

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

EFEITO DA INDUÇÃO DE OBESIDADE PELA DIETA DE
CAFETERIA A PARTIR DOS 21 DIAS DE IDADE SOBRE A
ESTRUTURA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE RATAS
WISTAR

Dissertação de Mestrado

Everson Ferreira Menezes

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

EFEITO DA INDUÇÃO DE OBESIDADE PELA DIETA DE
CAFETERIA A PARTIR DOS 21 DIAS DE IDADE SOBRE A
ESTRUTURA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE RATAS
WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas : Fisiologia

Everson Ferreira Menezes

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Anvitto

Porto Alegre

2010

Agradecimentos

A **Deus** e nossos **Protetores** pela grande oportunidade de chegar até aqui.

Ao Professor Dr. **Gilberto Luiz Sanvitto** pela oportunidade concedida e pela compreensão. Muito Obrigado!

A todos os **Professores** do ICB que de alguma maneira me auxiliaram com seus conhecimentos e exemplos.

À **Sara C. Sagae** pela excelente pessoa e profissional, muito obrigado por tudo o que fez, desde a graduação, e tem feito por mim. Você é o maior exemplo que levarei para minha vida.

Ao casal **Marcelo Grilo e Medianeira** pela grande amizade. Meus padrinhos em Porto Alegre.

Ao **Marcelo Alves de Souza** pelas horas de conversas e excelente convivência. Muito obrigado meu irmão mineiro.

À **Elaine Fazio** por ter me ajudado naquele momento que mais precisei, esta vitória é sua também.

À **Chris Krebs** pelo grande auxílio com a preparação e todo processamento das lâminas.

À minha querida e amada **Mãe Vera Lucia Menezes**, esta vitória é para a Senhora, pois sei que de onde está neste momento está muito feliz com os acontecimentos em minha vida. Muito obrigado pelo tempo que dedicou a nossa família!

Ao meu grande **Pai Alceu Menezes**, pelos grandes exemplos de humildade, batalha e por sempre estar me dando apoio em minhas decisões.

Ao meu irmão **Anderson Luiz Menezes**, pelos momentos de muita alegria que passo ao seu lado, mesmo que por telefone. Você sabe que quando crescer quero ser como você!

Ao querido tio **Darci Menezes**, nem tem como agradecer ao senhor por tudo o que já fez por mim.

À minha noiva **Fernanda Letícia Martiny**, pela paciência comigo e acima de tudo, por ter me ensinado o sentido de muitas coisas em minha vida. Obrigado pelo companheirismo, amizade, pelas horas e horas de conversa, de boas risadas, de planos...tudo está para se concretizar.

À **família Martiny** por ter me recebido tão bem como mais um membro. Muito obrigado minha família gaúcha.

A todos os **técnicos e funcionários** do ICB que sem dúvida, sem vocês nada do que fazemos existiria.

Aos **animais** pelo sacrifício em favor do desenvolvimento científico.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo....qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim."

Chico Xavier

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Resumo

1. Introdução.....	1
1.1 Obesidade	1
1.2 Obesidade e Reprodução	4
1.3 O estudo da obesidade.....	6
1.4 O ciclo estral da rata.....	8
1.5 Desenvolvimento Folicular.....	9
2. Objetivo	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Animais	12
3.2 Grupos	12
3.3 Composição das Dietas	13
3.4 Controle do Ciclo Estral	13
3.5 Peso Corporal e Comprimento Nasoanal	15
3.6 Peso das gorduras intraperitoneal e perigonadal, e dos ovários	15
3.7 Estudo do ovário.....	15
3.8 Análise estatística.....	16
3.9 Cálculo do tamanho da amostra	16
4. Resultados.....	17
4.1 Peso corporal.....	17
4.2 Comprimento Naso-anal.....	19
4.3 Peso das gorduras Intraperitoneal e Perigonadal.....	19
4.4 Peso Ovariano	20
4.5 Número de Folículos.....	21
4.6 Diâmetro dos Folículos Antrais Normais.....	22
4.7 Espessura da Camada da Teca.....	23
5. Discussão	24
5.1 Dieta de Cafeteria e Obesidade.....	24
5.2 Tecido Adiposo Visceral ou Intra-abdominal.....	25

5.3 Desenvolvimento Folicular e Esteroidogênese	26
6. Conclusões	32
7. Referências	33

Lista de Figuras

Figura 1: Coleta de Secreção Vaginal.....	14
Figura 2: Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo.....	14
Figura 3: Aspecto morfológico de ovário de rata do grupo CON.	17
Figura 4: Peso corporal apresentado pelas fêmeas dos grupos CON e CAF no momento do desmame, aos 21 dias.	18
Figura 5: Peso final apresentado pelas fêmeas dos grupos CON e CAF....	18
Figura 6: Comprimento naso-anal das fêmeas dos grupos CON e CAF.....	19
Figura 7: Peso da gordura Intraperitoneal presente nas fêmeas dos grupos CON e CAF.	20
Figura 8: Peso da gordura Perigonadal presente nas fêmeas dos grupos CON e CAF.	20
Figura 9: Peso dos ovários direitos coletados das fêmeas dos grupos CON e CAF.....	21
Figura 10: Número de folículos antrais normais, pré-antrais, primários e secundários encontrados no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF.	21 e 22
Figura 11: Diâmetro dos folículos antrais normais presentes no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF.	23
Figura 12: Espessura da teca de folículos antrais normais no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF.	23

Lista de Abreviaturas

AMPc – Monofosfato Cíclico de Adenosina

CAF - Cafeteria

CON - Controle

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL-1 – Interleucina 1

IMC – Índice de Massa Corporal

LH – Hormônio Luteinizante

LHRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

PCOS – Síndrome do Ovário Policístico

RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro

SHBG - globulinas ligadoras de esteróides

TNF-alfa - Fator de Necrose Tumoral-Alfa

Resumo

A obesidade é considerada um problema de saúde mundial, a qual vem assumindo características epidêmicas. O aumento de obesidade entre a população humana causa profundas conseqüências econômicas em relação a custos médicos diretos e indiretos, por estar associada com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças que diminuem a qualidade e a expectativa de vida, podendo levar à morte prematura. Estas influências da obesidade têm feito que pesquisadores busquem esclarecer os mecanismos envolvidos no controle do peso corporal, utilizando-se, principalmente, de modelos experimentais animais; dentre os quais, esta a Dieta de Cafeteria, que promove o aumento de peso nos animais através do fornecimento de alimentos altamente palatáveis que constituem parte dos hábitos alimentares das pessoas de países ocidentais.

Com relação a questões reprodutivas, uma determinada quantidade de energia armazenada no tecido adiposo é essencial para o sucesso da reprodução feminina, entretanto, o excesso de peso corporal possui efeito prejudicial à reprodução, relação que tem sido reconhecida há muitos anos.

Com base no exposto anteriormente, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a função reprodutiva de ratas Wistar adultas, submetidas à Dieta de Cafeteria a partir dos 21 dias de idade; analisando a função ovariana através de abordagens morfológicas e estruturais dos ovários. A partir do 70º dia de vida iniciou-se a coleta diária da secreção vaginal e o controle do ciclo ocorreu até as fêmeas atingirem 150 dias de vida, sendo utilizadas no experimento, apenas as que apresentaram ciclo estral regular. As fêmeas eram sacrificadas às 13h do proestro, em seguida as gorduras intraperitoneal e perigonadal eram isoladas e pesadas, e os ovários após serem removidos eram pesados e preparados para análise histológica.

A dieta de cafeteria provocou nas fêmeas tratadas um aumento no peso final, assim como no acúmulo de gordura intraperitoneal e perigonadal; além disso, reduziu o número de folículos pré-antrais e também a espessura da camada das células da teca destes animais. Entretanto, é necessário a realização de mais estudos, para que possamos determinar com clareza quais mecanismos estão envolvidos na relação obesidade-reprodução.

1. Introdução

1.1 Obesidade

A obesidade pode ser definida como um distúrbio da homeostasia energética, sendo em humanos caracterizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), com indivíduos obesos apresentando IMC maior que 30 Kg/m². Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde mundial, a qual vem assumindo características epidêmicas (Cnattingius & Lambe, 2002), sendo prevalente principalmente em países desenvolvidos (Organização Mundial da Saúde, 1997), entretanto está cada vez mais presente em países em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2005, mais de 1,6 bilhões de adultos apresentaram sobrepeso e pelo menos 400 milhões de adultos apresentaram-se obesos no mundo. No Brasil, o VIGITEL 2008, encontrou uma prevalência de 13% de obesidade na população, sendo que entre as mulheres a prevalência foi de 13,6%.

O aumento de obesidade entre a população humana causa profundas consequências econômicas em relação a custos médicos diretos e indiretos (WOLF & COLDITZ, 1998), por estar associada com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças que diminuem a qualidade e a expectativa de vida, podendo levar à morte prematura (HILL & PETERS, 1998); quando comparadas com pessoas magras, há um maior nível de mortalidade entre as primeiras (OGDEN et al., 2007). Doenças, como a hipertensão, são mais prevalentes em pessoas obesas do que na população em geral (PI-SUNYER, 1999); assim como, pessoas obesas apresentam maior risco de desenvolver doenças coronarianas (KANNEL et al., 1996), e um aumento nos níveis de estresse oxidativo após o exercício físico (VINCENT et al., 2004). É observado um aumento na prevalência de asma em indivíduos obesos e sobrepeso, com a obesidade quase sempre antecedendo a asma (FORD, 2005; SHORE & JOHNSTON, 2006; BEUTHER & SUTHERLAND, 2007; LITONJUA & GOLD, 2008). A obesidade também tem sido relacionada com o aumento de risco de alguns tipos de câncer (VAINIO & BIANCHINI, 2002; RENEHAN et al., 2008;

RENEHAN et al., 2009). O excesso de peso, assim como a obesidade, são poderosos iniciadores de artrite óssea de joelho em mulheres de meia-idade e modestos iniciadores de artrite óssea de articulações (HART & SPECTOR, 1993; BROWNING & KRAM, 2007). Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação positiva entre obesidade e muitas formas de doenças mentais (SIMON et al., 2006; PETRY et al., 2008; SCOTT et al., 2008); e ainda, com alterações de humor, transtornos relacionadas à ansiedade, transtornos alimentares e de personalidade (SIMON et al., 2006; HUDSON et al., 2007, PICKERING et al., 2007; PETRY et al., 2008; SCOTT et al., 2008), mostrando-se, estas desordens, mais fortes em mulheres do que em homens (McINTYRE, 2006; BARRY et al., 2008).

Outra dificuldade encontrada por indivíduos obesos é a estigmatização a qual são submetidos baseada em seu peso (PUHL & BROWNELL, 2006), a qual está associada a um significativo prejuízo psicossocial. Estigma liga o indivíduo a um estereótipo negativo (GOFFMAN, 1963), logo, grupos que possuem um estigma têm sido vítimas de preconceito e discriminação, que são fatores de risco para a saúde (STUBER et al., 2008). Existe na literatura uma considerável discussão sobre o estigma da obesidade e a forma com as pessoas obesas são tratadas (ROGGE et al., 2004; BROWNELL, 2005; LATNER & SCHWATZ, 2005; VAIDYA, 2006; STUBER et al., 2008); estando esta estigmatização correlacionada com significantes problemas de saúde, tais como depressão, hipertensão, doenças coronarianas e infarto (MAJOR & O'BRIEN, 2005; STUBER et al. 2008), desta forma, o próprio estigma pode contribuir para os riscos à saúde.

A obesidade é uma síndrome de etiologia multifatorial que apresenta causas que estão sendo exaustivamente estudadas por pesquisadores em indústrias farmacêuticas e centros de pesquisas em universidades em todo o mundo. Existem algumas hipóteses que tentam explicar a origem da obesidade, colocando que no passado era evolutivamente vantajoso armazenar certa quantidade de energia. Uma destas hipóteses propõe que a ingestão de maior quantidade de energia tinha por objetivo armazenar calorias no tecido adiposo para que os indivíduos sobrevivessem a períodos de relativo jejum (CROCKER & YANOVSKI, 2008). Entretanto, devido a hábitos atuais, esta necessidade perdeu-se, levando a propor que a seleção natural teria

favorecido polimorfismos em muitos genes que poderiam predispor crianças e adultos a uma ingestão alimentar excessiva (ASHRAFI et al., 2003; RANKINEN et al., 2006). A capacidade de estocar excesso de energia no tecido adiposo como gordura tem potencial origem em todos os níveis biológicos (genético, fisiológico e social). Embora muitos estudos recentes demonstrem um potente contribuidor genético para a obesidade (FRAYLING et al., 2007), esta relação não está bem clara, pelo fato de que, os genes totalmente relacionados com a obesidade, deveriam estar presentes desde o passado até os dias de hoje (KEITH et al., 2006).

O aumentado risco a saúde decorrente da obesidade é dependente da quantidade e localização do tecido adiposo (OHLSON, 1985; BJORNTORP, 1997; BJORNTORP, 1992a, b, c); especificamente, do tecido adiposo distribuído na região abdominal ou visceral (BJORNTORP, 1997a, b, c), que é característico de homens (WAJCHENBERG, 2000). Entretanto, mulheres apresentam maior quantidade de tecido adiposo subcutâneo do que homens (LONNQVIST et al., 1997; MUJICA et al., 2008), e apresentam um excesso de adiposidade na região subcutânea gluteal ou femoral, que é associado com riscos para desordens metabólicas (LAPIDUS et al., 1984; OHLSON, 1985; DONAHUE & ABBOTT, 1987; DONAHUE et al., 1987; BJORNTORP, 1996). A gordura subcutânea está dispersa dentro de uma grande área sob a pele, é relativamente pouco inervada e vascularizada e tem células com maior diâmetro que dos adipócitos intra-abdominais (WAJCHENBERG, 2000). Este tecido realiza a captação de ácidos graxos e estoca o excesso de calorias (MICHAILIDOU et al., 2007; SHADID et al., 2007), sendo importante para as mulheres quando necessitam utilizar-se dos estoques de energia para suprir a demanda calórica durante a amamentação.

Outra preocupação importante que atualmente está presente entre os profissionais da saúde, é a prevalência de obesidade infantil. A obesidade infantil está aumentando de forma alarmante, os níveis triplicaram nas últimas três décadas (HEDLEY et al., 2004). Como estas alterações de peso afetarão as novas gerações é um ponto ainda desconhecido.

1.2 Obesidade e Reprodução

Uma determinada quantidade de energia armazenada no tecido adiposo é essencial para a reprodução feminina. O tecido adiposo é um sítio de ativa produção de andrógenos (PASQUALI, 2006) e é um local de ativa conversão de andrógenos a estrógenos, que é um processo intensamente dependente e diretamente proporcional à quantidade de gordura corporal (LONGCOPE et al., 1969). Além disso, a distribuição de gordura corporal influencia as concentrações de globulinas ligadoras de esteróides (SHBG) em mulheres obesas. De fato, fêmeas com fenótipo de obesidade abdominal possuem menores concentrações de SHBG em comparação a mulheres com obesidade periférica (PASQUALI & CASIMIRRI, 1993), o que eleva as concentrações de testosterona e estradiol disponíveis. A retroalimentação negativa do excesso de estrogênio pode contribuir para a reduzida sinalização hipotálamo-hipófise (GOSMAN et al., 2006).

Em mulheres a obesidade se manifesta como um conjunto de condições e, geralmente, precedem muitos dos conhecidos distúrbios metabólicos, como a antecipação da menarca, a subfertilidade e a Síndrome do Ovário Policístico (PCOS). Assim como no fim da vida reprodutiva feminina, a cessação da função ovariana é também relacionada com o desenvolvimento de obesidade (RACHON & TEEDE, 2009).

A infância é a fase da vida do indivíduo na qual variações no programa de nutrição determinam o crescimento e o desenvolvimento (McCANCE & WIDDOWSON, 1956). O ganho de peso durante o início da infância é um determinante crucial na instalação da puberdade em meninos e meninas (DOS SANTOS SILVA, 2002; NOVOTNY, 2003; PADEZ & ROCHA, 2003; DUNGER, 2006); período no qual a criança desenvolve as características sexuais secundárias e a capacidade reprodutiva (PATTON & VINER, 2007). Dados a partir do século 19 demonstram uma redução na idade da maturação sexual em meninas (COLE, 200), a qual é prevalente nas que apresentam sobrepeso e obesidade (KAPLOWITZ et al., 2001; LEE et al., 2007). Além disso, o IMC de mulheres adultas que apresentaram mais cedo a menarca é maior quando comparado com mulheres que apresentaram maturação tardia (ADAIR & GORDON-LARSEN, 2001; WANG, 2002).

Significantes alterações no perfil da ingestão alimentar têm sido observadas durante o ciclo menstrual, tanto em humanos como em primatas não humanos. Durante a fase pré-ovulatória a ingestão de alimento é reduzida, aumentando durante a fase luteal (CZAJA, 1978; ROSENBLAT et al., 1980; DALVIT, 1981; KEMNITZ et al., 1984; LISSNER et al., 1988; GONG et al., 1989; LYONS et al., 1989; BUFFENSTEIN et al., 1995; BARR et al., 1995; DYE & BLUNDELL, 1997; REIMER et al., 2005). Em mulheres com síndrome pré-menstrual, observa-se um aumento na ingestão alimentar durante o período pré-menstrual (BOWEN & GRUNBERG, 1990; CROSS et al., 2001; REED et al. 2008).

Uma condição freqüentemente associada com obesidade e desordens reprodutivas é a PCOS, observada em 4% a 7% da população feminina adulta (EHRMANN, 2005). A obesidade está presente em aproximadamente 30% dos casos de PCOS, chegando, em algumas regiões do mundo a 75% dos casos (DeMOLA, 2009). A PCOS é a mais freqüente alteração ovariana em mulheres na pré-menopausa (AZZIZ et al., 2004), estando comumente presente após a menarca em adolescentes e sendo caracterizada por uma série de características com diagnóstico não específico e uma grande diversidade em seu perfil clínico (JANSSEN et al., 2008); como anovulação e hiperandrogenismo relacionado a elevadas concentrações de LH (APTER, 1997).

Em mulheres obesas, é aumentada a incidência de complicações durante a gravidez. Nestas mulheres, a obesidade está associada a desordens hipertensivas, diabetes gestacional, infecções, tromboembolismo, alterações de humor, complicações durante o trabalho de parto, e também aumenta o risco de problemas nos filhos (WATKINS et al., 2003; CEDERGREN, 2004; WEISS et al., 2004; RAMSAY et al., 2006; YU et al., 2006; CATALANO, 2007). O risco de aborto em mães obesas ocorre em gravidez espontânea ou induzida por diferentes técnicas reprodutivas (FEDORCSAK et al., 2000; WANG et al., 2001; LASHEN et al., 2004).

Menopausa é o termo usado para descrever o último período fisiológico menstrual na vida de uma mulher, sendo diagnosticado com a ocorrência na redução dos ciclos menstruais regulares durante os últimos doze meses (LUND, 2008). Este fenômeno é decorrente da idade do ovário, resultando na

exaustão dos folículos ovarianos (WISE et al., 1996), levando à infertilidade e à progressiva perda da atividade hormonal (GREENDALE & SOWERS, 1997). Muitas vezes este fenômeno está associado com o desenvolvimento da Síndrome Metabólica e suas conseqüências (CARR, 2003). Estudos utilizando-se ratas ovariectomizadas mostram um ganho de peso e aumento do acúmulo de gordura no tecido adiposo abdominal nestes animais, sugerindo que os hormônios ovarianos podem atuar como protetores contra a síndrome metabólica e obesidade (RACHÓN et al., 2007 a; 2007 b).

1.3 O estudo da obesidade

A modulação do apetite e a regulação do peso corporal são realizadas por uma séria de moléculas que agem sobre o hipotálamo, formando um sistema altamente integrado, redundante e complexo que minimiza o impacto das flutuações de curto-prazo no balanço energético sobre a massa adiposa, agindo em diferentes níveis na regulação do peso corporal (WOODS et al., 1998).

A crescente prevalência de obesidade no mundo atual tem causado conseqüências adversas à saúde da população e à economia dos países, levando pesquisadores buscarem esclarecer os mecanismos envolvidos no controle do peso corporal, utilizando-se, principalmente, de modelos experimentais animais. Dentre estes, encontramos os que induzem a obesidade provocando lesões cerebrais, principalmente no núcleo ventromedial (CAMPFIELD & SMITH, 1983; SEGAL et al., 1991), a obesidade com origem genética (BRAY & YORK, 1979) e a obesidade provocada por lesão química de regiões hipotalâmicas por drogas específicas.

Um modelo experimental muito vantajoso, por provocar uma obesidade semelhante à humana, que é induzida por uma dieta altamente palatável constituída por alimentos que fazem parte dos hábitos alimentares das pessoas de países ocidentais, é conhecido como dieta de cafeteria (SCLAFANI & SPRINGER, 1976; ROTHWELL & STOCK, 1979; LLADÓ et al., 1991; PRADA et al., 2005; KRETSCHMER et al., 2005). Esta dieta é fornecida juntamente com a ração padrão de biotério e baseia-se em uma escolha à vontade de

alimentos processados que possuem uma elevada quantidade de gordura e/ou carboidratos, o que a torna altamente calórica.

O fornecimento da dieta de cafeteria aos animais pode ser iniciado em diferentes fases da vida, em alguns estudos o acesso a dieta ocorre aos 7 dias após o parto (DAMETO et al., 1994), em outros, os animais são submetidos à dieta após o desmame (PRATS et al., 1989), ou ainda, quando adultos (ROTHWELL & STOCK, 1979). O ganho de peso corporal total de um animal submetido a esta dieta é de aproximadamente 30% a 40% no final da 12ª semana de estudo, o que resulta em aumento significativo na quantidade de gordura visceral, elevação da pressão arterial, resistência à insulina e hiperleptinemia (DE PAULA et al., 2004; WOFFORD & HALL, 2004); e mesmo que a dieta não provoque aumento do peso corporal, sua simples administração pode causar alterações no metabolismo glicídico, lipídico e na função endotelial (NADERALI et al., 2001).

Alterações em respostas bioquímicas (HIMMS-HAGEN et al., 1981; LAADÓ et al., 1991; PROENZA et al., 1992) com conseqüentes efeitos fisiológicas, são observadas em animais submetidos à dieta de cafeteria. Estas alterações resultam em reduzida eficiência energética (HIMMS-HAGEN et al., 1981), elevação na termogênese (ROTHWELL & STOCK, 1980), reduzidas concentrações plasmáticas e produção hepática de uréia (SERRA et al., 1987), reduzida sensibilidade aos efeitos anoréxicos da leptina (LEVIN & DUNELL, 2002; LEVIN et al., 2004), e da capacidade de catabolismo protéico (SERRA et al., 1991). Ainda, provoca redução na sensibilidade aos efeitos modulatórios da glicose em neurônios sensíveis à glicose (LEVIN, 1992; LEVIN & PLANAS, 1993; LEVIN et al., 1998; SONG et al., 2001) e da expressão gênica do hormônio do crescimento (ZHOU et al., 1998); aumentando o peso corporal, deposição de gordura e ingestão alimentar, que perdura durante todo o período da dieta (LLADO et al., 1995).

Em relação a questões reprodutivas, ratas tratadas com a dieta de cafeteria apresentam uma redução no número de concepções e de nascimentos (WEHMER et al., 1979; ROLLS et al., 1980) e irregularidades no ciclo estral (GLICK et al., 1990).

1.4 O ciclo estral da rata

A rata constitui um importante modelo experimental para estudos referentes ao controle do ciclo ovariano de mamíferos por ser um animal que apresenta ovulação espontânea e um perfil de variações de gonadotrofinas e esteróides gonadais semelhante ao da mulher; além de ter um ciclo estral de curta duração (FREEMAN, 1994).

O ciclo estral da rata é constituído por quatro fases distintas: o estro, metaestro, diestro e proestro; as quais podem ser determinadas através das mudanças que ocorrem na mucosa vaginal, caracterizadas por um padrão distinto de células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas em cada período (MATTHEWS & KENYON, 1984).

A fase do estro é caracterizada pela presença de células queratinizadas na mucosa vaginal, sendo o período em que a fêmea apresenta-se sexualmente receptiva, ou seja, ela está pronta para o coito. Esta fase tem duração de 25 a 27 horas e é, mais precisamente, durante a manhã deste período, que ocorre a ovulação. Se não há concepção durante o estro, segue-se uma fase de recuperação, o metaestro ou diestro I, com duração de 6 a 8 horas, sendo reconhecida pela presença de células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas. Esta fase precede o diestro ou diestro II, que tem duração de 55 a 57 horas e é caracterizada pelo predomínio de leucócitos e presenças de muco, podendo estar presente algumas células epiteliais. Antes de um novo estro, a rata passa pela fase do proestro, com duração de 12 a 14 horas e onde, a mucosa vaginal, caracteriza-se pela presença de células epiteliais (FREEMAN, 1994).

Em cada fase do ciclo estral verifica-se variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975; FREEMAN, 1994), que estão relacionadas com alterações comportamentais.

A variação das concentrações dos esteróides gonadais funciona como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório (ISHIKAWA, 1992; SCHWARTZ, 2000; CONNEELY, 2001). O estradiol, um dos esteróides gonadais, apresenta uma reduzida concentração plasmática entre o estro e a manhã do metaestro, e começa a aumentar na tarde desta fase,

alcançando valores mais elevados ao redor do meio dia do proestro, caindo no fim da tarde até atingir os valores basais no início da madrugada do estro. As concentrações plasmáticas de progesterona, outro esteróide gonadal, começam a aumentar quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), atinge o pico juntamente com ele e retorna a valores basais na manhã do estro. Um segundo pico de progesterona inicia ao meio dia do metaestro, mantendo-se na madrugada do diestro e reduzindo a valores basais no início da manhã (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975; FREEMAN, 1994).

O aumento nas concentrações do estrógeno induz um aumento na secreção de gonadotrofinas na tarde do proestro (FREEMAN, 1994). O mecanismo pelo qual o estrógeno estimula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ainda não está claro, mas, o mediador dos mecanismos de retroalimentação positiva dos esteróides gonadais pode ser o sistema noradrenérgico central (ANSELMO-FRANCI et al., 1997).

O padrão de secreção do LH, do FSH e da prolactina é similar durante a maior parte do ciclo estral, com suas concentrações permanecendo baixas e não sendo modificadas até a tarde e início da noite do proestro. O pico plasmático do LH, importante para o processo ovulatório, ocorre entre as 15h e 18h da fase do proestro; a elevação na concentração plasmática do FSH ocorre a partir das 15h do proestro; e o pico da prolactina ocorre às 15h do proestro (SMITH et al., 1975). Diferente ao que ocorre com o LH, as concentrações plasmáticas de FSH e prolactina apresentam um pico secundário durante o estro, que respectivamente, pode estar relacionado com o recrutamento de folículos para o próximo ciclo e com a função luteotrófica (SZAWKA & ANSELMO-FRANCI, 2004).

1.5 Desenvolvimento Folicular

O ovário é um órgão que apresenta duas funções fundamentais, a formação de um oócito capaz de ser fertilizado, com total capacidade de desenvolvimento; e a secreção de hormônios esteróides necessários para a preparação do trato reprodutivo para a fertilização e subsequente

estabelecimento da gravidez. Para as funções esteroidogênicas e ovulatórias do ovário serem realizadas, uma coordenada e complexa série de eventos ocorre, a qual é chamada de desenvolvimento folicular (OKTEM & OKTAY, 2008). Segundo o mesmo autor, os folículos são as unidades funcionais do ovário, formados por um oócito envolvido por uma ou mais camadas de células somáticas, chamadas de células da granulosa.

Eventos complexos, com múltiplas características, tais como, o recrutamento folicular, proliferação e atresia das células da granulosa e da teca, esteroidogênese, expressão de receptores de gonadotrofinas, maturação do oócito, ovulação, luteinização e formação do corpo lúteo, determinam o desenvolvimento folicular, até o estágio ovulatório. Os mecanismos envolvidos na sinalização para o recrutamento do folículo primordial, determinando seu desenvolvimento, permanecem ainda não esclarecidos; na literatura, tem sido sugerida uma sinalização bidirecional entre o oócito e as células da granulosa e entre as células da granulosa e as células intersticiais da teca, interagindo com a matriz extracelular e fatores de crescimento, que são essenciais para o início do crescimento folicular e subsequente desenvolvimento (OKTAY, 2000; EPPIG, 2001; SKINNER, 2005). A progressão de folículo primordial passando por folículo secundário, até tornar-se folículo pré-antral é contínua até a menopausa; envolvendo o alargamento do oócito, a proliferação das células da granulosa formando uma estrutura multilaminar, a formação da lâmina basal e da camada interna das células da teca (KNIGHT & GLISTER, 2006).

A progressão do desenvolvimento do folículo pré-antral para o estágio antral ou pré-ovulatório é caracterizado por uma contínua proliferação das células da granulosa e da teca, aumento da vasculatura, crescimento do oócito e o desenvolvimento da cavidade antral; com este folículo alcançando suas características pré-ovulatórias através de uma delicada e extensa rede de interações autócrinas e parácrinas entre as células da granulosa, células da teca e o oócito, com gonadotrofinas e fatores locais (OKTEM & OKTAY, 2008).

Na literatura, ainda encontramos muitas controvérsias em relação aos mecanismos envolvidos na foliculogênese, e o conhecimento atual que temos sobre o assunto são baseados em estudos realizados com fêmeas de roedores, principalmente com ratas. Uma das mais recentes diferenças

encontradas no processo de desenvolvimento folicular entre a maioria das fêmeas de mamíferos e as fêmeas de roedores, mais especificamente de camundongos, é a presença de células germinativas no ovário destas, as quais têm a capacidade de proliferação e diferenciação, e desta forma, podem sustentar a produção de folículos e oócitos após o nascimento destas fêmeas. Estes resultados contrariam o que é determinado pelo dogma central da biologia reprodutiva, o qual afirma que fêmeas de mamíferos nascem com um número determinado de células reprodutivas, as quais regridem sem reposição ao longo da vida pós-natal (JONSON et al., 2004).

Outra importante diferença entre as fêmeas de roedores e especificamente as mulheres, é em relação à formação dos folículos primordiais. No ovário humano estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, enquanto que em fêmeas de roedores, formam-se durante os três primeiros dias após o nascimento. Em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são semelhantes entre as fêmeas de roedores e primatas, entretanto, em roedores múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo estral (HIRSHFIELD, 1991).

2. Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a função reprodutiva de ratas Wistar adultas, submetidas à Dieta de Cafeteria a partir dos 21 dias de idade; analisando a função ovariana através de abordagens morfológicas e estruturais dos ovários.

A realização deste trabalho buscou enriquecer a literatura com dados que possam ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na complexa, e ainda pouco compreendida, relação inibitória entre a obesidade e reprodução. E para este objetivo, utilizamos um modelo experimental de obesidade baseado em uma dieta que contém alimentos industrializados cada vez mais presentes na vida de pessoas, principalmente, que habitam países ocidentais.

A hipótese formulada, é de que as alterações reprodutivas observadas em fêmeas submetidas à dieta de cafeteria, tais como, redução no número de

concepções e de nascimentos, possam ser causadas por alteração na estrutura ovariana, decorrente da obesidade.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizadas 20 ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), as quais foram mantidas no biotério setorial do Laboratório de Neuroendocrinologia e do Comportamento deste Instituto. As fêmeas permaneceram em caixas individuais, em ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas às 06:00h e apagadas às 18:00h) e temperatura controlados, com livre acesso à água e ração.

O dia do parto foi rigorosamente controlado e era considerado como dia zero. No dia 1, as ninhadas foram padronizadas em 4 filhotes fêmeas; as quais permaneceram com as mães até o dia 21 pós-parto, momento em que era realizado o desmame.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (NIH), 1986 e com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Projeto nº 2007885).

3.2 Grupos

Após o desmame, as fêmeas foram divididas nos dois grupos seguintes, sempre com o cuidado para que irmãs não fizessem parte do mesmo grupo.

Controle (CON): formado por animais que foram alimentados com a dieta padrão de biotério e água. Número de animais=15.

Cafeteria (CAF): formado por animais que foram submetidos à dieta de cafeteria, em adição a dieta padrão de biotério e água. Número de animais=15.

3.3 Composição das Dietas

A dieta padrão de biotério é composta por ração padrão e água, com valor energético de 3,8 kcal/g (70% carboidratos, 20% proteína e 10% gordura).

A dieta de Cafeteria é composta por ração modificada, juntamente com alimentos adicionais e refrigerante. A ração modificada consiste de pellet contendo 37% ração padrão, 25% amendoim torrado, 25% chocolate em barra e 12.5% bolacha de maisena e possuirá 38% carboidratos, 15% proteína e 46.5% de gordura. Além da ração modificada os animais receberam alimentos adicionais que consistiram em salgadinhos, waffer e bolo pronto. A dieta de cafeteria possui 5,4 Kcal/g.

Todas as manhãs, a partir das 8 horas, os componentes das dietas eram repostos e de 3 a 4 dias na semana, as caixas onde os animais estavam alojados eram trocadas.

3.4 Controle do Ciclo Estral

A partir do 70º dia de vida iniciou-se a coleta diária da secreção vaginal das fêmeas de ambos os grupos (Fig.1), para determinar em qual fase do ciclo estral estas se encontravam (Fig.2). A coleta do esfregaço iniciava-se às 9 horas, seguido da observação a fresco do material no microscópio óptico. O controle do ciclo ocorreu até as fêmeas atingirem 150 dias de vida, sendo utilizadas no experimento, apenas as que apresentaram ciclo estral regular.

A coleta de material para o experimento ocorreu às 13 horas da fase do proestro.



Figura 1: Coleta de Secreção Vaginal

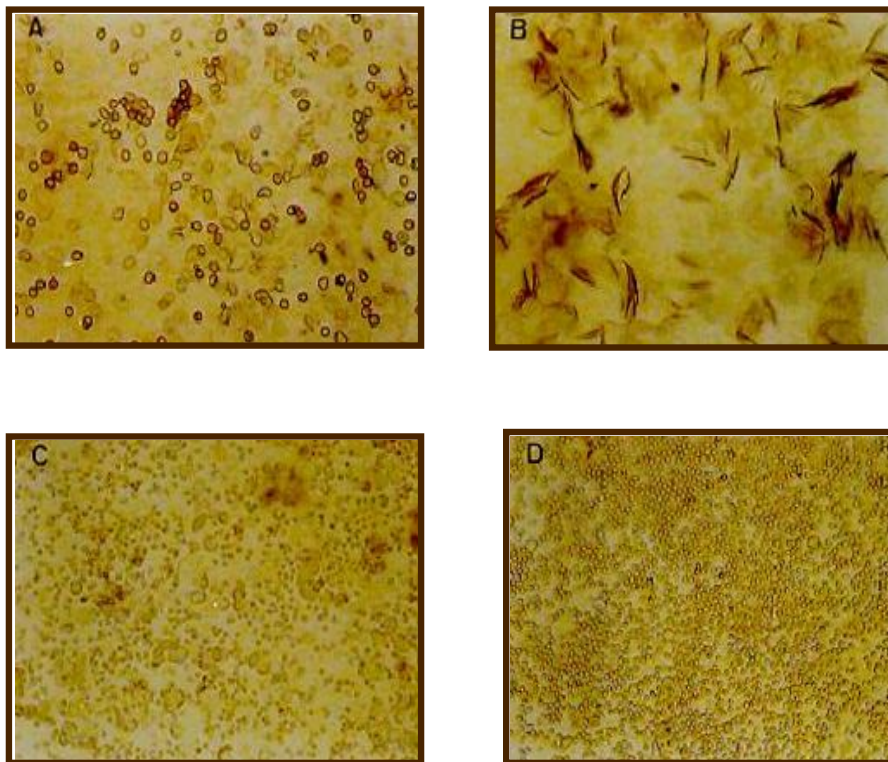


Figura 2: Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo.

3.5 Peso Corporal e Comprimento Nasoanal

Antes das fêmeas serem sacrificadas por decapitação em uma guilhotina, foram pesadas em uma balança digital para determinação do peso corporal.

Logo após o sacrifício, foi obtido o comprimento nasoanal de todos os animais.

3.6 Peso das gorduras intraperitoneal e perigonadal, e dos ovários

As gorduras intraperitoneal e perigonadal, assim como os ovários, foram isolados e pesados em balança de precisão.

3.7 Estudo do ovário (Fig.3)

Os ovários foram fixados em paraformaldeído 10% e incluídos em parafina para análise histológica. Foram realizados cortes seriados de 8 μ m de espessura em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. Utilizando-se de microscópio óptico associado a um sistema de imagens, os cortes foram analisados para a verificação dos parâmetros de acordo com os critérios apresentados por Lara et al. (2000). Para a realização deste protocolo utilizamos a **Unidade de Morfometria e Histometria**, Projeto FAPERGS Proap nº 04/2005, processo 0410882, sob responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia (UFRGS).

a) Contagem do número de folículos por ovário:

a.1) Número de folículos antrais normais: definidos como aqueles que apresentam uma cavidade antral bem definida contendo um oócito com um núcleo.

a.2) Número de folículos antrais atrésicos: aqueles que apresentam células da granulosa em processo degenerativo e muitas vezes com aparente degeneração oocitária.

b) Medida do diâmetro folicular:

b.1) Tamanho de folículos antrais saudáveis e atresicos: a análise morfométrica do diâmetro de cada folículo antral e atresico foi realizada através do uso de um sistema de análise de imagem digital (Programa *Image Pro Plus*).

c) Avaliação da espessura da camada das células da teca.

d) Avaliação de uma possível disfunção ovariana através da avaliação da incidência de cistos foliculares:

d.1) Cistos: folículos com ampla cavidade antral, delgada camada de células da granulosa e hipertrofia tecal.

d.2) Folículos tipo III: definidos como grandes, destituído de oócito, contém de 4 a 5 camadas de pequenas e densas células granulosas circundando um grande antro e com compartimento tecal normal.

e) Contagem do número de folículos Pré-Antrais, folículos Primários e folículos Secundários.

3.8 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados utilizando-se o teste *t* de Student.

O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significantes.

3.9 Cálculo do tamanho da amostra

O desfecho primário no cálculo da amostra para os experimentos propostos, com nível de significância $p < 0,05$ e poder de 80%, baseou-se em estudo prévio realizado em nosso laboratório (FREY, 2007), entretanto o trabalho ainda não foi publicado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o

programa PEPI 4.0.

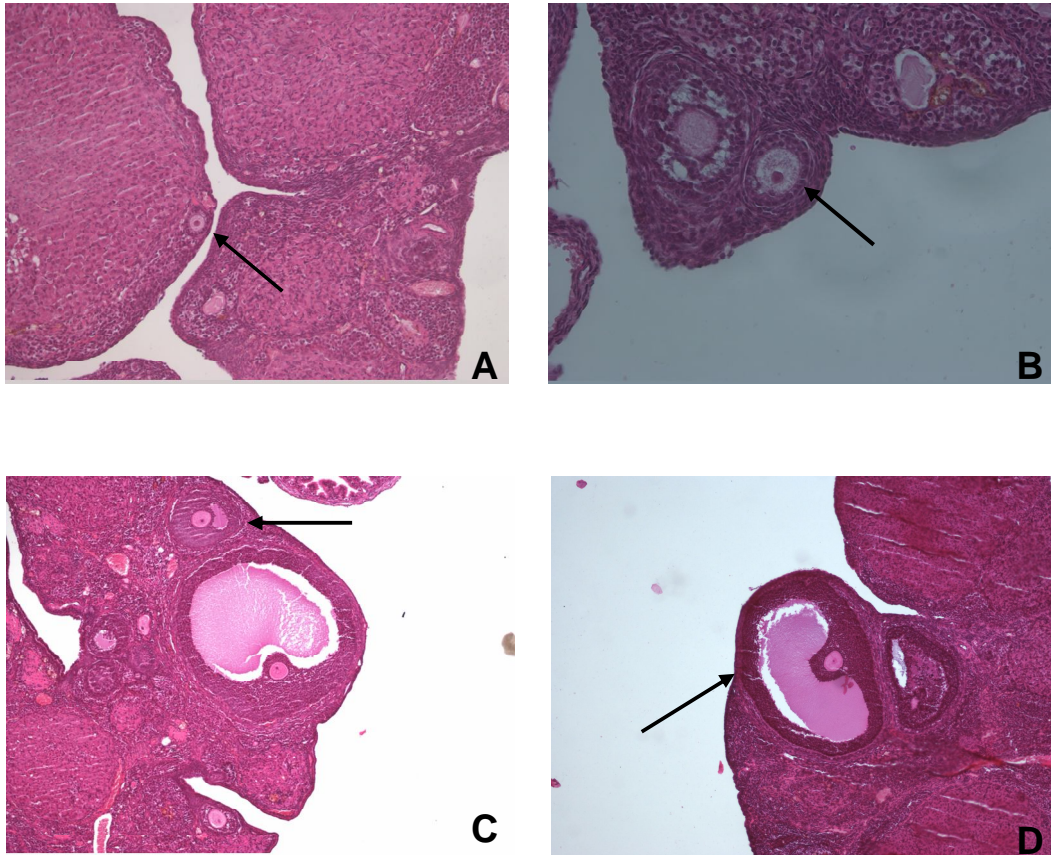


Figura 3: Aspecto morfológico de ovário de rata do grupo CON. (A) Folículo Primário, (B) Folículo Secundário, (C) Folículo Pré-Antral, (D) Folículo Antral. 10X.

4. Resultados

4.1 Peso corporal

Fêmeas do grupo CON e CAF não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao peso corporal no momento aos 21 dias (Fig.4), que foi o momento do desmame. O peso corporal final das fêmeas

do grupo CAF foi significativamente maior em relação ao peso das fêmeas do grupo CON (Fig.5).



Figura 4: Peso corporal apresentado pelas fêmeas dos grupos CON e CAF no momento do desmame, aos 21 dias ($p < 0,05$ Teste t de Student).

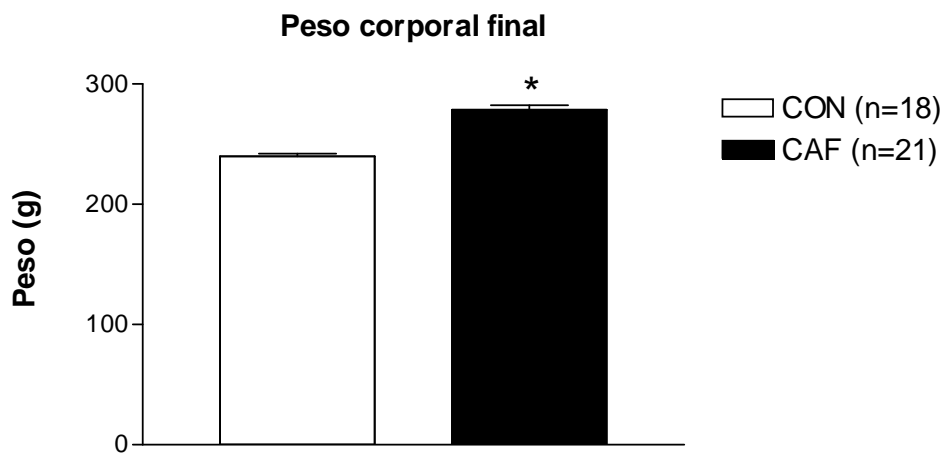


Figura 5: Peso final apresentado pelas fêmeas dos grupos CON e CAF.

* Comparado ao grupo CON ($p < 0,05$ Teste t de Student).

4.2 Comprimento Nasoanal

Na figura 6, fêmeas do grupo CON e CAF não apresentaram diferença significativa em relação ao comprimento naso-anal.

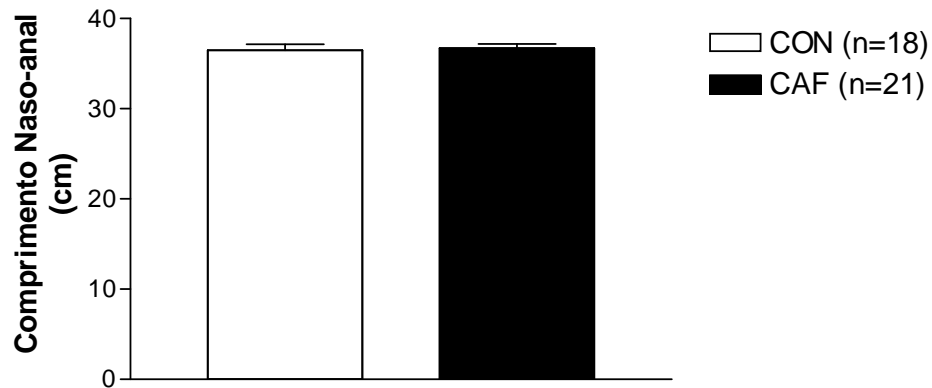


Figura 6: Comprimento naso-anal das fêmeas dos grupos CON e CAF. ($p < 0,05$ Teste t de Student).

4.3 Peso das gorduras Intraperitoneal e Perigonadal

O peso das gorduras intraperitoneal (Fig.7) e perigonadal (Fig.8) foi significativamente maior nas fêmeas do grupo CAF, ao serem comparadas com estas gorduras das fêmeas CON.

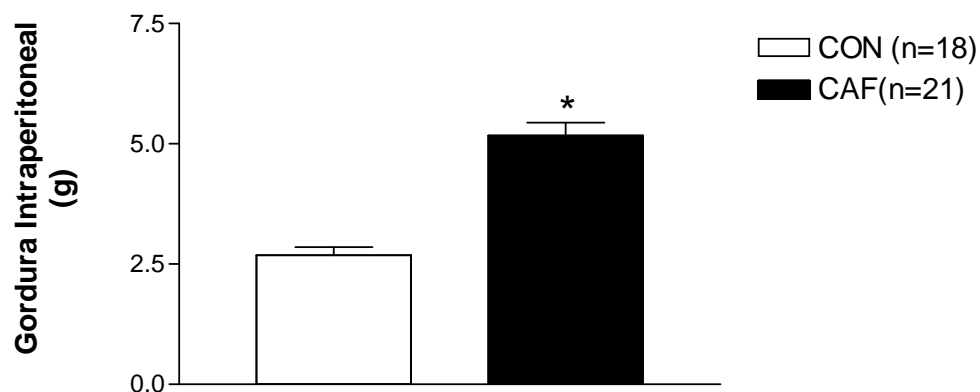


Figura 7: Peso da gordura Intraperitoneal presente nas fêmeas dos grupos CON e CAF. *Comparado ao grupo CON ($p < 0,05$ Teste t de Student).

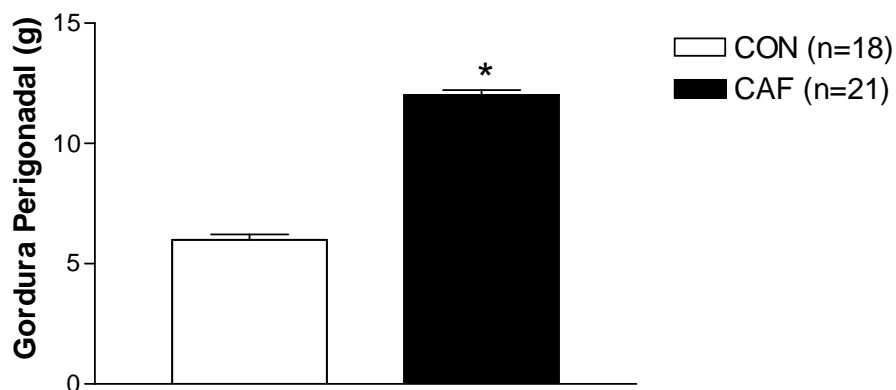


Figura 8: Peso da gordura Perigonadal presente nas fêmeas dos grupos CON e CAF. *Comparado ao grupo CON ($p < 0,05$ Teste t de Student).

4.4 Peso Ovariano

O peso do ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Fig.9).

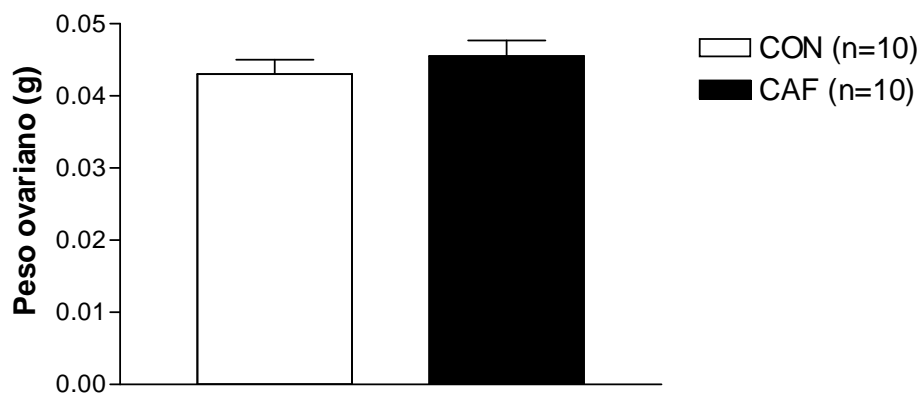


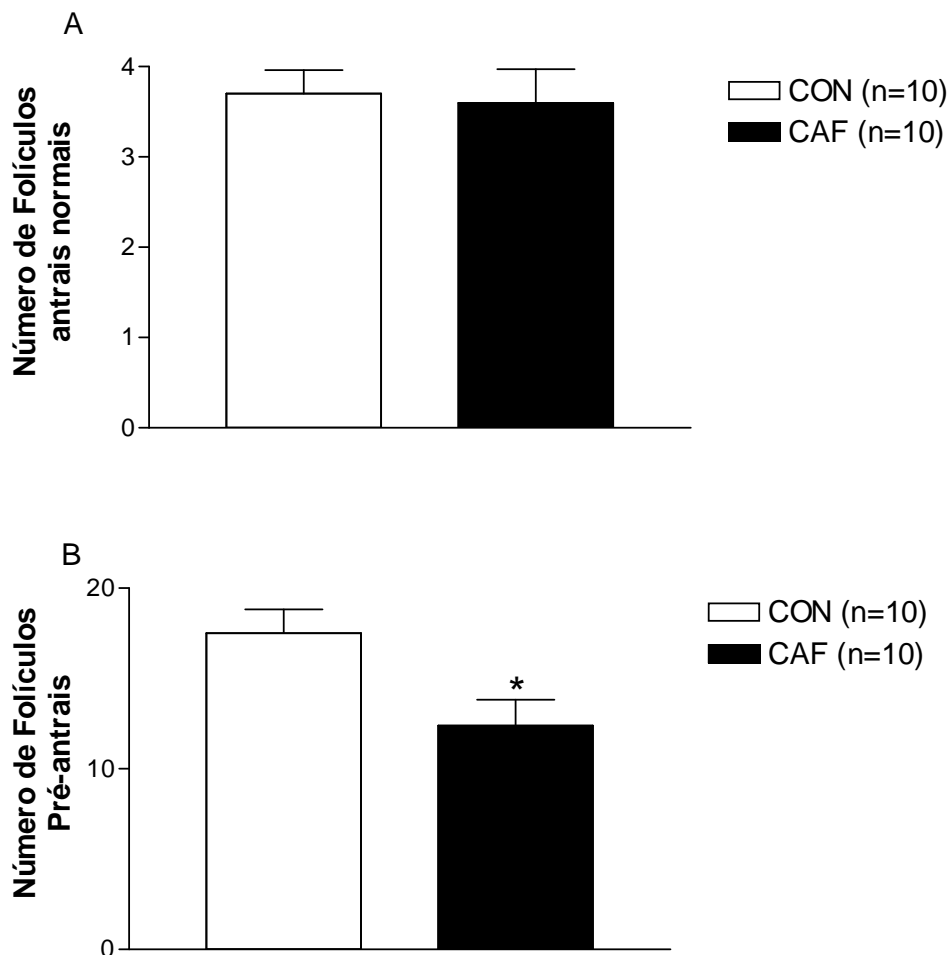
Figura 9: Peso dos ovários direitos coletados das fêmeas dos grupos CON e CAF ($p < 0,05$ Teste t de Student).

4.5 Número de Folículos

O número de folículos antrais normais (Fig.10 A) quantificados nos ovários das fêmeas dos grupos CON e CAF não apresentou diferença estatisticamente significativa. Nos ovários analisados não foi verificada a presença de folículos antrais atresícos.

Nos ovários das fêmeas do grupo CAF foi encontrado um número significativamente menor de folículos pré-antrais (Fig.10 B), quando comparado com as fêmeas do grupo CON.

A quantidade de folículos primários (Fig. 10 C) e secundários (Fig. 10 D) encontrados nos ovários das fêmeas dos grupos CON e CAF não apresentou diferença estatisticamente significativa.



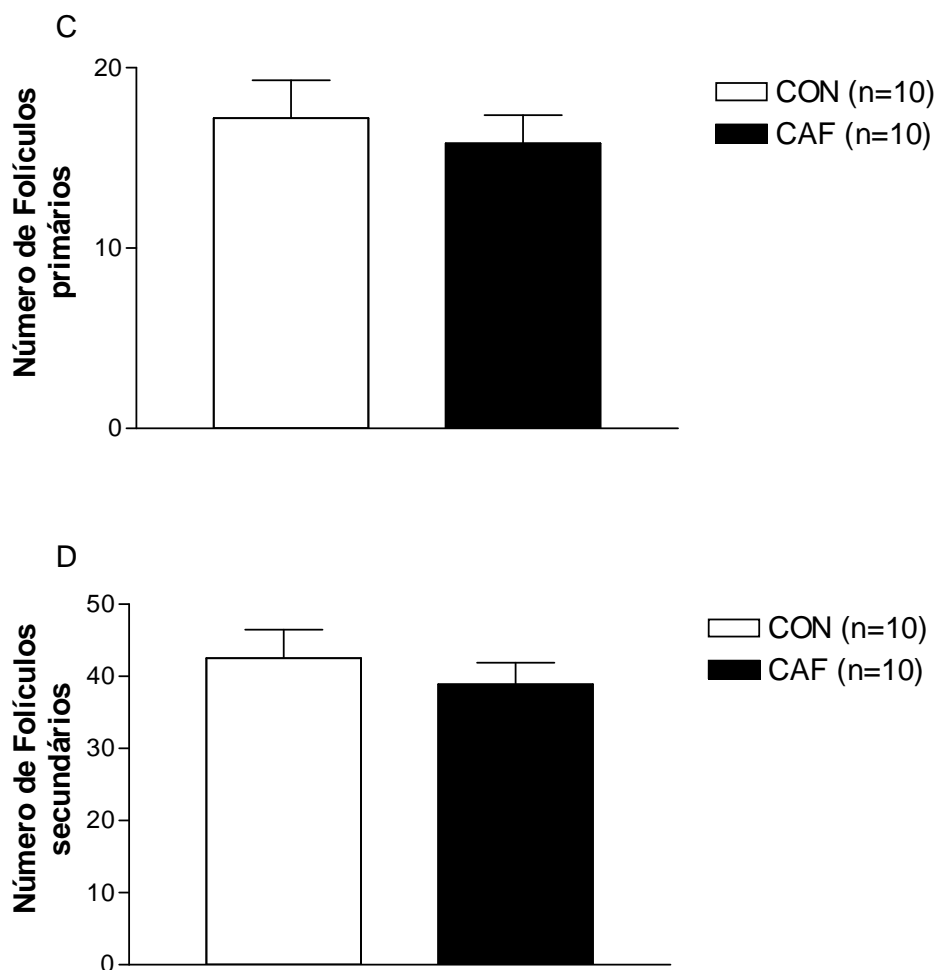


Figura 10: Número de folículos antrais normais (A), pré-antrais (B), primários (C) e secundários (D) encontrados no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF. *Comparado ao grupo CON ($p < 0,05$ Teste t de Student).

4.6 Diâmetro dos Folículos Antrais Normais

A análise do diâmetro dos folículos antrais normais mostrou a presença apenas de folículos com diâmetro superior a $500 \mu\text{m}$ no ovário das fêmeas dos grupos CON e CAF (Fig.11).

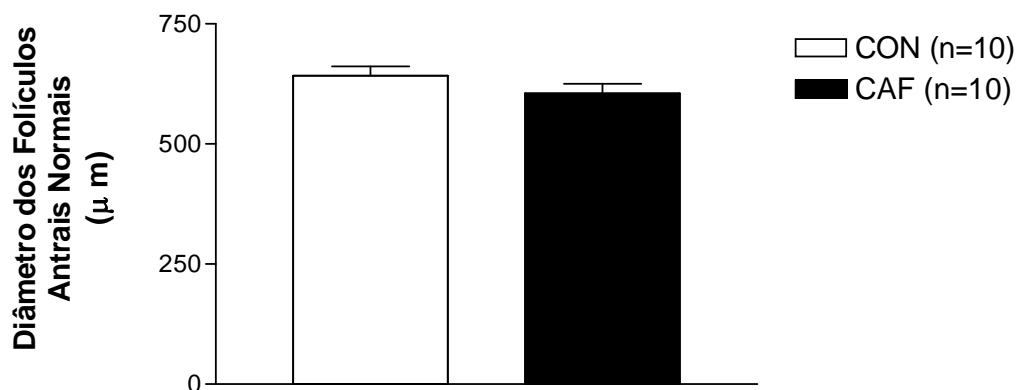


Figura 11: Diâmetro dos folículos antrais normais presentes no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF ($p < 0,05$ Teste t e Student).

4.7 Espessura da Camada da Teca

A espessura da camada das células da teca dos folículos antrais normais das fêmeas do grupo CAF foi significativamente menor em relação à espessura destas células nos folículos das fêmeas do grupo CON (Fig12).

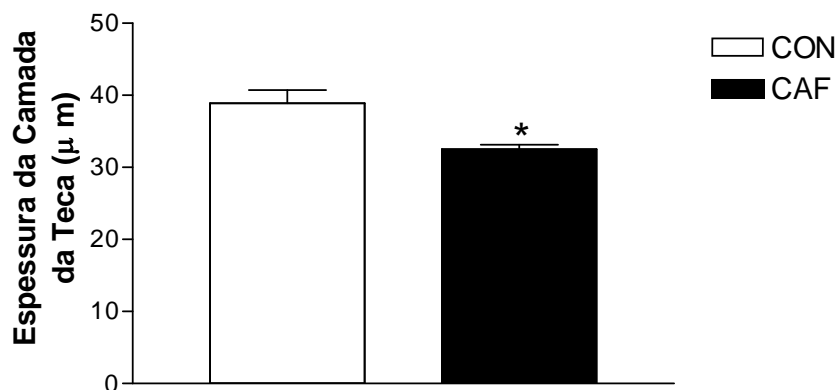


Figura 12: Espessura da teca de folículos antrais normais no ovário direito das fêmeas dos grupos CON e CAF ($p < 0,05$ Teste t de Student).

5. Discussão

O presente estudo teve por objetivo verificar aspectos da função reprodutiva de ratas Wistar adultas, submetidas à dieta de cafeteria a partir dos 21 dias de idade por meio de abordagens morfológicas e estruturais dos ovários. Nossos resultados mostraram um aumento do peso final nos animais submetidos à dieta desde o desmame, quando comparados com os animais do grupo alimentado com dieta padrão de biotério; não provocando alterações comprimento nasoanal entre os animais dos grupos experimentais. A efetividade da dieta fica ainda mais evidente quando observamos os resultados referentes ao peso das gorduras intraperitoneal e perigonadal, as quais apresentaram maior acúmulo nas fêmeas alimentadas com a dieta.

Em relação à estrutura dos ovários das fêmeas, a dieta de cafeteria não provocou nenhuma alteração no peso ovariano, assim como, não alterou o número de folículos antrais normais, de folículos primários e secundários. Entretanto, encontramos um número menor de folículos pré-antrais em fêmeas que foram tratadas com a dieta. Neste estudo, encontramos apenas folículos antrais com diâmetro superior a 500 μ m, sendo que, a espessura da camada da teca apresentou-se menor nas fêmeas do grupo CAF.

5.1 Dieta de Cafeteria e Obesidade

Em nosso experimento, a utilização da dieta de cafeteria promoveu um maior ganho de peso corporal nos animais tratados, corroborando com a literatura (LLADO et al., 1995). Este modelo vem sendo utilizado para induzir o aumento de peso corporal em animais em diferentes épocas da vida, com idades de início que vão de 7 dias após o parto (DAMETO et al., 1994); início logo após o desmame (PRATS et al., 1989), até inícios mais tardios, durante a vida adulta (ROTHWELL & STOCK, 1979). No presente estudo, a dieta iniciou-se a partir do desmame. Assim como o início da dieta varia de acordo com o experimento, a duração da dieta também pode ser variável; na maioria dos estudos, o fornecimento da dieta dura entre 3 e 8 semanas, embora duração maior que 5 meses tenha sido descrita (De Schepper et al., 1998).

5.2 Tecido Adiposo Visceral ou Intra-abdominal

Os riscos à saúde decorrentes da obesidade variam de acordo com a localização do tecido adiposo. Diferenças na distribuição do tecido adiposo sugerem que sua formação não ocorre de forma homogênea, desta forma, os diferentes depósitos adiposos têm propriedades diferentes, que podem ter importantes conseqüências sobre a saúde (SHI & CLEGG, 2009).

O tecido adiposo intra-abdominal é metabolicamente e funcionalmente diferente do tecido adiposo subcutâneo, sendo caracterizado por uma maior quantidade de capilares e axônios simpáticos eferentes por unidade de volume, quando comparado com o tecido subcutâneo (WAJCHENBERG, 2000). O tecido adiposo intra-abdominal tem características adipogênicas, metabólicas, pró-aterogênicas e pró-trombóticas (TRAYHURN, 2005). Além disso, existe uma maior quantidade de ácidos graxos livres e de glicerol sendo liberados a partir do tecido adiposo intra-abdominal para o sistema venoso portal em mulheres obesas (SHI & CLEGG, 2009).

O tecido adiposo está ativamente envolvido na regulação da função celular através de uma complexa rede de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos, que influenciam a resposta de muitos tecidos. A característica do tecido adiposo como órgão multifuncional é baseada na capacidade das células adiposas em secretarem uma grande variedade de hormônios, fatores de crescimento, enzimas, citoquinas e fatores complemento, além destas células, expressarem receptores para muitos destes fatores, os quais garantem uma extensa rede de comunicação local e sistêmica em resposta a estímulos externos específicos ou alterações metabólicas. A grande maioria dos fatores derivados dos adipócitos apresentam-se alterados, acompanhando mudanças com a massa de tecido adiposo (KAHN et al., 2006).

A estrutura, função e origem celular dos fatores produzidos e secretados pelo tecido adiposo variam consideravelmente (TRAYHURN & WOOD, 2004; FRÜHBECK, 2004; LA CAVA et al., 2004; GRANGER, 2004; GIMENO & KLAMAN, 2005). Dentre os principais fatores, encontramos as citoquinas, que contribuem para o pleiotropismo do tecido adiposo e marcam uma extensa rede

comunicação autócrina, parácrina e endócrina (TRAYHURN, 2005; YU Y-H & GINSBERG, 2005; BERG & SCHERER, 2005). Uma das principais relações das citocinas com a obesidade é determinada pela resposta inflamatória. Neste contexto, fatores vasculares como o Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF-alfa), as Interleucinas, o inibidor da ativação do plasminogênio, fatores teciduais, oxido nítrico, angiotensinogênio, dentre outros, compõem a lista dos mais estudados. Estes fatores estão relacionados, direta ou indiretamente, na regulação da homeostase vascular através de efeitos sobre a pressão sanguínea, inflamação, aterogênese, coagulação, angiogênese, proliferação, apoptose e imunidade.

Do ponto de vista da reprodução feminina, um dos principais fatores que podemos citar é o TNF-alfa, o qual é produzido pelo tecido adiposo tanto a partir dos adipócitos, como pelas células da matriz tecidual (WEISBERG et al., 2003; FAIN et al., 2004) e seus níveis plasmáticos circulantes parecem estar relacionados com o IMC (ZAHORSKA-MARKIEWICZ et al., 2000). O envolvimento do TNF-alfa na função ovariana tem sido evidenciada a partir de estudos que tem demonstrado a presença tanto de TNF-alfa imunorreativo como de seu RNAm em oócitos e células da granulosa de folículos antrais normais e atresicos em ratos e humanos, assim como em uma subpopulação de células da teca humana (ROBY & TERRANOVA, 1989; ROBY et al., 1990; SANCHO-TELLO et al., 1992; NAYLOR et al., 1993; MARCINKIEWICZ et al., 1994). A proliferação das células da teca induzidas pelo TNF-alfa, assim como, o aumento das ações proliferativas da insulina e do IGF-1, e o aumento da população de células esteroidogenicamente ativas, tem sido observada em estudos in vitro (SPACZYNSKI et al., 1999). Por outro lado, o TNF-alfa agindo conjuntamente com IL-1 promove a inibição da esteroidogênese estimulada por gonadotrofinas em células ovarianas indiferenciadas (BORNSTEIN et al., 2004).

5.3 Desenvolvimento Folicular e Esteroidogênese

O ovário é composto por três regiões distintas, um córtex contendo o epitélio germinal e os folículos; uma medula central, consistindo do estroma,

que é formado por tecido conectivo vascularizado; e uma área de ligação do ovário ao mesovário (CARR, 1998).

Os folículos no córtex ovariano encontram-se em vários estágios de desenvolvimento e regressão. A formação folicular marca o início da foliculogênese, a qual pode ser definida como o processo no qual um folículo primordial, que consiste de uma pequena célula e uma lâmina de células da granulosa achatadas, cresce e diferencia-se em um folículo antral, o folículo pré-ovulatório, que se torna maduro e é liberado no processo de ovulação. Os folículos pré-ovulatórios contêm um oócito desenvolvido e várias camadas de células da granulosa, que são envolvidas pelas células da teca. O processo de foliculogênese pode ser dividido em três etapas distintas, iniciando pelo desenvolvimento do folículo primordial em folículo primário e a transição deste, crescendo e formando o folículo secundário; em seguida inicia a formação do antra e o desenvolvimento inicial do folículo pré-antral, e por fim, o seu desenvolvimento em folículo antral (SILVA et al., 2009).

A síntese de hormônios esteróides nos ovários ocorre predominantemente nas camadas de células da granulosa e da teca dos folículos. A porção interna da teca é altamente vascularizada e produz grande quantidade de progesterona e andrógenos, os quais atuam como precursores para a síntese de estrógenos nas células da granulosa. A androstenediona e a testosterona difundem-se para as células da granulosa, onde são convertidas, principalmente, a estradiol, pela ação da enzima aromatase (LUU-THE, 2001; MINDNICH et al., 2004). No estágio de folículo pré-ovulatório, durante o qual ocorre a maturação folicular, a síntese de estradiol é gradualmente aumentada devido ao *up regulation* da aromatase por ação do LH e FSH. Durante esta fase crítica, o estrógeno parece ser responsável por aumentar os receptores de LH e iniciar a alça de feedback positivo responsável pelo pico de LH que resulta no principal estímulo para ocorrer a ovulação (GREENWALD & ROY, 1994). Após o pico de LH e consequente ovulação, o folículo entra na fase luteal, onde predomina a síntese de progesterona. Sob o controle de vários hormônios, sinalização de segundos mensageiros, como o AMPc, citocinas e fatores de transcrição, a produção de esteróides ovarianos altera qualitativa e quantitativamente durante o ciclo ovulatório.

A análise da estrutura ovariana demonstra que a morfologia não foi alterada, entretanto, as fêmeas alimentadas com a dieta de cafeteria apresentaram alteração quantitativa no desenvolvimento folicular, representado por redução significativa no número de folículos pré-ovulatórios; e em relação à estrutura dos folículos antrais, estas fêmeas apresentaram espessura significativamente reduzida da camada das células da teca.

Devido à complexidade e ao padrão cíclico do sistema reprodutivo feminino, tanto em mulheres, como em modelos experimentais, a determinação da sua relação com a obesidade é difícil de ser estabelecida com precisão; o que se sabe é que a função ovariana é regulada por sinais hormonais e intra-ovarianos que agem em sincronia para controlar o desenvolvimento folicular, a secreção de esteróides e a ovulação. Em mulheres, a obesidade está relacionada a uma série de distúrbios metabólicos, que podem resultar em antecipação da menarca, a subfertilidade, a Síndrome do Ovário Policístico (PCOS) e até mesmo a cessação antecipada da função ovariana (RACHON & TEEDE, 2009). Esta relação negativa entre obesidade e reprodução também é evidenciada no modelo experimental que utilizamos, onde as fêmeas apresentam redução no número de concepções e de nascimentos (WEHMER et al., 1979; ROLLS et al., 1980) e irregularidades no ciclo estral (GLICK et al., 1990).

Em consonância ao resultado do presente estudo que demonstra uma redução na quantidade de folículos pré-antrais em fêmeas tratadas com a dieta de cafeteria, Kikuchi et al. (2001) encontraram reduzido desenvolvimento destes folículos isolados de fêmeas de camundongos adultos e pré-puberais. Segundo esses autores, este resultado é decorrente do efeito inibitório dos níveis elevados de leptina sobre o desenvolvimento dos folículos pré-antrais como um provável resultado do bloqueio da via do AMPc. A leptina é produzida principalmente pelos adipócitos, em adição, os ovários (CIOFFI et al., 1997; LOFFLER et al., 2001, RYAN et al., 2002) e oócitos (ANTCZAK & VAN BLERKOM, 1997; CIOFFI et al., 1997; RYAN et al., 2002) também podem ser sítios de sua síntese, atuando primariamente no hipotálamo para regular o metabolismo e a deposição de gordura (HAMILTON et al., 1995; LONNQVIST et al., 1995). Este hormônio protéico possui concentração sistêmica elevada durante a ingestão alimentar e em indivíduos com aumento da gordura corporal

(MAFFEI et al., 1995; CONSIDINE et al., 1996; DAGAGO-JACK et al., 1996; KLEIN et al., 1996; MANTZOROS et al., 1997; BUTZOW et al., 1999). A leptina do tecido adiposo pode atuar como um sinal humoral para o sistema reprodutivo, indicando se os estoques energéticos disponíveis são suficientes para a reprodução normal (TATARANNI et al., 1997), podendo ser importante para influenciar estados de transição reprodutiva, como a puberdade (SPICER, 1991; RENE-GONZALEZ, 2000 MOSCHOS et al., 2002; SMITH et al., 2002). A presença de receptores de leptina em células da teca e da granulosa (KARLSSON et al., 1997; ARGAWAL et al., 1999; LOFFLER et al., 2001), oócitos (CIOFFI et al., 1997; MATSUOKA et al., 1999; RYAN et al., 2002) e embriões (KAWAMURA et al., 2002), indica uma potencial relação direta da leptina na regulação da função ovariana de mamíferos, como também no desenvolvimento do oócito e do embrião.

Além destes efeitos da leptina sobre o desenvolvimento folicular, este hormônio também possui efeitos sobre a regulação da esteroidogênese folicular, embora as informações existentes ainda sejam contraditórias sobre sua ação estimulatória ou inibitória. Jason e colaboradores (2004) determinaram que *in vitro* a leptina aumenta a produção de insulina, e de estradiol, progesterona e testosterona folicular estimulada por gonadotrofinas, sendo que, quanto maior a concentração de leptina, maior é a esteroidogênese. Este ambiente com elevados níveis de andrógenos provoca atresia folicular em ratos e aumenta a apoptose das células da granulosa (HILLIER & ROSS, 1979; BILLIG et al., 1993), com estudos demonstrando que os níveis elevados de andrógenos também reduzem a indução da expressão dos receptores de LH, atuando em vários níveis para inibir tanto o crescimento, como o desenvolvimento folicular (FAROOKHI, 1985).

Há algum tempo, o tecido adiposo deixou de ser visto apenas como um local de armazenamento de energia, tornando-se um importante órgão endócrino. Além de produzir a leptina, os adipócitos também produzem andrógenos (PASQUALI, 2006) e promovem a conversão de andrógenos a estrógenos que é intensamente dependente e diretamente proporcional à quantidade de gordura corporal (LONGCOPE et al., 1969). Ainda, a distribuição de gordura corporal influencia as concentrações de globulinas ligadoras de esteróides (SHBG) em mulheres obesas (PASQUALI & CASIMIRRI, 1993), o

que eleva as concentrações de testosterona e estradiol disponíveis, fazendo com que o feedback negativo central do excesso de estrógeno contribua para a reduzida sinalização hipotálamo-hipófise (GOSMAN et al., 2006). Como resultado, em mulheres obesas e em nosso modelo experimental, a concentração de gonadotrofinas pode estar reduzida, o que, de certa forma, estaria prejudicando o desenvolvimento folicular e a passagem do folículo pré-antral para antral.

A alteração mais freqüente da função ovariana em mulheres na pré-menopausa é a PCOS (AZZIZ et al., 2004), com a obesidade estando presente em aproximadamente 30% dos casos. Esta síndrome é caracterizada principalmente por anovulação e hiperandrogenismo relacionado a elevadas concentrações de LH (APTER, 1997). Segundo Regan e colaboradores (1990), elevadas concentrações de LH resultam em redução da capacidade reprodutiva, a qual, pode ser causada pela ação desta gonadotrofina estimulando a produção de andrógenos ovarianos. Muitos estudos têm procurado entender qual o impacto da obesidade sobre o estado hiperandrogênico na mulher com PCOS e a principal ligação que estas investigações têm feito, são em relação à ação da leptina (BRZECHFFA et al., 1996; EL ORABI et al., 1999; JACOBS et al., 1999; PANIDIS et al., 2003) que se encontra aumentada nestas mulheres. A partir da descrição por Mercer e colaboradores (1996) e Schwartz e colaboradores (1996), da expressão do gene do receptor de leptina no hipotálamo, tem-se sugerido a ação deste hormônio estimulando a secreção aumentada de gonadotrofinas, principalmente do LH, o que resultaria em um ambiente hiperandrogênico nos ovários, contribuindo para o prejudicial desenvolvimento dos folículos.

Dentre os muitos fatores que podem ser parte da resposta que buscamos, está a leptina, principalmente, como já colocado anteriormente, por ser sintetizada e liberada pelo tecido adiposo, e poder atuar tanto no sistema nervoso central, como periféricamente nos ovários; influenciando, do ponto de vista reprodutivo, em ambos locais de atuação, a esteroidogênese e o desenvolvimento folicular, que estão intimamente relacionados. Partindo deste princípio, podemos sugerir a leptina, como um dos principais, mas não o único fator que está envolvido no mecanismo que reduz a capacidade reprodutiva de mulheres obesas, assim como de fêmeas utilizadas como modelos

experimentais. Entretanto, a comprovação desta sugestão em nosso modelo experimental dependerá de novos estudos a serem realizados.

Quando observamos os resultados referentes aos números de folículos nas diferentes fases nos ovários (figura 10), é verificado que a única alteração verificada é em relação à quantidade de folículos pré-antrais, que encontra-se reduzida nas fêmeas do grupo CAF ao comparar com as CON. Este resultado pode ser decorrente do fato de que o desenvolvimento dos folículos primordiais, passando pelos primários até chegar aos secundários, não tem envolvimento significativo da ação dos esteróides ovarianos e por isso a quantidade destes folículos não encontra-se alterada. Entretanto, para o folículo atingir o estágio antral, a dependência dos esteróides sexuais é clara, como vimos anteriormente. Nossos resultados mostram que a espessura da camada das células da teca está reduzida nas fêmeas do grupo CAF, e a dependência do sucesso da esteroidogênese pela integridade destas células nos faz sugerir que a redução encontrada na quantidade de folículos pré-antrais esta relacionada com uma redução na capacidade esteroidogênica nesta fase folicular. Além da ação da leptina, sugerida anteriormente, outros fatores que podem estar envolvidos é o TNF-alfa e a IL-1, os quais agindo conjuntamente têm a capacidade de inibir a esteroidogênese em células ovarianas indiferenciadas e assim estariam auxiliando na limitação da transição dos folículos secundários a pré-antrais.

Chegando neste ponto, um novo questionamento surge, o que estaria fazendo com que, mesmo os ovários das fêmeas CAF possuindo uma menor quantidade de folículos pré-antrais, como eles não apresentaram alterações em relação a quantidade dos folículos antrais? Se observamos nos resultados, podemos verificar que um pequeno número de folículos pré-antrais chega ao estágio antral, em ambos os grupos, desta forma, a quantidade de folículos pré-antrais das fêmeas CAF pode estar sendo suficiente para formar folículos antrais.

Entretanto, mesmo a quantidade de folículos antrais não apresentando diferença entre os grupos, a estrutura destes folículos das fêmeas do grupo CAF mostra-se alterada, pela redução da espessura da camada das células da teca. Devido à importância da esteroidogênese para o sucesso da reprodução

esta alteração estrutural encontrada pode estar diretamente relacionada com a redução da capacidade reprodutiva.

6. Conclusões

Existe uma relação multifatorial entre a capacidade reprodutiva em fêmeas de mamíferos e aumento de massa adiposa. Utilizando como modelo biológico ratas induzidas à obesidade precoce por ingestão de uma dieta de cafeteria, constatou-se redução da quantidade de folículos pré-antrais e redução da espessura da camada das células da teca. Estes resultados podem ser decorrentes de uma alteração no processo esteroidogênico ovariano, associado à ação de fatores produzidos e secretados pelos adipócitos.

Com base nos resultados que encontramos é difícil de se determinar com exatidão, até o momento, quais fatores e mecanismos estão envolvidos na relação inibitória existente entre obesidade e reprodução. O que temos como certo é que a relação existe e que é multifatorial, tanto em mulheres como nas demais fêmeas de mamíferos. Com estes resultados isolados, ainda não é possível determinar de que maneira o excesso de peso da fêmea estaria influenciando no sistema reprodutivo, por este motivo, que estudos vêm sendo realizados em nosso laboratório, utilizando-se deste modelo, para analisar possíveis fatores envolvidos nesta relação, para que em um futuro próximo possamos unir os resultados encontrados e só então chegarmos a um possível mecanismo ou, possíveis mecanismos, que possam estar determinando esta prejudicial relação entre a obesidade e a reprodução feminina.

7. Referências

Adair LS, Gordon-Larsen P. Maturation timing and overweight prevalence in US adolescent girls. *Am. J. Public Health* 91, 642–644, 2001.

Anselmo Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus Coeruleus lesions decrease noroepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research* 767: 289-296, 1997.

Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development; the regulatory protein leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 3:1067–1086, 1997.

Apter D. Pubertal development in PCOS. Editores: Azziz, R, Nestler, JE, Dewailly, D. Androgen excess disorders in women. Philadelphia: *Lippincott-Raven Publishers* 327-338, 1997.

Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin like growth factor I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endo Metab* 84:1072–1076, 1999.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421(6920):268–72, 2003.

Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89:2745–2749, 2004.

Barr SI, Janelle KC, Prior JC. Energy intakes are higher during the luteal phase of ovulatory menstrual cycles. *Am J Clin Nutr* 61:39–43, 1995.

Barry D, Pietrzak RH, Petry NM. Gender differences in associations between body mass index and DSM-IV mood and anxiety disorders: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Ann Epidemiol* 18: 458–466, 2008.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939–949, 2005.

Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 661-666, 2007.

Billig H, Furuta I, Hsueh JW. Estrogens inhibit and androgens enhance granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133:2204–2212, 1993.

Bjorntorp P. Hormonal effects on fat distribution and its relationship to health risk factors. *Acta Paediatr* 383:59–60, 1992.

Bjorntorp P. Metabolic abnormalities in visceral obesity, *Ann. Med.* 24:3–5, 1992.

Bjorntorp P. Regional fat distribution – implications for type II diabetes, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 16 (4):19–27, 1992.

Bjorntorp P. The android woman – a risky condition. *J. Intern. Med.* 239:105–110, 1996.

Bjorntorp P. Hormonal control of regional fat distribution. *Hum. Reprod.* 12 (1): 21–25, 1997.

Bjorntorp, P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases, *Nutrition* 13 (1997) 795–803.

Bornstein RS, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 215:135–141, 2004.

Bowen DJ, Grunberg NE. Variations in food preference and consumption across the menstrual cycle. *Physiol Behav* 47:287–291, 1990.

Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 59:719-809, 1979.

Brownell K D. The chronicling of obesity: growing awareness of its social, economic, and political contexts. *Journal of Health Politics, Policy and Law* 30:955–964, 2005.

Browning RC, Kram R. Effects of obesity on the biomechanics of walking at different speeds. *Med Sci Sports Exerc* 39(9):1632–41, 2007.

Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, Weitsman SR, Buyalos RP, Magoffin DA. Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4166–4169, 1996.

Buffenstein R, Poppitt SD, McDevitt RM, Prentice AM. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. *Physiol Behav* 58:1067–1077, 1995.

Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708, 1974.

Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Siegber R, Nilsson CG, Apter D. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3135–3139, 1999.

Campfield LA, Smith FJ: Alteration of islet neurotransmitter sensitivity following ventromedial hypothalamic lesion. *Am. J. Physiol.* 244:R635-640, 1983.

Carr BR. The Ovary. William's Textbook of Endocrinology. *W.B. Saunders, Harcourt & Brace* 751–817, 1998.

Carr MC. The emergence of the metabolic syndromewith menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:2404–2411, 2003.

Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 109:419–33, 2007.

Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 103:219–224, 2004.

Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittner S, Snidgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3:467–472, 1997.

Cnattingius S, Lambe M. Trends in smoking and overweight during pregnancy: prevalence, risks of pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes. *Semin. Perinatol.* 26:286-295, 2002.

Cole TJ. Secular trends in growth. *Proc. Nutr. Soc.* 59:317–324, 2000.

Connely OM. Prespective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 142:2194-2199, 2001.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive leptin concentration in normal weight and obese humans. *New Eng J Med* 334:292–295, 1996.

Crocker MK, Yanovski JA. Pediatric Obesity: Etiology and Treatment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 38:525–548, 2009.

Cross GB, Marley J, Miles H, Willson K. Changes in nutrient intake during the menstrual cycle of overweight women with premenstrual syndrome. *Br J Nutr* 85:475–482, 2001.

Czaja JA. Ovarian influences on primate food intake: assessment of progesterone actions. *Physiol Behav* 21:923–928, 1978.

Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationship in obese and non-obese humans. *Diabetes* 45:695–698, 1996.

Dalvit SP. The effect of the menstrual cycle on patterns of food intake. *Am J Clin Nutr* 34:1811–1815, 1981.

Dameto MC, Rayo JM, Esteban S, Prieto RM, Tur JA. Effect of cafeteria diet on alpha-MG intestinal absorption in rats. *Comp Biochem Physiol* 108:467–470, 1994.

DeMola RL. Obesity and Its Relationship to Infertility in Men and Women. *Obstet Gynecol Clin N Am* 36:333–346, 2009.

De Paula RB, da Silva AA, Hall JE. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension* 43:41-7, 2004.

De Schepper, J., Zhou, X., De Bock, Smitz, S. J., Louis, O., Hooghe-Peters, E., et al. Study of serum leptin in cafeteria-diet-overfed rats Influence of diet, insulin and corticosterone. *Horm Res.* 50:271–275, 1998.

Donahue RP, Abbott RD. Central obesity and coronary heart disease in men, *Lancet* 2:1215, 1987.

Donahue RP, Orchard TJ, Becker DJ, Kuller LH, Drash AL. Sex differences in the coronary heart disease risk profile: a possible role for insulin. The Beaver County study, *Am. J. Epidemiol.* 125:650–657, 1987.

dos Santos Silva. Prenatal factors, childhood growth trajectories and age at menarche. *Int. J. Epidemiol.* 31, 405–412, 2002.

Dunger DB. Early and late weight gain and the timing of puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254–255, 140–145, 2006.

Dye L, Blundell JE. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod* 12:1142–1151, 1997.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352:1223–36, 2005.

El Orabi H, Ghalia AA, Khalifa A, Mahfouz H, El Shalkani A, Shoieb N. Serum leptin as an additional possible pathogenic factor in polycystic ovary syndrome. *Clin Biochem* 32:71–75, 1999.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829–838, 2001.

Fain JN, Bahouth SW and Madan AK. TNF α release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:616–622, 2004.

Farookhi R. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgen treatments on luteinizing hormone receptors and ovulation induction in immature rat. *Biol Reprod* 33:363–369, 1985.

Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:43–8, 2000.

Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 115: 897-909; quiz 910, 2005.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Davey-Smith G, Hattersley AT, McCarthy MI. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, 2007.

Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: *Physiology of Reprod. Ed E. Knobil and J. Neill*. Raven Press, New York. 45:613-657, 1994.

Frühbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem (Cardiovasc Hematol Agents)* 2:197–208, 2004.

Gimeno RE, Klamon LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr Opin Pharmacol* 5:122–128, 2005.

Glick A, Yamini S, Lupien J, Sod-Moriah U. Estrous cycle irregularities in overfed rats. *Physiol Behav.* 47(2):307-310, 1990.

Goffman, E. Stigma: Notes on the Management of Spoiled Identity. *Simon and Schuster*, New York, 1963.

Gong EJ, Garrel D, Calloway DH. Menstrual cycle and voluntary food intake. *Am J Clin Nutr* 49:252–258, 1989.

Gosman GG, Heather IK, Legro RS. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. *Hum. Reprod* 12(5):585-601, 2006.

Granger JP. Inflammatory cytokines, vascular function, and hypertension. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 286:R989–R990, 2004.

Greendale GA, Sowers, M. The menopause transition. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 26:261–277, 1997.

Greenwald G, Roy S. Follicular development and its control. *In The Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. Neill, Eds.)* 629–724, 1994.

Hamilton B, Paglia D, Dwan A, Beital M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature Med* 1:953–956, 1995.

Hart DJ, Spector TD. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford study. *J Rheumatol* 20(2):331–5, 1993.

Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999–2002. *JAMA*, 291(23):2847–2850, 2004.

Hill JO, Peters JC. Environmental Contributions to the obesity epidemic. *Science*, 280: 1371-1373, 1998.

Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen primed hypohysectomized immature female rats. *Biol Reprod* 20:261–268, 1979.

Himms-Hagen J, Triandafillou J, Gwilliam C. Brown adipose tissue of cafeteria fed rats. *Am. J. Physiol.* 241:E120, 1981.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology.* 124: 43-101, 1991.

Hudson JI, Hiripi E, Pope HG Jr, Kessler RC. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol Psychiatry* 61:348–358, 2007.

Ishikawa J. Luteinizing hormone requirements for ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*. 46: 1144-1150, 1992.

Jacobs HS, Conway GS. Leptin, polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 5:166–171, 1999.

Janssen I, Powell LH, Crawford S, Lasley B, Sutton-Tyrrell K. Menopause and the metabolic syndrome: the study of women's health across the nation. *Arch. Intern. Med.* 168:1568–1575, 2008.

Jason ES, Rodney LD, Daniel M, Janis GM, Gary DS. Direct Effects of Leptin on Mouse Reproductive Function: Regulation of Follicular, Oocyte, and Embryo Development. *Biology of Reproduction* 71:1446–1452, 2004.

Jonson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145-150, 2004.

Kannel WB, D'Agostino RB, Cobb JL. Effect of weight on cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 63(Suppl 3):419S–22S, 1996.

Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, Pedlow SE, Herman-Giddens ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics* 108:347–353, 2001.

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144–4148, 1997.

Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Tanaka T. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 143:1922–1931, 2002.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840–846, 2006.

Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, Ruden D, Pietrobelli A, Barger JL, Fontaine KR, Wang C, Aronne LJ, Wright SM, Baskin M, Dhurandhar NV, Lijoi MC, Grilo CM, Deluca M, Westfall AO, Allison DB. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int.J.Obes.(Lond)* 30:1585–1594, 2006.

Kemnitz JW, Eisele SG, Lindsay KA, Engle MJ, Perelman RH, Farrell PM. Changes in food intake during menstrual cycles and pregnancy of normal and diabetic rhesus monkeys. *Diabetologia* 26:60–64, 1984.

Kikuchi N, Andohg K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biol Reprod.* 65:66–71, 2001.

Klein S, Coppack SW, Mohamed AV, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45:984–987, 1996.

Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily and ovarian follicle development. *Reproduction* 132:191–206, 2006.

Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebcher C, Treutel S, Kruger N, Scholz H, Haus A. Modulatory role of foold, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci.*, 76:1553-1573, 2005.

La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unravelling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med* 82:4–11, 2004.

Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden, *Brit. Med. J.* 289: 1257–1261, 1984.

Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic in the rat. *Endocrinology* 141:1059-1072, 2000.

Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case–control study. *Hum Reprod* 19:1644–6, 2004.

Latner JD, Schwartz MB. Weight Bias in a Child's World. In Brownell, K. D., Puhl, R. M., Schwartz, M. B. and Rudd, L. (eds), *Weight Bias: Nature, Consequences, and Remedies. The Guildford Press, London, 54–67, 2005.*

Lee JM, Appugliese D, Kaciroti N, Corwyn RF, Bradley RH, Lumeng JC. Weight status in young girls and the onset of puberty. *Pediatrics* 119:e624–e630, 2007.

Lissner L, Stevens J, Levitsky DA, Rasmussen KM, Strupp BJ. Variation in energy intake during the menstrual cycle: implications for food-intake research. *Am J Clin Nutr* 48:956–962, 1988.

Lee JW, Lee DC, IM JA, KIM SM, LEE HR. Insulin resistance is associated with arterial stiffness independent of obesity in male adolescents. *Hypertens Res.* 30(1):5-11, 2007.

Levin BE. Intracarotid glucose-induced norepinephrine response and the development of diet-induced obesity. *Int. J. Obes.* 16:451-457, 1992.

Levin BE, Planas B. Defective glucoregulation of brain α -adrenoceptors in obesity-prone rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 264:R305-R311, 1993.

Levin BE, DUNN-MEYNELL AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283:R941-R948, 2002.

Levin BE, DUNN-MEYNELL AA. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *American J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 286:R771-R778, 2004.

Litonjua AA, Gold DR. Asthma and obesity: common early-life influences in the inception of disease. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1075-1084; quiz 1085-1076, 2008.

Lladó I; Proenza AM; Serra F; Palou A; Pons A. Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats. *Int. J. Obesity* 15: 415-419, 1991.

Lladó I, Pico C, Palou A, Pons A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol. Behav.* 58:513-519, 1995.

Loffler S, August G, Kohler U, Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod* 7:1143–1149, 2001.

Longcope C, KATO T, HORTON R. Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *J. Clin. Invest.* 48:2191-212201, 1969.

Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese gene in adipose tissues of human obese subjects. *Nat Med* 1:950–953, 1995.

Lonnqvist F, Thorne A, Large V, Arner P. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:1472–1480, 1997.

Lund KJ. Menopause and the menopausal transition. *Med. Clin. North Am.* 92, 1253–1271, xii, 2008.

Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 76:143–151, 2001.

Lyons PM, Truswell AS, Mira M, Vizzard J, Abraham SF. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr* 49:1164–1168, 1989.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med* 1:1155–1161, 1995.

Major B, O'Brien LT. The social psychology of stigma. *Annual Review of Psychology*, 56:393–421, 2005.

Mantzoros XS, Dunaif A, Flier JS. Leptin concentrations in the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1687–1691, 1997.

Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM, Terranova PF. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod.* 50:1251–1260, 1994.

Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumotoa N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem Biophys Res Comm* 256:480–484, 1999.

Matthews MK, Kenyon R. Four-versus five-day estrous cycle in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology & Behavior* 33:65-67, 1984.

McCance RA, Widdowson EM. The effects of chronic undernutrition and of total starvation on growing and adult rats. *Br. J. Nutr.* 10:363–373, 1956.

McIntyre RS, Konarski JZ, Wilkins K, Soczynska JK, Kennedy SH. Obesity in bipolar disorder and major depressive disorder: Results from a national community health survey on mental health and well-being. *Can J Psychiatry* 51:274–280, 2006.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by *in situ* hybridization. *FEBS Letts.* 387:113-116, 1996.

Michailidou Z, Jensen MD, Dumesic DA, Chapman KE, Seckl JR, Walker BR, et al. Omental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 15:1155–63, 2007.

Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 betahydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218, 7–20, 2004.

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77:433–444, 2002.

Mujica V, Leiva E, Icaza G, Diaz N, Arredondo M. Evaluation of metabolic syndrome in adults of Talca city, Chile. *Nutr. J.* 7:14, 2008.

Nadareli EK, Pickavance LC, Wilding JP, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is dependent of the degree of increase in total body weight. *Clin. Sci.* 100: 635-41, 2001.

Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 91:2194–2206, 1993.

Novotny, R. et al. Formula feeding in infancy is associated with adolescent body fat and earlier menarche. *Cell Mol. Biol.* 49:1289–1293, 2003.

Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 132:2087–2102, 2007.

Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913, *Diabetes* 34:1055–1058, 1985.

Oktaý,K. *et al.* Interaction of extracellularmatrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol. Reprod.* 63: 457–461, 2000.

Oktem, O, Oktaý, K. The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1127: 1–9, 2008.

Padez C, Rocha MA. Age at menarche in Coimbra (Portugal) school girls: a note on the secular changes. *Ann. Hum. Biol.* 30:622–632, 2003.

Panidis D, Roussa D, Kourtis A, Tsimas V, Papathanasiou K, Makedos G. Serum leptin levels in normal weight and overweight women with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Obstet Gynecol* 30:207–210, 2003.

Pasquali R, Casimirri F. The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Osf)* 39: 1-16, 1993.

Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas, The European Menopause Journal*, 54:363-371, 2006.

Patton GC, Viner R. Pubertal transitions in health. *Lancet* 369:1130–1139, 2007.

Petry NM, Barry D, Pietrzak RH, Wagner JA. Overweight and obesity are associated with psychiatric disorders: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychosom Med* 70:288–297, 2008.

Pi-Sunyer FX. Comorbidities of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* 31(Suppl 11):S602–8, 1993.

Pickering RP, Grant BF, Chou SP, Compton WM. Are overweight, obesity, and extreme obesity associated with psychopathology? Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *J Clin Psychiatry* 68:998–1009, 2007.

Prada PO, Zecchini HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJA. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1^{ser307} phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146:1576-1587, 2005.

Prats E, Monfar M, Castella J, Iglesias R, Alemany M. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav.* 1989;45:263–272. Puhl RM, Brownell KD. Confronting and coping with weight stigma: An investigation of overweight and obese adults. *Obesity* 14:1802–1815, 2006.

Proenza AM, Lladó I, Serra F, Picó C, Pons A, Palou A. Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch, Int. Physiol. Biochim.* 100:147-154, 1992.

Rachon´ D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W. Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and

glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 14:925–932, 2007a.

Rachon´ D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W. Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotrophic effects in ovariectomized rats. *Maturitas* 57, 161–170, 2007b.

Rachon D, Teede H. Ovarian function and obesity—Interrelationship, impact on women’s reproductive lifespan and treatment options. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009.

Ramsay JE, Greer I, Sattar N. Obesity and reproduction. *BMJ* 333:1159–62, 2006.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14(4):529–644, 2006.

Reed SC, Levin FR, Evans SM. Changes in mood, cognitive performance and appetite in the late luteal and follicular phases of the menstrual cycle in women with and without PMDD (premenstrual dysphoric disorder). *Horm Behav* 54:185–193, 2008.

Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility and miscarriage. *Lancet* 336:1141-1144, 1990.

Reimer RA, Debert CT, House JL, Poulin MJ. Dietary and metabolic differences in pre- versus postmenopausal women taking or not taking hormone replacement therapy. *Physiol Behav* 84:303–312, 2005.

Rene-Gonzalez R, Simon C, Caballero Campo-P, Norman R, Chardonens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update* 6:290–300, 2000.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569–78, 2008.

Renehan AG, Egger M, Zwahlen M. Body mass index and cancer risk: the evidence for causal association. *BMC Open J. Obes.* In press, 2009.

Roby KF, Terranova PF. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in rat and bovine ovary using immunocytochemistry and cell blot: evidence for granulosa production. In: *Hirshfield AN (ed.), Growth Factors and the Ovary.* New York: Plenum Press 273–278, 1989.

Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1096–1102, 1990.

Rogge MM, Greenwald M, Golden A. Obesity, stigma, and civilized oppression. *Advances in Nursing Science* 27:301–315, 2004.

Rolls BJ, Rowe EA, Fahrbach SE, Agius L, Williamson DH. Obesity and high energy diets reduce survival and growth rates of rat pups. *Proc Nutr Soc.* 39(2):51A, 1980.

Rosenblatt H, Dyrenfurth I, Ferin M, vande Wiele RL. Food intake and the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Physiol Behav* 24:447–449, 1980.

Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31–35, 1979.

Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 66:1548–1554, 2002.

Sancho-Tello M, Perez-Roger I, Imakawa K, Tilzer L, Terranova PF. Expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 130:1359–1364, 1992.

Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hipotalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav* 17:461-471,1976.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest* 98:1101-1106, 1996.

Schwartz NB. Neuroendocrine regulation of reproductive cycle. In Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores: Conn P.M., Freeman ME, New Jersey: *Human Press* 135-146, 2000.

Scott KM, Bruffaerts R, Simon GE, Alonso J, Angermeyer M, de Girolamo G. Obesity and mental disorders in the general population: Results from the world mental health surveys. *Int J Obes* 32:192–200, 2008.

Segal, M. M.; Bell, J. & Abrams, G. M.: Hypothalamic or central obesity is Associated with an early rise in plasma insulin concentration. *Arch. Neurol.* 48:429-431, 1991.

Serra F, Bonet L, Palou A. Amino-acid-enzyme activities in brown and white adipose tissues and in the liver of cafeteria rats. Effects of 24 hours starving. *Arch, Int, Physiol. Biochim.* 65:263-268, 1987.

Serra F, Gianotti M, Palou A, Pons A. Dietary obesity shows adaptations of amino-acid metabolism and enzyme activities to save amino nitrogen. *Biochem. Int.* 24: 769-776, 1991.

Shadid S, Koutsari C, Jensen MD. Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. *Diabetes* 56:1369–75, 2007.

Shi H, Clegg J. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & Behavior* 97:199–204, 2004.

Shore SA, Johnston RA. Obesity and asthma. *Pharmacol Ther* 110: 83-102, 2006.

Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis *Theriogenology* 71:1193–1208, 2009.

Simon GE, Von Korff M, Saunders K, Miglioretti DL, Crane PK, van Belle G. Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. *Arch Gen Psychiatry* 63:824–830, 2006.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum.Reprod.* 11:461–471, 2005.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 95: 219-226, 1975.

Smith GD, Jackson LM, Foster DL. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology* 57:73–86, 2002.

Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMN). *Diabetes* 50:2673-2681, 2001.

Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor necrosis factor- α stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 61:993-8, 1999.

Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 21:251–270, 1991.

Stuber J, Meyer I, Link B. Stigma, prejudice, discrimination and health. *Social Science and Medicine* 67:351–357, 2008.

Szawka RE, Anselmo Franci JA. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. *Life Sciences*. 75:911-922, 2004.

Tataranni PA, Monroe MB, Dueck CA. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:818–821, 1997.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355, 2004.

Trayhurn P. Adipose tissue in obesity-an inflammatory issue. *Endocrinology* 146:1003–5, 2005.

Trayhurn, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 184:285–293, 2005.

Vaidya V. Psychosocial aspects of obesity. *Advances in Psychosomatic Medicine* 27: 73–85, 2006.

Vainio H, Bianchini F. Weight Control and Physical Activity. IARC Handbook of Cancer Prevention International Agency for Research in Cancer. *Lyon. IARC Press*. 6, 2002.

Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 36(5):772–9, 2004.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 21:697–738, 2000.

Wang Y. Is obesity associated with early sexual maturation? A comparison of the association in American boys versus girls. *Pediatrics* 110:903–910, 2002.

Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod* 16:2606–9, 2001.

Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* 111:1152–1158, 2003.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808, 2003.

Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade G, Eddleman K, Carter SM, Craigo SD. Obesity, obstetric complications and Cesarean delivery rate—a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol* 190:1091–1097, 2004.

Wehmer F, Bertino M, Jen KL. The effects of high fat diet on reproduction in female rats. *Behav Neural Biol.*, 27(1):120-4, 1979.

Wise PM, Krajnak KM, Kashon ML. Menopause: the aging of multiple pacemakers. *Science* 273:67–70, 1996.

Wofford MR, Hall JE. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Curr. Pharm. Des.* 10:3621-37, 2004.

Wolf AM, Colditz GA. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. *Obes Res* 6:97–106, 1998.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz, M. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280:1378-1383, 1998.

Yu CKH, Teoh TG, Robinson S. Obesity in pregnancy. *BJOG* 113:1117–25, 2006.

Yu Y-H, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. Sequelae of insulinresistant adipose tissue. *Circ Res* 96:1042–1052, 2005.

Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Olszanecka-Glinianowicz M and Zurakowski A. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 24:1392–1395, 2000.

Zhou X, Schepper JD, Craemer DD, Delhase M, Gys G, Smitz J, Hooghe-Peters EL. Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet-induced obese rats. *Journal of Endocrinology* 159: 165-172, 1998.