



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO



**EFEITO MODULADOR DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR
DESCENDENTES DE MÃES EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
AÇÚCAR**

JÉSSICA FURTADO SOARES

SÃO LUÍS

2022

JÉSSICA FURTADO SOARES

**EFEITO MODULADOR DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR
DESCENDENTES DE MÃES EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
AÇÚCAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

SÃO LUÍS

2022

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

Furtado Soares, Jéssica.

EFEITO MODULADOR DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS METABOLICOS E REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR DESCENDENTES DE MÃES EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM AÇÚCAR / Jéssica Furtado Soares. - 2022.

45 f.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2022.

1. Dieta rica em sacarose. 2. Disfunções reprodutivas. 3. Prole fêmea. I. de Andrade Paes, Antonio Marcus. II. Título.

JÉSSICA FURTADO SOARES

**EFEITO MODULADOR DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR
DESCENDENTES DE MÃES EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
AÇÚCAR**

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a.Dr^a. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof^o.Dr^o. Renato Simões Gaspar
Universidade de São Paulo-USP

Prof^o.Dr^o. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^o.Dr^o. Antonio Marcus de Andrade Paes
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
(Orientador)

“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

(Mario Quintana)

Dedico esta dissertação aos meus pais, por todo amor e toda dedicação na minha criação. Sem vocês, eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu alicerce, à minha família. Em especial aos meus pais, Waldelice Furtado Soares e Jonas de Jesus Bittencourt Soares, que sempre batalharam para que eu tivesse a melhor educação possível. Obrigada por sempre enxergarem o melhor em mim, até quando eu duvidava. Obrigada por sempre apoiarem os meus sonhos e por toda a motivação nessa jornada acadêmica. A vocês, dedico tudo o que sou.

Agradeço imensamente ao meu amor, Vinícius Campos Carreiro, pelo companheirismo e suporte durante todo o período de mestrado. Obrigada por estar comigo nos meus melhores momentos e por me confortar nos momentos difíceis. Sinto-me a pessoa mais sortuda do mundo por viver a vida ao seu lado.

Obrigada aos meus amigos de graduação, que se tornaram verdadeiros amigos para toda a vida, Jéssica Kelly Reis Pereira, Josivan Regis Farias e Nívia Rhennyha do Nascimento Soares. Obrigada por sonharem comigo, por rirem comigo, por serem as melhores fontes de conselhos. Vocês são únicos.

Agradeço à toda a equipe do Laboratório de Fisiologia Experimental- LeFisio (UFMA), pelos ensinamentos, pelo apoio e por serem os melhores exemplos de como ser pesquisador. Agradeço à professora Perla Lopes Freitas, por ter me dado suporte quando eu me encontrava perdida e por ter me apresentado à família LeFisio. Serei eternamente grata a ti, “colega”! Agradeço à Odara Champoudry da Silva, por estar comigo diariamente nos experimentos e por não poupar esforços para me ajudar. A você, minha admiração pela pessoa e profissional que está se tornando (você vai longe!).

Agradeço imensamente ao meu orientador, Antonio Marcus de Andrade Paes, por toda paciência, por todo o auxílio e por ter acreditado no meu potencial. Tudo o que já construí na minha vida profissional teve a sua participação e se iniciei minha vida na docência, tenho você como inspiração. A você, minha eterna gratidão.

Também gostaria de agradecer à todas as agências de fomento pelo apoio à pesquisa, em especial à Capes. Pois nesse país sem muita valorização à pesquisa e ao pesquisador, é essencial termos uma rede de apoio. O meu muito obrigada.

Por fim, agradeço por todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui!

EFEITO MODULADOR DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DE RATAS WISTAR DESCENDENTES DE MÃES EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM AÇÚCAR

RESUMO

A prevalência de obesidade entre mulheres em fase reprodutiva está aumentando nos últimos anos e a obesidade materna não é prejudicial apenas para a mãe, mas também para os descendentes. Além disso, a exposição a um ambiente desfavorável durante a gravidez propicia o desenvolvimento de doenças ou funções fisiológicas alteradas na vida adulta. Essas alterações incluem hipertensão, dislipidemias, doenças cardiovasculares e disfunções reprodutivas. É sabido que a metformina é utilizada para tratar desordens metabólicas. Porém, não está demonstrado que este mesmo agente farmacológico é eficiente na reprogramação metabólica com vistas à prevenção de disfunções reprodutivas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito modulador da metformina sobre parâmetros metabólicos e reprodutivos de ratas Wistar descendentes de mães expostas à uma dieta rica em sacarose (DRS). Em relação aos dados maternos, as mães do grupo DRS apresentaram hipercolesterolemia. Além disso, o índice de Lee, no período pré-gestacional, mostrou diferenças significativas no grupo DRS quando comparado ao grupo CTR, indicando um aumento de massa corporal influenciada pela dieta rica em sacarose. No que se refere aos descendentes, a prole fêmea de mães DRS apresentou diferenças significativas no peso corporal após o nascimento, bem como no desmame. Além disso, a prole DRS desenvolveu hipertrigliceridemia, RI e intolerância à glicose. Porém, a prole DRS tratada com metformina, não apresentou nenhuma dessas alterações metabólicas. Por fim, foi observada uma antecipação da puberdade no grupo DRS quando comparado com o grupo CTR, enfatizando os efeitos deletérios da dieta materna rica em açúcar à nível reprodutivo da prole. Portanto, reforça-se a importância de mais estudos acerca da reprogramação metabólica causada por este medicamento, bem como a investigação do efeito da metformina em outras abordagens experimentais.

Palavras-chave: Dieta rica em sacarose, disfunções reprodutivas, prole, metformina, DOHaD.

MODULATIVE EFFECT OF METFORMIN ON METABOLIC AND REPRODUCTIVE PARAMETERS OF WISTAR RATS DESCENDENT FROM MOTHERS EXPOSED TO A DIET RICH IN SUGAR

ABSTRACT

The prevalence of obesity among women in the reproductive phase is increasing in recent years and maternal obesity is not only harmful for the mother, but also for the offspring. In addition, exposure to an unfavorable environment during pregnancy favors the development of diseases or altered physiological functions in adult life. These changes include hypertension, dyslipidemia, cardiovascular disease and reproductive disorders. It is known that metformin is used to treat metabolic disorders. However, it has not been demonstrated that this same pharmacological agent is efficient in metabolic reprogramming with a view to preventing reproductive disorders. Therefore, this project aims to evaluate the modulator effect of metformin on metabolic and reproductive parameters of Wistar rats descended from mothers exposed to a diet rich in sucrose (DRS). Regarding maternal data, mothers in the DRS group had hypercholesterolemia. In addition, the Lee index, in the pre-pregnancy period, showed significant differences in the DRS group when compared to the CTR group, indicating an increase in body mass influenced by the sucrose-rich diet. With regard to the offspring, the female offspring of DRS mothers showed significant differences in body weight after birth, as well as at weaning. Furthermore, the DRS offspring developed hypertriglyceridemia, IR and glucose intolerance. However, the DRS offspring treated with metformin did not show any of these metabolic changes. Finally, an anticipation of puberty was observed in the DRS group when compared to the CTR group, emphasizing the deleterious effects of the maternal diet rich in sugar on the reproductive level of the offspring. Therefore, the importance of further studies on the metabolic reprogramming caused by this drug is reinforced, as well as the investigation of the effect of metformin in other experimental approaches.

Key-words: High sucrose diet, reproductive dysfunctions, offspring, metformin, DOHaD.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| AGL | ácidos graxos livres |
| CTR | controle |
| DCV | doenças cardiovasculares |
| DHGNA | doença hepática gordurosa não alcoólica |
| DM2 | diabetes mellitus tipo 2 |
| DRS | dieta rica em sacarose |
| DRSMet | prole DRS tratada com metformina |
| FSH | hormônio folículo estimulante |
| GH | hormônio de crescimento |
| HDL-C | lipoproteína-colesterol de alta intensidade |
| HE | hematoxilina-eosina |
| HPG | hipotálamo-hipófise-gônada |
| IGF1 | fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 |
| IL-6 | interleucina 6 |
| IMC | índice de massa corporal |
| LDL | lipoproteína-colesterol de baixa intensidade |
| LH | hormônio luteinizante |
| PAI-1 | inibidor do ativador do plasminogênio |
| PCR | proteína C reativa |
| RI | resistência insulínica |
| SHBG | globulina de ligação ao hormônio sexual |
| SM | síndrome metabólica |
| SOP | síndrome dos ovários policísticos |
| TG | triglicerídeos |
| TNF α | fator de necrose tumoral α |
| TTG | teste de tolerância à glicose |
| TTI | teste de tolerância à insulina |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismos epigenéticos no contexto DOHaD..... | 16 |
| Figura 2. Consequências da dieta hiperlipídica materna em diferentes sistemas da prole..... | 17 |
| Figura 3. Influência da DRS sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos materno..... | 26 |
| Figura 4. Perfil bioquímico materno..... | 27 |
| Figura 5. Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole..... | 28 |
| Figura 6. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole..... | 29 |
| Figura 7. Efeito da dieta materna sobre a homeostase glicêmica e lipídica da prole..... | 30 |
| Figura 8. Impacto da DRS materna sobre o sistema reprodutivo da prole..... | 31 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 14 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 3.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença..... | 15 |
| 3.2 Síndrome Metabólica..... | 17 |
| 3.3 Relação entre distúrbios metabólicos e disfunções reprodutivas..... | 19 |
| 3.4 Dieta materna e efeitos na saúde da prole..... | 21 |
| 4. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 5.1 Desenho experimental..... | 23 |
| 5.2 Dieta rica em sacarose (DRS)..... | 24 |
| 5.3 Administração de cloridrato de metformina..... | 24 |
| 5.4 Avaliação da abertura vaginal e ciclo estral..... | 24 |
| 5.5 Teste de tolerância à glicose (TTG)..... | 24 |
| 5.6 Análises bioquímicas..... | 25 |
| 5.7 Análise e estatística..... | 25 |
| 6. RESULTADOS | 25 |
| 6.1 Influência da DRS sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos materno | 25 |
| 6.2 Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole..... | 27 |
| 6.3 Efeito da DRS materna sobre a homeostase glicêmica e lipídica da prole..... | 29 |
| 6.4 Impacto da DRS materna sobre o sistema reprodutivo da prole..... | 31 |
| 7. DISCUSSÃO | 32 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 34 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| ANEXO A | 43 |
| ANEXO B | 45 |

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença epidêmica por conta de sua repercussão no cenário mundial. Houve um aumento substancial, entre os anos de 1975 e 2014, na média do índice de massa corporal (IMC) em homens (de 21,7 kg/m² para 24,2 kg/m²) e mulheres (de 22,1 kg/m² para 24,4 kg/m²), levando ao crescimento da prevalência de sobrepeso e obesidade que, se não atenuado, até 2025 atingirá 18% dos homens e mais de 21% das mulheres em todo o mundo (NCD-RisC, 2016). De acordo com dados obtidos pela vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), a prevalência de adultos obesos no Brasil foi estimada em 22,4%, com valores semelhantes entre mulheres (22,6%) e homens (22,3%) (BRASIL, 2020).

O sobrepeso e obesidade são fatores predisponentes para o desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), definida como um conjunto de fatores de risco, como a hipertrigliceridemia, hipertensão arterial e resistência insulínica (ALBERTI, 2009), sendo estes, fatores de risco ligado à distúrbios reprodutivos (CASTRO et al., 2014). Em mulheres obesas, há perturbações do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (eixo HPG), que geram disfunção menstrual, acarretando anovulação e infertilidade. Além de perturbações no eixo HPG, o tecido adiposo disfuncional libera adipocinas que interagem com várias vias moleculares, dentre elas vias mediadoras da sinalização de insulina, da diferenciação e da maturação de ovócitos (SILVESTRIS et al., 2018). Numa perspectiva intergeracional, a obesidade materna pode resultar em distúrbios metabólicos negativos tanto para a mãe quanto para a prole. A correlação entre obesidade materna e consequências adversas à saúde dos filhos é complexa e, provavelmente, envolve alterações no metabolismo de glicose e lipídios (GRILLO et al., 2022).

Para que se entenda até que ponto a obesidade materna pode influenciar a saúde da prole, pesquisadores tem se voltado para o conceito DOHaD, ou seja, para as origens desenvolvimentistas da saúde e doença. Este conceito pode ser definido como a resposta adaptativa do organismo a um insulto específico durante um período crítico de seu desenvolvimento, o qual pode levar a efeitos negativos na saúde que persistem a curto, médio ou longo prazo (ZAMBRANO; NATHANIELSZ, 2013). Estudos epidemiológicos com crianças nascidas com baixo peso por conta de restrição de crescimento intrauterino revelaram associações entre crescimento

intrauterino restrito, baixo peso ao nascer e função reprodutiva na idade adulta (IBANEZ et al., 2011).

Um dos principais insultos no ambiente intrauterino que pode levar à disfunções metabólicas e reprodutivas na idade adulta da prole é a dieta materna inadequada, sendo incluída tanto a subnutrição quanto o consumo de alimentos hipercalóricos (ELSAKR; GANNON, 2017). Em relação à alimentos hipercalóricos, podemos citar a dieta rica em açúcar, que prejudica tanto os índices glicêmicos/insulinêmicos quanto a saúde folicular ovariana, como demonstrado em estudos experimentais (DE MELO, 2021; AGARWAL et al 2018; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al 2015).

Alguns trabalhos tem avaliado nos efeitos do medicamento metformina em diversos sistemas fisiológicos. Este medicamento é primariamente utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), porém, haja vista a estreita relação entre distúrbios metabólicos e reprodutivos, tem-se utilizado a metformina para o tratamento de distúrbios ovarianos (QUIN et al 2019), sendo um possível reprogramador da saúde ovariana da prole exposta a insultos em períodos críticos de desenvolvimento.

Portanto, tendo em vista o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nas mulheres, causado principalmente pela dieta inadequada; assim como as implicações na saúde reprodutiva, tanto direta quanto intergeracionalmente; este trabalho busca elucidar o papel reprogramador da metformina, administrada na prole em fase peri-puberal, em um modelo experimental de mães expostas à uma dieta rica em açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito modulador do tratamento com metformina sobre parâmetros metabólicos e reprodutivos da prole de ratas expostas a uma dieta rica em sacarose, durante as fases gestacional e lactacional.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento peripuberal com metformina sobre parâmetros metabólicos glicolipídicos da prole de ratas expostas a uma dieta rica em sacarose, durante as fases gestacional e lactacional;

- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento peripuberal com metformina, sobre parâmetros reprodutivos em ratas descendentes de mães submetidas a uma dieta rica em açúcar.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença

O conceito DOHaD ganhou destaque a partir do relatório epidemiológico de Barker (1986). O relatório destacava, principalmente, que a nutrição pré-natal inadequada aumentava o risco do surgimento de várias doenças não transmissíveis na idade adulta, o que o levou à sua famosa hipótese (BARKER, 2007). A referida "hipótese de Barker" agora também é chamada de "hipótese de origem fetal" ou "programação de desenvolvimento" (SUZUKI, 2017). O conceito DOHaD traz a concepção de que o ambiente vivenciado por um indivíduo no início da vida pode definir sua saúde a longo prazo por meio de efeitos programados no desenvolvimento (GLUCKMAN, 2008).

Desde então, muitos estudos experimentais tem mostrado que o maior risco de obesidade, DM2 e doenças cardiovasculares (DCV) pode ser causado por insultos ambientais durante períodos críticos de desenvolvimento, como por exemplo, nutrição materna inadequada, estresse materno, disfunção placentária e hipóxia fetal crônica. Esses insultos levam ao acometimento de múltiplos órgãos, como mostram pesquisas em humanos e modelos animais, onde é constatado que a obesidade materna influencia negativamente o ambiente fetal, levando à predisposição a estas doenças (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012; GIUSSANI; DAVIDGE, 2013).

Atualmente, os mecanismos epigenéticos constituem a base teórica mais consistente no contexto do conceito DOHaD. As modificações epigenéticas, como metilação do DNA, regulação mediada por RNA não codificante e modificações de histonas, podem ser causadas por exposições ambientais durante a gestação ou no início da vida da prole. Entre estas modificações epigenéticas, a metilação do DNA é atualmente, o mecanismo melhor definido (AGARWAL et al., 2018). E assim, distúrbios metabólicos como obesidade, DM2 e DCV podem ser resultado da constância dessas modificações, como mostra a Figura 1.

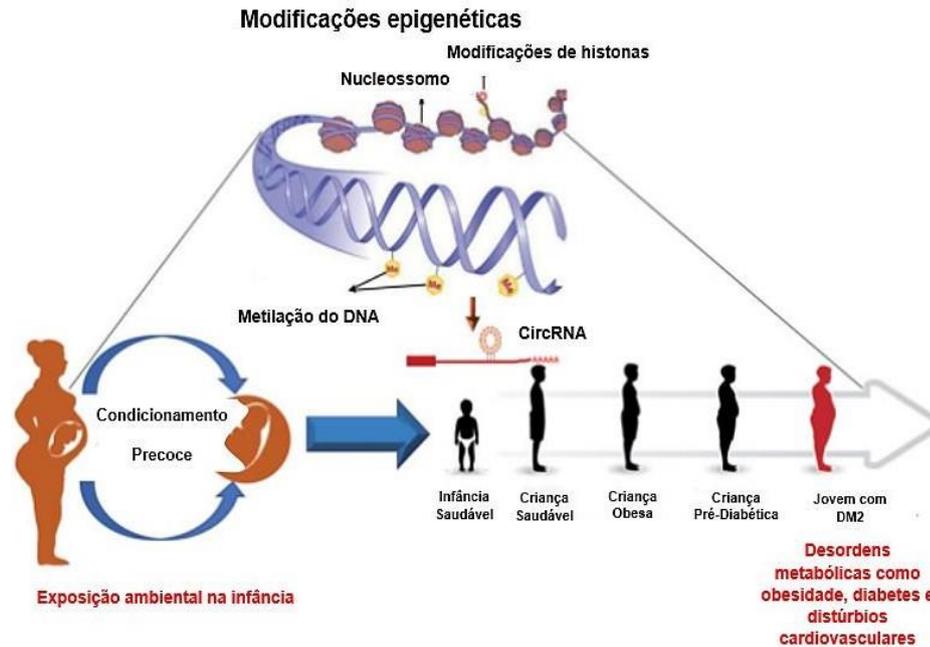


Figura 1. Mecanismos epigenéticos no contexto DOHaD. Demonstração da influência de um ambiente intrauterino desfavorável que pode levar à modificações no DNA, como metilação e modificação de histonas e consequentemente, o surgimento de doenças na vida adulta. Adaptado de Agarwal et al (2018).

Os insultos no período pré e pós-natal que levam ao maior risco de desenvolver a obesidade ou outras disfunções metabólicas a longo prazo são vastamente explorados em experimentos com modelos animais que possuem características fisiológicas similares àsquelas dos humanos (BARKER, 2007; BARKER, 2007). Estudos voltados para o conceito DOHaD geralmente investigam a dieta materna inadequada (dieta com alto teor de açúcar, hiperlipídica, ou fast-food- comida não saudável), obesidade materna ou as alterações epigenéticas na prole causadas pela dieta hiperlipídica (HSU; TAIN, 2021). Estão representados na Figura 2, os efeitos negativos de uma dieta materna hiperlipídica em diferentes sistemas na prole. No entanto, é importante levar em consideração o modelo animal, sexo, época e duração da exposição (WILLIAMS et al., 2014).

O consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares simples está aumentando entre mulheres, o que contribui para o ganho de peso durante a gestação. À vista disso, pesquisas que buscam encontrar esclarecimentos sobre os efeitos da dieta materna inadequada na saúde da prole, utilizam cada vez mais uma combinação de gorduras saturadas e sacarose, pois estas representam bem o padrão alimentar ocidental: açúcares simples e altos níveis de gordura (KERELIUK; BRAWERMAN; DOLINSKY, 2017).

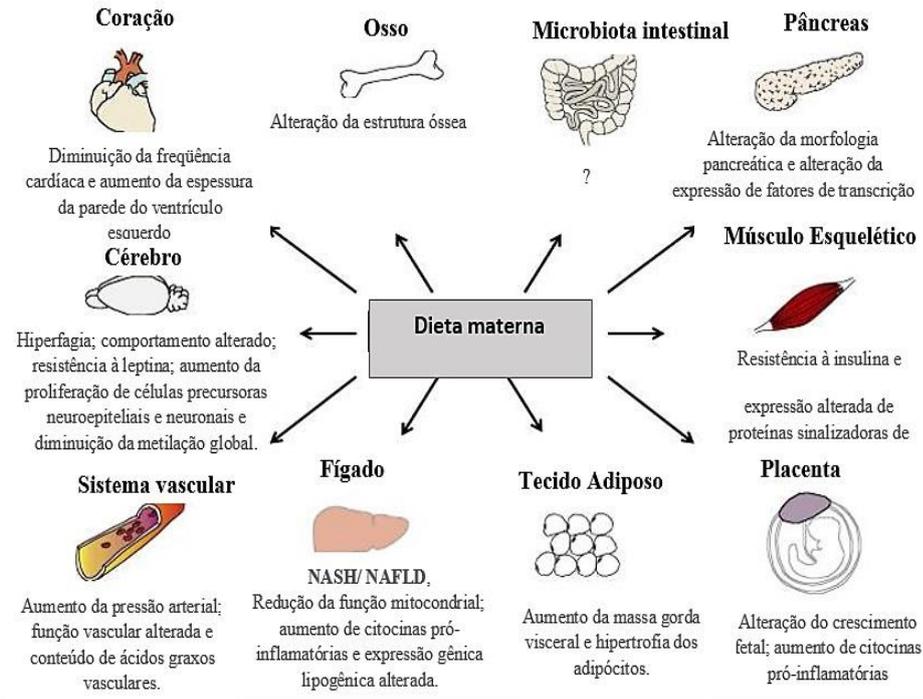


Figura 2. Consequências da dieta hiperlipídica materna em diferentes sistemas da prole. Fonte: Adaptado de Williams (2014).

3.2 Síndrome Metabólica

A SM é caracterizada pela presença de, pelo menos, três dos seguintes fatores de risco: hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, hiperglicemia, resistência insulínica e obesidade abdominal (ALBERTI et al., 2009). Além destas alterações metabólicas, a SM também tem sido associada ao maior risco de doença cardiovascular (DCV), diabetes melito tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2017) e síndrome dos ovários policísticos (SOP) (SAGVEKAR et al., 2018). Sendo assim, a SM é uma entidade clínica de substancial heterogeneidade, que não se restringe aos adultos, uma vez que, sua prevalência em populações mais jovens está crescendo em paralelo à obesidade infantil, aumentando-se o risco de doenças DCV e DM2 na idade adulta (FARIAS et al., 2018).

Os mecanismos pelos quais a SM se desenvolve parecem decorrer, primeiramente, da resistência periférica à ação da insulina. Tulloch-Reid et al (2004), observaram que o aumento do tecido adiposo subcutâneo abdominal e do tecido adiposo visceral estão fortemente correlacionados com a resistência à insulina (RI). No entanto, outros estudos mostraram que a incidência de resistência à insulina era maior em indivíduos com obesidade central em comparação àqueles com obesidade subcutânea (HAYASHI et al., 2008; PREIS et al., 2010). De fato, alguns autores

acreditam que a RI é o principal responsável pela associação entre obesidade visceral e doenças metabólicas (GALLAGHER; LEROITH; KARNIELI, 2010).

Denominamos de RI, o comprometimento da captação de glicose nos tecidos periféricos (músculo, fígado e tecido adiposo) e o aumento da produção endógena de glicose pelo fígado, resultando em hiperglicemia, em situações de jejum e pós-prandial (KAWAI; DE PAULA; ROSEN, 2012). Em um sentido mais abrangente, o estado resistente à insulina também inclui o comprometimento da ação da insulina no metabolismo lipídico e das proteínas (JO et al., 2009). No fígado, a RI promove aumento da lipogênese de novo, podendo resultar em dislipidemia, que é caracterizada pela diminuição do HDL-c e elevação dos níveis de LDL-c e triglicerídeos (MUSUNURU, 2010). Além disso, a RI aumenta a oxidação dos ácidos graxos livres (AGL) no soro e fornece substrato para a síntese de triglicerídeos no fígado (ALVAREZ et al., 2008). Além das dislipidemias estarem associadas com fatores genéticos e ambientais, como tabagismo e sedentarismo, o sobrepeso e obesidade também estão ligados a este distúrbio metabólico (GONZÁLEZ-RIVAS et al., 2018).

Sobrepeso e obesidade são definidos pela Organização Mundial da Saúde como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde (WHO, 2017). Os métodos antropométricos são os mais utilizados para medir altura, peso, dobras subcutâneas e índice de massa corporal (IMC) (WHO, 2017). Os indivíduos adultos são considerados com sobrepeso e obesos quando o IMC é $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, respectivamente. Em relação à população infantil, a classificação também se baseia no IMC, porém, neste caso, o excesso de peso é identificado quando o IMC é igual ou superior ao percentil 85 e obesidade se exceder o percentil 95, de acordo com os valores de referência para idade e sexo (WHO, 2017). A depender do valor do IMC, o paciente é classificado com baixo peso; normal; sobrepeso; obesidade classe I; obesidade classe II ou obesidade classe III (WHO, 2017).

Considerada uma doença multifatorial, a obesidade é resultado de uma relação complexa entre suscetibilidade genética e fatores ambientais. Muitos *locus* são conhecidos hoje associados ao desenvolvimento da obesidade. No entanto, dentre as diversas causas, o aumento drástico da obesidade nas últimas décadas foi desencadeado, principalmente, por fatores ambientais. Podemos citar, por exemplo, o fácil acesso a alimentos palatáveis ou hipercalóricos (ricos em gorduras saturadas e carboidratos refinados) (REBOLLEDO-SOLLEIRO et al., 2020).

Como consequência do maior acesso a alimentos palatáveis e hipercalóricos, nas últimas 4 décadas a obesidade infantil aumentou globalmente, tornando-se um problema para a saúde pública (LIN et al., 2018). E este é um fator preocupante, levando em consideração que a obesidade na infância geralmente leva à obesidade adulta (FREEDMAN et al., 2007). Além disso, em mulheres, existe uma complexa interrelação entre a SOP, RI e obesidade. Provavelmente, a hiperinsulinemia é um mecanismo que contribui nessa interrelação, visto que a insulina, além do impacto no metabolismo em geral, controla o metabolismo androgênico, estimula o desenvolvimento de folículos e a produção de andrógenos ovarianos (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2007).

3.3 Relação entre distúrbios metabólicos e disfunções reprodutivas

A dieta inadequada está ligada ao surgimento de disfunções reprodutivas. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, De Melo et al (2021) demonstrou uma correlação entre a prevalência de SOP e o consumo de bebidas açucaradas, principalmente na faixa etária de mulheres em idade reprodutiva. Além da SOP, a puberdade precoce, ciclos menstruais irregulares e infertilidade são outros exemplos de disfunções reprodutivas causadas pela dieta inadequada, sendo acompanhadas frequentemente por obesidade, hiperinsulinemia, RI e hiperandrogenismo (PANDEY et al., 2010; ADAIR; GORDON- LARSEN, 2001; EHRMANN, 2005; MCCARTNEY; MARSHALL, 2016).

Há uma estreita ligação entre produção de andrógenos e RI, pois os ovários permanecem sensíveis à insulina e por esta razão, tornam-se vulneráveis ao efeito da hiperinsulinemia (WU et al., 2014). Sob aumento da concentração circulante de insulina, a produção ovariana de andrógenos aumenta tanto por efeito direto, quanto por aumento da sensibilidade ao hormônio luteinizante (LH), conforme definido por Wu et al (2014), resultando em danos ao sistema reprodutor (CASTRO et al., 2014). Os esteróides sexuais, estrógenos (17β -estradiol-E2 e estronaE1) e andrógenos (testosterona-T, di-hidrotestosterona DHT, androstenediona e desidroepiandrosterona), sofrem mudanças na produção de acordo com o aumento de peso, pelo fato de o tecido adiposo ser capaz de sintetizar diretamente estes hormônios, convertendo andrógenos em estrogênios (QUINKLER et al., 2004). Além disso, a hiperinsulinemia leva à diminuição da produção da globulina ligadora de

hormônios sexuais (SHBG) trazendo um aumento da disponibilidade de andrógenos (TOPRAK et al., 2001)

Segundo Poston et al (2016), a prevalência de obesidade entre mulheres em idade reprodutiva está aumentando exponencialmente nos últimos anos. E a obesidade materna é prejudicial não apenas para a mãe (favorece o aparecimento de diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e aborto), mas também para o bebê (anomalias congênitas, natimortalidade), além de efeitos observados a longo prazo, sendo denominado de “programação de desenvolvimento” (ZAMBRANO et al., 2016; GLUCKMAN, 2008).

A secreção e o metabolismo de hormônios sexuais sofrem efeitos negativos na obesidade resultando em mudanças na biodisponibilidade de andrógenos e estrogênio. Com o aumento da adiposidade, a aromatização de andrógenos a estrógenos sofre elevação gerando um incremento nos níveis livres de estradiol e testosterona. Outrossim, com uma hiperinsulinemia associada, a elevação desses hormônios é ainda mais intensificada, resultando em uma diminuição de SHBG e aumento da produção de andrógenos ovarianos (LEVENS; SKARULIS, 2008). São diversos os mecanismos pelos quais a obesidade causa ou exacerba a infertilidade. Dentre os mecanismos existentes, podemos destacar um aumento na concentração de leptina no soro e no fluido folicular decorrente do IMC alto bem como a diminuição dos níveis séricos de adiponectina (METWALLY; LI; LEDGER, 2007).

A leptina que atua através dos receptores nas células da teca e da granulosa inibe a esteroidogênese ovariana e níveis mais baixos de adiponectina estão relacionados com o aumento da insulina circulante, que pode causar hiperandrogenemia, em parte, inibindo a produção hepática de SHBG (globulina de ligação ao hormônio sexual) (GIL-CAMPOS; CANETE; GIL, 2004). Ademais, a insulina, que atua via IGF1, aumenta a esteroidogênese mediada por LH no sistema celular do ovário e, desse modo, aumenta os andrógenos ovarianos (BERGH et al., 1993).

Em resumo, a SHBG, o hormônio do crescimento (GH) e as proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP), sofrem diminuição e os níveis de leptina, elevação. Assim, a neuroregulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) deteriora-se. Portanto, essas alterações podem explicar a função ovulatória prejudicada e, conseqüentemente, a saúde reprodutiva (PARIHAR, 2003).

Para o diagnóstico de SOP e outras disfunções reprodutivas, de acordo com o Consenso de Rotterdam (2004), é necessário que se excluam outras causas de irregularidade menstrual e hiperandrogenismo. Dado o diagnóstico, o tratamento costuma ser a atividade física para a redução da RI. As opções medicamentosas incluem os anticoncepcionais orais, progestágenos, antiandrogênicos, inibidores estrogênicos e agentes sensibilizadores de insulina, como a metformina (PEREIRA, 2015).

Os anticoncepcionais orais são amplamente utilizados como tratamento para a SOP, por melhorarem os sintomas dessa condição, como por exemplo, o hirsutismo e a acne (FRAISON, 2020). Porém, o medicamento metformina possui mecanismo de ação que atua na melhora da sensibilidade à insulina e conseqüentemente, redução dos níveis de andrógenos ovarianos, melhorando assim, tanto alterações metabólicas quanto os sintomas da SOP (KATSIKI, 2010), sendo uma boa opção para mulheres que apresentam SM e distúrbios reprodutivos.

3.4 Dieta materna e efeitos na saúde da prole

A exposição a um ambiente desfavorável durante a gravidez e lactação alteram a fisiologia fetal ou metabolismo neonatal, propiciando o desenvolvimento de doenças ou funções fisiológicas alteradas na vida adulta (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Essas alterações incluem hipertensão, dislipidemias, doenças cardiovasculares e disfunções reprodutivas (ZAMBRANO et al., 2014; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2015).

Através de experimentos em animais e estudos com humanos, foi observado que a maturação e função reprodutiva são influenciadas por eventos precoces. Além de, muitas vezes, a história nutricional pré e pós-natal ser determinante para a função reprodutiva da prole (SLOBODA et al., 2009). A história nutricional refere-se aos déficits e aos excessos nutricionais em fase intra-uterina, lactacional e pós-desmame, causando perturbações a nível reprodutivo na prole, tais como: declínio na reserva folicular, taxas de ovulação alteradas, aceleração da fase de menarca e menopausa precoce (SLOBODA et al., 2009; GARDNER; OZANNE; SINCLAIR, 2009; TOM et al., 2010).

Certos eventos levam a uma condição de “relativo hiperandrogenismo funcional”, o que pode prejudicar a função ovariana, favorecendo o desenvolvimento de infertilidade na obesidade (GAMBINERI et al., 2019). Tendo como exemplo, o estudo de Chan et al (2018), onde ratas prenhas foram alimentadas com uma dieta

padrão durante a gravidez e lactação, ou uma dieta restrita em calorias (50% de controle) durante a gravidez, mostra que a diminuição de folículos antrais na prole foi acompanhada pela irregularidade do ciclo estral, por conta do estro persistente, sendo o último, sinal de síndrome dos ovários policísticos e de envelhecimento ovariano. Denomina-se de envelhecimento ovariano a diminuição das funções ovarianas, o declínio da quantidade e qualidade dos folículos ovarianos e por fim, a menopausa. Dentre os agentes anti-envelhecimento, a metformina é um dos principais estudados (QIN et al., 2019).

4. JUSTIFICATIVA

Cheong et al (2014) demonstraram que a obesidade materna induzida por uma dieta rica em gordura influencia diretamente o número de folículos primordiais, folículos antrais e folículos de Graaf da prole, bem como, a expressão de genes envolvidos com apoptose (FoxO3a), crescimento e desenvolvimento folicular (Gdf9) e geração de ritmos circadianos (Clock e Bmal1) nos ovários. Os autores concluíram ainda, que a dieta materna não interage com a dieta da prole, ou seja, mesmo que a prole tenha uma nutrição adequada pós-desmame, isto não exclui os efeitos deletérios no sistema reprodutor causados pela dieta da mãe. Em nosso grupo de pesquisa, já foi demonstrado que a exposição à dieta rica em sacarose leva à puberdade precoce, aumento do número de folículos antrais atresícos, folículos císticos e hipertrofia de adipócitos periovarianos, implicando diretamente na saúde ovariana (DE MELO, 2021).

É importante que se entenda com mais clareza os efeitos negativos do padrão nutricional da mãe sobre o sistema reprodutivo da prole. Além disso, faz-se necessária a busca por agentes farmacológicos que possam atenuar esses efeitos. Recentemente, demonstrado por Qin et al (2019), que a metformina é capaz de prevenir o envelhecimento dos ovários de murinos e ajudar na regularidade estral em animais adultos. Porém, não está demonstrado se este mesmo agente farmacológico pode ser efetivo na pré-puberdade.

Desta forma, investigamos a hipótese de que a administração de metformina em fase peripuberal é eficiente na reprogramação metabólica com vistas à prevenção de disfunções ovarianas na prole de ratas fêmeas expostas a uma dieta rica em sacarose durante a perigestação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental

Ratos com 21 dias de vida (*Rattus norvegicus*) Wistar machos (n=12) e fêmeas (n=12), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio da Pós-Graduação do CCBS com uma temperatura (23 ± 2 °C) constante, ciclo claro/escuro de 12h e acesso a água e alimento ad libitum. Após o período de aclimação, as fêmeas com 30 dias de vida, foram divididas em dois grupos, um grupo (n=6) que foi exposto à dieta rica em sacarose (DRS) durante 8 semanas antes do acasalamento e um grupo (n=6) que foi exposto à ração padrão (CTR) por igual período. Os machos, foram alimentados com ração padrão durante todo o período experimental. Após 8 semanas, os animais foram acasalados. Para a confirmação do acasalamento, realizou-se lavado vaginal matinal com o objetivo de verificar a presença de espermatozoides. Os grupos de fêmeas CTR e DRS, permaneceram em suas respectivas dietas durante a gestação e lactação.

A prole fêmea foi pesada ao nascer, no 7º, 14º e 21º dia de vida. Após o desmame, a prole fêmea das mães CTR (n=10), recebeu solução salina 0,9% (1 ml/100g, via oral); enquanto a prole fêmea das mães DRS foi dividida em dois grupos: a que recebeu solução salina 0,9% (DRS, n=8); e a que recebeu metformina (300 mg/kg/dia, v.o., DRS_{Met}, n=8). As proles CTR, DRS e DRS_{Met} foram tratadas do 30º ao 51º dia de vida, período relativo à fase peripuberal dos animais utilizados neste estudo. O acompanhamento ponderal e o consumo de ração das proles foram realizados 2 vezes por semana desde o desmame (21 dias de vida). A avaliação da abertura vaginal foi a partir do 30º dia. Já a ciclicidade estral, entre 75º e 105º dia.

Ademais, o teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado no final do período experimental, por volta dos 102 dias. Com 105 dias de vida, foi realizado o índice de Lee, para a determinação de obesidade, mensurado através da fórmula $[IL = \text{peso corporal (g)}^{1/2} / \text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000]$ (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). No mais, os animais foram eutanasiados sob anestesia com injeção de cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para coleta de órgãos. Foram coletadas alíquotas de sangue e posteriormente, efetuada a separação do soro, para as análises bioquímicas.

5.2 Dieta rica em sacarose (DRS)

Para a preparação da DRS, foi utilizada a metodologia de Pinto e colaboradores (2016). Para isso, 40% do pó da ração padrão para roedores Nuvilab® (Nuvital, Brasil) foi misturada com 8,5% de açúcar refinado, 40% de leite condensado e 10,5% de água filtrada. Quando homogênea, a massa foi manipulada em forma cilíndrica (semelhante à ração padrão) e colocada em estufa a 38 °C durante 3 dias. Em seguida, a DRS era armazenada em geladeira, no período máximo de 7 dias.

5.3 Administração de cloridrato de metformina

Durante o período de tratamento (30 a 51 dias de vida), enquanto os animais CTR recebiam solução salina 0,9% (1 ml/100g, via oral), a prole fêmea DRS_{Met} recebia 300 mg/kg/dia, v.o, de cloridrato de metformina, seguindo o mesmo protocolo adotado por Hufnagel et al (2021).

5.4 Avaliação da abertura vaginal e do ciclo estral

A avaliação da abertura vaginal foi a partir do 30º dia. A ciclicidade estral foi realizada entre o 75º e 105º dia, seguindo o método de Marcondes, Bianchi e Tanno (2002). Os esfregaços vaginais foram coletados por volta das 8:00 e 9:00 horas da manhã durante os 30 dias consecutivos para a determinação da condição do ciclo estral. A coleta da secreção vaginal foi feita com pipeta automática com 20uL de solução salina (NaCl a 0,9%) e depois o material depositado nas lâminas de vidro à fresco e observado em microscopia óptica com lentes de 10× e 40×.

5.5 Testes de tolerância à glicose (TTG)

Para o teste de tolerância à glicose (TTG) os animais ficaram em um jejum de 8 horas antes da administração do *bolus* de glicose (4 g/ kg) via intraperitoneal. A coleta das gotas de sangue foi feita através de punção da veia caudal utilizando agulhas (25x0,7G). A avaliação da glicemia com glicosímetro (Accu- Chek Active®, Roche, EUA) foi realizada antes da administração da glicose (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 minutos após.

5.6 Análises bioquímicas

O sangue coletado foi centrifugado (3500 rpm, 10 min) para obtenção do soro para determinação das concentrações de triglicerídeos e colesterol seguindo

orientações do fabricante (Labtest®, Brasil). As glicemias em jejum e alimentada foram mensuradas durante os ensaios do TTG.

5.7 Análise e estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (e.p.m). Utilizou-se o teste t de Student e os grupos foram comparados também através do ANOVA, utilizando o Newman – Keuls como pós-teste. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Prism 8.0 (GraphPad, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Influência da DRS sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos materno

Para avaliar o efeito da DRS sobre o perfil ponderal, os grupos de fêmeas CTR (n=6) e DRS (n=6) foram pesados duas vezes por semana antes do acasalamento (8 semanas), durante a gestação e lactação. Após o período de lactação, as fêmeas foram eutanasiadas para a coleta de sangue e análise morfométrica de órgãos. Como mostra a Figura 3A, não há diferença de peso corporal entre os grupos durante o período total de acompanhamento, porém, ao final do período de indução pré-gestacional (Figura 3C) as mães DRS demonstraram aumento significativo no índice de Lee (CTR $318,0 \pm 1,161$ vs. DRS $328,2 \pm 2,016$, $p=0,0014$), indicando um aumento de massa corporal influenciada pela dieta rica em sacarose. O aumento da massa corporal pré-gestacional não interferiu, entretanto, no índice de prolificidade das mães DRS, quando comparadas às CTR (Figura 3E). Após o desmame, as mães foram eutanasiadas e realizou-se coleta do tecido adiposo periovariano, periuterino, mesentérico e retroperitoneal das mães CTR e DRS, porém não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 3F-I).

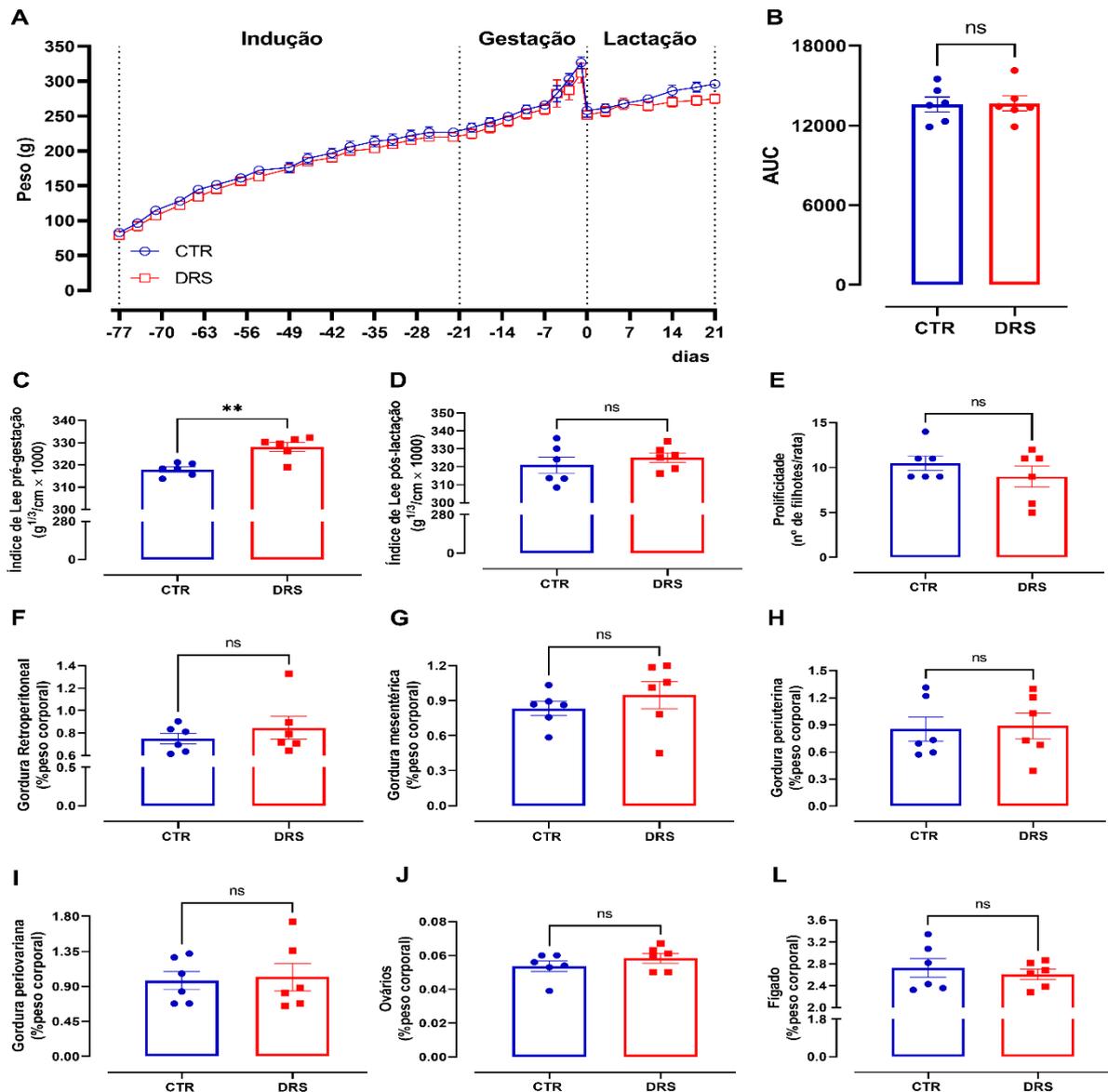


Figura 3. Influência da DRS sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos materno. (A) Acompanhamento ponderal dos grupos antes do acasalamento, durante a gestação e lactação. (B) Área sob a curva (AUC) do ganho de peso corporal. (C) Índice de Lee no período pré-gestacional, obtido através do cálculo da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasopal dos animais. (D) Índice de Lee no período pós-lactação. (E) Índice de prolificidade obtido através do cálculo do tamanho da ninhada entre as mães. (F-L) Parâmetros morfométricos. (F) gordura retroperitoneal; (G) gordura mesentérica; (H) gordura periuterina; (I) gordura periovariana; (J) ovários; (L) fígado. Os valores foram expressos com média \pm e.p.m., sendo 6 fêmeas do grupo CTR e 6 fêmeas do grupo DRS. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

A fim de estabelecer quais os efeitos da DRS sobre os parâmetros bioquímicos das mães, foram medidos os níveis de triglicerídeos, colesterol e glicemia após o desmame (Figura 4A-C). Além disso, para verificar se os animais apresentavam

resistência à insulina, foi realizado o índice TyG (que corresponde ao produto dos níveis de triglicerídeos e glicemia em jejum). Os animais do grupo DRS não apresentaram diferenças significativas nos índices glicêmicos e de triglicerídeos, o que resultou em ausência de diferença do TyG. Porém, como mostra a Figura 4C, os animais do grupo DRS apresentaram elevados níveis de colesterol quando comparados com o grupo CTR (CTR $60,32 \pm 5,305$ vs. DRS $101,9 \pm 11,32$, $p=0,0126$).

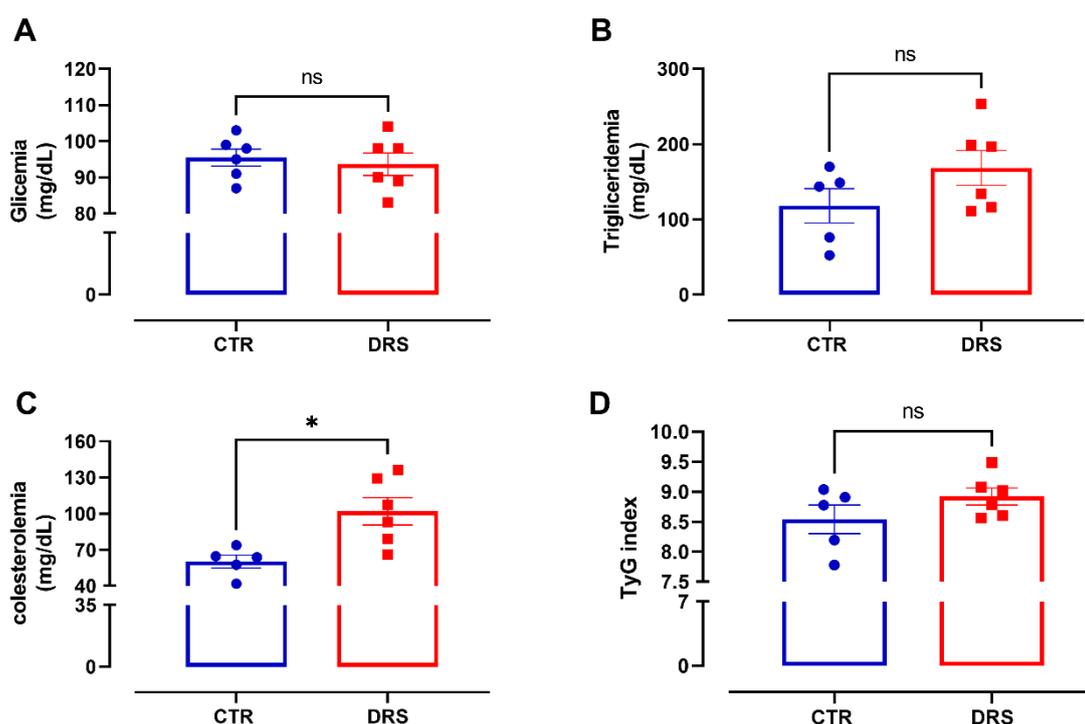


Figura 4. Perfil bioquímico materno. (A) glicose em jejum; (B) triglicerídeos total; (C) colesterol total; (D) TyG. Os valores foram expressos com média \pm e.p.m., sendo 6 fêmeas do grupo CTR e 6 fêmeas do grupo DRS. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. * $p<0,01$ quando comparado ao grupo controle.

6.2 Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole

Com o objetivo de verificar se havia diferença de peso entre os descendentes de mães CTR e DRS, a prole foi pesada nos dias pós-natal 1, 7, 14 e 21, além de 2 vezes na semana após o desmame. Como mostra na Figura 5C, a DRS influenciou o peso corporal ao nascimento (CTR $5,770 \pm 0,09434$ vs. DRS $6,263 \pm 0,1056$, $p=0,0038$) assim como ao desmame nos 21 dias de vida (CTR $45,39 \pm 0,6063$ vs. DRS $51,21 \pm 0,4629$, $p=0,0001$), representando um efeito precoce da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole. Após o desmame (21 dias), a prole foi dividida em 3 grupos:

o grupo que recebeu NaCl 0,9% dos 30 aos 51 dias de vida: CTR (n=15); o grupo sem tratamento nascido de mães DRS (n=8); e o grupo tratado com metformina, DRS_{Met} (n=8). Embora a prole DRS tenha demonstrado aumento de peso no período pré-desmame, após a lactação não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sugerindo um papel importante da dieta controle na reversão do aumento de peso corporal.

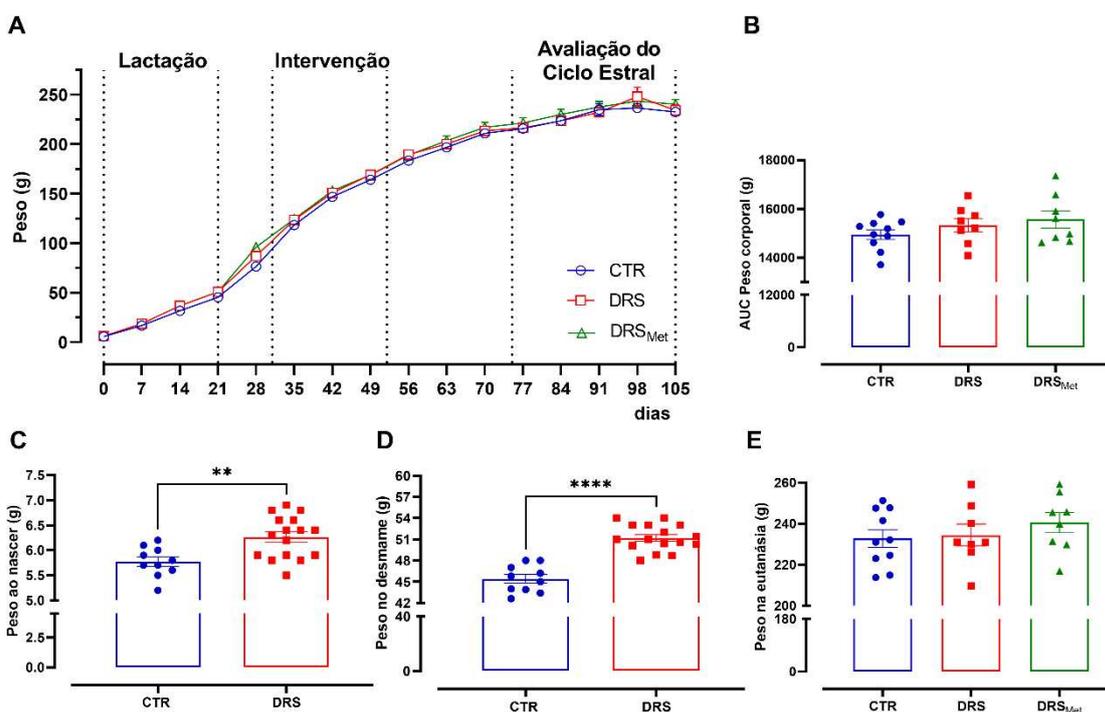


Figura 5. Efeito da dieta materna sobre o perfil ponderal da prole. (A) Acompanhamento de peso no período lactacional e pós-desmame. (B) AUC do peso corporal após o desmame (C) Peso ao nascer. (D) Peso no desmame. (E) Peso na eutanásia. Os valores foram expressos com média \pm e.p.m., sendo 10 fêmeas do grupo CTR, 8 fêmeas do grupo DRS e 8 fêmeas do grupo DRS_{Met} . A análise estatística foi realizada através do teste t de Student não pareado. ** $p < 0,0038$. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo CTR.

Após o período de 105 dias de acompanhamento, a prole fêmea foi eutanasiada para a coleta de sangue e órgãos. A Figura 6 representa a análise morfométrica de órgãos da prole dos grupos CTR, DRS e DRS_{Met} . Como pode ser observado, o tecido adiposo marrom do grupo DRS_{Met} apresentou aumento de peso quando comparada ao grupo DRS (CTR $0,1196 \pm 0,005178$ vs DRS $0,1039 \pm 0,006046$ vs DRS_{Met} $0,1319 \pm 0,007731$, $p = 0,0202$). Além disso, foi observada uma diminuição de peso uterino no

grupo DRS quando comparado ao grupo CTR (CTR $0,2467 \pm 0,01204$ vs DRS $0,1964 \pm 0,01173$ vs DRS_{Met} $0,2089 \pm 0,008568$, $p < 0,0098$).

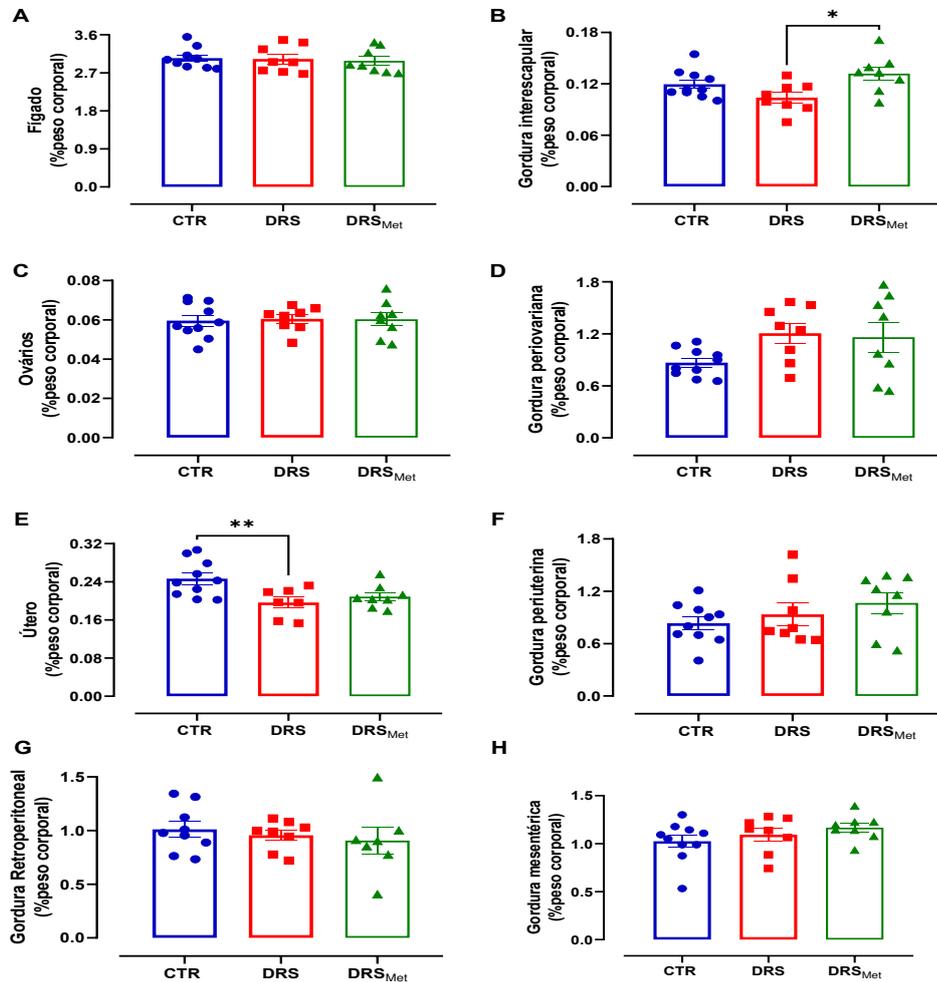


Figura 6. Parâmetros morfométricos de órgãos e tecidos da prole. (A) Fígado. (B) Gordura interescapular (C) Ovários. (D) Gordura periovariana. (E) Útero. (F) Gordura periuterina. (G) Gordura Retroperitoneal. (H) Gordura mesentérica. Os valores foram expressos com média \pm e.p.m., sendo 15 fêmeas do grupo CTR, 8 fêmeas do grupo DRS e 8 fêmeas do grupo DRS_{Met}. A análise estatística foi realizada através do *One-Way ANOVA*. * $p < 0,0202$ quando comparado ao grupo CTR. ** $p < 0,0098$ quando comparado ao grupo CTR.

6.3 Efeito da DRS materna sobre a homeostase glicêmica e lipídica da prole

Na avaliação do perfil bioquímico pós-desmame (Figura 7A), constatou-se aumento dos níveis de glicemia em jejum na prole (CTR $122,7 \pm 2,124$ vs DRS $139,5 \pm 3,035$, $p = 0,0004$) apesar de não haver diferenças na glicemia pós-prandial quando comparada com o grupo CTR. Além disso, no TTG (Figura 7B-C), realizado 3 dias antes do final do período experimental, por volta dos 102 dias, observou-se no grupo

DRS a instauração da intolerância à glicose, enquanto o grupo DRS_{Met} apresentou padrão de absorção de glicose próximo ao grupo CTR, reafirmado pela área sob a curva (CTR 10129 ± 1326 vs DRS 18364 ± 2122 vs DRS_{Met} 10942 ± 1474 , CTR vs DRS $p= 0,0046$; DRS vs DRS_{Met} , $p= 0,0156$). Em relação aos níveis de triglicerídeos (Figura 7E), o grupo DRS mostrou um aumento significativo, enquanto o grupo tratado, DRS_{Met} , mostrou valores próximos ao CTR (CTR $23,96 \pm 0,8679$ vs DRS $40,71 \pm 2,488$ vs DRS_{Met} $27,41 \pm 1,247$, CTR vs DRS $p< 0,0001$; DRS vs DRS_{Met} , $p< 0,0001$), sugerindo um efeito metabólico benéfico do medicamento metformina, mesmo após o período de tratamento. Ademais, foi realizado o TyG (Figura 7F), que é um parâmetro obtido através dos valores de glicemia e triglicerídeos em jejum. Nessa avaliação, o grupo DRS apresentou aumento significativo em comparação ao grupo CTR. Porém, o grupo tratado, DRS_{Met} , mostrou valores próximos ao grupo CTR, reforçando que a intervenção precoce na puberdade preveniu o desfecho metabólico deletério na idade adulta (CTR $7,017 \pm 0,03989$ vs DRS $7,444 \pm 0,04461$ vs DRS_{Met} $7,056 \pm 0,04807$, CTR vs DRS, $p< 0,0001$; DRS vs DRS_{Met} , $p<0,0001$).

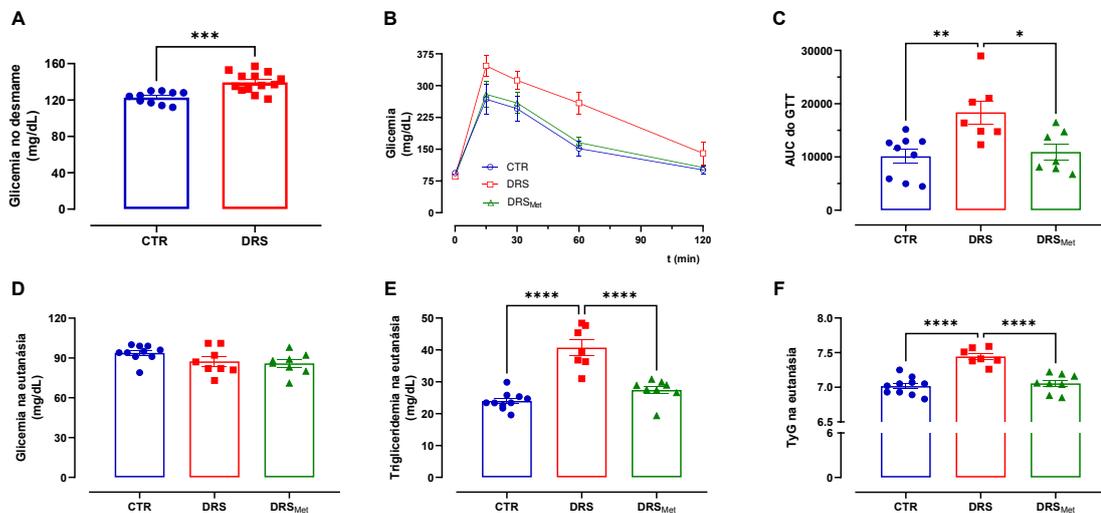


Figura 7. Efeito da dieta materna sobre a homeostase glicêmica e lipídica da prole. (A) Glicemia no desmame. (B) Teste de Tolerância à Glicose. (C) Área sob a curva do TTG. (D) Índices glicêmicos na eutanásia. (E) Trigliceridemia na eutanásia. (F) TyG na eutanásia. Os valores foram expressos com média \pm e.p.m., sendo 15 fêmeas do grupo CTR, 8 fêmeas do grupo DRS e 8 fêmeas do grupo DRS_{Met} . A análise estatística foi realizada através do One-Way ANOVA. * $p< 0,0156$ quando comparado ao grupo CTR. ** $p< 0,0046$ quando comparado ao grupo CTR. *** $p< 0,0004$ quando comparado ao grupo CTR. **** $p< 0,0001$ quando comparado ao grupo CTR.

6.4 Impacto da DRS materna sobre o sistema reprodutivo da prole

Para verificar a consequência da DRS materna no início da puberdade, avaliou-se o período de abertura vaginal a partir dos 30 dias de vida da prole fêmea. Como mostra a Figura 8A, a prole de mães DRS, DRS e DRS_{Met}, entrou na puberdade mais cedo (CTR $42,80 \pm 0,2906$ vs DRS $39,50 \pm 0,2673$ vs DRS_{Met} $39,75 \pm 0,3134$; CTR vs DRS, $p < 0,0001$; CTR vs DRS_{Met}, $p < 0,0001$), confirmando um efeito da dieta materna sobre o sistema reprodutivo da prole. Além disso, também foi verificada a ciclicidade estral durante 30 dias, entre 8 e 10 h da manhã, entre os 75 e 105 dias de vida dos animais, porém sem diferenças significativas entre os grupos em relação à regularidade do ciclo (Figura 8B-D).

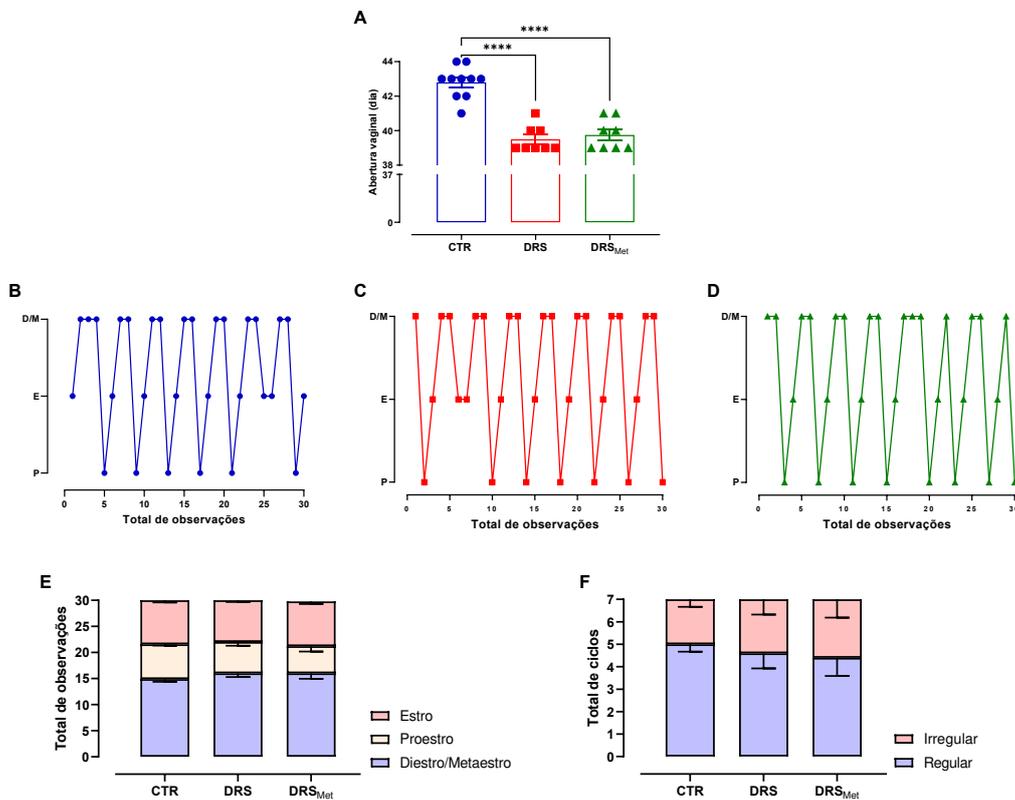


Figura 8. Impacto da DRS materna sobre o sistema reprodutivo da prole. (A) Abertura vaginal avaliada diariamente, a partir dos 30 dias de vida dos animais. (B-D) Avaliação do ciclo estral, em que proestro é identificado como (P), estro (E), metaestro (M) e diestro (D). (E) Quantitativo de cada fase do ciclo estral entre os grupos. (F) Total de ciclos regulares e irregulares entre os grupos.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, testamos a hipótese de que a metformina é eficiente na reprogramação de desfechos metabólicos e reprodutivos de ratas descendentes de mães expostas à uma dieta rica em sacarose durante a gestação e lactação. Além de avaliarmos parâmetros na prole, as mães também foram avaliadas. Após o período de acompanhamento, foi constatado que as mães apresentaram aumento no índice de Lee no período pré-gestacional, porém não apresentaram diferenças no peso corporal e eficiência energética. Além disso, houve aumento do colesterol sérico total.

A DRS não influenciou no ganho de peso corporal materno, de acordo com nossos achados anteriores (DE MELO et al., 2021), porém, as mães DRS apresentaram maior consumo energético (dados não mostrados) quando comparados com o grupo CTR. Isso pode ser explicado pelo aumento da palatabilidade, levando em consideração que os alimentos com alto teor de carboidratos simples e doces são mais aceitáveis em comparação aos alimentos com baixo teor de carboidratos (BELLISLE, 2015).

Além de mais palatáveis, os alimentos ricos em sacarose contribuem para o aumento de triglicerídeos e colesterol. No nosso trabalho não foram encontradas diferenças significativas de triglicerídeos entre os grupos, porém, houve um aumento nos níveis de colesterol materno. Isso deve-se ao fato de que a sacarose, quando hidrolisada, separa-se em duas moléculas: a glicose e a frutose. Enquanto a glicose é a responsável por provocar uma resposta glicêmica e insulinêmica, a frutose é metabolizada no fígado, sendo convertida em trioses que podem ser usadas para a síntese de novo de triglicerídeos e colesterol (FRAYN & KINGMAN, 1995; HELLERSTEIN, 2002).

Quanto à prole fêmea, verificamos que a descendente de mães DRS apresentou aumento de peso ao nascer e no desmame. Cardenas-Perez et al (2018), que utilizaram três tipos de dietas em seu estudo: dieta rica em gordura (HFD); dieta de cafeteria (CAF) e dieta rica em açúcar (HSD), observaram uma diminuição de peso da prole de mães CAF e um aumento de peso corporal na prole de mães HSD, semelhante aos achados de nosso estudo. No entanto, após o desmame, a prole fêmea DRS não apresentou diferenças significativas de peso em comparação ao grupo CTR. Alguns estudos relatam a necessidade de um desafio metabólico pós-natal para que os efeitos da programação sejam mostrados (KING et al., 2014).

Portanto, esse resultado pode ser devido à falta de desafios metabólicos, levando em consideração que todos os grupos de prole receberam dieta padrão pós-desmame.

Além do maior peso corporal, a prole fêmea DRS também apresentou hiperglicemia em jejum no desmame, resultado semelhante ao encontrado no estudo de Maciejczyk et al (2018), em que foi observado que a dieta rica em sacarose, por um período de oito semanas, provocou aumento nos níveis de glicemia em jejum e de insulina, o que pode sugerir que a DRS afeta a homeostase da glicose. Porém, na idade adulta, os animais DRS não apresentaram hiperglicemia em jejum, embora fossem intolerantes à glicose. Sendo que, o grupo tratado, DRS_{Met}, mostrou padrão de absorção de glicose semelhante ao grupo CTR. Portanto, a administração de metformina no grupo DRS_{Met} pode ter melhorado a sensibilidade à insulina, efeito este que permaneceu mesmo após o tratamento, contribuindo assim para melhor absorção glicêmica. Segundo Grisouard et al (2010), a metformina é capaz de aumentar a disponibilidade de GLUT4, favorecendo assim, a mobilização de glicose para os tecidos, sendo então capaz de reverter distúrbios ligados à homeostase da glicose.

Também foi observada no grupo DRS_{Met}, uma redução dos níveis de triglicerídeos e ausência de RI, confirmada pelo TyG com valores próximos aos do grupo CTR. Essas reversões podem estar ligadas ao fato de que a metformina aumenta a atividade de enzimas lipolíticas e ativa a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (MUSI et al, 2002). A ativação dessa proteína, por diversos mecanismos, provoca a redução na síntese de malonil-CoA. Esta redução estimula o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias para a β -oxidação (SCHREURS et al., 2010). Em resumo, além da metformina melhorar a sensibilidade à insulina, também funciona como agente lipolítico e promotor da oxidação de ácidos graxos.

A prole fêmea descendente de mães DRS entrou na puberdade mais cedo, o que foi verificado através da idade de abertura vaginal. Mesmo sem diferenças significativas relacionadas ao percentual de gordura entre os grupos de prole CTR e DRS, a prole de mães DRS era mais pesada que a prole CTR desde o primeiro dia de nascimento. Essa diferença de peso corporal pode ter programado a saúde reprodutiva da prole fêmea e levado à antecipação da puberdade, uma vez que o fornecimento excessivo de energia está relacionado à puberdade precoce, segundo Connor et al (2012).

Nos parâmetros reprodutivos até agora analisados, não foram detectados efeitos diretos do tratamento com metformina. Embora a prole DRS apresentasse puberdade precoce, esse resultado não influenciou na diferença de regularidade do ciclo estral. Porém, esse achado está de acordo com nossos dados anteriores (DE MELO et al., 2021), em que não foi observada diferença no ciclo estral entre os grupos, entretanto, na análise histológica foram identificadas alterações na morfologia ovariana. Portanto, é necessário que no presente estudo, seja realizada a verificação histológica para confirmar se a dieta rica em sacarose foi capaz de provocar alterações na morfologia ovariana, de forma intergeracional, e se a metformina será capaz de atenuá-los.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, tem-se a obesidade como uma das principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que mais acometem mulheres em idade reprodutiva. Essa prevalência crescente é preocupante, tendo em vista que os distúrbios metabólicos e reprodutivos são percebidos também de forma intergeracional. Paralelo ao aumento crescente de SM e obesidade, o consumo de alimentos e bebidas açucaradas tem ganhado destaque, independentemente do nível socioeconômico do país. Portanto, o presente estudo utilizou uma dieta rica em sacarose com composição semelhante à dieta ocidental, para demonstrar as consequências metabólicas do consumo de açúcar. Ademais, foi demonstrado de que forma a DRS programou as desordens metabólicas e reprodutivas na prole fêmea, exposta indiretamente à DRS, e se a metformina foi capaz de reprogramar essas condições.

Quanto às mães, os principais achados foram o aumento do índice de Lee no período pré-gestacional, além de hipercolesterolemia. Em relação aos descendentes, observou-se que a DRS materna afeta a homeostase da glicose na prole não tratada, enquanto a prole tratada com metformina conseguiu restaurar o padrão fisiológico glicêmico. Além disso, o tratamento com metformina conseguiu reverter a hipertrigliceridemia assim como a RI. Por fim, a prole DRS entrou na puberdade mais cedo que a CTR, confirmando um dano reprodutivo, de forma intergeracional, causado pela dieta materna rica em açúcar.

Portanto, reforça-se a importância de mais estudos acerca da reprogramação metabólica causada pela metformina e investigação desse medicamento em outras abordagens experimentais.

REFERÊNCIAS

ADAIR, L.S, GORDON-LARSEN, P. Maturational timing and overweight prevalence in US adolescent girls. **Am J Public Health**, v. 91, n. 4, p. 642-644, 2001.

ALBERTI, K.G; ECKEL, R.H, GRUND, S.M, 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, 2009.

ALBERTI K.G., ZIMMET P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet. Med**, v. 15, p. 539–553, 1998.

ALBERTI K.G., ZIMMET P.Z, SHAW J. The metabolic syndrome—A new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, p. 1059–1062, 2005.

AGARWAL, P; MORRISSEAU, T.S; KERELIUK, S.M; DOUCETTE,C.A; WICKLOW, B.A, DOLINSKY, V. W. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 55, n. 2, p. 71-101, 2018.

ALVAREZ, M.M; VIEIRA, A.C; SICHIERI, R; VEIGA, G.V. Association between central body anthropometric measures and metabolic syndrome components in a probabilistic sample of adolescents from public schools. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 4, 2008.

BARKER, D.J. Obesity and early life. **Obesity Reviews**, v. 8, n. 1, p. 45–49, 2007.

BARKER, D.J. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007.

BARKER, D.J, OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v. 1, p. 1077–1081, 1986.

BELLISLE, F; Intense sweeteners, appetite for sweet taste and relationship with weight management. **Curr Obes Rep**, v. 4, n. 1, p. 106-110, 2015.

BERGH, C; CARLSSON, B; OLSSON, J.H; SELLESKOG, U, HILLENSJO T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. **Fertil Steril**, v. 59, p. 323–31, 1993.

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, 1968.

BRASIL, VIGITEL. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2020. 2020.

CASTRO, A.V; KOLKA, C.M; KIM, S.P, BERGMAN, R.N. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 6, p. 600-609, 2014.

CARDENAS-PEREZ, R. E., FUENTES-MERA, L., DE LA GARZA, A. L., TORRE-VILLALVAZO, I., REYES-CASTRO, L. A., RODRIGUEZ-ROCHA, H., GARCIA-GARCIA, A., CORONA-CASTILLO, J. C., TOVAR, A. R., ZAMBRANO, E., ORTIZ-LOPEZ, R., SAVILLE, J., FULLER, M., & CAMACHO, A. Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. **Nutrition & metabolism**, v.15, p. 38, 2018.

CHAN, K.A; JAZWIEC, P.A; GOHIR, W; PETRIK, J.J, SLOBODA, D.M. Maternal nutrient restriction impairs young adult offspring ovarian signaling resulting in reproductive dysfunction and follicle loss, **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 5, p. 664–682, 2018.

CHEONG, Y; SADEK, K.H; BRUCE, K.D; MACKLON, N, CAGAMPANG, F.R. Diet-induced maternal obesity alters ovarian morphology and gene expression in the adult mouse offspring. **Fertil Steril**, v. 102, n. 3, p. 899-907, 2014.

CHOMCZYNSKI, P; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nat Protoc**, v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.

CONNOR, K.L; VICKERS, M.H; BELTRAND, J; MEANEY, M.J, SLOBODA, D.M. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **J Physiol**, v. 590, p. 2167-80, 2012.

DE MELO, G.B; SOARES, J.F; COSTA, T.C.L; BENEVIDES, R.O.A; VALE, C.C; PAES, A.M.A, GASPAR, R.S. Early Exposure to High-Sucrose Diet Leads to Deteriorated Ovarian Health. **Front Endocrinol**, v. 19, n. 12, p. 656831, 2021.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Role of obesity and adiposity in polycystic ovary syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 2, p.8-13, 2007.

EHRMANN, M.D. Polycystic Ovary Syndrome. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1223-1236, 2005.

ELSAKR, J.M, GANNON, M. Developmental programming of the pancreatic islet by *in utero* overnutrition. **Trends Dev Biol**, v.10, p.79-95, 2017.

FARIAS, C.R.L et al. Persistent metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease in children and adolescents. **Rev. Bras. Enferm**, v. 71, n. 3, p. 1013-1021, 2018.

FRAISON, E; KOSTOVA, E; MORAN, L.J; BILAL, S; VENETIS, C; COSTELLO, M.F. Metformin versus the combined oral contraceptive pill for hirsutism, acne, and menstrual pattern in polycystic ovary syndrome. **Cochrane Database Syst Rev**, v.8, n.8, 2020.

FRAYN K. N., KINGMAN S. M. Dietary sugars and lipid metabolism in humans. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 62, p. 250S–261S, 1995.

FREEDMAN, D.S; MEI, Z; SRINIVASAN, S.R; BERENSON, G.S, DIETZ, W.H. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. **J Pediatr**, v. 150, n. 1, p. 12-17, 2007.

GALLAGHER, E.J; LEROITH, D, KARNIELI, E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. **Mt Sinai J Med**, v. 77, n. 5, p. 511-23, 2010.

GAMBINERI, A; LAUDISIO, D; MAROCCO, C; RADELLINI, S; COLAO, A, SAVASTANO, S. Female infertility: which role for obesity? **International Journal of Obesity Supplements**, v. 9, n. 1, p. 65-72, 2019.

GARDNER, D.S; OZANNE, S.E, SINCLAIR, K.D. Effect of the Early-Life Nutritional Environment on Fecundity and Fertility of Mammals. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1534, p. 3419–3427, 2009.

GIL-CAMPOS, M; CANETE, R.R, GIL, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clin Nutr**, v. 23, p. 963–74, 2004.

GIUSSANI, D.A, DAVIDGE, S.T. Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia. **J Dev Orig Health Dis**, v. 4, n. 5, p. 328-337, 2013.

GLUCKMAN, P.D, HANSON, M.A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr Res**, v. 56, p. 311-317, 2004.

GLUCKMAN, P.D; HANSON, M.A; COOPER, C, THORNBURG, K.L. Effect of *in utero* and early-life conditions on adult health and disease. **N Engl J Med**, v. 359, n.1, p.61–73, 2008.

GONZÁLEZ-RIVAS, J. P; NIETO-MARTÍNEZ, R; BRAJKOVICH, I; UGEL, E., & RÍSQUEZ, A. Prevalence of Dyslipidemias in Three Regions in Venezuela: The VEMSOLS Study Results. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 110, n.1, p.30–35, 2018.

GRILO, L.F.; DINIZ, M.S.; TOCANTINS, C.; AREIA, A.L.; PEREIRA, S.P. The Endocrine–Metabolic Axis Regulation in Offspring Exposed to Maternal Obesity—Cause or Consequence in Metabolic Disease Programming?. **Obesities**, v.2, p.236-255, 2022.

GRUNDY S.M; CLEEMAN J.I; DANIELS S.R; DONATO K.A; ECKEL R.H; FRANKLIN B.A; GORDON D.J; KRAUSS R.M; SAVAGE P.J; SMITH S.C. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v. 112, p. 2735–2752, 2005.

HAYASHI, T; BOYKO, E.J; MCNEELY, M.J; LEONETTI, D.L; KAHN, S.E, FUJIMOTO, W.Y. Visceral adiposity, not abdominal subcutaneous fat area, is associated with an increase in future insulin resistance in Japanese Americans. **Diabetes**, v. 57, n. 5, p. 1269-75, 2008.

HELLERSTEIN M. K. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: Modifying factors and implications for cardiovascular risk. **Curr. Opin. Lipidol**, v. 13, p. 33-40, 2002.

HERNANDEZ-DIAZCOUDER A; ROMERO-NAVA R; CARBO R; SANCHEZ-LOZADA L.G, SANCHEZ-MUNOZ F. High Fructose Intake and Adipogenesis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 11, p. 2787, 2019.

HUFNAGEL, A, FERNANDEZ-TWINN, D.S, BLACKMORE, H.L, ASHMORE, T.J, HEATON, R.A, JENKINS, B, KOULMAN, A, HARGREAVES, I.P, AIKEN, C.E, OZANNE, S.E. Maternal but not fetoplacental health can be improved by metformin in a murine diet-induced model of maternal obesity and glucose intolerance. **J Physiol**, v. 0.0, p 1–17, 2021.

IBANEZ, L; LOPEZ-BERMEJO, A; DIAZ, M, MARCOS, M.V. Endocrinology and gynecology of girls and women with low birth weight. **Fetal Diagn Ther** v. 30, p. 243–249, 2011.

JO, J; GAVRILOVA, O; PACK, S; JOU, W; MULLEN, S; SUMNER, A.E, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Comput Biol**, v. 5, n. 3, p. 324, 2009.

KAWAI, M; DE PAULA, F.J, ROSEN, C.J. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. **J Intern Med**, v. 272, n. 4, p. 317-29, 2012.

KATSIKI, N; HATZITOLIOS, A.I. Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 22, n. 6, p. 466-76, 2010.

KERELIUK, S. M; BRAWERMAN, G. M; DOLINSKY, V.W. Maternal Macronutrient Consumption and the Developmental Origins of Metabolic Disease in the Offspring. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1451, 2017.

KING V; NORMAN J.E; SECKL JR; DRAKE A.J. Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 73, 2014.

LEVENS, E.D, SKARULIS, M.C. Assessing the role of endometrial alteration among obese patients undergoing assisted reproduction. **Fertil Steril**, v. 89, n. 1606e8, 2008.

LI, X, SHAO, R. PCOS and obesity: insulin resistance might be a common etiology for the development of type I endometrial carcinoma. **Am J Cancer Res**, v. 4, p. 73–79, 2014.

LIN, Y.C; STRONG, C; TSAI, M.C; LIN, C.Y, FUNG, X. Validating sizing them up: A parent-proxy weight-related quality-of-life measure, with community-based children. **International Journal of Clinical and Health Psychology**, v. 18, n. 1, p. 81-89, 2018.

MACIEJCZYK, M; MATCZUK, J; ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, M; NIKLIŃSKA, W; FEJFER, K; SZARMACH, I; ŁADNY, J. R; ZIENIEWSKA, I; ZALEWSKA, A. Eight-Week Consumption of High-Sucrose Diet Has a Pro-Oxidant Effect and Alters the Function of the Salivary Glands of Rats, **Nutrients**, v.10, n. 10, p. 150, 2018.

MARCONDES, F. K; BIANCHI, F. J, TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal ofBiology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARTIN-GRONERT, M. S; OZANNE, S. E. Metabolic programming of insulin action and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, p. 29–39, 2012.

MCCARTNEY, C.R, MARSHALL, J.C. Clinical practice. Polycystic ovary syndrome. **New Engl J Med**, v. 375, n. 1, p. 54-64, 2016.

METWALLY, M; LI, T.C, LEDGER, W.L. The impact of obesity on female reproductive function. **Obesity Rev**, v. 8, p. 515–23, 2007.

MUSUNURU K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. **Lipids**, v. 45, n.10, p. 907–914, 2010. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement

studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v.387, n. 10026, p. 1377-1396, 2016.

PANDEY, S; PANDEY, S; MAHESHWARI, A, BHATTACHARYA, S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. **J Hum Reprod. Sci**, v. 3, n. 2, p. 62-67, 2010.

PARIHAR, M. Obesity and infertility. **Reviews in Gynecological Practice**, v. 3, p.120-6, 2003.

PARLEE, S. D; LENTZ, S. I; MORI, H; MACDOUGALD, O. A. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods in enzymology**, v. 537, p. 93–122, 2014.

PEREIRA, J.M; SILVA, V.O; CAVALCANTI, D.S.P. Síndrome do Ovário Policístico: Terapia Medicamentosa com Metformina e Anticoncepcionais Orais. **Saúde & Ciência em ação - Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v.1, n. 1, 2015.

PINTO, B.A.S; MELO, T.M; FLISTER, K.F.T, MARTINS, L.M; KAJIHARA, D; TANAKA, L.Y; LAURINDO, F.R.M, PAES, A.M.A. Early exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal endoplasmic reticulum-stress in young rats. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 4, p. 917-927, 2016.

PREIS, S.R; MASSARO, J.M; ROBINS, S.J; HOFFMANN, U; VASAN, R.S; IRLBECK, T, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heartstudy. **Obesity (Silver Spring)**, v.18, n. 11, p. 2191-8, 2010.

PORETSKY, L; CATALDO, N.A; ROSENWAKS, Z, GIUDICE L.C. The Insulin related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocr Rev**, v. 20, n. 4 p. 535–82, 1999.

POSTON, L; CALEYACHETTY, R; CNATTINGIUS, S; CORVALÁN, C; UAUY, R; HERRING, S, GILLMAN, M.W. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, n. 12, p. 1025-1036, 2016.

QIN, X; DU, D; CHEN, Q; WU, M; WU, T; WEN, J, WANG, S. Metformin prevents murine ovarian aging. **Aging**, v. 11, n.11, p. 3785–3794, 2019.

QUINKLER, M; SINHA, B; TOMLINSON, J.W; BUJALSKA, I.J; STEWART, P.M; ARLT, W. Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity- a site-specific role for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. **J Endocrinol**, v. 183, n. 2, p. 331-42, 2004.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D; SOLLEIRO-VILLAVICENCIO H; VELASCO, M, ROLDÁN-ROLDÁN G. Obesity, metabolic syndrome and olfactory perception. **Rev Neurol**, v. 70, n. 2, p. 53-66, 2020.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, G.L; VEGA, C.C, BOECK, L, et al. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. **Int J Obes**, v. 39, p. 549-556, 2015.

SAGVEKAR P; DADACHANJI R; PATIL K, MUKHERJEE S. Pathomechanisms of polycystic ovary syndrome: Multidimensional approaches. **Front Biosci**, v. 10, n. 3, p. 384-422, 2018.

SILVESTRIS, E; PERGOLA, G; ROSANIA, R, LOVERRO, G. Obesity as disruptor of the female fertility. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 16, n.1, p.1, 2018.

SLOBODA, D.M; HOWIE, G.J; PLEASANT, A; GLUCKMAN, P.D, VICKERS, M.H. Pre- and Postnatal Nutritional Histories Influence Reproductive Maturation and Ovarian Function in the Rat. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. 6744, 2009.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Origins of Health and Disease Development**, v. 9, n. 3, p. 266–269, 2017

THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Hum Reprod**, v. 19, n. 1, p. 41-47, 2004.

TILLY, J.L. Ovarian follicle counts—not as simple as 1, 2, 3. **Reprod. Biol. Endocrinol**, v. 1, p. 11, 2003.

TOM, S.E; COOPER, R; KUH, D; GURALNIK, J.M; HARDY, R, POWER, C. Fetal environment and early age at natural menopause in a British birth cohort study. **Hum Reprod**, v. 25, n. 3, p. 791–798, 2010.

TOPRAK, S; YÖNEM, A; ÇAKIR, B; GÜLER, S; AZAL, O; OZATA, M, CORAKÇI, A. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. **Horm Res**, v. 55, n. 2, p. 65–70, 2001.

TULLOCH-REID, M.K; HANSON, R.L; SEBRING, N.G; REYNOLDS, J.C; PREMKUMAR, A, GENOVESE, D.J, et al. Both subcutaneous and visceral adipose tissue correlate highly with insulin resistance in african americans. **Obes Res**, v.12, n.8, p. 1352-9, 2004.

WHO, W. H. O. Obesity and overweight. 2017. Disponível em: <
<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >.

WILLIAMS, L; SEKI, Y; VUGUIN, P.M, CHARRON, M.J. Charron Animal Models of In Utero Exposure to a High Fat Diet: A Review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 507–519, 2014.

WU, C; LIN, F; QIU, S; JIANG, Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. **PLoS ONE**, v.9, p.e99155, 2014.

YOGEV, Y, VISSER, G.H. Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. **Semin Fetal Neonatal Med**, v.14, p. 77-84, 2009.

ZAMBRANO, E; GUZMAN, C, RODRIGUEZ-GONZALEZ, G.L, et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, p. 538-549, 2014.

ZAMBRANO, E; IBÁÑEZ, C; MARTÍNEZ-SAMAYOA, P.M; LOMAS-SORIA, C; DURAND-CARBAJAL, M, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G.L. Maternal obesity: lifelong metabolic outcomes for offspring from poor developmental trajectories during the perinatal period. **Arch Med Res**, v. 47, n.1, p. 1-12, 2016.

ZAMBRANO, E, NATHANIELSZ, P.W. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. **Nutr Rev**, v.71, n.1, p. 42-54, 2013.

ZHANG, S; TU, H; YAO, J; LE, J; JIANG, Z; TANG, Q; ZHANG, R; HUO, P; LEI, X. Combined use of Diane-35 and metformin improves the ovulation in the PCOS rat model possibly via regulating glycolysis pathway. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 18, n. 1, p. 58, 2020.

ANEXO A



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**CERTIFICADO***

Certificamos que a proposta intitulada: "INTRODUÇÃO DIETÉTICA PRECOCE DE AÇÚCARES DE ADIÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DA SÍNDROME METABÓLICA E SUAS COMORBIDADES", Processo nº 23115.038755/2018-22, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 30/11/2018.

We certify that the proposal: "EARLY DIETARY INTRODUCTION OF ADDED SUGARS AND ITS CORRELATION WITH THE INITIATION AND PROGRESS OF METABOLIC SYNDROME AND THEIR COMBORITIES ", Process n. 23115.038755/2018-22, under the responsibility of **Prof. Dr. Antonio Marcus Andrade Paes**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 11/30/2018.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 05/07/2021 a 05/07/2022

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: Ratos **Sexo:** Machos **Idade:** 60 dias
 (*Rattus norvegicus*) **Peso:** 250 - 350g
 Wistar

Sexo: Fêmeas **Idade:** 60 dias
Peso: 250 - 350g

AMOSTRA

30

+ 10*

30

+ 10*

* Aditivo de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



Local do experimento: Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/UFMA.

São Luís, 29 de julho de 2021.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMA



Documento assinado digitalmente
Rafael Cardoso Carvalho
Data: 20/07/2021 13:36:20-0360
Verifique em <https://verificador.dfe.gov.br>

ANEXO B



Early Exposure to High-Sucrose Diet Leads to Deteriorated Ovarian Health

Giuliane Barros de Melo ^{1†}, Jéssica Furtado Soares ^{1,2}, Thamyres Cristhina Lima Costa ^{1,2}, Renata Ohana Alves Benevides ^{1,2}, Caroline Castro Vale ^{1,2}, Antonio Marcus de Andrade Paes ^{1,2} and Renato Simões Gaspar ^{1,3**}

¹ Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Biological and Health Sciences Centre, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ² Health Sciences Graduate Program, Biological and Health Sciences Centre, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ³ Institute for Cardiovascular and Metabolic Research, School of Biological Sciences, University of Reading, Reading, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Elisabetta Baldi,
University of Florence, Italy

Reviewed by:

Alessandro Conforti,
University of Naples Federico II, Italy
Gonzalo Cruz,
Universidad de Valparaíso, Chile

*Correspondence:

Renato Simões Gaspar
renatosgaspar@gmail.com

[†]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Reproduction,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 21 January 2021

Accepted: 26 March 2021

Published: 19 April 2021

Citation:

Melo GB, Soares JF, Costa TCL, Benevides RDA, Vale CC, Paes AMA and Gaspar RS (2021) Early Exposure to High-Sucrose Diet Leads to Deteriorated Ovarian Health. *Front. Endocrinol.* 12:656831. doi: 10.3389/fendo.2021.656831

Background: The metabolic syndrome (MetS) is correlated with disorders of the reproductive system, such as the polycystic ovary syndrome (PCOS). While consumption of a diet rich in carbohydrates is linked to the development of MetS, it is still unclear if this diet leads to ovarian dysfunction and PCOS.

Objectives: We investigated the influence of a high-sucrose diet (HSD) on the ovarian milieu of Wistar rats and studied the correlation between high consumption of sugary drinks and the prevalence of PCOS in women.

Methods: Wistar rats were given a standard laboratory diet (CTR, 10% sucrose, n = 8) or HSD (HSD, 25% sucrose, n = 8) from postnatal day 21 to 120. Animals were evaluated weekly to calculate food intake, feed efficiency and weight gain. Both onset of puberty and estrous cycle were monitored. Metabolic serum biochemistry, organ morphometry and ovarian histology were performed upon euthanasia. In parallel, a fixed-effects multiple linear regression analysis was performed using data from Brazilian states (459 state-year observations) to test the correlation between the consumption of sugar-sweetened beverages (surrogate for HSD intake) and the prevalence of PCOS (surrogate for ovarian dysfunction).

Results: HSD animals showed increased adipose tissue accumulation, hyperglycaemia and insulin resistance when compared to CTR. Interestingly HSD rats also entered puberty earlier than CTR. Moreover, ovaries from HSD animals had an increased number of atretic antral follicles and cystic follicles, which were correlated with the hypertrophy of periovarian adipocytes. Finally, there was a positive correlation between the intake of sugary drinks and prevalence of PCOS in women of reproductive age.

Conclusions: HSD ingestion leads to ovarian dysfunction in rats and could be correlated with PCOS in women, suggesting these alterations could lead to public health issues. Therefore, we reinforce the deleterious impact of HSD to the ovarian system and suggest that the reduction of added sugars intake could be beneficial to ovarian health.

Keywords: metabolic syndrome, diet rich in sucrose, hyperglycaemia, ovarian dysfunction, polycystic ovary syndrome