1.750 pacientes com SOP, observou que mulheres anovulatórias (88,81%) foram mais amenorreicas e com maior duração de ciclo em relação às mulheres oligoovulatórias (11,9%) (BURGERS et al., 2010).

1.2.3 Síndrome de ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) representa a endocrinopatia reprodutiva mais comum e afeta cerca de 5-10% das mulheres durante a vida reprodutiva. É um distúrbio hiperandrogênico caracterizado por anovulação crônica, frequentemente associado a alterações metabólicas incluindo obesidade, resistência insulínica, hiperinsulinemia e a progressão para a DM2 (MARCH et al., 2010). Outro fator que contribui para o hiperandrogenismo e RI na SOP, é a fosforilação da serina do receptor de insulina, com diminuição da atividade do CYP450c17 presente no ovário que favorece a síntese de andrógenos (MARSHALL; DUNAIF, 2012).

A fisiopatologia desta síndrome é complexa e envolve fatores genéticos, desregulação da atividade GnRH/LH, anormalidades intrínsecas da esteroidogênese ovariana e ação da hiperinsulinemia na produção androgênica ligada a fatores ambientais como dieta e atividade física (MAYER; EVANS; NESTLER, 2015). Enquanto que na maioria dos órgãos alvo observa-se um aumento da resistência à insulina, no ovário a sinalização insulínica não é prejudicada. Dados demonstram que fêmeas de camundongos obesas mantiveram a sensibilidade à insulina na hipófise e ovários apesar de observada RI em órgãos como fígado, músculo e tecido adiposo (WU, S. et al., 2012).

A hiperinsulinemia favorece o distúrbio metabólico com aumento de LDL e diminuição de HDL em pacientes portadoras da síndrome (TEEDE; DEEKS; MORAN, 2010). Outro efeito ocasionado pela hiperinsulinemia é a diminuição da produção hepática da proteína SHBG (*sex hormone-binding globulin*), contribuindo para quantidade de testosterona livre (GOODARZI et al., 2011). A hiperandrogenemia é detectada em 60% dos casos, sendo que a RI é diagnosticada em 50 a 80% independente do peso excessivo ou índice de massa corpórea (IMC) (HOEGER, 2007; SPECA; NAPOLITANO; TAGLIAFERRI, 2007). Estudos realizados demonstram que a prevalência da obesidade eleva-se de 51 para 74% em pacientes com SOP; 14% das pacientes italianas e 30% das espanholas com SOP eram obesas e apresentaram IMC significativamente maior. Entretanto, 76% das croatas e 42% das indianas com a síndrome apresentaram IMC inferior a 25 Kg/m. Na casuística do Hospital das Clínicas de São Paulo, observa-se que 36% das portadoras de SOP são obesas, 27% tem sobrepeso e 37% apresentam IMC normal (BALDANI et al., 2012; LEÃO, 2014; SAXENA et al., 2012; YILDIZ et al., 2008).

Tanto a hiperinsulinemia quanto a hiperandrogenemia prejudicam o desenvolvimento folicular ovariano, cujas alterações ovarianas envolvem aumento de volume do órgão, aumento do número de folículos primordiais e primários, hiperplasia e luteinização das células da teca, numerosos cistos foliculares e espessamento da camada cortical externa ou cápsula (SPECA et al., 2007; TEEDE et al., 2010). Assim, constata-se que a SOP é a causa mais comum dos distúrbios de fertilidade. As mulheres que conseguem engravidar tendem a um maior risco de vir a sofrer um aborto no primeiro trimestre da gravidez, com uma relação de 30 a 50% das mulheres com SOP contra 10 a 15% para mulheres sem essa patologia (PASQUALI, 2006).

1.3 Modelos experimentais de obesidade para verificação das desordens reprodutivas

Mediante limitações logísticas e éticas inerentes à experimentação humana, WALTERS e colaboradores em sua revisão, demonstram que os roedores são os modelos experimentais mais adequados para avaliar as consequências promovidas pela obesidade sobre a função reprodutiva, uma vez que é possível avaliar os mecanismos que interferem na função reprodutiva (WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2012). ZHOU e colaboradores, demonstraram que ratas Sprague-Dawley com obesidade induzidas por dieta rica em gordura apresentam puberdade precoce, ciclicidade estral anormal e

reduções significativas na expressão de genes relacionados com a ovulação (ZHOU et al., 2014). BAZZANO e colaboradores, ao avaliarem ratas obesas induzidas por dieta de cafeteria, mostraram que a função ovariana foi alterada pela presença de prolongamento de ciclo estral e aumento do número de folículos antrais atresicos, além de detectar presença de cistos ovarianos que prejudicaram a concepção desses animais (BAZZANO et al., 2015). Em ratas obesas também induzidas por dieta rica em gordura, ao final do tratamento observou-se resistência insulínica instaurada, bem como aumento dos níveis de insulina, comprometendo as funções ovarianas que refletiu em ciclo estral irregular e morfologia ovariana alterada (AKAMINE et al., 2010).

Outro modelo de obesidade utilizado e associado a alterações metabólicas e hormonais em roedores é o induzido por L- glutamato monossódico (MSG), através da aplicação de injeções subcutâneas em ratos no período neonatal proposto pela primeira vez por Olney e Sharpe (1969). O MSG promove neurotoxicidade específica no núcleo arqueado do hipotálamo (SERESS, 1982) com consequente diminuição da produção do hormônio do crescimento (GH) (MAITER et al., 1991), apresentando aumento da atividade parassimpática e consequente diminuição da atividade simpática (BALBO et al., 2002). Com isso, este modelo é capaz de desenvolver em ratos obesidade, crescimento atrofiado, dislipidemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia (LIU et al., 2011) e resistência à insulina (HIRATA et al., 1997). Hernández- Bautista e colaboradores verificaram que quanto mais jovem o animal induzido (ratos), maior é a probabilidade de apresentarem desordens metabólicas. Além disso, estudo realizado em camundongos de ambos os sexos induzidos com MSG demonstraram redução da fertilidade (PIZZI; BARNHART; FANSLOW, 1977).

Em nosso grupo de pesquisa, o uso de L- glutamato monossódico (MSG) em ratas da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, têm se mostrado um modelo promissor para estudos experimentais dos distúrbios de fertilidade, uma vez que os animais têm apresentado os principais parâmetros tais como: oligociclicidade, degeneração folicular ovariana, obesidade e distúrbios metabólicos (GASPAR et al., 2016).

1.4 Tratamento metabólico relacionado às desordens reprodutivas

A primeira linha de tratamento para melhora dos problemas de fertilidade associados a SM é a redução de peso (BECKER, 2015). Para isto, a melhora no estilo de

vida com intervenção nutricional, cessação do fumo, álcool, estresse e/ou aumento da atividade física são as principais orientações terapêuticas (DUVAL et al., 2015). Estudo realizado em mulheres obesas demonstrou que a perda de peso mesmo pequena (5 a 10%) levou a melhora da resistência insulínica e hiperandrogenismo, aumento dos níveis de SHBG, função menstrual e fertilidade (MORAN et al., 2011). Cerca de 50% das pacientes com SOP são beneficiadas com a redução de peso, o que favorece a restauração da função ovariana e ovulação através da melhoria dos parâmetros metabólicos, tal como sensibilidade à insulina (MAYER et al., 2015). Dessa forma, ocorre regularização dos ciclos menstruais, diminuição dos androgênios circulantes e aumento das chances de gravidez espontânea, com condições metabólicas mais favoráveis ao crescimento fetal saudável e com menor risco materno (MARCONDES, J. A.; BARCELLOS; ROCHA, 2011).

O exercício físico também é de extrema importância na atuação integrada ao tratamento da SM, pois a prevalência de síndrome metabólica parece ser mais alta nos indivíduos com baixa atividade física e está relacionada com a grande maioria dos componentes da síndrome (NERY; BARBISAN, 2010). Com a prática do exercício, há aumento da sensibilidade à insulina, diminuição de triglicérides, regularização dos níveis de HDL e pressão arterial sistêmica, reduzindo a incidência de hipertensão (LAKKA et al., 2003). Entretanto, um elevado percentual de pacientes não obtém resultados satisfatórios com a adoção de modificações no estilo de vida; nesses casos, considera-se a realização de um tratamento medicamentoso (ABESO-SBEM, 2010).

O citrato de clomifeno tem sido tradicionalmente o tratamento de primeira linha para indução da ovulação. Este anti-estrógeno permite induzir a liberação das gonadotrofinas pela glândula hipofisária, devido à sua ligação aos receptores estrogênicos por competição com os estrógenos endógenos que se encontram no hipotálamo, interferindo deste modo com o mecanismo normal de *feedback*, ou seja, bloqueando o *feedback* negativo do E₂ (BALEN, 2013). A eficácia de clomifeno está, portanto, estabelecida pela sua capacidade de aumentar a produção de FSH e, subsequente maturação folicular e ovulação (WILKES E MURDOCH, 2012).

Estima-se que apenas 44% das mulheres respondem positivamente aos 50mg e, quando não se obtém resposta a uma dose de 50mg, duplica-se a dose para 100mg. Para aquelas que não responderem a uma dose de 150mg por dia, aproximadamente 20% das mulheres, são consideradas clomifeno resistente, sendo necessário considerar outros tipos de tratamentos (METWALLY; LEDGER, 2010; BHAGAVATH E CARSON, 2012).

Doses acima destas raramente trazem benefícios a não ser em casos de mulheres com excesso de peso (BALEN, 2012), sendo que somente 80% das mulheres obesas que fizeram o uso deste medicamento, somente 20% conseguiram engravidar, podendo ainda ocasionar gravidez múltiplas, visão distorcida e suores noturnos (METWALLY et al., 2010).

Os sensibilizadores de insulina são principalmente utilizados em mulheres obesas ou portadoras de SOP a fim de restaurar e regular a ovulação permitindo assim a fecundação (KATSIKI; GEORGIADOU; HATZITOLIOS, 2009). Dentre estes medicamentos, encontra-se a metformina, que é um anti-hiperglicemiante oral (ZOLK, 2009). A metformina pertence à classe das biguanidas, é um dos agentes sensibilizadores da insulina aprovada pela FDA no tratamento de DM tipo 2 (MATHUR et al., 2008). Os efeitos do controle glicêmico ocorrem, principalmente, pela redução da produção hepática da glicose (inibição da neoglicogênese). Isso acontece em função da melhor sensibilidade dos receptores da insulina, melhor utilização da glicose no músculo esquelético e no adipócito e da diminuição da absorção intestinal de glicose (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Em relação à ação da metformina em paciente com SOP, parece afetar a função ovariana, direta ou indiretamente. Diretamente, estudos constataam que as mulheres com SOP geralmente apresentam uma atividade aumentada da CYP45c017, que regula a esteroidogênese ovariana. Agentes como a metformina demonstram-se eficazes em inibir os efeitos da hiperinsulinemia sobre a síntese androgênica e no crescimento folicular, o que contribui para a menor produção de esteroides sexuais e da luteinização prematura (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2005; DIAMANTI-KANDARAKIS; DUNAIF, 2012). Indiretamente, a metformina atua sobre o ovário, diminuindo os níveis excessivos de insulina e desta forma desencadeando a supressão do CYP17 das células da teca (LORENZI, 2002).

Apesar de seus benefícios, são observados alguns efeitos adversos, tais como diarreia, desconforto abdominal, náuseas, sabor metálico e anorexia, além de serem observadas intolerância ao uso desta biguanida, cerca de 30%, sendo motivo de descontinuidade de uso em 5% dos casos (BOUCHOUCHA; UZZAN; COHEN, 2011).

1.4.1 Tratamento alternativo

Frente aos trabalhos realizados (dados experimentais e clínicos) sobre a melhora dos quadros de fertilidade reduzida nos últimos anos, tem se verificado um avanço

significativo nas investigações científicas voltadas para os efeitos dos produtos naturais que tenham comprovada atividade sobre a RI para as alterações de fertilidade. Nesse contexto, várias plantas medicinais são estudadas com ação hipoglicemiante, como por exemplo, a espécie *S. cumini* (**Figura 5**), conhecida popularmente como jambolão.



Figura 4. Folhas da espécie *Syzygium cumini* Linee Skeels (BENEVIDES; CARTÁGENES, 2014)

O jambolão é uma planta medicinal pertencente à família Myrtaceae, proveniente da Índia, Malásia, China e das Antilhas e cultivada em vários países incluindo o Brasil (LORENZI, 2002), principalmente nas regiões sudeste, nordeste, norte e sul (MIGLIATO et al., 2006). Estudos sobre as propriedades relacionadas ao metabolismo, dentre elas efeito anti-hiperglicemiante, tem sido realizado principalmente nas frutas e sementes da planta, com escassas utilizações das folhas (ROY, 2008; SHARMA, B.; BALOMAJUMDER; ROY, 2008; SHARMA, S. B. et al., 2006).

O jambolão é rico em compostos contendo antocianidinas, glicosídeos, ácido elágico, isoquercetina e mirecetina (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013). Estudos demonstram efeitos anti-hiperglicemiantes associados aos metabólitos secundários que a planta possui, como por exemplo, os flavonóides (DE BONA et al., 2010). A administração de um extrato rico em flavonóides obtido a partir de sementes do jambolão melhorou vários parâmetros metabólicos, tais como a tolerância à glicose, perfil lipídico e liberação in vivo de insulina, em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (SHARMA, B. et al., 2008).

Mediante o potencial terapêutico apresentado por esta espécie, nosso grupo de pesquisa tem investigado nos últimos anos os efeitos metabólicos do extrato hidroalcoólico obtido das folhas do *S. cumini* em ratos obesos MSG. Bem como realizado

a caracterização do perfil de compostos polifenólicos presentes nas folhas do *S. cumini* (CHAGAS et al., 2015) e se certificado dos mecanismos envolvidos na evolução da obesidade induzida hipotalâmica pelo MSG (FRANCA et al., 2014).

Dados obtidos por (FRANCA et al., 2014) demonstraram que a administração de EHSyz promoveu efeitos anti-obesidade, anti-hiperlipêmico e anti-hiperglicêmico em ratos obesos induzidos com L- glutamato monossódico. O tratamento por 30 dias com EHSyz em ratos obesos MSG, resultou em redução de peso e índice de massa corporal, assim como redução de tecido adiposo branco, triglicerídeos e melhora da hiperinsulinemia e resistência insulínica destes animais (SANCHES et al., 2016). Benevides e colaboradores (2015) ao administrar EHSyz em ratas obesas- MSG, obteve redução do Índice Lee, dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, além de reversão da hipertrofia dos adipócitos periuterinos, o extrato promoveu ainda melhora de parâmetros metabólicos tais como glicemia e colesterol (BENEVIDES, 2015).

Frente a estes resultados, nos propomos avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *S. cumini* em ratas fêmeas obesas induzidas pelo MSG. Na hipótese de que, ao gerenciar os problemas relacionados ao perfil metabólico, o extrato possa apresentar resultados positivos em relação ao perfil ciclico destes animais. Visto que, conforme o levantamento bibliográfico apresentado, a reversão das consequências metabólicas ocasionadas pela obesidade pode resultar em alterações reprodutivas positivas.

2. JUSTIFICATIVA.

O modelo de indução de obesidade por L- glutamato monossódico (MSG) em ratas da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, causa efeitos positivos frente aos requisitos estabelecidos para o estudo de distúrbios de fertilidade, visto que observações do nosso grupo de pesquisa têm evidenciado que ratas obesas MSG apresentam oligociclicidade (GASPAR et al., 2016). Além dos distúrbios metabólicos explanados no referencial teórico tais como, obesidade visceral, dislipidemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e intolerância à glicose, que fazem deste um modelo experimental adequado ao estudo das relações entre obesidade e disfunção reprodutiva.

Desta forma buscamos neste trabalho averiguar a hipótese de que o tratamento com extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *Syzygium cumini* induz melhora dos parâmetros metabólicos, o que pode levar à melhora dos distúrbios reprodutivos em ratas MSG.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre parâmetros endócrino-metabólicos em ratas com obesidade induzida por L- glutamato monossódico (MSG).

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento do extrato hidroalcoólico da folha de *S. cumini* sobre parâmetros metabólicos de ratas MSG;
- Avaliar os efeitos do tratamento com *S. cumini* sobre perfil sérico bioquímico e hormonal das ratas MSG.
- Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. cumini* sobre a ciclicidade estral de ratas MSG.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

As folhas da espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletadas no Campus Bacanga da Universidade Federal do Maranhão na cidade de São Luís MA- Brasil. Para autenticação da espécie uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário do Maranhão (MAR) do Departamento de Biologia desta Universidade, sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Bezerra Almeida Júnior, onde encontra-se catalogada sob o número 4.574.

4.2 Preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini*

Após serem coletadas, as folhas foram selecionadas e posteriormente secas a 38°C no forno de fluxo de ar. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho elétrico e pesado. O pó obtido foi submetido à maceração em etanol (EtOH) a 70% em proporção 1:6 p/v, por 24 horas sob agitação mecânica a temperatura ambiente durante 3 dias (24 horas cada renovação do solvente). O extrato recolhido foi submetido à centrifugação à 3.500 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos e o sobrenadante concentrado em rotaevaporador à baixa pressão e temperatura de 45°C, seguido de liofilização. Para administração nos animais, o pó foi ressuspenso adequadamente em água destilada (Adaptado de SHARMA et al., 2008).

4.3 Animais experimentais

Foram utilizadas ratas da espécie *Rattus norvegicus*, variedade linhagem Wistar-Hannover, adultos, fêmeas, sadias ao exame clínico, com aproximadamente 75 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFMA. Estas fêmeas foram colocadas em acasalamento e seus filhotes fêmeas foram então submetidos ao processo de indução neonatal da obesidade com L-glutamato monossódico. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, forradas com Xilana®, com ração e água *ad libitum* e sob ciclo claro/escuro de 12hs, em temperatura de 20 ±2°C. O projeto está aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA (Parecer consubstanciado n° 016/13-ANEXO).

4.4 Indução da Obesidade com L- glutamato monossódico e Desenho experimental

Para indução da obesidade, a partir do segundo dia de vida, os filhotes fêmeas receberam por via subcutânea uma solução de L-glutamato monossódico na dose de 4,0 g/kg/dia durante 10 dias alternados, totalizando 5 doses (OLNEY, 1969). Os animais controle (CTRL) receberam uma injeção de solução salina hiperosmótica em volume igual ao dos animais tratados. Aos 21 dias de vida foi realizado o desmame. Aos 30 dias de vida os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (CTRL) e grupo obeso (MSG). Aos 75 dias de vida, as ratas obesas foram randomizadas em dois sub-grupos: o grupo controle obeso, tratado com NaCl 0,9% (MSG 0,1 mL/100g/dia, v.o) e grupo obeso tratado com extrato hidroalcoólico de *S. cumini* (EHSyz) na dose de 500 mg/Kg/dia, v.o. Os animais CTRL também foram tratados com NaCl 0,9% (CTRL, 0,1 mL/100g/dia, v.o.). Todos os grupos continham entre 9-12 animais e o tratamento teve início aos 75 dias de vida das ratas, realizado com as respectivas soluções, por um período de 60 dias (Figura 6).

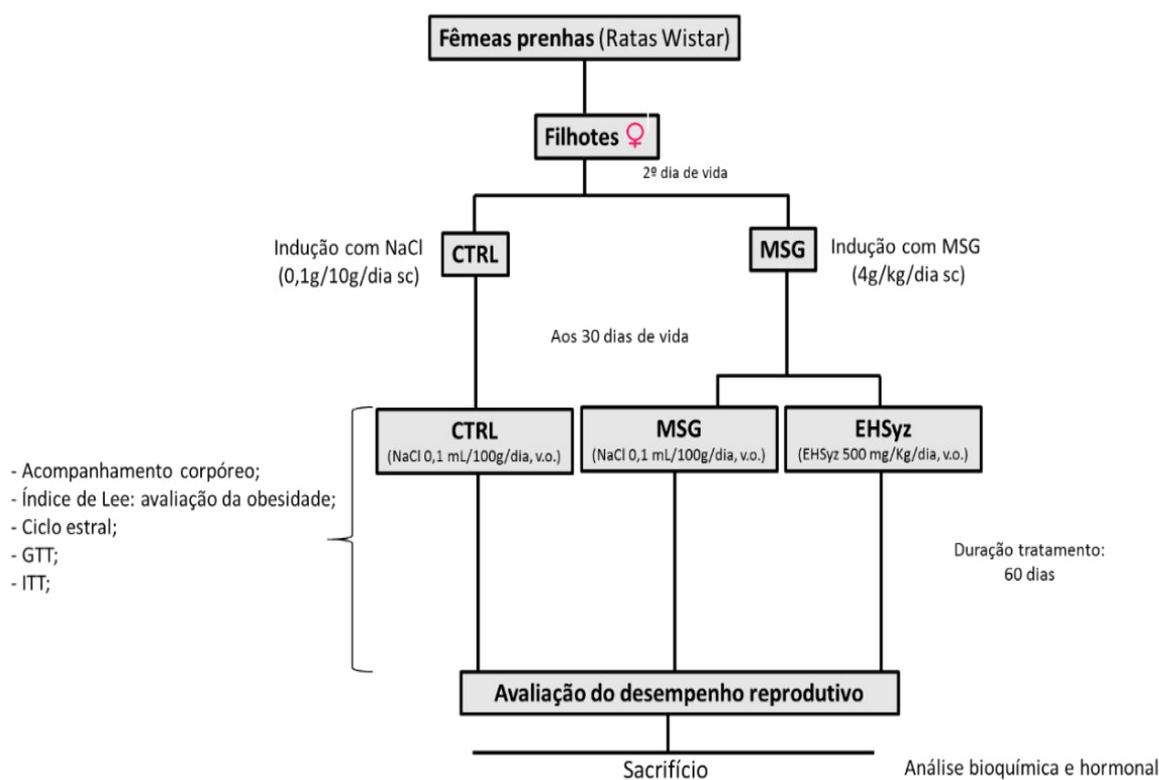


Figura 5. Fluxograma do Desenho Experimental.

4.5 Determinação do peso corporal e consumo de ração

A partir de 30 dias de vida e durante todo o período de tratamento foi realizado o controle de peso corporal das ratas. Os animais foram pesados três vezes por semana para

a determinação do volume das drogas que seriam administradas. O ganho de peso foi realizado diminuindo-se o peso final pelo inicial, obtendo-se a diferença semanal. A quantidade de ração consumida pelos animais também foi mensurada três vezes por semana, fazendo-se a diferença entre a quantidade de ração ofertada para cada gaiola e a sobra diária.

4.6 Índice de Lee

O desenvolvimento da obesidade foi avaliado, antes e após o tratamento, pelo cálculo do Índice de Lee ($IL = (\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}} / \text{comprimento nasoanal}) \times 1000$), que se assemelha ao índice de massa corpórea (IMC), correspondente ao índice de adiposidade em animais (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

4.7 Determinação do Ciclo Estral

A determinação das fases do ciclo estral foi realizada diariamente, sempre no mesmo horário pela manhã no horário entre 08:00 às 10:00 h, durante todo o período experimental, pela análise do esfregaço vaginal a fresco. A coleta da secreção vaginal foi realizada com inserção de pipeta de plástico com ponteira contendo 20µL de solução de NaCl 0,9% estéril, na vagina do animal. O material aspirado foi colocado sobre lâmina de vidro e visualizado a fresco, em microscópio óptico de luz comum, em aumento de 40 vezes (MARCONDES, F. K.; BIANCHI; TANNO, 2002). A classificação das fases do ciclo estral de cada animal foi feita de acordo com tipo celular predominante no lavado vaginal (células cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos) em: proestro, estro, metaestro e diestro (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005). As fêmeas foram identificadas como tendo ciclos regulares, ciclos irregulares e estro prolongado de acordo com critérios já descritos (KOUKI et al., 2005; MARCONDES, F. K. et al., 2002). A duração do ciclo foi determinada pela contagem de dias que passaram de um estro a outro (MOORE et al., 2015).

4.8 Teste oral de tolerância à glicose

Para realização do teste de tolerância à glicose (TTG), os animais foram mantidos em jejum alimentar de 8 horas, com fornecimento de água *ad libitum*. Inicialmente, foi realizado um picote (com lanceta) na extremidade da cauda para a coleta de uma alíquota de sangue para verificar os níveis basais de glicose (t zero), utilizando um glucosímetro digital (Accu-Chek Active®; Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, EUA). O TTG

foi realizado após administração oral de glicose (4g/kg peso corporal) por gavagem. Novas alíquotas de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 120 minutos, após a administração de glicose.

4.9 Teste de tolerância à insulina

Dois dias após a realização do TTG, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI). Novamente, os animais foram submetidos a um picote na extremidade da cauda para a coleta de uma alíquota de sangue para verificar os níveis basais de glicose (t zero). Após a coleta inicial, foi administrada insulina, na dose de 30mUI/ 100g de peso corpóreo, via subcutânea, em cada animal. Novas alíquotas de sangue foram coletadas nos tempos 0, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, após a injeção de insulina

4.10 Análise bioquímica sérica

Para as análises bioquímicas séricas, as ratas de todos os grupos experimentais foram anestesiadas para a coleta de sangue pelo plexo retro-ocular. Após este procedimento, foi realizada a separação do soro por centrifugação (3000 rpm/10 min). As dosagens quantitativas para a determinação dos parâmetros bioquímicos triglicérides e colesterol total foram realizadas por kits de ensaio espectrofotométricos (Labtest®, Lagoa Nova, MG, Brasil), de acordo com o elemento dosado e orientações do fabricante dos reagentes. A determinação da glicemia foi realizada utilizando-se um glucosímetro digital e suas respectivas fitas reagentes (Accu-Chek Active.; Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, EUA).

4.11 Avaliação de resistência à insulina

A RI foi inferida a partir do cálculo do índice TyG a partir da equação: índice TyG = $[\log(\text{triglicérides de jejum (mg/dl)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)})] / 2$ (SIMENTAL-MENDIA; RODRIGUEZ-MORAN; GUERRERO-ROMERO, 2008) et al, 2008); modelo de avaliação da homeostase (HOMA) Índice de resistência à insulina (HOMA-IR = $\text{insulina de jejum (U/mL)} / \text{glicose de jejum (mM)} / 22,5$) (Matthews et al, 1985).

4.12 Análise hormonal sérica

Para esta análise, os hormônios sexuais foram extraídos do soro antes do ensaio. Para tal, uma amostra de soro foi acrescida 5 vezes o volume de éter dietílico e vortexadas

por 30 segundos. Essa mistura foi centrifugada a 1000rpm por 3 minutos para facilitar a separação das fases. A camada superior (éter) foi transferida para um tubo limpo e o processo de extração foi repetido no soro. Ao final da segunda extração, a fase etérea foi adicionada àquela primeira e o tubo foi levado ao banho-maria para total evaporação. Por fim, utilizou-se Tampão PBS-Tween 0,1% para ressuspender os hormônios sexuais extraídos. Antes da análise, uma curva de precisão foi obtida com um valor de coeficiente de $r^2 > 0,96$. Para determinar os níveis hormonais foram utilizados kits comerciais conforme orientações do fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), medidos por ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.13 Avaliação do desempenho reprodutivo

Ao final do tratamento, todas as ratas dos grupos experimentais foram postas em acasalamento poligâmico (1 rato: 3 ratas), com machos da mesma espécie em condições adequadas durante 10 dias, totalizando a cobertura de 2 ciclos estrais para avaliação do desempenho reprodutivo, através do cálculo do: índice de fertilidade (n° de fêmeas que prenhas $\times 100 / n^\circ$ de fêmeas acasaladas); índice de prenhez (n° de fêmeas com recém-nascidos vivos $\times 100 / n^\circ$ de fêmeas prenhas) e índice de parto (n° de fêmeas que pariram $\times 100 / n^\circ$ de índice de fêmeas prenhas), cujo valores serão expressos em percentagem (CLEGG et al., 2001). Durante esse período foi realizado o acompanhamento corpóreo das fêmeas e possíveis presenças de sangue na gaiola.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (e.p.m) e os grupos comparados entre si pelo teste ANOVA, utilizando o Newman – Keuls como pós-teste. As diferenças foram significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do EHSyz sobre a evolução da obesidade induzida por MSG

Conforme observado na **Figura 7**, o acompanhamento da evolução ponderal das ratas CTRL e MSG a partir dos 30 dias de vida demonstrou que os animais com obesidade induzida pelo MSG evoluíram de forma proporcional entre si, porém com ganho de peso 25,7% inferior ao CTRL, visto que esses animais são menores. Após o início do tratamento, aos 75 dias de vida, a administração de EHSyz (500 mg/kg/dia), por 60 dias, às ratas MSG promoveu manutenção do ganho de peso, detectada já após os primeiros 12 dias de tratamento (EHSyz: $83,06 \pm 5,81\text{g}$ vs. MSG $108,8 \pm 6,33\text{g}$, $p < 0,0001$; **Figura 7A**). Este efeito manteve-se até o final do tratamento, com redução final do ganho de peso das ratas EHSyz em 37,1% ($96,13 \pm 5,81\text{g}$), quando comparadas às ratas CTRL ($153,5 \pm 2,66$) ou MSG ($152,9 \pm 9,21\text{g}$) $p < 0,0001$.

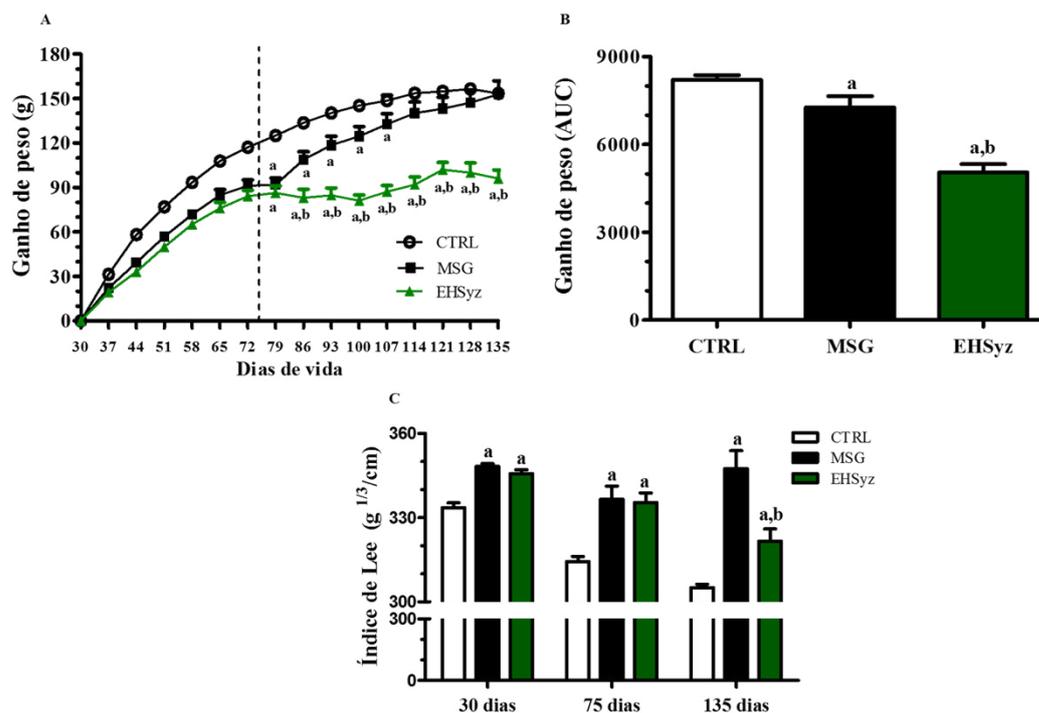


Figura 6. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre a evolução ponderal e índice de Lee de ratas obesas MSG. (A) Ganho de peso das ratas controle (CTRL) e obesas (MSG) tratadas com salina (v.o) e ratas obesas tratadas com extrato (EHSyz, 500mg/kg, v.o), durante 60 dias. (---) Linha tracejada representa o início do tratamento aos 75 dias de vida. (B) Área sob a curva do ganho de peso durante o tratamento. (C) Índice de Lee verificado aos 30, 75 e 135 dias de vida em todos os grupos. Os valores são expressos como média \pm e.p.m ($n=9-12$) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: $p < 0,0001$ vs CTRL; b: $p < 0,0001$ vs MSG.

A análise da área total da curva de evolução ponderal destas ratas mostra que as fêmeas EHSyz tiveram menor ganho de peso 43,80% ($5.050 \pm 271,3$) inferior às MSG ($7.262 \pm 380,1$), $p < 0,0001$. Estas, por sua vez, tiveram ganho de peso total 12,97% inferior às CTR ($8.204 \pm 152,8$), $p < 0,0001$ (**Figura 7B**). Tal efeito é corroborado pelos valores do Índice de Lee (**Figura 7C**). Aos 30 dias de vida, os animais MSG já apresentaram índice de massa corpórea ($348,2 \pm 1,06$) superior ao CTRL ($333,6 \pm 1,67$), demonstrando que a indução da obesidade foi efetiva. Aos 75 dias de vida, os animais MSG mantiveram-se obesos ($336,6 \pm 4,74$) em relação aos animais CTRL: $314,7 \pm 1,73$). Entretanto, ao final do tratamento com o EHSyz, observa-se redução da massa corpórea das ratas tratadas ($321,7 \pm 4,31$), tanto quando comparadas às ratas MSG ($347,6 \pm 6,3$), quanto quando comparadas às CTRL ($305,1 \pm 1,29$), $p < 0,0001$.

5.2 Efeito do EHSyz sobre a homeostase glicolipídica

A avaliação do perfil bioquímico sérico dos animais ao final do tratamento mostrou que o grupo EHSyz apresentou redução da glicemia em jejum ($104,8 \pm 2,35$ mg/dL), quando comparado ao grupo MSG ($113,4 \pm 2,88$ mg/dL), $p < 0,01$, assemelhando-se desta forma ao grupo CTRL ($103,9 \pm 1,38$ mg/dL) (**Figura 8A**). No entanto, não houve diferença nos níveis de glicose sérica entre os grupos quando avaliada a glicemia pós-prandial (**Figura 8B**). O extrato promoveu ainda redução dos níveis séricos de triglicérides em 60,7 % ($54,41 \pm 8,33$ mg/dL) quando comparado ao grupo MSG ($138,3 \pm 18,05$ mg/dL), $p < 0,0001$, (**Figura 8C**). Efeito semelhante ocorreu em relação ao colesterol total do grupo EHSyz, com diminuição de 29,7 % ($63,06 \pm 5,34$ mg/dL) em relação às ratas MSG ($89,75 \pm 5,76$ mg/dL) (**Figura 8D**). É importante enfatizar que os níveis séricos, em jejum, de glicose, triglicérides e colesterol total das ratas EHSyz não diferiram daqueles observados no grupo CTRL.

Os animais MSG apresentaram insulinemia 3 vezes superior aos CTRL ($0,92 \pm 0,22$ ng/mL vs. $0,35 \pm 0,06$ ng/mL, $p < 0,05$, **Figura 9A**) associada à resistência insulínica, a qual foi inferida pelo cálculo dos índices TyG e HOMA1-IR (**Figura 9B e C**). Naqueles animais tratados com EHSyz, a insulinemia foi parcialmente reduzida a $0,62 \pm 0,13$ ng/mL, a qual não difere nem do grupo CTRL, nem do MSG (**Figura 9A**). No entanto, este tratamento restabeleceu a sensibilidade periférica à ação da insulina, verificada tanto pelo índice TyG ($7,83 \pm 0,14$), quanto pelo índice HOMA-IR ($4,03 \pm 0,83$), os quais não diferiram do grupo CTRL ($7,47 \pm 0,10$ e $2,26 \pm 0,39$, respectivamente), mas foram

significativamente menores que aqueles verificados no grupo MSG ($8,81 \pm 0,12$ e $7,95 \pm 1,94$, respectivamente).

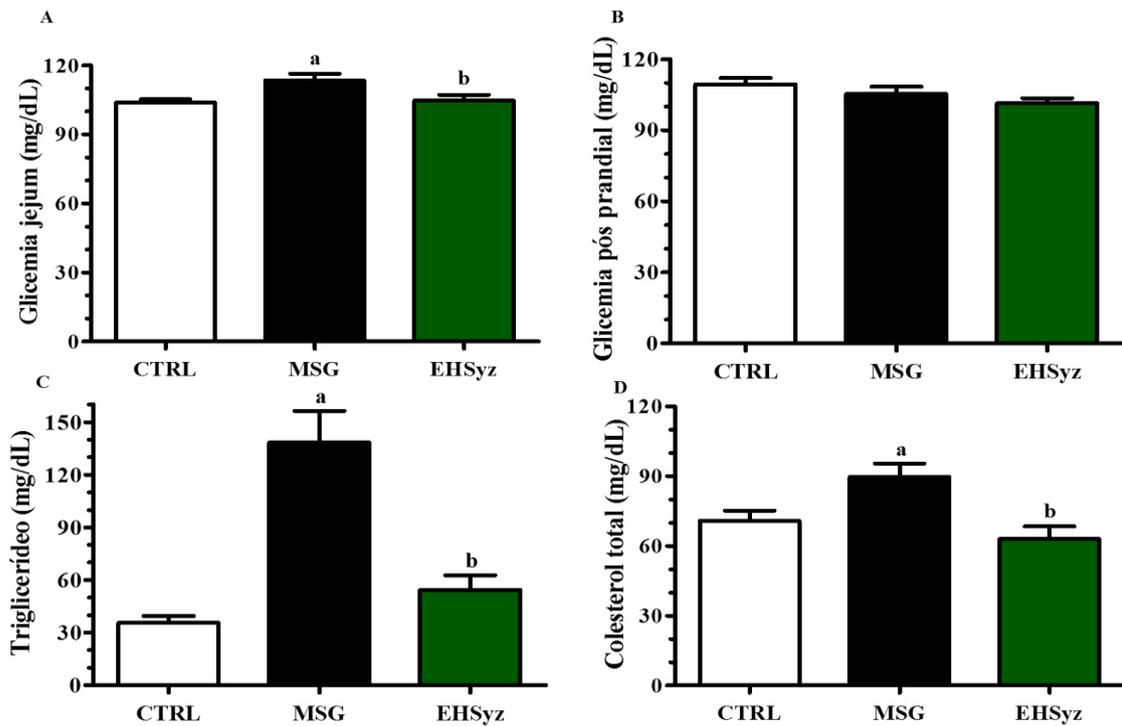


Figura 7. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S.cumini* (EHSyz) sobre os parâmetros bioquímicos de ratas obesas MSG. (A) Glicemia em jejum; (B) Glicemia pós-prandial; (C) Triglicerídeo e (D) Colesterol total das ratas controle (CTRL) e obesas (MSG) tratadas com salina (v.o) e ratas obesas tratadas com extrato (EHSyz, 500mg/kg, v.o), durante 60 dias. Os valores são expressos como média \pm e.p.m (n=9-12) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: $p < 0,05$ vs CTRL; b: $p < 0,05$ vs MSG.

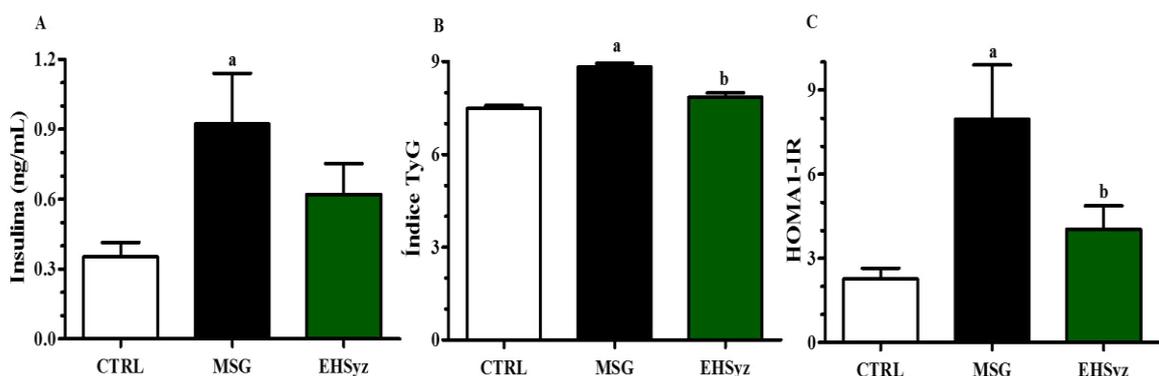


Figura 8. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S.cumini* (EHSyz) sobre a insulinemia e resistência à insulina de ratas obesas MSG. (A) Insulinemia (ng/mL). (B) Índice TyG ($[\log(\text{triglicerídeos de jejum (mg/dl)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)})/2]$) e (C) Índice HOMA1-IR ($\text{insulina de jejum (U/mL)} / \text{glicose de jejum (mM)} / 22,5$) das ratas controle (CTRL) e obesas (MSG) tratadas com salina (v.o) e ratas obesas tratadas com extrato (EHSyz, 500mg/kg, v.o), durante 60 dias. Os valores são expressos como média \pm e.p.m (n=9-12) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: $p < 0,05$ vs CTRL; b: $p < 0,05$ vs MSG.

Ao final do tratamento, os animais também foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TTG) (**Figura 10A**). Após 15 minutos da administração oral de glicose (4 g/Kg), o pico glicêmico das ratas EHSyz foi 14,5% menor ($141,54 \pm 5.73$ mg/dL) que das CTRL e 23,6% inferior às MSG ($185 \pm 7,54$ mg/dL), demonstrando uma melhor capacidade destas ratas em manter a homeostasia glicídica. Estes dados são corroborados pelo cálculo da área sob a curva (AUC) do TTG, o qual evidenciou aumento significativo do grupo MSG (19.802 ± 515) em relação ao CTRL (17.254 ± 196) (**Figura 10B**). Por sua vez, o EHSyz impediu a elevação da glicemia durante o teste nos animais tratados, melhorando a tolerância à glicose dos mesmos (17.338 ± 380) (**Figura 10B**). Para avaliação da sensibilidade à insulina, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI), no qual observou-se que os animais MSG apresentaram quadro de resistência periférica a esse hormônio caracterizadas pela incapacidade de redução da glicemia após injeção intraperitoneal de insulina (30mUI/ 100g) (**Figura 10C**). Enquanto isso, o EHSyz foi capaz de reverter tal resistência insulínica, conforme demonstrado pelo cálculo da área sob a curva glicêmica do teste (**Figura 10D**).

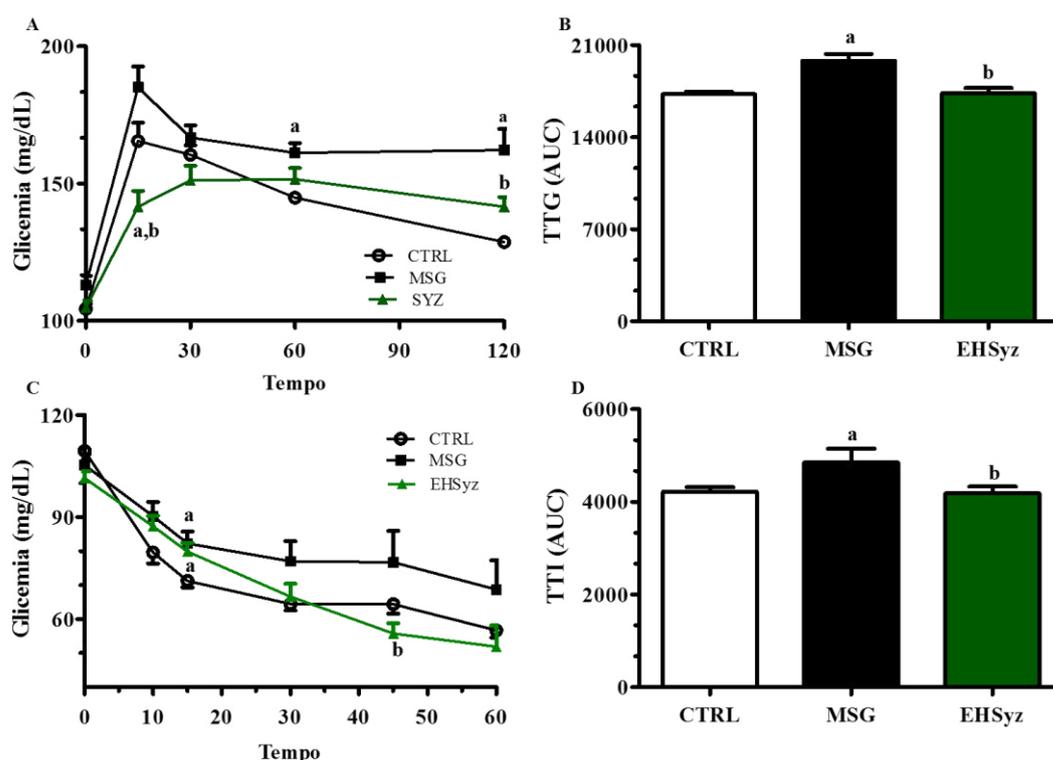


Figura 9. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S.cumini* (EHSyz) sobre a homeostase glicídica de ratas obesas MSG. (A) Teste oral de tolerância à glicose (TTG), (B) área sob a curva do TTG, (C) teste de tolerância à insulina (TTI) e (D) área sob a curva do TTI das ratas controle (CTRL) e obesas (MSG) tratadas com salina (v.o) e ratas obesas tratadas com extrato (EHSyz, 500mg/kg, v.o), durante 60 dias. Os valores são expressos como média \pm e.p.m (n=9-12) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: $p < 0,0004$ vs CTRL; b: $p < 0,0004$ vs MSG.

5.3 Efeito do EHSyz sobre o perfil reprodutivo

Para verificação da interferência da obesidade no padrão de ciclicidade estral das ratas tratadas com o EHSyz, avaliou-se o perfil do ciclo estral em observações diárias entre 8 e 10 h da manhã. Como mostrado na **Figura 11D**, as ratas CTRL apresentaram regularidade do ciclo superior a 60% durante todo o período de observação. Por outro lado, as ratas dos grupos MSG e EHSyz apresentaram percentual de normalidade médio abaixo de 10% nos primeiros 15 dias de tratamento (0–15), caracterizando um importante quadro de oligociclicidade (**Figuras 11B–D**). No entanto, com o avançar do tratamento, o percentual de ciclos regulares das ratas EHSyz aumentou de 8,3% na primeira quinzena, para 33,3% na terceira quinzena, $p < 0,02$ (**Figura 11D**). Esta melhora da ciclicidade estral é evidenciada pela maior frequência das fases proliferativas proestro (P) e estro (E) na segunda metade do tratamento com EHSyz (**Figura 11C**), quando comparada aos perfis das ratas CTRL (**Figura 11A**) e MSG (**Figura 11B**).

Para avaliar se a melhora da ciclicidade estral das ratas EHSyz era decorrente de alterações nos níveis séricos de hormônios sexuais, amostras de sangue foram coletadas após o tratamento para doseamento dos seguintes hormônios: corticosterona (C), hormônio luteinizante (LH), testosterona (T), di-hidrotestosterona (DHT), estradiol (E₂) e progesterona (P₄). A hipercorticosteronemia é uma característica do modelo de obesidade induzida pelo MSG, aqui verificada pelo aumento em 39% da concentração deste hormônio nas ratas MSG ($12,6 \pm 0,7 \mu\text{g/dL}$), quando comparadas às CTRL ($7,3 \pm 1,3 \mu\text{g/dL}$), $p < 0,01$. Nas ratas EHSyz, entretanto, a concentração sérica de C ($10,1 \pm 1,0 \mu\text{g/dL}$) manteve-se em níveis intermediários entre CTRL e MSG, não diferindo estatisticamente de nenhum dos grupos (**Figura 12A**). Não foram verificadas diferenças nas concentrações séricas de LH ou T entre os grupos (**Figuras 12 B e C**). No entanto, os grupos MSG e EHSyz apresentaram níveis reduzidos de DHT ($67,9 \pm 6,5 \text{ pg/mL}$ e $88,7 \pm 12,5 \text{ pg/mL}$) e estradiol ($12,4 \pm 1,630 \text{ pg/mL}$ e $9,25 \pm 0,78 \text{ pg/mL}$), em comparação ao grupo CTRL ($153,3 \pm 21,71 \text{ pg/mL}$ e $16,4 \pm 1,4 \text{ pg/mL}$, respectivamente) (**Figuras 12 D e E**). Por outro lado, apenas o grupo EHSyz apresentou redução dos níveis séricos de P₄ ($3,3 \pm 0,4 \text{ ng/mL}$), representando uma diminuição de 54% em relação às ratas obesas MSG ($7,2 \pm 1,5 \text{ ng/mL}$), $p < 0,05$.

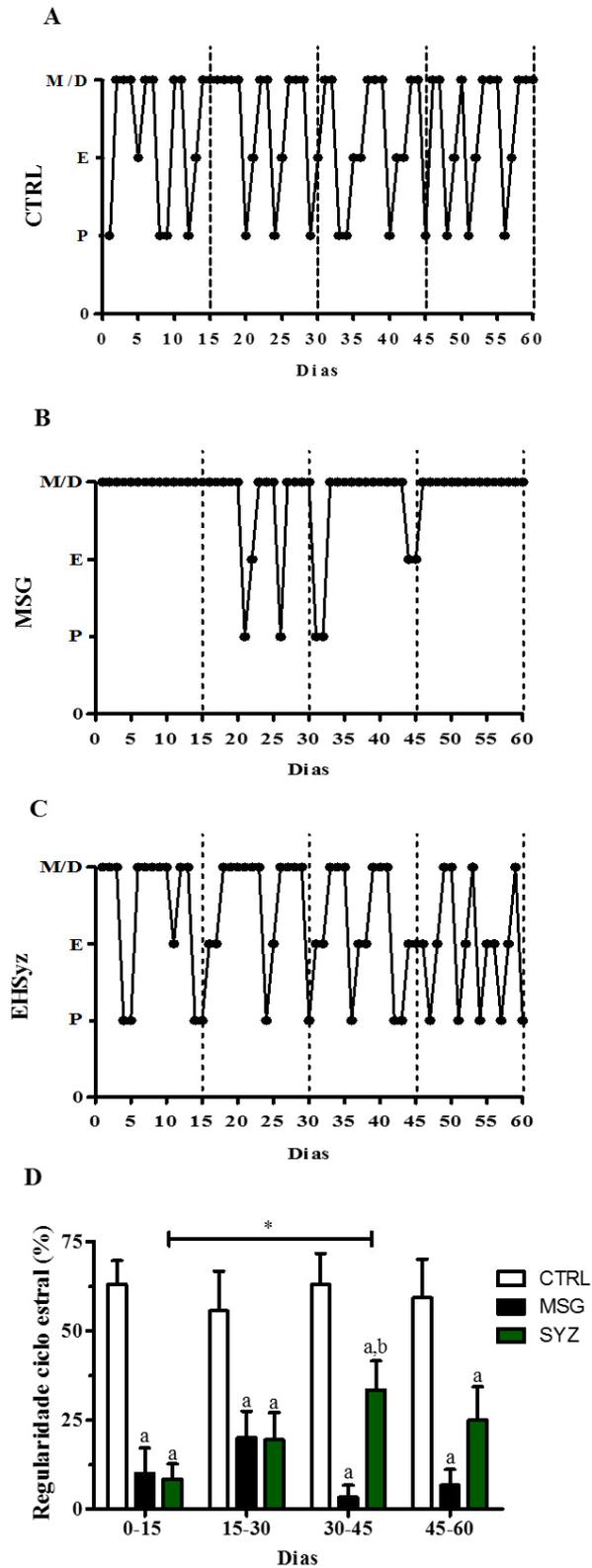


Figura 10. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* (EHSyz) sobre a ciclicidade estral de ratas obesas MSG. Imagens representativas de verificações diárias do ciclo estral de ratas controle (A), obesas MSG (B) obesas tratadas com EHSyz (C) na dose de 500mg/kg (v.o), durante 60 dias. (D) Percentual médio de regularidade do ciclo estral. (---) Linhas tracejadas delimitam períodos de 15 dias. M/D, metaestro-diestro; E, estro; P; proestro. Os valores são expressos como média \pm e.p.m (n=9-12) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: $p < 0,02$ vs CTRL; b: $p < 0,02$ vs MSG, * $p < 0,02$ EHSyz 45 vs. EHSyz 15.

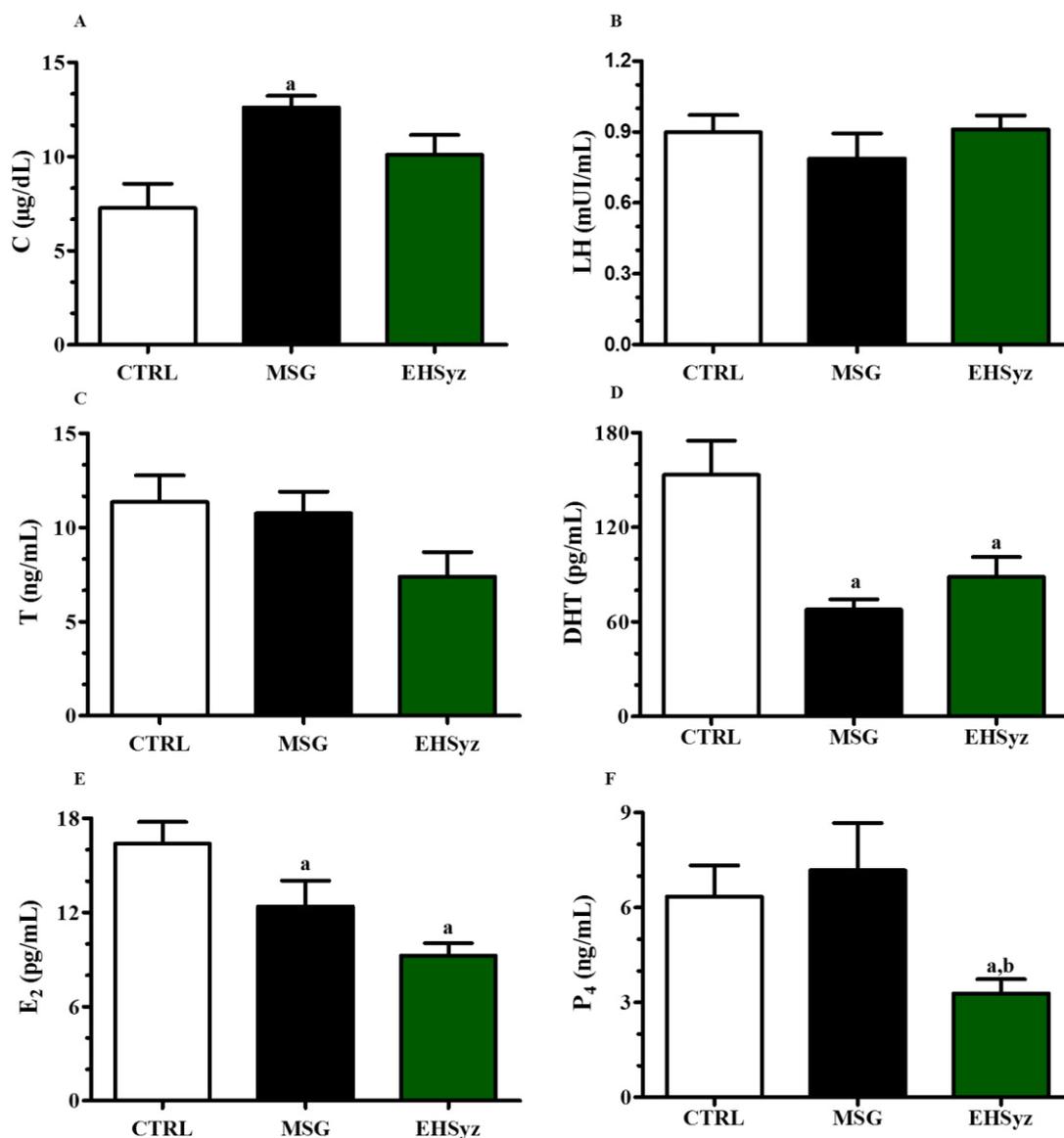


Figura 11. Efeito do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S.cumini* (EHSyz) sobre o perfil hormonal de ratas obesas MSG. (A) Cortisol (C); (B) Hormônio luteinizante (LH); (C) Testosterona (T); (D) Di-hidrotestosterona (DHT); (E) Estradiol (E₂); (F) Progesterona (P₄) das ratas controle (CTRL) e obesas (MSG) tratadas com salina (v.o) e ratas obesas tratadas com extrato (EHSyz, 500mg/kg, v.o), durante 60 dias. Os valores são expressos como média ± e.p.m (n=9-12) e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (Graph Pad Prism). a: p < 0,05 vs CTRL; b: p < 0,05 vs MSG.

Ao final do tratamento, as ratas de todos os grupos foram acasaladas com ratos machos não obesos, por um período de até 45 dias, para verificação dos índices reprodutivos. Durante o período gestacional, foi observado presença de sangue em 4 gaiolas de fêmeas prenhas do grupo MSG, sendo caracterizado como aborto espontâneo. Ao final do período de acasalamento e ou gestação, observou-se que as fêmeas do grupo EHSyz apresentaram-se totalmente inférteis, com índice de fertilidade, o qual relaciona proporção de fêmeas prenhas frente ao número de fêmeas acasaladas, igual a zero (0%).

Enquanto que as fêmeas dos grupos MSG e CTRL apresentaram fertilidades de 40 e 88,9%, respectivamente (**Tabela 1**). Entretanto, quando avaliado o índice de prenhez, que relaciona o número de fêmeas com filhotes nascidos vivos pelo número de fêmeas prenhas, as ratas MSG tiveram redução de 50% quando comparadas às CTRL. Em relação ao índice de prolificidade, o grupo CTRL apresentou ninhadas maiores, com média de 7,37 filhote em relação ao grupo MSG que apresentou média de 4 filhotes por ninhada, demonstrando o severo comprometimento reprodutivo das ratas MSG (**Tabela 1**).

Tabela 1. Desempenho reprodutivo de ratas controles e obesas tratadas ou não com extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (EHSyz).

ÍNDICE REPRODUTIVO	CTRL	MSG	EHSyz
Total de ratas acasaladas/ total de fêmeas prenhas	9/8	10/4	12/0
Índice de fertilidade (%)	88,89% (8/9)	40% (4/10)	0%
Índice de prenhez (%)	100% (8/8)	50% (2/4)	0%
Índice de prolificidade (média)	7,37	4	0%

Cálculo dos índices de fertilidade (fêmeas prenhas/ fêmeas acasaladas); índice de prenhez (fêmeas com recém-nascidos vivos/ fêmeas prenhas) e prolificidade (recém nascidos vivos/ n° de fêmeas que pariram). Resultados expressos em percentagem.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, a administração diária de EHSyz (500 mg/Kg/dia, v.o.) por um período de 60 dias resultou manutenção do ganho de peso de ratas com obesidade induzida pela administração neonatal de MSG, fato que resultou na redução da massa corpórea destes animais, conforme evidenciado pela diminuição do índice de Lee. Além disso, o tratamento com EHSyz reduziu a glicemia, trigliceridemia e colesterolemia das ratas tratadas quando comparadas às do grupo MSG, apresentando perfil glicolípídico sérico semelhante ao grupo CTRL. Da mesma forma, o EHSyz restaurou tanto a tolerância à glicose, quanto a resistência à insulina nas ratas tratadas com o extrato, reforçando as propriedades farmacológicas da espécie *S. cumini* no tratamento de distúrbios metabólicos.

O excesso ou deficiência de tecido adiposo implica em complicações fisiopatológicas que incluem distúrbios metabólicos e reprodutivos sobretudo em mulheres (RESSLER et al., 2015) e modelos experimentais (SANCHEZ-GARRIDO et al., 2015; SHI; VINE, 2012; WU, C. et al., 2014). A administração de MSG no período neonatal, com consequente ação neurotóxica e lesiva no núcleo arqueado hipotalâmico, ocasiona diminuição da atividade metabólica e aumento da atividade lipogênica (NASCIMENTO CURI et al., 1991). Outra consequência do depósito de tecido adiposo são as alterações metabólicas com maior grau de resistência à insulina e intolerância à glicose (LAFORREST et al., 2015).

Nossos dados mostram que o EHSyz foi capaz de evitar a hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia características das ratas MSG (FRANCA et al., 2014; MIRANDA et al., 2014; SANCHES et al., 2016), visto que nesses animais há redução da atividade metabólica com consequente acúmulo de tecido adiposo tanto por aumento da atividade lipogênica (HIRATA et al., 1997; NASCIMENTO CURI et al., 1991), quanto por diminuição da atividade lipolítica (SANCHES et al., 2016). Esta característica é atribuída à ativação de vias do estresse do retículo endoplasmático, com o aumento da expressão da proteína microsomal de transferência de triglicérides (MTP) no fígado, que acarreta maior síntese de VLDL (FRANCA et al., 2014). Nos animais MSG também há diminuição da expressão de GLUT-4 no músculo esquelético e tecido adiposo branco (PAPA, 2002), hiperestimulação do sistema nervo autônomo parassimpático levando à hipersecreção de insulina seguido por resistência à insulina de uma forma independente da concentração da glicose no sangue (MIRANDA et al., 2014).

Desta forma, nossos resultados corroboram dados apresentados na literatura para as propriedades anti-hiperglicêmicas da espécie *S. cumini*. Segundo pesquisas, a administração do extrato rico em flavonóides das sementes desta planta realizado em ratos diabéticos, promoveu a redução da glicemia e restauração da tolerância periférica à glicose tanto em camundongos (SHARMA et al., 2008) quanto em ratos (SHARMA, B. et al., 2008). O extrato aquoso das folhas de *S. cumini* melhorou a sensibilidade à insulina através da modulação do PPAR- γ hepático (SHARMA et al., 2012). O extrato metanólico das folhas promoveu aumento da expressão de mRNA do transportador de glicose GLUT-4 e PI3K, mediadores de suma importância para ação insulínica no músculo esquelético e adipócitos (ANANDHARAJAN et al., 2006).

Em ratos com obesidade induzida pelo MSG, o tratamento com EHSyz na dose de 500 mg/kg, reverteu completamente o acúmulo de triglicerídeos séricos e em tecidos sensíveis à insulina, músculo esquelético e fígado, bem como, melhorou a hiperinsulinemia e restaurou completamente a sensibilidade à insulina (SANCHES et al., 2016). Estes efeitos farmacológicos da planta são atribuídos à presença de compostos fitoquímicos tais como terpenos e derivados fenólicos, como flavonóides, antocianinas e taninos (CHAGAS et al., 2016). A este efeito anti-dislipidêmico, estudos demonstram que extratos de sementes de *S. cumini* ocasionaram inibição da HMG-CoA redutase, enzima responsável pela síntese de colesterol (RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004; SHARMA, A. K. et al., 2012)

Estudos demonstram que a perda de peso (KHASKHELI; BALOCH; BALOCH, 2013; SIM et al., 2014) associada a melhora dos parâmetros metabólicos (BECKER, 2015) em mulheres obesas aumentam as probabilidades de concepção. Frente aos resultados positivos quanto aos parâmetros metabólicos com o EHSyz, realizamos a avaliação da fertilidade e sua posterior análise dos índices reprodutivos em todos os grupos. Ao examinarmos o ciclo estral das ratas em estudo, verificamos que as fêmeas obesas MSG apresentaram oligociclicidade, com maior prevalência das fases não proliferativas (metaestro/ diestro). De fato, fêmeas MSG apresentam ciclo irregular e menor contagem de oócitos em relação a fêmeas magras, diminuindo a fertilidade e ocasionando distúrbios reprodutivos, os quais foram atribuídos aos distúrbios metabólicos característicos deste modelo experimental (GASPAR et al., 2016). O tratamento de ratas MSG com EHSyz resultou em melhora significativa da ciclicidade estral em torno da terceira quinzena de tratamento (30-45 dias de vida). Em trabalho anterior, foi demonstrado que ratas MSG tratadas com EHSyz (500 mg/kg/dia) durante 30 dias não

exibiram melhora significativa do perfil do ciclo estral, porém apresentaram aumento da contagem de folículos antrais saudáveis, aproximando-se da morfologia ovariana das fêmeas controle. Neste mesmo trabalho, as ratas MSG apresentaram 85% menos folículos antrais saudáveis que as controle (BENEVIDES, 2015).

Frente aos resultados obtidos com o EHSyz sobre a ciclicidade estral, avaliamos o desempenho reprodutivo destas ratas. Após acasalamento, os resultados obtidos demonstraram a absoluta incapacidade reprodutiva do grupo EHSyz, mesmo em relação às fêmeas MSG não tratadas. Destaca-se ainda que apesar da prenhez das ratas MSG, a quantidade de filhotes por rata foi inferior em relação ao grupo CTRL, além de apresentar aborto espontâneo. Os hormônios sexuais interferem na função, maturação e controle da função reprodutiva (GARCIA-GALIANO; PINILLA; TENA-SEMPERE, 2012). De fato, o hiperandrogenismo tem sido sugerido como uma importante causa de baixa fertilidade tanto em humanos (USADI; LEGRO, 2012) quanto em roedores (CAMPOS et al., 2008; WU, C. et al., 2014). Entretanto, ao verificarmos os níveis séricos de testosterona e LH, observamos que os mesmos não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Além disso, os níveis séricos de DHT nas ratas MSG e EHSyz estavam reduzidos quando comparados às ratas CTRL. Resultado semelhante foi observado com as concentrações séricas de estradiol. Entretanto, ao analisarmos os níveis séricos de progesterona nas ratas tratadas com EHSyz, observamos que estas apresentaram baixos níveis deste hormônio, o que corrobora com o nulo desempenho reprodutivo, apesar da melhoria das ciclicidade estral já discutida.

Nossos dados nos permitem inferir que a disfunção reprodutiva encontrada nos animais MSG não é decorrente de alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, visto que os níveis hormonais mantiveram-se semelhantes ou reduzidos em relação ao grupo CTRL. DADO e BLAKE (1985) demonstraram que apesar da destruição no núcleo arqueado e eminência mediana do hipotálamo com a administração de MSG, os axônios e dendritos em passagem por esses núcleos são poupados, preservando desta forma o estímulo da secreção hipofisária de LH, justificando os níveis normais de hormônios reprodutivos encontrados em outros estudos com ratos obesos MSG (LAMPERTI; BALDWIN, 1983; NEMEROFF et al., 1981). Dados recentes obtidos por nosso grupo, apresentaram perfil hormonal semelhante, uma vez que não foram detectadas alterações hormonais em ratas MSG em relação às controle (BENEVIDES, 2015; GASPAR et al., 2016).

Nos parece plausível especular que a hiperinsulinemia observada nas ratas MSG (CAMERON; CUTBUSH; OPAT, 1978) promove alterações estruturais, aparentemente irreversíveis, que impactam negativamente sobre a função ovariana. (CURI, 2007) mostrou que a hiperinsulinemia tem, de fato, a capacidade de induzir tais alterações, as quais não responderiam a tratamentos anti-hiperinsulinêmicos. WU et al. (2012) demonstraram que os tecidos hipofisário e ovariano preservam a sensibilidade à insulina em camundongos obesos hiperinsulinêmicos. Desta forma, o excesso de insulina no microambiente ovariano aumentaria o estímulo das células da teca com maior produção local de testosterona (EHRMANN, 2005), sem alterar os níveis séricos deste hormônio. No entanto, estudos sobre a biologia reprodutiva em roedores com síndrome metabólica induzida por dieta (SAGAE et al., 2012) ou modelos genéticos (RADAVELLI-BAGATINI et al., 2011), são patentes em associar as alterações reprodutivas ao hiperandrogenismos. Sendo assim, são necessários estudos adicionais acerca dos mecanismos pelos quais o tratamento com EHSyz melhora parâmetros metabólicos que resulta em melhora da ciclicidade estral de ratas obesas MSG, porém sem interferir no padrão hormonal das mesmas e sem melhorar sua capacidade reprodutiva.

7. CONCLUSÃO

S. cumini é uma espécie com vastas propriedades farmacológicas descritas, as quais reforçam seu potencial uso para o tratamento de distúrbios metabólicos relacionados à síndrome metabólica e suas comorbidades. Este estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico obtido da folha de *S. cumini* melhora parâmetros metabólicos de ratas obesas com função ovariana comprometida, com retenção do ganho de peso e diminuição da massa corpórea das mesmas, bem como melhora do perfil glicolipídico sérico. Embora administração do extrato tenha ocasionado melhora da oligociclicidade, este não foi capaz de melhorar a capacidade reprodutiva das ratas MSG pós acasalamento, tornando-se necessárias mais investigações acerca dos mecanismos envolvidos na baixa fertilidade em animais obesos MSG, bem como avaliação do EHSyz em outros modelos de baixa fertilidade associada à síndrome metabólica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo de toda minha formação acadêmica no curso de Farmácia na Universidade Federal do Maranhão, dei os primeiros passos na pesquisa como aluna de iniciação científica vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Quando manifestei meu desejo em participar do PPGCS ao meu orientador prof. Dr. Marcus Paes, estava certa e ciente de que ao ser integrante de um programa multidisciplinar teria a oportunidade de aprender e contribuir para o fortalecimento da ciência e tecnologia no estado do Maranhão.

De certo, ao ingressar no mestrado acadêmico e desenvolver meu projeto de pesquisa no Laboratório Experimental em Fisiologia (LEFISIO), amadureci meus conhecimentos e aprendi técnicas cruciais ao meu crescimento pessoal e profissional, de modo a ganhar confiança ao exercer meus protocolos expostos nesta dissertação. No referido laboratório, participei ativamente das linhas de pesquisa relacionadas à Síndrome metabólica e disfunções reprodutivas, do qual como resultado obtivemos o artigo (em anexo) e 1 prêmio reconhecido internacionalmente como fruto da pesquisa: “*Novel Animal Model Award for Predoctoral Student*” pela American Physiological Society. O programa também me proporcionou participar de congressos internacionais, bem como, não poderia deixar de mencionar o estágio didático, do qual pude de fato conhecer e exercer.

Ao terminar estas linhas, sinto uma sensação de orgulho e trabalho pré-cumprido. Sim, pois os desejos em me aventurar nos mares desconhecidos da ciência continuam.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO-SBEM. **Atualização das Diretrizes para o Tratamento Farmacológico da Obesidade e do Sobrepeso**. ABESO, 2010.

AITTOMAKI, K. et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v. 82, n. 6, p. 959-68, Sep 22 1995.

AKAMINE, E. H. et al. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **J Endocrinol**, v. 206, n. 1, p. 65-74, Jul 2010.

ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, Oct 20 2009.

ALEXANDER, N. B.; COTANCH, P. H. The endocrine basis of infertility in women. **Nurs Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 511-24, Sep 1980.

ANANDHARAJAN, R. et al. In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 434-41, Jun 2006.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. **Complement Ther Med**, v. 21, n. 3, p. 232-43, Jun 2013.

AZZIZ, R. et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. **Fertil Steril**, v. 91, n. 2, p. 456-88, Feb 2009.

BALBO, S. L. et al. Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes Metab**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 3S13-7; discussion 3S108-12, Dec 2002.

BALDANI, D. P. et al. Clinical and biochemical characteristics of polycystic ovary syndrome in Croatian population. **Coll Antropol**, v. 36, n. 4, p. 1413-8, Dec 2012.

BALEN, A. H. Ovulation induction in the management of anovulatory polycystic ovary syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 373, n. 1-2, p. 77-82, Jul 5 2013.

BAZZANO, M. V. et al. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. **Reprod Biomed Online**, v. 31, n. 5, p. 655-67, Nov 2015.

BECKER, G. F. **Efeito da dieta hipocalórica de baixo índice glicêmico sobre níveis de grelina, leptina parâmetros metabólicos e desfechos reprodutivos em mulheres inférteis com excesso de peso: um ensaio clínico randomizado**. 2015. 146 Doutorado (Tese (Doutorado)). Programa de pós graduação em medicina: ciências médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BELTRAN-SANCHEZ, H. et al. Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 8, p. 697-703, Aug 20 2013.

BENEVIDES, R. O. A. **Syzygium cumini (L.) Skeels melhora parâmetros metabólicos e ovarianos de ratas com oligociclicidade associada à obesidade induzida por L-glutamato monossódico**. 2015. 61f (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968.

BERRIOT-VAROQUEAUX, N. et al. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. **Annu Rev Nutr**, v. 20, p. 663-97, 2000.

BOUCHOUCHA, M.; UZZAN, B.; COHEN, R. Metformin and digestive disorders. **Diabetes Metab**, v. 37, n. 2, p. 90-6, Apr 2011.

BRASSARD, M.; AINMELK, Y.; BAILLARGEON, J. P. Basic infertility including polycystic ovary syndrome. **Med Clin North Am**, v. 92, n. 5, p. 1163-92, xi, Sep 2008.

BURGERS, J. A. et al. Oligoovulatory and anovulatory cycles in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): what's the difference? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 12, p. E485-9, Dec 2010.

CAMERON, D. P.; CUTBUSH, L.; OPAT, F. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism in insulin secretion. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 5, n. 1, p. 41-51, Jan-Feb 1978.

CAMPOS, K. E. et al. Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 2, p. 122-5, Feb 2008.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascul Pharmacol**, v. 57, n. 2-4, p. 91-7, Sep-Oct 2012.

CHAGAS, V. T. et al. Syzygium cumini (L.) seeds: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 259, 2015.

CIVELEK, M.; LUSIS, A. J. Conducting the metabolic syndrome orchestra. **Nat Genet**, v. 43, n. 6, p. 506-8, Jun 2011.

COMNINOS, A. N.; JAYASENA, C. N.; DHILLO, W. S. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 2, p. 153-74, Mar-Apr 2014.

CURI, D. **Comparação entre o tratamento com metformina e orientação dietética associada a exercícios físicos em mulheres com síndrome dos ovários policísticos**. 2007. (mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DE BONA, K. S. et al. Syzygium cumini extract decrease adenosine deaminase, 5'nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. **Cell Physiol Biochem**, v. 26, n. 4-5, p. 729-38, 2010.

DE CARVALHO VIDIGAL, F. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1198, 2013.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 97-105, Jan 9 2008.

DENISON, F. C. et al. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. **Reproduction**, v. 140, n. 3, p. 373-85, Sep 2010.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Metformin administration improves endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol**, v. 152, n. 5, p. 749-56, May 2005.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. **Endocr Rev**, v. 33, n. 6, p. 981-1030, Dec 2012.

DIEZ, J. J.; IGLESIAS, P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **Eur J Endocrinol**, v. 148, n. 3, p. 293-300, Mar 2003.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 98-107, Feb 2011.

DUVAL, K. et al. The Obesity-Fertility Protocol: a randomized controlled trial assessing clinical outcomes and costs of a transferable interdisciplinary lifestyle intervention, before and during pregnancy, in obese infertile women. **BMC Obes**, v. 2, p. 47, 2015.

EHRMANN, D. A. Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med**, v. 352, n. 12, p. 1223-36, Mar 24 2005.

ESHRE. Nutrition and reproduction in women. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 3, p. 193-207, May-Jun 2006.

FRANCA, L. M. et al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, n. 2, p. 725-30, Jan 10 2014.

FRANKS, S.; STARK, J.; HARDY, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 4, p. 367-78, Jul-Aug 2008.

GADDUCCI, A.; GUERRIERI, M. E.; GENAZZANI, A. R. Fertility drug use and risk of ovarian tumors: a debated clinical challenge. **Gynecol Endocrinol**, v. 29, n. 1, p. 30-5, Jan 2013.

GARCIA-GALIANO, D.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 1, p. 22-33, Jan 2012.

GASPAR, R. S. et al. Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG-obese female rats. **J Endocrinol**, Mar 7 2016.

GHANAYEM, B. I. et al. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. **Biol Reprod**, v. 82, n. 1, p. 96-104, Jan 2010.

GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metab**, v. 15, n. 5, p. 635-45, May 2 2012.

GOLDEN, N. H.; CARLSON, J. L. The pathophysiology of amenorrhea in the adolescent. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1135, p. 163-78, 2008.

GOODARZI, M. O. et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, n. 4, p. 219-31, Apr 2011.

GOSWAMI, D.; CONWAY, G. S. Premature ovarian failure. **Horm Res**, v. 68, n. 4, p. 196-202, 2007.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367-77, May 2008.

GUYTON, A. C. H., J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: 2011.

HEILBRONN, L. K. et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 4, p. 1844-8, Apr 2004.

HICKMAN, I. J.; MACDONALD, G. A. Impact of diabetes on the severity of liver disease. **Am J Med**, v. 120, n. 10, p. 829-34, Oct 2007.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 5, p. 671-4, May 1997.

HOEGER, K. M. Obesity and lifestyle management in polycystic ovary syndrome. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, n. 1, p. 277-94, Mar 2007.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotech Histochem**, v. 80, n. 2, p. 79-87, Mar-Apr 2005.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 4, p. 6184-223, 2014.

KAJIKAWA, Y. et al. Association of circulating levels of leptin and adiponectin with metabolic syndrome and coronary heart disease in patients with various coronary risk factors. **Int Heart J**, v. 52, n. 1, p. 17-22, 2011.

KATSIKI, N.; GEORGIADOU, E.; HATZITOLIOS, A. I. The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome. **Drugs**, v. 69, n. 11, p. 1417-31, Jul 30 2009.

KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 9, p. 1431-7, Sep 2008.

KHASKHELI, M. N.; BALOCH, S.; BALOCH, A. S. Infertility and weight reduction: influence and outcome. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 23, n. 10, p. 798-801, Nov 2013.

KNIGHTS, A. J. et al. Adipokines and insulin action: A sensitive issue. **Adipocyte**, v. 3, n. 2, p. 88-96, Apr 1 2014.

KOUKI, T. et al. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. **Brain Res Bull**, v. 64, n. 5, p. 449-54, Jan 15 2005.

LAFORREST, S. et al. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 52, n. 6, p. 301-13, 2015.

LAKKA, T. A. et al. Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 8, p. 1279-86, Aug 2003.

LAMPERTI, A. A.; BALDWIN, D. M. Effects of anterior hypothalamic deafferentation and arcuate nucleus lesions on the feedback actions of estradiol benzoate on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in the female hamster. **Biol Reprod**, v. 28, n. 3, p. 745-51, Apr 1983.

LEÃO, L. M. Obesidade e síndrome dos ovários policísticos: vínculo fisiopatológico e impacto no fenótipo das pacientes. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014 2014.

LEE, S. S. et al. Association between Metabolic Syndrome and Menstrual Irregularity in Middle-Aged Korean Women. **Korean J Fam Med**, v. 37, n. 1, p. 31-6, Jan 2016.

LEITÃO, P. P. S. **Impactor DA Beside nab Fertilizable Feminine**. 2012. 34 (Amstrad). Institutur de Sciences Biomedical Abel Alcazar, Universities do Port

LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 383-96, Jun 2012.

LI, S. et al. Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. **Circ Res**, v. 105, n. 11, p. 1072-82, Nov 20 2009.

LIU, S. N. et al. Long-term fenofibrate treatment impaired glucose-stimulated insulin secretion and up-regulated pancreatic NF-kappa B and iNOS expression in monosodium glutamate-induced obese rats: is that a latent disadvantage? **J Transl Med**, v. 9, p. 176, 2011.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002. 544p

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. [Glucose transporters in the metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 177-89, Apr 2006.

MAITER, D. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-6, Feb 1991.

MARCH, W. A. et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. **Hum Reprod**, v. 25, n. 2, p. 544-51, Feb 2010.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov 2002.

MARCONDES, J. A.; BARCELLOS, C. R.; ROCHA, M. P. [Difficulties and pitfalls in the diagnosis of polycystic ovary syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 55, n. 1, p. 6-15, Feb 2011.

MARSHALL, J. C.; DUNAIF, A. Should all women with PCOS be treated for insulin resistance? **Fertil Steril**, v. 97, n. 1, p. 18-22, Jan 2012.

MATHUR, R. et al. Use of metformin in polycystic ovary syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, n. 6, p. 596-609, Dec 2008.

MAYER, S. B.; EVANS, W. S.; NESTLER, J. E. Polycystic ovary syndrome and insulin: our understanding in the past, present and future. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 11, n. 2, p. 137-49, Mar 2015.

MESSINIS, I. E. et al. Polycystic ovaries and obesity. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 29, n. 4, p. 479-88, May 2015.

METWALLY, M. et al. Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. **Fertil Steril**, v. 94, n. 1, p. 290-5, Jun 2010.

MIRANDA, R. A. et al. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. **Cell Physiol Biochem**, v. 33, n. 4, p. 1075-86, 2014.

MIRCEA, C. N.; LUJAN, M. E.; PIERSON, R. A. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. **J Obstet Gynaecol Can**, v. 29, n. 11, p. 887-902, Nov 2007.

MOORE, C. J. et al. Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring. **Reprod Sci**, Mar 29 2015.

MORAN, L. J. et al. Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. Cd007506, 2011.

MOSCHOS, S.; CHAN, J. L.; MANTZOROS, C. S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril**, v. 77, n. 3, p. 433-44, Mar 2002.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 193-205, Mar 2008.

NASCIMENTO CURI, C. M. et al. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. **Biochem Int**, v. 24, n. 5, p. 927-35, Jul 1991.

NELSON, L. M. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. **N Engl J Med**, v. 360, n. 6, p. 606-14, Feb 5 2009.

NEMEROFF, C. B. et al. Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. **Neuroendocrinology**, v. 33, n. 5, p. 265-7, Nov 1981.

NERY, R. M.; BARBISAN, J. N. Effect of leisure-time physical activity on the prognosis of coronary artery bypass graft surgery. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 25, n. 1, p. 73-8, Jan-Mar 2010.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-81, Jul 9 2011.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

PANDEY, S. et al. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. **J Hum Reprod Sci**, v. 3, n. 2, p. 62-7, May 2010.

PAPA, P. C. V., A. M.; SILVA, J. L. T.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLU-T4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, v. 71, p. 1917 – 1928, 2002.

PARIHAR, M. Obesity and infertility. **Reviews in Gynaecol Practic**, v. 3, p. 120-126, 2003.

PASQUALI, R. Obesity, fat distribution and infertility. **Maturitas**, v. 54, n. 4, p. 363-71, Jul 20 2006.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 3, p. 143-56, Mar 2014.

PHILLIPS, C. M. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 14, n. 3, p. 219-27, Sep 2013.

PIZZI, W. J.; BARNHART, J. E.; FANSLOW, D. J. Monosodium glutamate administration to the newborn reduces reproductive ability in female and male mice. **Science**, v. 196, n. 4288, p. 452-4, Apr 22 1977.

QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes Dev**, v. 21, n. 12, p. 1443-55, Jun 15 2007.

RABE, K. et al. Adipokines and insulin resistance. **Mol Med**, v. 14, n. 11-12, p. 741-51, Nov-Dec 2008.

RADAVELLI-BAGATINI, S. et al. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. **J Endocrinol**, v. 209, n. 3, p. 307-15, Jun 2011.

RANG&DALE. **Farmacologia**. [tradução de Raimundo Rodrigues Santos et al]. Elsevier. Rio de Janeiro: 2012.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sci**, v. 75, n. 22, p. 2717-31, Oct 15 2004.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annu Rev Med**, v. 44, p. 121-31, 1993.

RESSLER, I. B. et al. Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 12, p. E1076-84, Jun 15 2015.

ROBKER, R. L. et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 5, p. 1533-40, May 2009.

ROY, B. S. G. V. R. S. P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 697-705, 1 October 2008 2008.

SAGAE, S. C. et al. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. **Physiol Behav**, v. 105, n. 5, p. 1104-11, Mar 20 2012.

SANCHES, J. R. et al. Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 48, 2016.

SANCHEZ-GARRIDO, M. A. et al. Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion. **Endocrinology**, v. 156, n. 8, p. 2984-98, Aug 2015.

SAXENA, P. et al. Polycystic ovary syndrome: Is obesity a sine qua non? A clinical, hormonal, and metabolic assessment in relation to body mass index. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 16, n. 6, p. 996-9, Nov 2012.

SCARPELLINI, E.; TACK, J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. **Dig Dis**, v. 30, n. 2, p. 148-53, 2012.

SEIF, M. W.; DIAMOND, K.; NICKKHO-AMIRY, M. Obesity and menstrual disorders. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 29, n. 4, p. 516-27, May 2015.

SELI, E. et al. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 6, p. 790-804, Jun 2014.

SERESS, L. Divergent effects of acute and chronic monosodium L-glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. **Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 2207-16, 1982.

SHARMA, A. K. et al. *Syzygium cumini* ameliorates insulin resistance and beta-cell dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF-alpha in type 2 diabetic rats. **J Pharmacol Sci**, v. 119, n. 3, p. 205-13, 2012.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 7, p. 2376-83, Jul 2008.

SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v. 104, n. 3, p. 367-73, Apr 6 2006.

SHI, D.; VINE, D. F. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. **Fertil Steril**, v. 98, n. 1, p. 185-93, Jul 2012.

SIM, K. A. et al. Weight loss improves reproductive outcomes in obese women undergoing fertility treatment: a randomized controlled trial. **Clin Obes**, v. 4, n. 2, p. 61-8, Apr 2014.

SIMENTAL-MENDIA, L. E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 6, n. 4, p. 299-304, Dec 2008.

SINGLA, P.; BARDOLOI, A.; PARKASH, A. A. Metabolic effects of obesity: A review. **World J Diabetes**, v. 1, n. 3, p. 76-88, Jul 15 2010.

SLIWOWSKA, J. H. et al. Insulin: its role in the central control of reproduction. **Physiol Behav**, v. 133, p. 197-206, Jun 22 2014.

SPECA, S.; NAPOLITANO, C.; TAGLIAFERRI, G. The pathogenetic enigma of polycystic ovary syndrome. **J Ultrasound**, v. 10, n. 4, p. 153-60, Dec 2007.

SPITE, M.; CLARIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metab**, v. 19, n. 1, p. 21-36, Jan 7 2014.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-12, Jan 18 2001.

TALMOR, A.; DUNPHY, B. Female obesity and infertility. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 29, n. 4, p. 498-506, May 2015.

TEEDE, H.; DEEKS, A.; MORAN, L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. **BMC Med**, v. 8, p. 41, 2010.

TEIXEIRA, S. S. **Mecanismos envolvidos na ação genômica do hormônio tireoidiano sobre a expressão e translocação da isoforma 4 do transportador de glicose (GLUT4): estudo no tecido muscular esquelético e adiposo.** 2016. 106 (Universidade

de São Paulo, São Paulo). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo

TSILCHOROZIDOU, T.; OVERTON, C.; CONWAY, G. S. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 60, n. 1, p. 1-17, Jan 2004.

UKKOLA, O.; SANTANIEMI, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? **J Mol Med (Berl)**, v. 80, n. 11, p. 696-702, Nov 2002.

USADI, R. S.; LEGRO, R. S. Reproductive impact of polycystic ovary syndrome. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, n. 6, p. 505-11, Dec 2012.

VAN KASTEREN, Y. M.; SCHOEMAKER, J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. **Hum Reprod Update**, v. 5, n. 5, p. 483-92, Sep-Oct 1999.

VILLARROEL, C. et al. Hirsutism and oligomenorrhea are appropriate screening criteria for polycystic ovary syndrome in adolescents. **Gynecol Endocrinol**, v. 31, n. 8, p. 625-9, 2015.

WALTERS, K. A.; ALLAN, C. M.; HANDELSMAN, D. J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. **Biol Reprod**, v. 86, n. 5, p. 149, 1-12, May 2012.

WU, C. et al. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99155, 2014.

WU, S. et al. Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 114-23, Jan 2012.

WU, S. H.; LIU, Z.; HO, S. C. Metabolic syndrome and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Eur J Epidemiol**, v. 25, n. 6, p. 375-84, Jun 2010.

XAVIER, H. T. M. O. Prevenção das complicações da aterosclerose na síndrome metabólica: da fisiopatologia à farmacoeconomia da terapia hipolipemiente com estatinas. **Rev Bras.Med**, v. 62, 2005.

YILDIZ, B. O.; KNOCHENHAUER, E. S.; AZZIZ, R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 1, p. 162-8, Jan 2008.

ZHAI, H. L. et al. Trace glucose and lipid metabolism in high androgen and high-fat diet induced polycystic ovary syndrome rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, p. 5, 2012.

ZHOU, Q. et al. High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 127, 2014.

ZOLK, O. Current understanding of the pharmacogenomics of metformin. **Clin Pharmacol Ther**, v. 86, n. 6, p. 595-8, Dec 2009.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 19
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 19/12
EFEITO DE SYZYGIUM CUMINI L SKEELS- JAMBOLÃO-EM MODELO DE OVARIO POLICISTICO INDUZIDO EM RATAS	Nº do Protocolo: 23115.004018/2012-31
	Data de entrada no CEUA: 26/04/2012
	Parecer: APROVADO COM RECOMENDAÇÃO

I – Identificação

Título do projeto:		
EFEITO DE SYZYGIUM CUMINI L SKEELS-JAMBOLÃO-EM MODELO DE OVARIO POLICISTICO INDUZIDO EM RATAS		
Identificação da equipe executora:		
Profa. MS. Selma do Nascimento Silva– Responsável		
Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges-Colaborador		
Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges-Colaboradora		
Porfa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes-Colaboradora		
Profa. Dra. Sonia Maria de Farias Freire-Colaboradora		
Instituição onde será realizado:		
Universidade Federal do Maranhão/Farmacologia		
Área temática:	Multicêntrico:	Data de recebimento:
Farmacologia		26/04/2012
Cooperação estrangeira:		Data de devolução:
		10/06/2012

II – Objetivos:

Investigar os efeitos metabólicos glicídicos e lipídicos do extrato das folhas de *Syzygium cumini*, bem como seus efeitos na atividade ovariana em modelo experimental de síndrome de ovário policístico (SOP) induzida por drogas em roedores.

III – Sumário do projeto:

Síndrome do ovário policístico (SOP) é uma endocrinopatia mais freqüente na mulher com idade reprodutiva, apresenta um quadro clínico variável, mas em geral com hirsudismo, acne e/ou alopecia androgênica, anovulação crônica associada a distúrbio menstrual e infertilidade, além de resistência a insulina. Ensaios randômicos usam metformina como droga insulino-sensibilizador sugerem que produz efeitos colaterais após uso prolongado. Por esta razão uma terapia alternativa com ervas de atividade hipoglicêmica como *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) conhecida como jambolão. No estudo a SOP será induzida com um inibidor de aromatase e serão avaliados o ciclo estral, parâmetros bioquímicos, hormonais, ensaio uterotrófico, bem como morfologia ovariana.

IV – Comentário do relator frente à resolução resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre:

O presente trabalho apresenta relevância na busca da potencialidade de produtos da flora regional com atividade farmacológica hipoglicemiante e associados a doenças endócrinas como SOP.

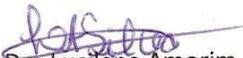
V – Pendências

VI – Recomendações:

- a. Item 5.3 do formulário não justificado
- b. Item 5.4 apresenta valor estimado, não tem valor exato. Esclarecer se há perdas e/ou justificar a quantidade mínima de 40 animais.
- c. Esclarecer o destino dos animais ou carcaças após experimentação

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

São Luís, 03 / 07 / 2012


Prof. Dra. Lucilene Amorim

Presidente do CEUA / UFMA

Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats

Renato Simões Gaspar¹, Renata Ohana Alves Benevides¹,
João Lucas de Lima Fontelles¹, Caroline Castro Vale¹, Lucas Martins França¹,
Paulo de Tarso Silva Barros^{1,2} and Antonio Marcus de Andrade Paes¹

¹Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

²Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Correspondence
should be addressed
to A M de A Paes

Email
marcuspaes@ufma.br

Abstract

Obesity and metabolic syndrome are the common causes of reproductive and fertility disorders in women. In particular, polycystic ovary syndrome, which is clinically characterized by hyperandrogenism, oligo/anovulation, and polycystic ovarian morphology, has been increasingly associated with metabolic disorders. However, given the broad interplay between metabolic and reproductive functions, this remains a field of intense research. In this study, we investigated the effect of monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity on reproductive biology of female rats. Newborn female rats were subcutaneously injected with MSG (4 g/kg/day) or equiosmolar saline (CTR) each 2 days up to postnatal day (pnd) 10. On pnd 60, estrous cycle was evaluated using vaginal smears twice a day for 15 days, which showed MSG rats to be oligocyclic. Thereafter, animals were killed on estrous phase for blood and tissue collection. MSG rats had increased body mass, accumulation of retroperitoneal and visceral fat pads, and visceral adipocyte hypertrophy compared with CTR rats. MSG rats were also dyslipidemic and hyperinsulinemic but were normoglycemic and normoandrogenic. Ovarian morphology analysis showed that MSG rats had a two-fold decrease in oocyte count but a six-fold increase on ovarian follicular cysts, along with a higher number of total primordial and atretic follicles. Moreover, MSG rats had a four-fold increase in anti-Müllerian hormone immunohistochemical staining on antral follicles. Taken together, data presented here characterize MSG obesity as a unique model to study the metabolic pathways underlying reproductive disorders in the absence of overactivated hypothalamic–pituitary–gonadal axis.

Key Words

- ▶ monosodium L-glutamate
- ▶ hypothalamic obesity
- ▶ metabolic syndrome
- ▶ reproductive disorders
- ▶ proliferation

Journal of Endocrinology
(2016) **229**, 61–72

Introduction

Obesity and metabolic syndrome (MetS) have escalating prevalence worldwide and have reached an epidemic proportion, affecting the world population regardless of ethnicity or Human Development Index

(O'Neill & O'Driscoll 2015). The latest consensus defines MetS as the presence of three of the five metabolic dysfunctions: obesity/central obesity, insulin resistance, dyslipidemia mainly as hypertriglyceridemia, hypertension,

and fasting hyperglycemia (Alberti *et al.* 2009). Of the abovementioned dysfunctions, obesity is of paramount importance in the development of MetS as it seems to precede other MetS features (O'Neill & O'Driscoll 2015). Concerning women's health, obesity and MetS are of special importance as epidemiological studies have shown that obesity is more prevalent in women (Wells *et al.* 2012), increasing their mortality risk (O'Neill & O'Driscoll 2015) and predisposition for severe disturbances on reproductive physiology (Vryonidou *et al.* 2015).

The association between MetS risk factors, especially obesity and insulin resistance, and ovarian dysfunction has been reported in female mice (Wu *et al.* 2014b), rats (Sanchez-Garrido *et al.* 2015), and mini pigs (Newell-Fugate *et al.* 2014). Metabolic disturbances cause defects in the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis via insulin and leptin feedback, which contributes to alter reproductive hormone levels (Watanobe 2002, Wu *et al.* 2014b). Obesity causes infertility in women, and even a modest 5% loss in body weight can lead to ovulation (Duval *et al.* 2015). Furthermore, experimental models to study the effects of obesity on ovarian microenvironment and its reproductive outcomes often present hyperandrogenism, longer and irregular estrous cycle, and polycystic ovaries (Shi *et al.* 2009, Newell-Fugate *et al.* 2014, Wu *et al.* 2014b). Such characteristics are hallmarks of polycystic ovary syndrome (PCOS), the main reproductive disorder associated with obesity and MetS (Rotterdam 2004). Nevertheless, the characterization of novel approaches to investigate the interplay between MetS and female reproductive disturbances remains a field of intense research.

On this matter, the monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity model, first described by Olney (1969), shows unique MetS-related characteristics. MSG administration to newborn rodents results in damage to the arcuate nucleus and median eminence of hypothalamus (Olney 1969, Olney & Sharpe 1969), decreasing growth hormone releasing hormone (GHRH) release, which impairs pulsatile growth hormone (GH) secretion by anterior pituitary somatotrophs (Maiter *et al.* 1991). During adulthood, MSG rodents show stunted growth, mild obesity, increased fat accumulation, dyslipidemia, hyperleptinemia, hyperinsulinemia, and insulin resistance, which characterize it as a mild MetS model (Zhang *et al.* 2010, Franca *et al.* 2014, Miranda *et al.* 2014). Besides metabolic repercussions, MSG rodents show impaired reproductive parameters associated

with dysfunctional HPG axis (Lamperti & Baldwin 1983, Dada & Blake 1985, Rose & Weick 1987, Franca *et al.* 2006). Albeit not being sterile, as initially suggested (Olney 1969), MSG female rodents exhibit reduced ovarian weight (Lamperti & Blaha 1976), longer estrous cycle (Nagasawa *et al.* 1974), delayed puberty (Lorden & Caudle 1986), and reduced fertility (Campos *et al.* 2008). However, ovarian morphology of MSG rodents has deserved little attention in the literature. Sasaki and Sano (1986) reported increased ovarian follicular atresia with no corpora lutea in MSG mice, whereas Bojanić *et al.* (2009) reported many atretic follicles with unspecific ovarian degeneration in MSG rats. More recently, it was shown that 75-day-old MSG mice presented an increased number of primary ovarian follicles, with no further analysis (Das & Ghosh 2011).

Notwithstanding the abovementioned features, there is scarce reports assessing the repercussions of metabolic and reproductive disturbances found in MSG animals on ovarian morphology. Therefore, in this study, we investigated the reproductive outcomes, particularly in the context of PCOS-like features, observed in MSG-induced obese female rats. To seek this purpose, morphometric, biochemical, and histological analyses were conducted in 75-day-old control and MSG female rats as an attempt to support the MSG obesity as a unique and affordable model to study how MetS may influence reproductive function in an animal without overstimulation of HPG axis.

Materials and methods

Animals

Pregnant Wistar rats were provided from the Animal Facility House of the Federal University of Maranhão, São Luís–MA, Brazil. After delivery, female newborns were used in this study. All animals were kept in a 12h light:12h darkness cycle, controlled temperature (22–24°C), with access to water and food *ad libitum*, in cages with up to four animals. Each group came from different mothers, with eight pups per litter. All procedures were performed in accordance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Animal Care and Welfare Committee of the Federal University of Maranhão under ruling number 016/13.

Study procedure

All newborn animals received subcutaneous injections of MSG (4 g/kg/day; Sigma-Aldrich; MSG group, $n=7$) or equiosmolar saline (CTR group, $n=8$) on alternate days, from postnatal day (pnd) 2 through 10 (Olney 1969). Animals were weaned at pnd 21. On pnd 60, the Lee Index ((body weight^{1/3} (g)/naso–anal length (cm)) × 1000) (Bernardis & Patterson 1968) was performed as a body mass index and vaginal smears were started to be collected. At pnd 73, animals were fasted for 8 h and tail capillary blood was collected to assess glycemia (strip test Accu-check Active; Roche Diagnostics; 10 mg/dL sensitivity and CV 2%), triglyceridemia (3 mg/dL; CV 3.5%), and cholesterolemia (1.04 mg/dL CV 2%) (Labtest, Lagoa Nova, MG, Brazil). Oral glucose tolerance test (OGTT) was conducted in overnight fasted rats by administration of 4 g/kg glucose and glycemia measurements 0, 15, 30, 60, and 120 min after gavage. Insulinemia was determined by radioimmunoassay with ¹²⁵I (Genesis, São Paulo, SP, Brazil) as described previously (Ribeiro *et al.* 2015). Sensitivity was 0.1 ng/mL and intra-assay CV was 0.075%. To estimate insulin resistance, both the HOMA1-IR (Wallace *et al.* 2004) and the TyG (Simental-Mendia *et al.* 2008) indices were calculated. Rats were killed on estrous phase, between pnd 75 and pnd 80. Upon killing, the Lee Index was redone and animals were anesthetized with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (Syntec, Cotia, SP, Brazil). Blood was collected by aorta puncture, centrifuged, and serum stocked at –20°C until analysis. Ovaries, uterus, and retroperitoneal and gonadal (visceral) fat pads were weighted. Oviducts were collected bilaterally for fresh *ex vivo* oocyte count as described elsewhere (Bernuci *et al.* 2008). Ovaries and attached gonadal fat pads were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, and kept on 70% v/v ethanol for histological processing.

Estrous cycle assessment

Vaginal smears were taken twice a day for at least 15 consecutive days to determine the phases of the estrous cycle and cycles were deemed as regular, irregular, or prolonged estrous, as described previously (Marcondes *et al.* 2002, Connor *et al.* 2012). Briefly, regular cycles were typically 4–5 days long with characteristic transition between phases, irregular cycles presented discrepant phase transitioning and/or aberrant duration of phases, whereas cycles with two or more days of estrous were deemed prolonged estrous.

Ovarian morphology

The right ovary was embedded in paraffin and cut into 4 µm sections. Six serial sections, 44 µm apart each, were stained with hematoxylin–eosin (HE) and analyzed under light microscopy. Follicles containing an oocyte were classified according to Hirshfield and Midgley (1978): primordial follicles consisted of one layer, flattened cells surrounding an oocyte; primary follicles had one layer of cuboidal cells; secondary follicles had more than one layer of cuboidal granulosa cells; antral follicles had multiple layers of cuboidal granulosa cells and contained one or more antral spaces, cumulus oophorus, and theca layer may also have been evident. Healthy follicles had no deformation on any cell layers or pyknotic nuclei. Atretic follicles were characterized by shrinkage or collapsing, lacking the oocyte or presenting granulosa cells with at least two pyknotic nuclei (Brawer *et al.* 1986, Wright *et al.* 1999, Lara *et al.* 2000, Webber *et al.* 2003). Cystic follicles were considered large fluid-filled cysts with diminished granulosa cell layer (up to four layers) and thickened theca interna cell layer (Brawer *et al.* 1986, Lara *et al.* 2000, Manneras *et al.* 2007, Shi *et al.* 2009). Micrographs were taken at 40× magnification.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining, 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich) slides were used. Sections were deparaffinized, blocked for endogenous peroxidase activity, washed with PBS, and immersed in 90°C citrate buffer. Slides were then blocked for non-specific binding in 5% v/v albumin–phosphate buffer. Primary antibody for anti-Müllerian hormone (AMH) (R&D Systems) was incubated at 1:400 dilutions at 4°C overnight. Slides were rinsed in PBS and incubated for 2 h at room temperature with secondary anti-goat antibody (R&D Systems) and then with streptavidin–biotin peroxidase complex (avidin biotin complex; Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). The peroxidase activity was developed with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) in distilled water and 0.03% v/v H₂O₂. After a final PBS wash, all sections were counterstained with hematoxylin. A negative control of primary antibody immunostaining is shown in Supplementary Fig. 1 (see section on supplementary data given at the end of this article). Three serial sections per animal were stained and analyzed under light microscopy. Follicles were divided into preantral (primordial, primary, and

Table 1 Morphometric parameters of CTR and MSG obese rats.

	CTR	MSG
Morphometric parameters		
Body weight (g)	166.40±3.45	158.00±3.70
Naso-anal length (cm)	17.70±0.12	16.03±0.22**
Lee Index ((g ^{1/3} /cm) × 1000)	310.60±1.71	337.30±2.99**
Retroperitoneal fat pad (g/100 g BW)	1.08±0.17	2.84±0.26**
Visceral fat pad (g/100 g BW)	1.08±0.18	3.67±0.33**
Uterus (g/100 g BW)	0.34±0.02	0.20±0.02**
Ovaries (mg/100 g BW)	0.15±0.01	0.07±0.00**

Results are mean±s.e.m. of n=5-7. **P<0.001 vs CTR.

secondary) and antral. Micrographs were taken at 100× and 200× magnifications. Percentage of follicle area stained with AMH was calculated using ImageJ software 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>).

Measurement of adipocyte area

Gonadal fat pads were processed together with the right ovary and cut into 4 µm sections. One hundred adipocytes were analyzed from each animal. All sections were at least 100 µm apart to prevent multiple counts of the same adipocyte. Micrographs were taken at 200× magnification. The adipocyte area was calculated using AxioVision (AxioVs40x64 V 4.9.1.0; Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Subsequently, the frequency of adipocytes per similar size class with intervals of 500 µm² was calculated.

Serum reproductive hormones

Steroidal hormones were extracted from serum before the assay. Briefly, serum was thawed on ice; diethyl ether 5 v/v was added and thoroughly mixed. This mixture was centrifuged under 1000g for 3 min to separate phases. Upper layer (ether) was then stocked on a clean tube and was repeated twice for optimal extraction. A precision curve was run for a coefficient value of r²>0.96. Estradiol and testosterone assays (Roche Diagnostics GmbH) were performed on the same day. Sensitivity was 5 pg/mL and 0.25 ng/mL respectively. CV was 2.73% and <1% respectively. Luteinizing hormone (LH) serum levels were not extracted before the assay and were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit as per manufacturer’s instructions (Elabscience Biotechnology Co. Ltd, Wuhan, China). Sensitivity was 0.938 mIU/mL and CV <10%.

Statistical analyses

The results are expressed as mean±s.e.m. on the tables and bar graphs. On the box plot graphs, the box shows the 25th and 75th percentiles and the middle line is considered the median. The whiskers indicate the upper and lower values not classified as statistical outliers. Student’s t-test was used for comparison and differences were considered significant at P<0.05.

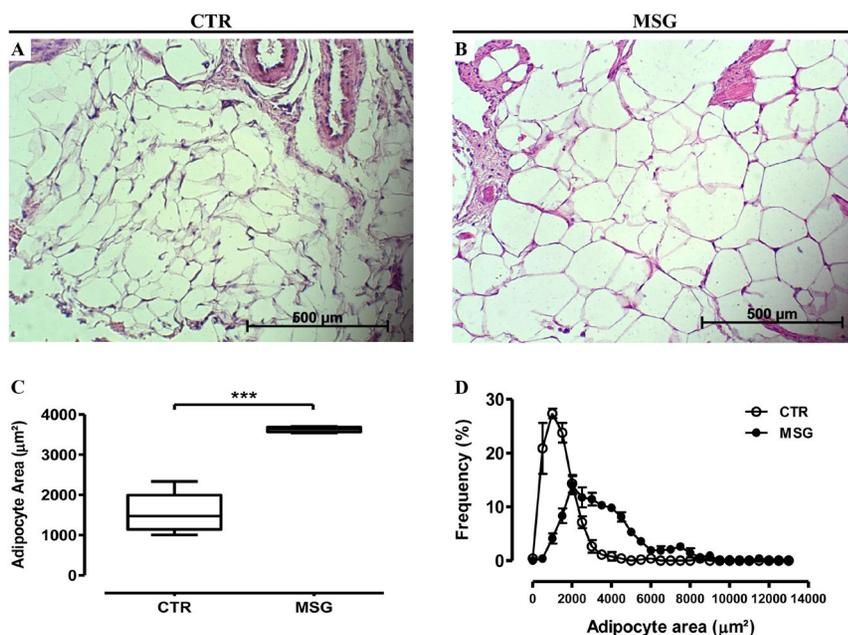


Figure 1 Increased periovarian adipocyte area in MSG obese rats. (A and B) Representative sections of paraffin-embedded and hematoxylin-eosin-stained periovarian fat pads from CTR (A, n=5) and MSG (B, n=4) animals. (C) Mean adipocyte area demonstrated by box and whiskers plot illustrating median (central line), range (whiskers), and 25th and 75th percentiles (box) of at least 97 adipocytes per animal. (D) Adipocyte area distribution of CTR (open circles) and MSG (black circles) rats. ***P<0.001 compared with CTR by Student’s t-test. A full colour version of this figure is available at <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0453>.

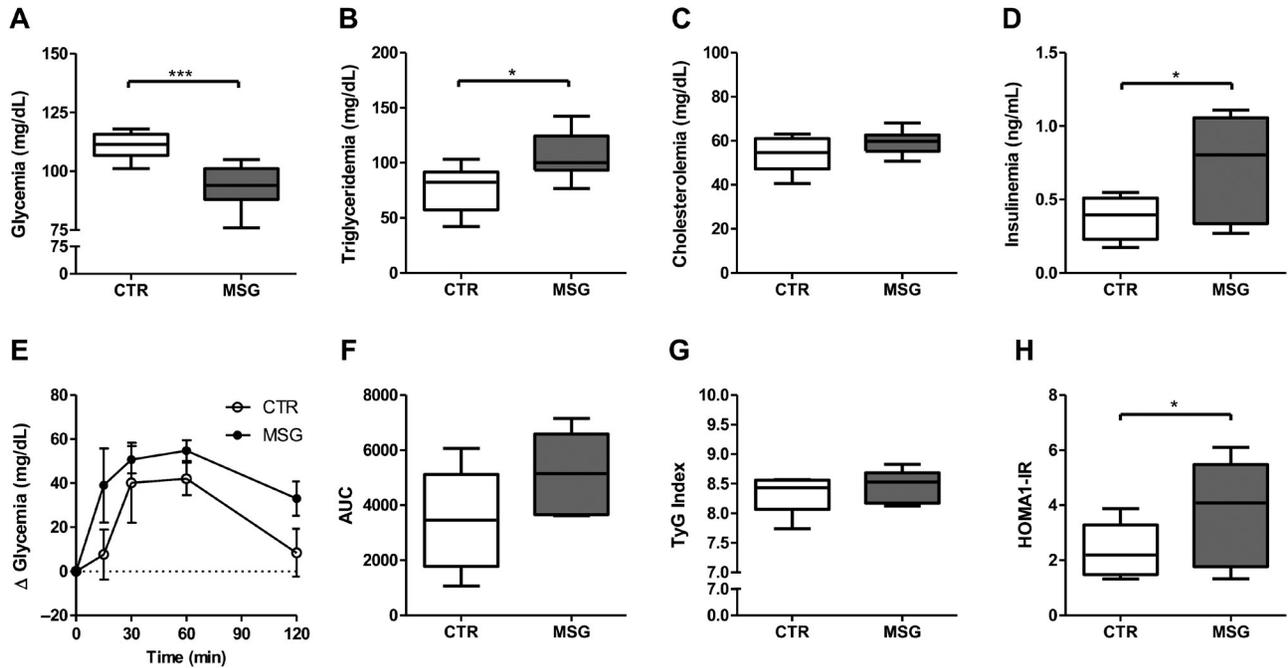


Figure 2 Serum metabolic profile of CTR and MSG animals. Fasted glycemia (A) measured by strip test. Fasted triglyceridemia (B) and cholesterolemia (C) determined by spectrophotometric assay kits. Fasted insulinemia (D) measured by radioimmunoassay. (E) Oral glucose tolerance test (OGTT) conducted in fasting CTR and MSG animals. (F) Area under the curve (AUC) of OGTT expressed no difference between groups. (G) TyG Index was calculated based on fasted glycemia and triglyceridemia: $\ln(\text{fasting glycemia (mg/dL)} \times \text{fasting triglyceridemia (mg/dL)})/2$. (H) HOMA1-IR index calculated based on fasted glycemia and insulinemia: $(\text{fasting insulinemia } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glycemia (mmol/L)})/22.5$. All data expressed as box and whiskers plot: median (central line), range (whiskers), and 25th and 75th percentiles (box) with $n=6-8$. * $P < 0.05$ vs CTR; *** $P < 0.001$ vs CTR analyzed by Student's *t*-test.

Results

Morphometric parameters

Morphometric parameters were measured on pnd 75 for both CTR and MSG female rats (Table 1). Body weight did not differ between groups; however, MSG animals were shorter than CTR animals, which contributed to a higher body mass in MSG, as inferred from Lee Index calculation. Moreover, MSG rats presented higher white adipose tissue accumulation. Specifically, retroperitoneal and visceral fat pads were increased by almost 3- and 3.5-fold, respectively, compared with CTR rats. Interestingly, both uterus and ovaries were lighter in MSG rats, probably due to decreased GH serum levels, a hallmark of this model.

Panels A and B in Fig. 1 show visceral fat attached to ovaries stained with HE for CTR and MSG respectively. The mean adipocyte area from each animal was two-fold increased in MSG animals compared with CTR animals (CTR 1551 ± 223.70 vs MSG $3632 \pm 32.73 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$; Fig. 1C). Noteworthy, the histogram of adipocyte area distribution indicated that MSG animals had increased frequency of large adipocytes, shifting the curve to the

right (Fig. 1D). These findings reiterate an imbalance on the metabolic aspects of MSG rats, which could impair reproductive functions on these animals.

Serum metabolic and reproductive hormone profiles

Assessment of serum metabolic parameters, as shown in Fig. 2, revealed that MSG rats had lower glycemia (CTR 111.00 ± 1.98 vs MSG $92.86 \pm 3.59 \text{ mg/dL}$, $P < 0.01$; Fig. 2A) despite higher triglyceridemia (CTR 75.53 ± 8.07 vs MSG $106.80 \pm 8.17 \text{ mg/dL}$, $P < 0.05$; Fig. 2B), with no difference on cholesterolemia (CTR 53.11 ± 3.06 vs MSG $59.30 \pm 2.04 \text{ mg/dL}$; Fig. 2C). MSG animals were hyperinsulinemic, with roughly three times more fasting serum insulin levels than CTR animals (CTR 0.32 ± 0.07 vs MSG $0.89 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$, $P < 0.05$; Fig. 2D). OGTT was performed on fasting animals without significant difference between groups (Fig. 2E; CTR 3451 ± 836.60 vs MSG 5191 ± 586.30 ; Fig. 2F). Insulin resistance was estimated by calculating both TyG (CTR 8.28 ± 0.12 vs MSG 8.48 ± 0.10 ; Fig. 2G) and HOMA1-IR (CTR 2.06 ± 0.44 vs MSG 4.56 ± 0.96 , $P < 0.05$; Fig. 2H) indices, which showed statistical difference only on the HOMA1-IR.

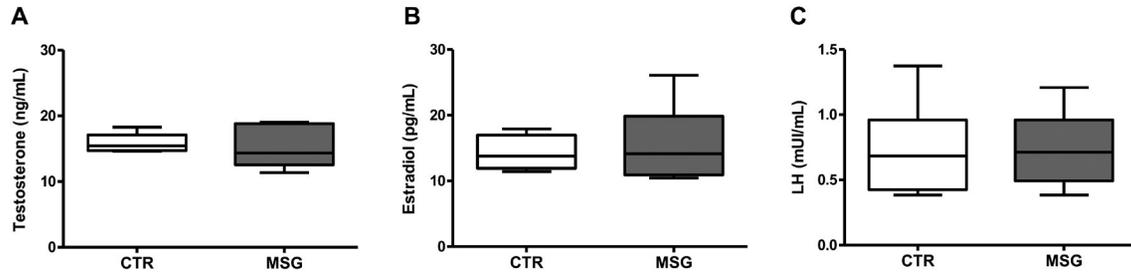


Figure 3

Serum reproductive hormones of CTR and MSG rats do not differ. All animals were on estrous upon blood collection. Serum testosterone (A) and estradiol (B) were extracted before the assay as described in the “Materials and methods” section. (C) Luteinizing hormone (LH) was measured without prior extraction. Data expressed as box and whiskers plot illustrating median (central line), range (whiskers), and 25th and 75th percentiles (box) with $n=4-7$. Student’s *t*-test analysis showed no difference between groups.

Serum reproductive hormones of both groups are shown in Fig. 3. Surprisingly, no difference was found on serum testosterone (CTR 15.82 ± 0.66 vs MSG 15.15 ± 1.30 ng/mL; Fig. 3A), estradiol (CTR 14.23 ± 1.36 vs MSG 15.63 ± 2.46 pg/mL; Fig. 3B), or LH (CTR 14.23 ± 1.36 vs 15.63 ± 2.46 MSG mIU/mL; Fig. 3C) levels. In spite of the absence of reproductive hormone alterations, our data

support MSG female rats suffer from MetS, which might affect other ovarian functions.

Cyclicity, ovulation and ovarian morphology

Typically, CTR animals showed regular 4- to 5-day cycles, whereas MSG animals were oligocyclic, with less

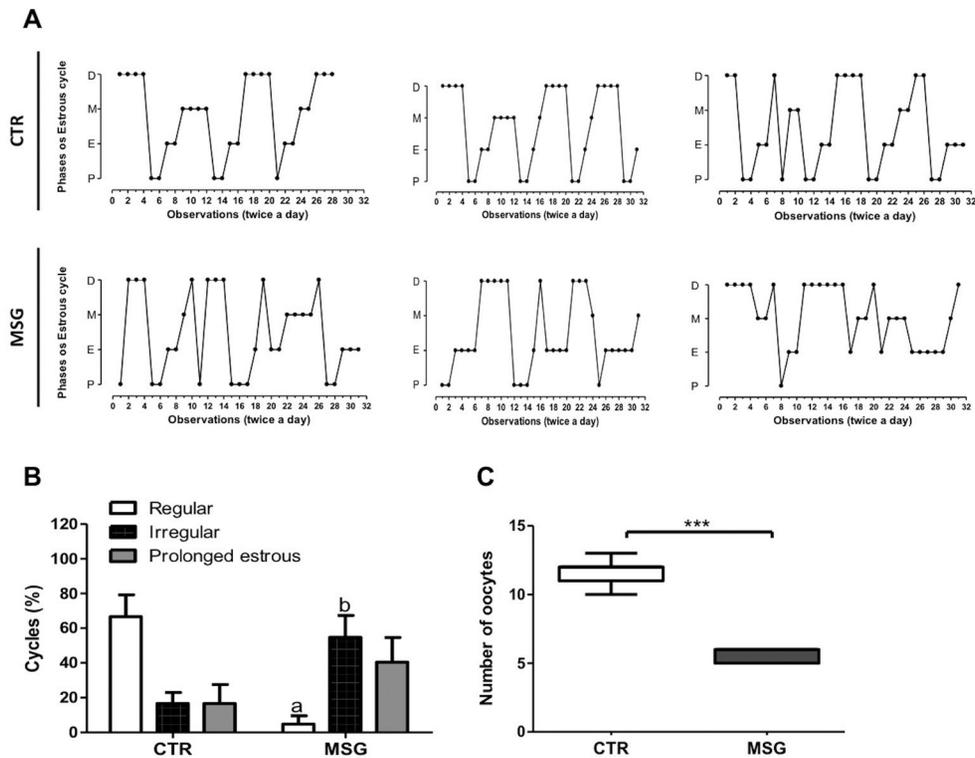


Figure 4

Hyperinsulinemic MSG animals exhibit irregular cycles and less ovulated oocytes. (A) Representative estrous cycles from three different CTR (top) and MSG (bottom) females taken twice a day from 60 to 75 pnd; P, proestrus; E, estrus; M, metaestrus; D, diestrus. (B) Estrous cycle classified as regular, irregular, or prolonged estrous according to the criteria exposed in the “Materials and methods” section; data presented as mean \pm S.E.M. (C) Mean fresh *ex vivo* oocyte count after ovulation on fallopian tubes from CTR and MSG rats demonstrated by box and whiskers plot illustrating median (central line), range (whiskers), and 25th and 75th percentiles (box). a $P < 0.05$ vs regular CTR; b $P < 0.05$ vs irregular CTR; *** $P < 0.001$ vs CTR. All comparisons were analyzed by Student’s *t*-test. $n=6-8$ per group.

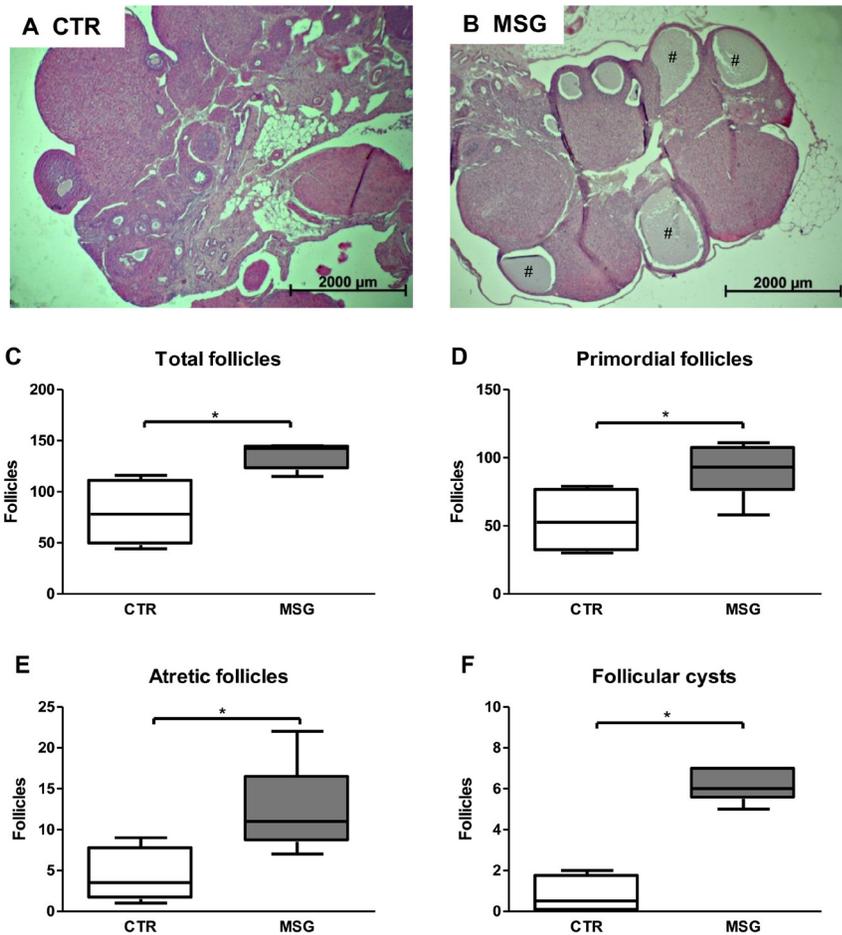


Figure 5

Quantitative histological analysis of ovarian alterations in MSG obese rats. (A and B) Representative sections of paraffin-embedded and hematoxylin–eosin-stained ovaries from CTR (A) and MSG (B) rats; # in B indicates follicular cysts. (C, D, E and F) Ovaries from CTR (n=4) and MSG (n=5) rats were embedded with paraffin and cut into 4 μm sections. Every 11th section was stained with hematoxylin and eosin and analyzed for differential follicular counting according to the morphological pattern showed in each graph. Total follicles from CTR and MSG rats are demonstrated by box and whiskers plot illustrating median (central line), range (whiskers), and 25 and 75th percentiles (box). *P<0.05 vs CTR analyzed by Student's t-test. A full colour version of this figure is available at <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0453>.

proestrus-to-estrus progression and longer metaestrus–diestrus phase (Fig. 4A). This was statistically translated by decreased regular (CTR 66.67 ± 12.60 vs 4.76 ± 4.76% MSG, P<0.05; Fig. 4B) and increased irregular (CTR 16.67 ± 6.30 vs 54.76 ± 12.58% MSG, P<0.05; Fig. 4B) cycles in MSG rats. There was no difference on prolonged estrous between groups (CTR 16.67 ± 10.91 vs 40.48 ± 14.14% MSG, P=0.19; Fig. 4B). Ovulation was evaluated by fresh *ex vivo* oocyte count. Our MSG rats showed a two-fold decrease in oocyte count compared with CTR (CTR 11.57 ± 0.37 vs MSG 5.57 ± 0.20, P<0.001; Fig. 4C). These results suggest that MSG rats have compromised fertility and reproductive function.

Ovary sections were then analyzed under light microscopy (Fig. 5). Representative sections from CTR (Fig. 5A) and MSG (Fig. 5B) rats displayed striking differences between groups regarding follicular cyst count. Figure 5C shows increased total follicle count in MSG animals (CTR 79.00 ± 16.44 vs MSG 136.30 ± 7.13, P<0.05; Fig. 5C), greatly due to increased primordial follicle pool (CTR 53.50 ± 12.31 vs MSG 91.80 ± 9.12, P<0.05;

Fig. 5D). MSG animals also had a three-fold increase in atretic follicle number when compared with CTR animals (CTR 4.25 ± 1.70 vs MSG 12.20 ± 2.56, P<0.05; Fig. 5E). Moreover, MSG animals had an astonishing six-fold increase on follicular cysts (CTR 0.75 ± 0.48 vs MSG 6.20 ± 0.37, P<0.01; Fig. 5F). Taken together, these reproductive data support PCOS-like characteristics in MSG animals.

AMH immunohistochemistry

As AMH hypersecretion by granulosa cells is involved in follicle maturation, ovarian immunohistochemistry was performed. Data in Fig. 6A, B, C and D show higher intensity of AMH staining on MSG antral follicles compared with CTR. The quantitative analysis showed no difference in the percentage of staining among preantral follicles (Fig. 6E). However, there was a four-fold increase in AMH staining on antral follicles of MSG rats (CTR 2.07 ± 0.59 vs MSG 9.43 ± 2.06, P<0.01; Fig. 6F). Despite this, there was no significant difference in total follicle

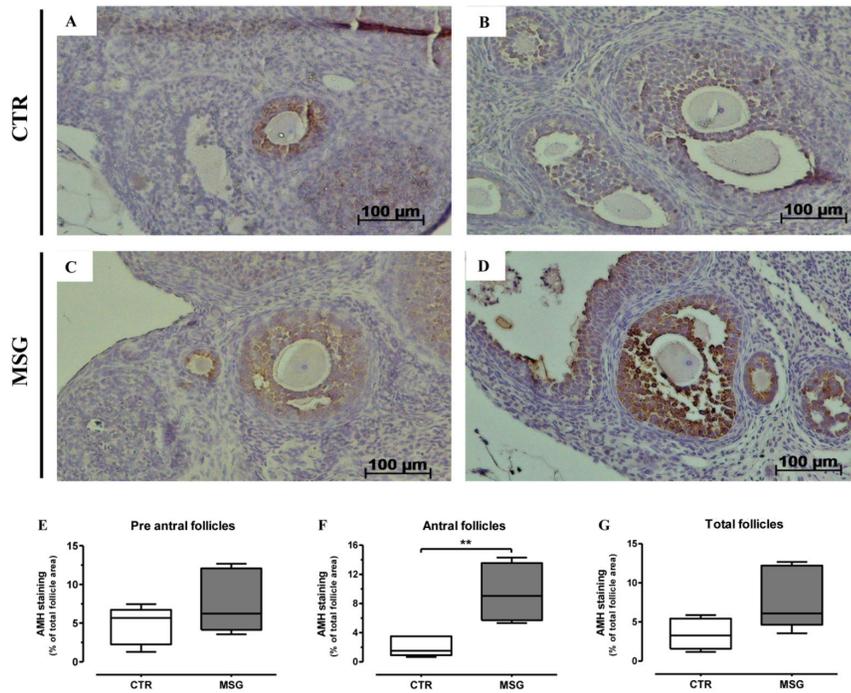


Figure 6 Immunohistochemical localization of anti-Müllerian hormone (AMH) in the ovaries of CTR and MSG obese rats. Ovarian sections from CTR ($n=5$) and MSG ($n=4$) rats were stained with AMH and analyzed three serial sections per animal as described in the “Materials and methods” section. (A, B, C and D) Representative sections of AMH staining on preantral and antral follicles are shown for CTR (A and B) and MSG (C and D) rats respectively. (E, F and G) Percentage of AMH staining on preantral (E), antral (F), and total (G) follicles area; mean percentage of staining in the ovaries from CTR and MSG rats are demonstrated by box and whiskers plot illustrating median (central line), range (whiskers), and 25 and 75th percentiles (box). $**P < 0.01$ vs CTR by Student’s *t*-test. A full colour version of this figure is available at <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0453>.

staining (Fig. 6G). Altogether, these data are suggestive of a dysregulation on the granulosa cell layer with disrupted maturation of MSG ovarian follicles.

Discussion

This study strengthens the pivotal role of hyperinsulinemia and MetS-associated comorbidities in reproductive dysfunctions, resembling those present in PCOS. Subcutaneous injections of MSG to newborn female rats lead to hyperinsulinemia, although with unaltered serum testosterone, estradiol, or LH levels. MSG rats exhibited obesity, hypertriglyceridemia, and visceral adipocyte hypertrophy. Additionally, they had irregular estrous cycles, with oligo-ovulation, and increased number of ovarian follicular cysts and atretic follicles. Moreover, our MSG rats presented augmented AMH immunostaining on antral follicles and increased primordial follicle pool. Such characteristics suggest that MetS features, such as hyperinsulinemia, obesity, and adipocyte dysfunction, trigger reproductive deficits producing a PCOS-like phenotype despite the absence of hyperandrogenemia or increased LH levels. To the best of our knowledge, this report is the first to describe a MetS female model without overactivated HPG and one of the few to describe PCOS characteristics despite normoandrogenism. In tandem, our female MSG rat reveals itself to be an affordable model to study how MetS influences the reproductive

system under no interference of increased serum HPG hormones.

Metabolic disturbances are highly prevalent among women diagnosed with PCOS and are considered to play an important role in the pathophysiology of this syndrome. Indeed, 50–80% of PCOS women are obese, whereas 44–70% are resistant to insulin (Dumesic *et al.* 2015). Obesity has been associated with more severe PCOS symptoms, whereas treatments directed to weight loss, such as exercise and anorexic drugs, significantly improve reproductive parameters. Numerous mechanisms correlating obesity and PCOS have been proposed, one of which consists in elevated insulinemia due to increased fat deposition, hypertriglyceridemia, and insulin resistance. It is important to notice that hyperinsulinemia has been proposed as a culprit for PCOS, and the concurrence of hyperinsulinemia/insulin resistance has higher prevalence in PCOS women, independent of body weight (Wu *et al.* 2014a, Dumesic *et al.* 2015).

Data presented herein show that our MSG rats developed MetS, translated by a rise in their Lee Index, accumulation of visceral and retroperitoneal fat pads, hypertriglyceridemia, and hyperinsulinemia. However, we found decreased serum glucose levels and unchanged OGTT in MSG rats. Data on insulin resistance were controversial, as TyG Index suggested that MSG rats have regular insulin sensitivity, whereas HOMA1-IR indicated the opposite. This could be explained by an exacerbated vagus nerve activity, a hallmark for MSG rodents, which

causes insulin oversecretion independently from serum glucose levels and insulin resistance (Miranda *et al.* 2014). In fact, even 6-month male MSG rats showed lower glycemia than control (Liu *et al.* 2011), yet there is scarce data concerning glycemia measurements on MSG females. Therefore, despite increased HOMA1-IR index, 75-day-old MSG females are likely to have preserved insulin sensitivity, which needs to be addressed through molecular methods in future studies.

Another important metabolic finding of our MSG rats was adipocyte hypertrophy on visceral periovarian fat pads. The mean adipocyte area of MSG animals was two-fold higher than that of CTR animals, reflected by a right-sided shift in the histogram of adipocytes' area. Adipocyte enlargement is related to hyperinsulinemia (Gao *et al.* 2015) and hyperleptinemia (Couillard *et al.* 2000). Leptin affects the reproductive physiology evoking gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and LH secretion in rats (Watanobe 2002), while disturbing follicle maturation and ovulation (Escobar-Morreale & San Millan 2007). Of interest, hyperleptinemia has been described in MSG female rats as young as 30 days old (Franca *et al.* 2006), reaching a ten-fold increase in 120-day-old female rats (Moreno *et al.* 2006). Thus, adipocyte hypertrophy showed herein might be related to increased leptin levels, which contribute to a disruption of female reproductive function. In humans, it has been shown that PCOS women have a 25% increase in adipocyte diameter when compared with BMI-matched non-PCOS subjects (Manneras-Holm *et al.* 2011), advocating for a relationship between PCOS and adipocyte hypertrophy.

Assessment of reproductive hormone levels showed that testosterone, estradiol, and LH were unaltered in our MSG rats. Neonatal MSG administration causes destruction of neuronal bodies in arcuate nucleus and median eminence of hypothalamus, disrupting the hypothalamic–pituitary axis (Lamperti & Blaha 1976). However, it has been shown that axons and dendrites in passage through these nuclei are spared, maintaining a lower but preserved LH secretion (Dada & Blake 1985). Moreover, facing an insufficient GnRH release, LH levels are maintained by input from anterior hypothalamic nucleus (Lamperti & Baldwin 1983), as well as reorganization of other hypothalamic nuclei (Rose & Weick 1987). Subsequently, MSG rodents have been shown to exhibit low to normal levels of reproductive hormones (Nemeroff *et al.* 1981, Lamperti & Baldwin 1983, Dada & Blake 1985, Franca *et al.* 2006), despite their gonadal atrophy (Table 1) and possible peripheral aromatization of androgens by white adipose tissue, as shown in other animal obese models (Newell-Fugate *et al.* 2014).

It has been reported that LH is the main inducer of ovarian androgen production (Knudsen *et al.* 2010), whereas hyperinsulinemia contributes to roughly 20% of serum testosterone levels (Azziz *et al.* 2001, Norman *et al.* 2002, Creanga *et al.* 2008). In humans (Tosi *et al.* 2012) and animal MetS models (Newell-Fugate *et al.* 2014, Wu *et al.* 2014b), hyperinsulinemia is able to cause elevation of LH secretion with consequent hyperandrogenemia, as hypothalamic nuclei structures are intact. However, in our MSG female rats, hyperinsulinemia seems to be unable to increase LH secretion, given the hypothalamic damage caused by MSG injection, resulting in lower to normal testosterone production, as shown in Fig. 3. Therefore, considering the normoandrogenemia verified in our MSG rats and their dysfunctional HPG axis, reproductive disorders described herein might be directly consequent to metabolic disturbances, i.e., hyperinsulinemia, obesity, and adipocyte dysfunction.

Our MSG rats exhibited irregular estrous cycles, which reinforces previous findings (Nagasawa *et al.* 1974, Lamperti & Blaha 1976, Lorden & Caudle 1986, Campos *et al.* 2008) and supports the connection between MetS and reproductive disorders. The MSG rats had lighter ovaries when compared with CTR, explained by deficient GH pulsatile secretion. They were oligocyclic rather than acyclic, with a higher frequency of irregular cycles and two-fold less oocyte on their fallopian tubes after ovulation. Of note, one could hypothesize the oligocycles/oligo-ovulation in MSG animals to be due to increased prolactin levels; however, it is well documented that MSG rodents, especially females, exhibit unchanged prolactinemia (Clemens *et al.* 1978, Nemeroff *et al.* 1981, Franca *et al.* 2006). Nonetheless, we recognize this as a limitation in this report and suggest future studies to investigate the effect of MSG obesity on the prolactin feedback loop. Noteworthy, our MSG obese rats present disrupted estrous cycle and oligo-ovulation patterns similar to female obese mice (Wu *et al.* 2014b), rats (Manneras *et al.* 2007), and mini pigs (Newell-Fugate *et al.* 2014) with otherwise preserved HPG axis function, suggesting that the latter has a minor effect on MetS outcomes on estrous cycle and ovulation.

MetS and its highly associated reproductive disorder, PCOS, also cause anomalies on ovarian structures. For instance, PCOS women showed increased follicle count, primordial follicles, follicular cysts, and atresia (Rotterdam 2004, Shi *et al.* 2009, Walters *et al.* 2012). MetS female models, such as the genetically modified JCR:LA-cp rats, which has a malfunction on its leptin receptors, are also presented with PCO and follicle atresia (Shi *et al.* 2009),

whereas the New Zealand obese mice showed increased primordial follicle counts and follicle atresia without PCO (Radavelli-Bagatini *et al.* 2011). Diet-induced obese mini pigs were also reported to have cystic ovarian follicles (Newell-Fugate *et al.* 2014). Our MSG rats showed increased number of primordial follicles when compared with CTR animals, an observation corroborated by previous findings that hyperinsulinemia promotes follicle maturation arrest (Franks *et al.* 2000). Moreover, MSG rats exhibited a robust increase in follicular cysts and atretic follicle counts, suggesting an impaired ovarian microenvironment. Atretic primary follicles were visualized only in the ovaries of MSG rats (Supplementary Fig. 2), which denote a severe impairment on follicle development. Of note, all the abovementioned models that present PCO also exhibit hyperandrogenism; therefore, the fact that our MSG female rats exhibited PCO without hyperandrogenism reinforces the role of hyperinsulinemia as an inductor of PCO *per se*, without the contribution of overactivated HPG axis.

Nonetheless, another important contributor to ovarian follicle development is AMH. Our MSG rats had increased AMH immunostaining on antral follicles, even though it had not affected total AMH staining when compared with CTR rats. Previous reports showed that AMH functions as an inhibitory growth factor in the ovary during early stages of folliculogenesis (Durlinger *et al.* 2002) and increases primordial follicle population (Kevenaar *et al.* 2006), which corroborates our findings of primordial follicle pool and follicular atresia in MSG rats. Intriguingly, an increase in AMH production specifically by antral follicles was also observed in PCOS women (Bhide *et al.* 2015). Thus, these data suggest a synergic role for hyperinsulinemia and AMH overproduction in the pathogenesis of impaired follicle development along with augmented follicular atresia and cysts.

Taken together, our reproductive data support a PCOS-like phenotype in MSG obese female rats, with the presence of some key diagnostic criteria, namely oligo-ovulation and PCO. However, one should be aware that these rats do not mimic all physiological processes seen in human PCOS and other animal models, particularly because of the hypothalamic basilar nuclei damage of MSG model with consequent stunted growth, a feature not described in PCOS women. Additionally, our MSG rats presented unchanged serum reproductive hormones, a feature found in a minority of PCOS women, but that deserves further investigation. Therefore, one should be cautious when translating data from our MSG female rats to humans.

In conclusion, our MSG obese female rats reiterate the fundamental role of hyperinsulinemia, obesity, and adipocyte dysfunction in reproductive disorders. To the best of our knowledge, there is no other rodent model presenting the characteristics described herein, which opens up the perspective of investigating *in vivo* how MetS affects reproductive biology without the interference of exacerbated HPG axis function.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0453>.

Declaration of interest

The authors declare that the research was conducted with no commercial or financial relationship that could be interpreted as a potential conflict of interest.

Funding

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA (Grant no. 00280/12 and scholarships to R S G, R O B, and J L L F) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (scholarship to C C V).

Acknowledgments

The authors are very grateful to Dr Deborah M Sloboda from the Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, and Dr Farida Sohrabji from the Department of Neuroscience and Experimental Therapeutics, College of Medicine, Texas A&M University, for critical discussion of the data. The authors would also like to thank the superb technical support given by Tiago da Silva Teófilo from the Laboratory of Histology, Federal University of Maranhão, and Marco Antônio Sales dos Santos and Laboratório Gaspar for the support given during the hormone assays.

References

- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr, *et al.* 2009 Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120** 1640–1645. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644)
- Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, Whitcomb RW, Hanley R, Fereshetian AG, O'Keefe M, Ghazzi MN & the PCTS Group 2001 Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 1626–1632.

- Bernardis LL & Patterson BD 1968 Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology* **40** 527–528. (doi:10.1677/joe.0.0400527)
- Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE & Anselmo-Franci JA 2008 Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* **149** 2907–2916. (doi:10.1210/en.2007-1254)
- Bhude P, Dilgil M, Gudi A, Shah A, Akwa C & Homburg R 2015 Each small antral follicle in ovaries of women with polycystic ovary syndrome produces more antimullerian hormone than its counterpart in a normal ovary: an observational cross-sectional study. *Fertility and Sterility* **103** 537–541. (doi:10.1016/j.fertnstert.2014.10.033)
- Bojanic V, Bojanic Z, Najman S, Savic T, Jakovljevic V, Najman S & Jancic S 2009 Diltiazem prevention of toxic effects of monosodium glutamate on ovaries in rats. *General Physiology and Biophysics* **28** 149–154.
- Brawer JR, Munoz M & Farookhi R 1986 Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of Reproduction* **35** 647–655. (doi:10.1095/biolreprod35.3.647)
- Campos KE, Volpato GT, Calderon IM, Rudge MV & Damasceno DC 2008 Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **41** 122–125. (doi:10.1590/S0100-879X2008005000001)
- Clemens JA, Roush ME, Fuller RW & Shaar CJ 1978 Changes in luteinizing hormone and prolactin control mechanisms produced by glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Endocrinology* **103** 1304–1312. (doi:10.1210/endo-103-4-1304)
- Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ & Sloboda DM 2012 Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *Journal of Physiology* **590** 2167–2180. (doi:10.1111/jphysiol.2011.223305)
- Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C & Despres JP 2000 Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **24** 782–788. (doi:10.1038/sj.ijo.0801227)
- Creanga AA, Bradley HM, McCormick C & Witkop CT 2008 Use of metformin in polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* **111** 959–968.
- Dada MO & Blake CA 1985 Monosodium L-glutamate administration: effects on gonadotrophin secretion, gonadotrophs and mammatrophs in prepubertal female rats. *Journal of Endocrinology* **104** 185–192. (doi:10.1677/joe.0.1040185)
- Das RS & Ghosh SK 2011 Long-term effects in ovaries of the adult mice following exposure to monosodium glutamate during neonatal life—a histological study. *Nepal Medical College Journal* **13** 77–83.
- Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS & Legro RS 2015 Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocrine Reviews* **36** 487–525. (doi:10.1210/er.2015-1018)
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen AP 2002 Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* **143** 1076–1084. (doi:10.1210/endo.143.3.8691)
- Duval K, Langlois MF, Carranza-Mamane B, Pesant MH, Hivert MF, Poder TG, Lavoie HB, Ainmelk Y, St-Cyr Tribble D, Laredo S, et al. 2015 The Obesity-Fertility Protocol: a randomized controlled trial assessing clinical outcomes and costs of a transferable interdisciplinary lifestyle intervention, before and during pregnancy, in obese infertile women. *BMC Obesity* **2** 47. (doi:10.1186/s40608-015-0077-x)
- Escobar-Morreale HF & San Millan JL 2007 Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **18** 266–272. (doi:10.1016/j.tem.2007.07.003)
- Franca LR, Suescun MO, Miranda JR, Giovambattista A, Perello M, Spinedi E & Calandra RS 2006 Testis structure and function in a nongenetic hyperadipose rat model at prepubertal and adult ages. *Endocrinology* **147** 1556–1563. (doi:10.1210/en.2005-0640)
- Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, Silva LA, Debbas V, Laurindo FR & Paes AM 2014 Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **443** 725–730. (doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.042)
- Franks S, Mason H & Willis D 2000 Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **163** 49–52. (doi:10.1016/S0303-7207(99)00239-7)
- Gao M, Ma Y & Liu D 2015 High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS ONE* **10** e0119784.
- Hirshfield AN & Midgley AR Jr 1978 Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* **19** 597–605. (doi:10.1095/biolreprod19.3.597)
- Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP & Visser JA 2006 Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* **147** 3228–3234. (doi:10.1210/en.2005-1588)
- Knudsen KL, Blank SK, Burt Solorzano C, Patrie JT, Chang RJ, Caprio S, Marshall JC & McCartney CR 2010 Hyperandrogenemia in obese peripubertal girls: correlates and potential etiological determinants. *Obesity* **18** 2118–2124.
- Lamperti A & Blaha G 1976 The effects of neonatally-administered monosodium glutamate on the reproductive system of adult hamsters. *Biology of Reproduction* **14** 362–369. (doi:10.1095/biolreprod14.3.362)
- Lamperti AA & Baldwin DM 1983 Effects of anterior hypothalamic deafferentation and arcuate nucleus lesions on the feedback actions of estradiol benzoate on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in the female hamster. *Biology of Reproduction* **28** 745–751. (doi:10.1095/biolreprod28.3.745)
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL & Ojeda SR 2000 An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* **141** 1059–1072. (doi:10.1210/endo.141.3.7395)
- Liu SN, Liu Q, Li LY, Huan Y, Sun SJ & Shen ZF 2011 Long-term fenofibrate treatment impaired glucose-stimulated insulin secretion and up-regulated pancreatic NF-kappa B and iNOS expression in monosodium glutamate-induced obese rats: is that a latent disadvantage? *Journal of Translational Medicine* **9** 176. (doi:10.1186/1479-5876-9-176)
- Lorden JF & Caudle A 1986 Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* **8** 509–519.
- Maiter D, Underwood LE, Martin JB & Koenig JI 1991 Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology* **128** 1100–1106. (doi:10.1210/endo-128-2-1100)
- Mannaras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M & Stener-Victorin E 2007 A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **148** 3781–3791. (doi:10.1210/en.2007-0168)
- Mannaras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Oden A, Holm G, Hellstrom M, Lonn L, Olivecrona G, Stener-Victorin E, et al. 2011 Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS:

- enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96** E304–E311. (doi:10.1210/jc.2010-1290)
- Marcondes FK, Bianchi FJ & Tanno AP 2002 Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* **62** 609–614. (doi:10.1590/S1519-69842002000400008)
- Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, Barella LF, Franco CC, Trombini AB, Malta A, Gravena C, Torrezan R, Mathias PC, et al. 2014 Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. *Cellular Physiology and Biochemistry* **33** 1075–1086. (doi:10.1159/000358677)
- Moreno G, Perello M, Camihort G, Luna G, Console G, Gaillard RC & Spinedi E 2006 Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged, hyperadipose female rats. *International Journal of Obesity* **30** 73–82. (doi:10.1038/sj.ijo.0803109)
- Nagasawa H, Yanai R & Kikuyama S 1974 Irreversible inhibition of pituitary prolactin and growth hormone secretion and of mammary gland development in mice by monosodium glutamate administered neonatally. *Acta Endocrinologica* **75** 249–259.
- Nemeroff CB, Lamartiniere CA, Mason GA, Squibb RE, Hong JS & Bondy SC 1981 Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. *Neuroendocrinology* **33** 265–267. (doi:10.1159/000123243)
- Newell-Fugate AE, Taibl JN, Clark SG, Alloosh M, Sturek M & Krisher RL 2014 Effects of diet-induced obesity on metabolic parameters and reproductive function in female Ossabaw minipigs. *Comparative Medicine* **64** 44–49.
- Norman RJ, Davies MJ, Lord J & Moran LJ 2002 The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **13** 251–257.
- O'Neill S & O'Driscoll L 2015 Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews* **16** 1–12. (doi:10.1111/obr.12229)
- Olney JW 1969 Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164** 719–721. (doi:10.1126/science.164.3880.719)
- Olney JW & Sharpe LG 1969 Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* **166** 386–388. (doi:10.1126/science.166.3903.386)
- Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proietto J, Spritzer PM & Andrikopoulos S 2011 The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. *Journal of Endocrinology* **209** 307–315. (doi:10.1530/JOE-11-0022)
- Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Boschero AC & Carneiro EM 2015 Taurine supplementation enhances insulin secretion without altering islet morphology in non-obese diabetic mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **803** 353–370. (doi:10.1007/978-3-319-15126-7)
- Rose PA & Weick RF 1987 Evidence for reorganization of the neuroendocrine centres regulating pulsatile LH secretion in rats receiving neonatal monosodium-L-glutamate treatment. *Journal of Endocrinology* **113** 261–269. (doi:10.1677/joe.0.1130261)
- Rotterdam EA-SPCWG 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* **81** 19–25. (doi:10.1016/j.fertnstert.2003.10.004)
- Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, Heras V, Castellano JM, Castano JP, Luque RM, Vazquez MJ, Roa J, et al. 2015 Metabolic and gonadotropic impact of sequential obesogenic insults in the female: influence of the loss of ovarian secretion. *Endocrinology* **156** 2984–2998. (doi:10.1210/en.2014-1951)
- Sasaki F & Sano M 1986 Roles of the arcuate nucleus and ovary in the maturation of growth hormone, prolactin, and nongranulated cells in the mouse adenohypophysis during postnatal development: a stereological morphometric study by electron microscopy. *Endocrinology* **119** 1682–1689. (doi:10.1210/endo-119-4-1682)
- Shi D, Dyck MK, Uwiera RR, Russell JC, Proctor SD & Vine DF 2009 A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **150** 4425–4436. (doi:10.1210/en.2008-1612)
- Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M & Guerrero-Romero F 2008 The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* **6** 299–304. (doi:10.1089/met.2008.0034)
- Tosi F, Negri C, Perrone F, Dorizzi R, Castello R, Bonora E & Moghetti P 2012 Hyperinsulinemia amplifies GnRH agonist stimulated ovarian steroid secretion in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** 1712–1719.
- Vryonidou A, Paschou SA, Muscogiuri G, Orio F & Goulis DG 2015 MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic syndrome through the female life cycle. *European Journal of Endocrinology* **173** R153–R163.
- Wallace TM, Levy JC & Matthews DR 2004 Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* **27** 1487–1495. (doi:10.2337/diacare.27.6.1487)
- Walters KA, Allan CM & Handelsman DJ 2012 Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction* **86** 149, 141–112.
- Watanobe H 2002 Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *Journal of Physiology* **545** 255–268. (doi:10.1113/jphysiol.2002.023895)
- Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K & Franks S 2003 Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* **362** 1017–1021. (doi:10.1016/S0140-6736(03)14410-8)
- Wells JC, Marphatia AA, Cole TJ & McCoy D 2012 Associations of economic and gender inequality with global obesity prevalence: understanding the female excess. *Social Science & Medicine* **75** 482–490.
- Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S & Hardy K 1999 Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* **14** 1555–1562. (doi:10.1093/humrep/14.6.1555)
- Wu C, Lin F, Qiu S & Jiang Z 2014a The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. *PLoS ONE* **9** e99155. (doi:10.1371/journal.pone.0099155)
- Wu S, Divall S, Nwaopara A, Radovick S, Wondisford F, Ko C & Wolfe A 2014b Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes* **63** 1270–1282. (doi:10.2337/db13-1514)
- Zhang N, Huan Y, Huang H, Song GM, Sun SJ & Shen ZF 2010 Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmaceutica Sinica* **31** 35–42. (doi:10.1038/aps.2009.176)

Received in final form 1 March 2016

Accepted 7 March 2016

Accepted Preprint published online 7 March 2016