

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**GIULIANE BARROS DE MELO**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini*  
(L.) SKEELS SOBRE O METABOLISMO E MICROAMBIENTE OVARIANO DE  
RATAS WISTAR ALIMENTADAS COM RAÇÃO RICA EM SACAROSE**

São Luis – MA

2018

**GIULIANE BARROS DE MELO**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini*  
(L.) SKEELS SOBRE O METABOLISMO E MICROAMBIENTE OVARIANO DE  
RATAS WISTAR ALIMENTADAS COM RAÇÃO RICA EM SACAROSE**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão.

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

São Luis – MA

2018

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

Barros de Melo, Giuliane.

EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE  
*Syzygium cumini* L. SKEELS SOBRE O METABOLISMO E  
MICROAMBIENTE OVARIANO DE RATAS WISTAR ALIMENTADAS COM  
RAÇÃO RICA EM SACAROSE / Giuliane Barros de Melo. - 2018.  
56 f.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.  
Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,  
Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2018.

1. Dieta rica em sacarose. 2. Microambiente ovariano.  
3. Obesidade. 4. *Syzygium cumini*. I. de Andrade Paes,  
Antonio Marcus. II. Título.

**GIULIANE BARROS DE MELO**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini*  
(L.) SKEELS SOBRE O METABOLISMO E MICROAMBIENTE OVARIANO DE  
RATAS WISTAR ALIMENTADAS COM RAÇÃO RICA EM SACAROSE**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão.

DATA: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

RESULTADO: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes – UFMA

---

Assinatura

Profa. Dra. Karla Frida Torres Flister – UFMA

---

Assinatura

Profa. Me. Renata Ohana Benevides – Faculdade Pitágoras

---

Assinatura

*A Deus, amor, vida e fortaleza.*

*À minha família, com quem amo  
partilhar a vida. Obrigada pelo carinho,  
paciência e por todo incentivo. A ela dedico  
todas as minhas conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela vida, por todo amor, bênçãos e amparo para vencer os obstáculos ao longo dessa jornada.*

*Aos meus pais Joel e Lílian por todo amor, dedicação, esforço e incentivo. A vocês dedico todas as minhas conquistas.*

*À minha irmã Glauciane por todo amor e apoio, por ser “a minha pessoa”, independentemente de qualquer situação.*

*Ao meu companheiro de todas as horas e namorado Mateus Leal. Obrigada por todo suporte e doação, por seu carinho e amor.*

*Aos meus amigos e colegas da turma 86 do curso de farmácia da UFMA, em especial, os “Catitos”, que me acolheram e compartilharam muito de suas vidas. Obrigada pela amizade.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Paes, pela confiança e incentivo, por ter me apresentado à pesquisa, uma das minhas paixões. Agradeço pela oportunidade e carinho.*

*Aos meus queridos “Policísticos”, Renato, Renata e Carol. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas horas de dedicação e por todo carinho. A vocês minha admiração e carinho.*

*Ao Laboratório de Fisiologia Experimental (LEFisio) pela infraestrutura concedida para realização deste trabalho. A todos os membros, que cederam seu apoio e proporcionaram bons momentos, em especial, minha amiga Thamyres.*

*À Universidade Federal do Maranhão, onde pude realizar minha formação acadêmica.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada como a ocorrência distúrbios metabólicos inter-relacionados, que estão diretamente ligados ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Os fatores de risco como obesidade e resistência insulínica podem gerar alterações nas funções neuroendócrinas e reprodutivas, como diminuição das taxas de ovulação, assim como a possibilidade de gerar quadros de infertilidade. Frente ao grande número de efeitos adversos que a terapêutica convencional tem trazido, gradativamente, procura-se tratamentos alternativos, como a fitoterapia. Dessa forma, destaca-se o *Syzygium cumini* (*S. cumini*), com potencialidade terapêutica antioxidante e anti-diabetogênica. Mediante tais ações, buscou-se investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre a melhoria de funções reprodutivas frente ao progresso do perfil metabólico de ratas alimentadas com dieta rica em sacarose (DRS). Fêmeas Wistar foram separadas, aos 21 dias, em 2 grupos: CTR (n=8, ração padrão) e HSD (n=16, DRS) e avaliadas diariamente para verificação da abertura vaginal. Aos 90 dias de vida, o HSD foi subdividido em: HSD (n=8; tratado com água destilada; DRS) e SYZ (n=8; tratado com extrato de *S. cumini* na dose de 500mg/kg/dia; DRS), todos por 4 semanas. A administração do extrato promoveu manutenção do peso dos animais e melhora no perfil lipídico. Ainda, o tratamento com *S. cumini* restaurou a sensibilidade à insulina nas ratas e reduziu a massa de adipócitos viscerais em 67% e 31% da área média dos coxins periuterinos. O extrato não exerceu efeitos sobre a ciclicidade estral de ratas DRS. Entretanto a DRS propiciou ao HSD uma frequência de folículos císticos 86% maior que o CTR, assim como o apresentou melhora desse parâmetro não diferindo do CTR. Por fim, o uso do extrato nas ratas exerceu efeito protetor quanto ao desenvolvimento de folículos císticos, desencadeando um bom progresso ao microambiente ovariano. Desta forma, o extrato de *S. cumini* produziu efeitos marcantes sobre o metabolismo de ratas expostas à DRS, além de reduzir efeitos degenerativos sobre os ovários, evidenciando que a melhora do perfil metabólico refletiu positivamente sobre o ambiente folicular.

**Palavras-chave:** Obesidade, dieta rica em sacarose, *Syzygium cumini*, microambiente ovariano

## ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is an interrelated metabolic disorder, which is related to the development of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Obese and insulin risk can generate the same functions in the neuroendocrine and reproductive, as the rates of ovulation, as well as the possibility of generating infertility pictures. Faced with the large number of opponents who follow conventional treatment, such as herbal medicine, alternative treatments are sought, such as a herbal medicine. *Syzygium cumini* (*S. cumini*), with antioxidant and anti-diabetogenic potential. The aim of this study was to investigate the effects of the hydroalcoholic extract of the leaves of *S. cumini* on the improvement of reproductive functions against the progress of the metabolic profile of rats fed high sugar diet (HSD). The Wistar daughters were separated at 21 days into 2 groups: CTR (n = 8, standard ration) and HSD (n = 16, DRS) and were evaluated for vaginal return. At 90 days of life, the HSD was subdivided into HSD (n = 8, treated with distilled water, DRS) and SYZ (n = 8, treated with extract of *S. cumini* at a dose of 500mg / kg / day, DRS) all for 4 weeks. The extract promotes the weight maintenance of the animals and the improvement in the lipid profile. Furthermore, cumini treatment restored the protein in the rats and reduced the adipocyte mass by about 67% and the mean area of the periuterine cushions. The extract had no effect on estrous cycling of DRS rats. However, a DRS provided HSD with a cystic follicle frequency 86% higher than the CTR, as did the monitoring of this parameter, not differing from the CTR. Finally, the use of the data extract can be useful at the same time as the development of cystic follicles, triggering good progress to the ovarian microenvironment. In this way, the *S. cumini* extract produced effects on the metabolism of rats exposed to DRS, besides effects on the ovaries, evidencing that the improvement of the metabolic profile reflected positively on the follicular environment.

**Key words:** Obesity, sucrose-rich diet, *Syzygium cumini*, ovarian microenvironment



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1. Desenho experimental .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2. Acompanhamento ponderal .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3. Avaliação do índice de LEE .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 4. Avaliação do Consumo e Eficiência Alimentar .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5. Metabolismo glico-lipídico .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 6. Avaliação do quadro de resistência insulínica .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7. Redução da área de adipócitos periovarianos em ratos expostos à DRS e tratados com EHS .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8. Efeito da DRS sobre o início da puberdade .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 9. Avaliação do efeito do EHS sobre a ciclicidade estral de ratas alimentadas com DRS.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10. Análise histológica quantitativa de estruturas ovarianas em ratas alimentadas com DRS e tratadas com EHS .....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 1. Quantidade relativa de componentes da dieta rica em sacarose .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 2. Composição centesimal da dieta padrão e da rica em sacarose .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3. Análise morfométrica dos órgãos .....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTR	grupo controle
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DRS	dieta rica em sacarose
EHS	extrato hidroalcoólico das folhas de <i>S. cumini</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio regulador das gonadotrofinas
HAndg	hiperandrogenismo
HHG	hipotálamo-hipófise-gônadas
HI	hiperinsulinemia
HSD	grupo exposto à dieta rica em sacarose
LH	hormônio luteinizante
MSG	L-glutamato monossódico
RI	resistência à insulina
<i>S. cumini</i>	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels
SHBG	proteína carreadora de hormônios sexuais
SM	síndrome metabólica
SYZ	grupo exposto à dieta rica em sacarosee tratado com extrato de <i>S. cumini</i>
TyG	índice de avaliação de resistência à insulina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Síndrome metabólica e suas comorbidades .....	14
2.2. Obesidade e Reprodução .....	14
2.3. Tratamento de disfunções reprodutivas .....	17
2.4. Tratamento alternativo com produtos naturais.....	18
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos .....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Abordagem Experimental .....	21
4.2. Ração Rica em Sacarose.....	22
4.3. Animais .....	23
4.4. Material botânico e preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Syzygium cumini</i> .....	24
4.5. Avaliação do desenvolvimento ponderal e caracterização dos efeitos da dieta rica em sacarose .....	24
4.7. Índice TyG.....	25
4.8. Verificação de abertura vaginal e determinação de ciclo estral .....	25
4.9. Análise Histológica dos Ovários.....	25
4.10. Mensuração da área dos adipócitos .....	26
4.11. Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5.1. Efeito protetor do extrato de <i>S. cumini</i> sobre o desenvolvimento de síndrome metabólica em ratas expostas a DRS.....	27
5.2. Efeito do <i>S. cumini</i> sobre coxins adiposos periuterinos.....	35
5.3. Influência da DRS sobre a puberdade e investigação da ação do EHS sobre a ciclicidade estral .....	36
5.4. Efeito do extrato das folhas de <i>Syzygium cumini</i> sobre o desenvolvimento folicular ovariano em ratas alimentadas com DRS.....	39
6. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada como a ocorrência de pelo menos três dos seguintes distúrbios metabólicos: obesidade central e/ou visceral, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, resistência à insulina (RI), hiperinsulinemia (HI) e hipertensão (ALBERTI et al, 2009), que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares, representando, desse modo, um sério problema de saúde pública, com relevantes impactos na morbidade e na mortalidade da população (SANTOS, SCHRANK, KUPFER, 2009). Nesse contexto, dá-se atenção à obesidade, definida como excesso de gordura corporal (GONZÁLEZ-MUNIESA et al, 2017), e considerada uma doença crônica, de etiologia multifatorial (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al, 2011), caracterizada pelo desequilíbrio energético resultante de um subsídio acima das necessidades orgânicas, em período de tempo extenso (PERRINI et al, 2008). Como tal, este balanço energético positivo tem diversas causas que se comunicam e agem de modo potencial: os fatores internos, como genética ou fisiologia, e os externos, como dieta, exercício físico, estresse (DEHGHAN, AKHTAR-DANESH, MERCHANT, 2005; DUBOIS et al., 2012).

A obesidade, por si própria, é caracterizada como um fator de risco para o desenvolvimento da RI, um estado metabólico onde o mecanismo de homeostase da glicose não funciona adequadamente. Nesse cenário, entre as alterações metabólicas da insulina, incluem-se redução da sinalização dos receptores de insulina (PONTES et al, 2012). Evidências sugerem a influência direta da obesidade e RI no desencadeamento de efeitos deletérios sobre o metabolismo ao longo da vida da mulher, como o desenvolvimento de irregularidades na menstruação, oligoanovulação crônica e infertilidade na idade adulta. Além disso, podem aumentar o risco de abortos espontâneos e prejudicar os resultados das tecnologias de reprodução assistida e gravidez (PASQUALI, PATTON, GAMBINERI, 2007; DAĞ, DILBAZ, 2015).

A complexidade dos mecanismos que envolvem a fertilidade depende da funcionalidade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), sendo que a obesidade pode gerar alterações nas funções ovarianas e neuroendócrinas, com diminuição das taxas de ovulação, assim como a possibilidade de gerar quadros de infertilidade (PASQUALI, 2006; COSTA, 2018). Wu e colaboradores (2012), em um trabalho com roedores expostos a uma dieta hiperlipídica para desencadeamento da RI, mostraram

que a responsividade da hipófise e do ovário à insulina é exclusivamente preservada em camundongos com RI, verificando um possível papel patológico para a sinalização de insulina em estados de HI. Com isso, há um maior estímulo à esteroidogênese e potencialização na produção androgênica. Também, a HI estimula a secreção de androgênios pelas adrenais e suprime a produção hepática da globulina transportadora de hormônios sexuais (SHBG), promovendo aumento dos androgênios livres biologicamente ativos. O excesso local dos androgênios ovarianos devido à HI causa a atresia prematura dos folículos ovarianos, formando pequenos cistos e anovulação (ARIE et al, 2009; GASPAR et al, 2016). Outrossim, alguns trabalhos têm confirmado que mulheres obesas apresentam um ambiente folicular ovariano alterado, apresentando um quadro inflamatório instalado, particularmente com aumento da proteína C-reativa e dos níveis de atividade de androgênio, que pode ser associado aos resultados reprodutivos negativos tipicamente observados nestas pacientes (ROBKER et al, 2009).

Diante disso, essas desordens têm afetado cada vez mais a população e conseqüentemente aumentando o número de pacientes polimedicados. Na medida em que o número de medicamentos prescritos aumenta é também de se esperar um aumento das reações adversas e interações medicamentosas (BREGNHØJ et al, 2009; BUURMA et al, 2007). Por isso, tem-se verificado uma maior procura das medicinas complementares e alternativas (MENNITI-IPPOLITO et al, 2002). Uma dessas terapias alternativas é a fitoterapia, que constitui-se do uso de preparações derivadas de plantas com benefícios terapêuticos ou para a saúde (ERNST, PITTLER 2002).

Nessa conjuntura, destacar-se o *Syzygium cumini* (L.) Skeels (*S. cumini*), por ser uma potencial ferramenta terapêutica que pode atuar em vários alvos ao mesmo tempo (HELMSTÄDTER, 2008; SILVA et al, 2012). Em nosso grupo de pesquisa, o trabalho de Benevides (2015), ao avaliar os efeitos do tratamento com *S. cumini* sobre as funções metabólicas e do sistema reprodutor de ratas com obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG), confirma indução da obesidade pelo aumento significativo dos depósitos de tecido adiposo nos animais MSG em comparação aos controle, e verificou-se que as fêmeas MSG apresentaram 85% menos folículos antrais saudáveis que as controle. No que lhe diz respeito, o tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* reduziu o perímetro desses coxins adiposos, assim como elevou a taxa de folículos antrais saudáveis, evidenciando que a melhora

do perfil metabólico repercutiu de forma positiva sobre a taxa de maturação folicular sadia, podendo elevar os índices de fertilidade neste modelo animal.

O modelo de indução de obesidade por dieta tem se mostrado uma ferramenta experimental vantajosa ao passo que assemelha-se a forma de desenvolvimento da obesidade em humanos, que possuem uma alimentação rica em alimentos processados com elevada quantidade de açúcares refinados (BRAY, NIELSEN, POPKIN, 2004). Alterações em respostas morfológicas e bioquímicas com consequentes efeitos na homeostase, são observadas em animais expostos à dieta rica em sacarose. Estas modificações resultam em obesidade, HI e instauração da RI (BOTEZELLI et al., 2012; PINTO et al., 2016, SOUSA et al, 2018), o que tornam esse modelo experimental adequado ao estudo das relações entre obesidade e desordens reprodutivas.

Por conseguinte, levando em consideração o potencial terapêutico do *S. cumini* e a exuberância etnofarmacológica da flora encontrada no Maranhão, buscamos neste trabalho averiguar a hipótese de que o tratamento com extrato hidroalcolólico das folhas de *S. cumini* induz melhora no gerenciamento dos problemas metabólicos, o que pode levar a resultados positivos sobre o perfil reprodutivo de ratas alimentadas com dieta rica em sacarose.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Síndrome metabólica e suas comorbidades**

A SM possui vários componentes associados ao seu desenvolvimento. Dentre eles podem-se manifestar a obesidade, a RI e dislipidemias (ALBERTI et al, 2009), por interferência genética e/ou hábitos de vida. De todos os fatores, o de maior relevância para fisiopatologia da SM é a obesidade, pois está associada aos múltiplos transtornos que geram taxas elevadas de morbidade e de mortalidade, pois tão somente ela ocasiona diversos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares que causam hipertensão, hiperglicemia e reduz níveis de HDL (PENALVA, 2008). Um levantamento recente da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), por meio de uma pesquisa realizada com maiores de 18 anos, nas 26 capitais e no Distrito Federal, trouxe que quase 1 em cada 5 brasileiros (18,9%) é obeso e que mais da metade da população das capitais brasileiras (54,0%) estão com excesso de peso (BRASIL, 2016). O excesso de gordura corporal, principalmente o acúmulo visceral, está relacionado com diversas alterações no perfil lipídico, com a elevação na pressão arterial e HI (FREIXO, 2010).

Um outro fator que desempenha um papel etiológico central na SM é a RI, que geralmente acompanha a obesidade (ABBASI et al, 2002), definida como a falha da insulina em estimular o transporte de glicose para as células-alvo (BUGIANESI, MCCULLOUGH, MARCHESINI, 2005). O caminho que leva à RI engloba uma série de fatores que causam a alteração das vias de sinalização da insulina. Entre esses, os ácidos graxos livres são reconhecidos como um fator de risco significativo, contribuindo para o desenvolvimento da RI em órgãos-alvo. Notavelmente, a RI no fígado correlaciona-se com a elevação do conteúdo lipídico nesse órgão, originando-se principalmente de ácidos graxos livres no plasma (DONNELLY et al., 2005). Os ácidos graxos livres são extensivamente liberados pelo tecido adiposo branco no plasma quando ocorre a instalação da RI. De fato, a RI nesse tecido resulta em aumento da lipólise, o que leva a altos níveis de ácidos graxos circulantes (EGUCHI et al., 2006).

### **2.2. Obesidade e Reprodução**

A funcionalidade ovariana, durante a vida reprodutiva, depende da harmoniosa interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, que atuam coordenando o processo da foliculogênese, isto é, o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e resultando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005.). O folículo ovariano é a unidade estrutural principal e operacional dos ovários de mamíferos, que gera o microambiente imprescindível para o desenvolvimento do oócito (GOSDEN et al., 1993). É composto por um oócito circundado por células da granulosa e/ou células da teca. Dessa forma, os folículos podem ser classificados, de acordo com o grau de evolução, em folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) (SILVA, 2005).

O ciclo ovariano feminino pode ser dividido em três fases: fase proliferativa, a ovulação e a fase secretória (ARTINI et al., 2007). A regulação da foliculogênese depende tanto de fatores intraovarianos quanto extraovarianos, dentre esses, um dos mais importantes, é a ação do hipotálamo na secreção do hormônio regulador das gonadotrofinas (GnRH) em pulsos, que é transportado para a hipófise anterior, onde são produzidos, armazenados e secretados o hormônio folículo estimulante (FSH) e o luteinizante (LH). Estes hormônios estimulam os ovários a desenvolver um folículo dominante, que secreta níveis crescentes de estrogênio, que inibe a secreção das gonadotrofinas na hipófise anterior e, por feedback negativo no hipotálamo, diminui os níveis de LH e FSH. A partir de certa taxa de estrógeno, o feedback é revertido e a liberação de LH da hipófise é estimulada, o chamado pico pré-ovulatório. Após a ovulação, as células foliculares remanescentes no ovário luteinizam-se e forma-se o corpo lúteo, que secreta, de forma predominante, progesterona.

A progesterona, por sua vez, diferencia o endométrio, necessário para a implantação do óvulo fertilizado. Caso não ocorra esta implantação, a gonadotrofina coriônica humana (HCG) não é produzida, e o corpo lúteo involui. A queda dos níveis de estrógeno e progesterona derivados do corpo lúteo provoca a descamação do endométrio e conseqüentemente, a menstruação (SPEROFF, 2005; POPAT, 2008; GRAY, 2013). Já o ciclo reprodutivo de roedores fêmeas, denominado ciclo estral, tem duração de 4 a 5 dias e é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. A ovulação ocorre no início do proestro até o final do estro. A caracterização de cada fase do ciclo baseia-se na proporção entre três tipos celulares observados no esfregaço vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (MARCONDES,



BIANCHI, TANNO, 2002). Toda fisiologia da reprodução feminina está voltada para a liberação periódica do óvulo. Para que isto aconteça é necessária uma função ovariana adequada, na qual a ovulação e a secreção de esteroides sexuais ocorram de uma maneira regular e sincronizada.

Por essa razão, investigações têm demonstrado os riscos à saúde que o consumo de carboidratos refinados pode determinar, tanto no organismo humano quanto em roedores (TEFF et al, 2009; RAMOS, BATISTA, ALBUQUERQUE, 2017). Estudos dietéticos têm sido uma ferramenta fundamental para a investigação da SM, tendo em vista sua influência sobre o metabolismo e a regulação do corpo inteiro por meio de efeitos hormonais, alteração da homeostase da glicose e de vias metabólicas dos lipídios (SENAPHAN et al, 2015; SUMAN et al, 2016). Os efeitos negativos da obesidade sobre as funções reprodutivas são de difícil descrição devido à complexidade multifatorial. Vários mecanismos estão envolvidos na relação entre fertilidade e obesidade, dentre eles os mais citados são a hiperandrogenemia, a RI (PASQUALI et al, 2003).

Em se tratando de fisiopatologia reprodutiva, o hiperandrogenismo (HAndg) desenvolve-se como resultado de uma secreção exagerada de androgênios pelos ovários e adrenais. O HAndg de origem ovariana é desencadeado por diversas alterações, como a hiperestimulação do LH nas células da teca ovariana, a ação insulínica como cogonadotrofina (EHRMANN, 2005), uma resposta exacerbada das células tecais ao estímulo de LH, assim como uma maior expressão de enzimas tecais envolvidas na síntese de andrógenos (JAKIMIUK, 2001; MAGOFFIN, 2006).

A justificativa para o aumento de LH é uma alteração na homeostase do eixo HHG e pode ser produto de alterações nos mecanismos de feedback mediados por hormônios sexuais na secreção do GnRH no hipotálamo (PASTOR et al, 1998), o que pode influenciar no aumento da frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (EHRMANN, 2005). Supõe-se que a hipersecreção de LH está relacionada com um estímulo central através da insulina, tendo em vista que esse hormônio interage com receptores hipotalâmicos e pode estimular a secreção de GnRH e, conseqüentemente, LH (MACIEL et al, 2004). Em virtude de os níveis de FSH não estarem totalmente suprimidos, o crescimento folicular novo é estimulado ininterruptamente, mas não ao ponto da maturação e da ovulação, apesar do fato de que o potencial de crescimento não está realizado, o tempo folicular pode estender diversos meses sob a forma de vários folículos císticos, perdendo seu aspecto normal.

O estímulo excessivo do LH no compartimento teca-estromal também contribui para o aspecto cístico, devido ao aumento da síntese de androgênios intraovarianos (FERREIRA et al, 2008).

Além do mais, em seu trabalho experimental com ratas com obesidade induzida por MSG, Gaspar e colaboradores (2016) observaram que o quadro de obesidade desencadeou aumento de massa corporal, acúmulo de gordura retroperitoneal e gordura visceral, assim como hipertrofia de adipócitos viscerais, em comparação com o controle. Os animais MSG também eram dislipidêmicos e hiperinsulinêmicos. A análise da morfologia ovariana mostrou que as ratas MSG tiveram um decréscimo de 2 vezes na contagem de oócitos, mas um aumento de 6 vezes nos cistos foliculares, juntamente com um maior número de folículos totais, primordiais e atrésicos.

Também, no estudo de Robker et al (2009), evidenciaram-se alterações sistêmicas decorrentes da obesidade, relacionando-se com a redução do ambiente folicular ovariano. Além do que, folículos ovarianos de obesas manifestam características inflamatórias e um índice de atividade andrógena intensificada. Wu et al (2010), com base em evidências de lipotoxicidade induzida pela obesidade em outras células, verificaram que o acúmulo de lipídios ocorrem em células ovarianas e oócitos de roedores em resposta a uma dieta obesogênica, e isso foi associado à ativação de vias de lipotoxicidade comprovada através da verificação de elevada expressão de genes marcadores do estresse do retículo endoplasmático nesses animais quando comparados ao grupo controle.

Nesse sentido, as informações acima reforçam o comprometimento da saúde reprodutiva pela obesidade, também confirmado pela exibição de alterações no ambiente folicular ovariano, que pode ser associado com resultados reprodutivos desfavoráveis tipicamente observados em pacientes obesas (FARIAS, SABÓIA, LIMA, 2018).

### **2.3. Tratamento de disfunções reprodutivas**

Mesmo que pacientes portadoras de desordens reprodutivas busquem tratamento para fertilidade, regularizar o ciclo menstrual e combater o HAndg e RI, que são as principais causas de seus transtornos, as ameaças mais alarmantes são DM2 e, possivelmente, doença cardiovascular (MOURA et al, 2011; EHRMANN, 2005). Levantamentos comprovam que a perda de peso deve ser recomendada às pacientes obesas ou com sobrepeso, pois a redução de cerca de 5% da massa

corporal pode trazer condicionamento da ovulação. Nas intervenções farmacológicas, destaca-se uma gama de medicamentos, entre eles anticoncepcionais orais e agentes sensibilizadores de insulina. Estes têm sido usados para reduzir o quadro de HI e sua repercussão negativa sobre a função ovariana e a prevenção de suas decorrências cardiovasculares (EHRMANN, 2005).

Os anticoncepcionais orais já foram utilizados como tratamento de escolha para a redução do HAndg e das irregularidades menstruais (MARCONDES, HAYASHIDA, BACHEGA, 2007). Entretanto, vêm sendo substituídos devido à possibilidade de piorar a RI, induzir intolerância à glicose, assim como gerar dislipidemias, aumentando o risco de DM2 e doenças cardiovasculares (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2003). No meio dos sensibilizadores de insulina, a metformina tem se tornado o principal, dado que estudos demonstram as vantagens do seu uso (MOREIRA, 2011). No campo farmacológico, esse medicamento vem sendo vastamente estudado e administrado em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos, a fim de regular perturbações menstruais, tratar o hirsutismo e estimular a ovulação (MORALES, VERDESIA 2007). Todavia, tem-se descoberto que seu uso, a longo prazo, gera efeitos colaterais (PACKER, 2018).

#### **2.4. Tratamento alternativo com produtos naturais**

No âmbito de intervenções farmacológicas, as ações terapêuticas de diversas plantas têm sido estudadas para averiguação de suas potencialidades e uso alternativo no tratamento de doenças, em especial a obesidade e a RI (SOARES, 2013). O mecanismo pelo qual as plantas baixam a taxa sérica de glicose pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação pelas células  $\beta$ -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam essa taxa no sangue; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres e estímulo ao aumento da microcirculação sanguínea no organismo (NEGRI, 2005; BONA, 2011).

Nesse contexto, faz-se menção do *S. cumini*, também conhecido popularmente como jambolão. O *S. cumini* é uma espécie nativa da Índia, mas amplamente cultivada em muitos países da África e América do Sul. No Brasil, ela é lavrada em diversos estados das regiões sudeste, nordeste, norte e sul (SRIVASTAVA, CHANDRA, 2013). Pertence à família Myrtaceae e possui fruto pequeno e ovoide, com casca escura

devido à presença de antocianinas (VIEGAS et al., 2007). Sabe-se que *S. cumini* possui ampla gama de propriedades medicinais, as quais têm sido atribuídas à presença de compostos bioativos em diferentes partes da planta. Exemplo disso é o uso das folhas em gastroenteropatias e no auxílio do tratamento do diabetes, enquanto os frutos são utilizados no tratamento de faringite e doenças esplênicas. Além disso, as sementes são empregadas como diurético e, principalmente, no tratamento do diabetes (WARRIER, NAMBIAR, 1993; HELMSTADTER, 2008; BALIGA et al, 2011). Dados de Sharma et al (2012) corroboram com a literatura ao descrever algumas atividades biológicas do *S. cumini*, como ação anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante e cardioprotetora.

Frente ao potencial terapêutico dessa espécie, nosso grupo de pesquisa tem investigado os efeitos metabólicos do extrato das folhas de *S. cumini* em ratos obesos. Assim como realizado a caracterização do perfil fitoquímico de polifenóis presentes nas folhas de *S. cumini* (CHAGAS et al, 2015). Dados obtidos por Sanches e colaboradores (2016), ao utilizarem extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* em ratos com obesidade induzida por MSG por 30 dias, demonstram que esses animais exibem significativamente menor massa corpórea, índice de Lee e massa de tecido adiposo branco em comparação com ratos obesos que receberam veículo, além de mostrar um aumento de duas vezes na atividade lipolítica no coxim adiposo periepididimal, assim como os níveis de triglicérides no soro, fígado e músculo esquelético semelhantes aos encontrados em animais magros. Também, extrato de *S. cumini* também trouxe melhora no quadro de HI e RI em ratos obesos, o que resultou na reversão parcial da intolerância à glicose, em comparação aos ratos obesos. Vale (2016), ao administrar extrato das folhas de *S. cumini* em ratas obesas MSG, obteve manutenção do peso dos animais, redução do índice de Lee e melhora do perfil glicolipídico. O tratamento também trouxe um efeito protetor contra a instauração da RI, proporcionando efeitos acentuados sobre os parâmetros metabólicos das ratas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre parâmetros metabólicos e microambiente folicular ovariano em ratas alimentadas com dieta rica em sacarose.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

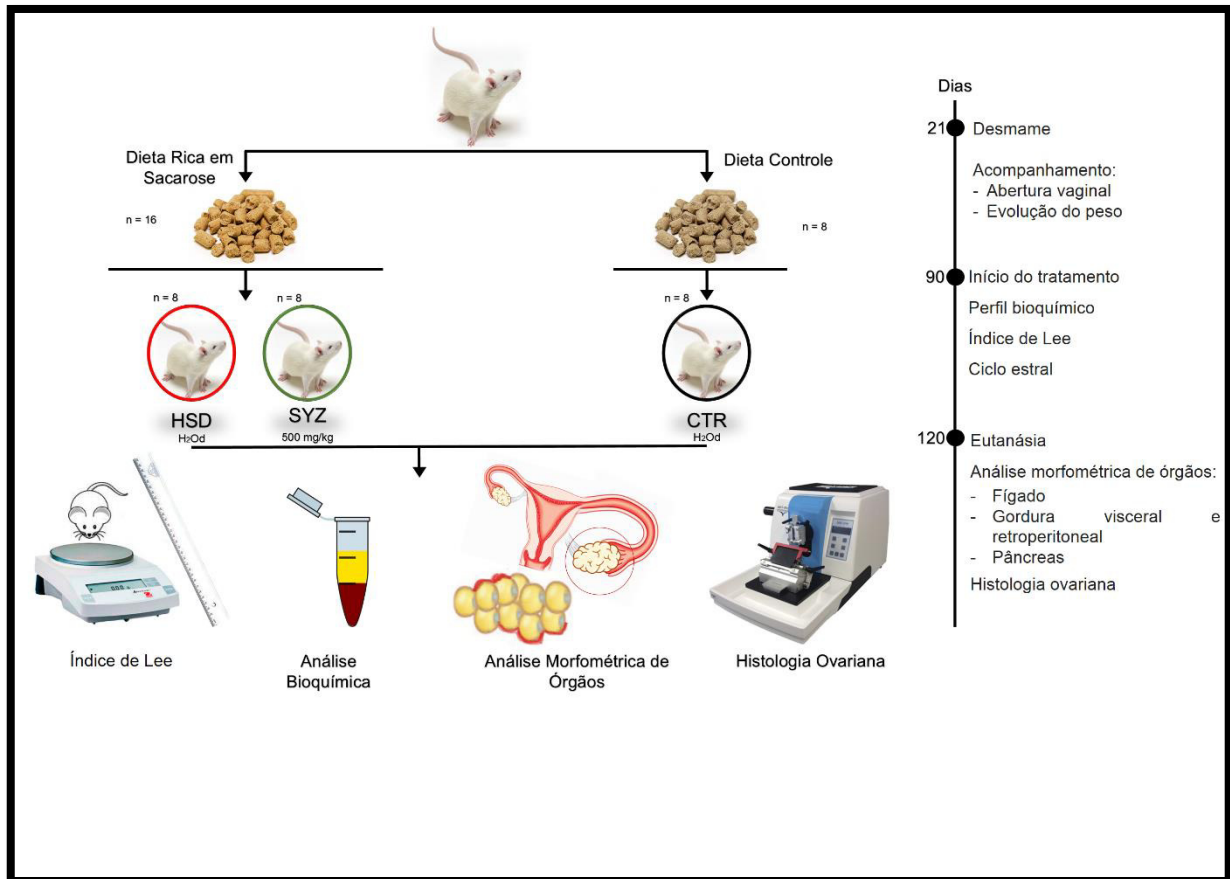
- Analisar os efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre morfometria e metabolismo glico-lipídico de ratas alimentadas com dieta rica em sacarose;
- Averiguar os efeitos do tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre a ciclicidade estral e alterações histopatológicas dos ovários de ratas alimentadas com dieta rica em sacarose.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Abordagem Experimental

Na perspectiva de verificar a conjectura de que a dieta rica em sacarose (DRS) seria capaz de causar mudanças no padrão morfológico e metabólico em ratas, construiu-se o seguinte desenho experimental:

- a. Inicialmente, ratas Wistar com 21 dias de vida (desmame) foram randomizadas em dois grupos: um grupo controle (CTR, n=8), que foi alimentado com a dieta padrão; e um grupo que recebeu a DRS (HSD, n=16);
- b. Acompanhou-se, semanalmente, a evolução ponderal, o consumo de ração e a eficiência alimentar;
- c. Para avaliação da influência da DRS sobre a puberdade dos animais, fez-se acompanhamento diário de forma observacional, a partir do desmame, a fim de se verificar o período de abertura vaginal das ratas;
- d. Aos 90 dias de vida, o grupo HSD foi subdividido aleatoriamente em 2 grupos, que continuaram recebendo a DRS: o grupo HSD (n=8), que recebeu por via oral (v.o.) veículo; e o grupo SYZ (n=8), tratado com extrato de *S. cumini* (500 mg/kg; v.o.);
- e. Foi feito, diariamente, o acompanhamento da ciclicidade estral; semanalmente, a avaliação ponderal, consumo de ração e eficiência alimentar e, mensalmente, a avaliação da obesidade pelo cálculo do índice de Lee;
- f. Após 120 dias de vida, os animais foram eutanasiados para coleta e análise morfométrica do fígado, pâncreas e depósitos de gordura retroperitoneal e visceral. Também, os ovários foram coletados para análise histológica. Assim como colheu-se alíquotas de sangue para separação do soro, que foi utilizado para caracterização do perfil bioquímico e do quadro de resistência insulínica.



**Figura 1. Desenho experimental.** Ratos Wistar fêmeas foram separados para desmame aos 21 dias de vida e separados em dois grupos: CTR (n=8, dieta padrão) e HSD (n=16, DRS). A partir de então, acompanhou-se os animais, diariamente, para se determinar a data de abertura vaginal; semanalmente, a evolução ponderal, o consumo de ração e a eficiência alimentar. Aos 90 dias de vida, o HSD foi subdividido em 2 grupos: HSD (n=8, DRS), que recebeu veículo (v.o.); e SYZ (n=8, DRS), tratado com extrato de *S. cumini* (500 mg/kg; v.o.). Em diante, acompanhou-se a ciclicidade estral diariamente; semanalmente, a avaliação ponderal, consumo de ração e eficiência alimentar; e, mensalmente, a avaliação da obesidade. Na data dos 120 dias de vida dos animais, ocorreu a eutanásia e foram coletados fígado, pâncreas e depósitos de gordura retroperitoneal e visceral para análise morfométrica; e ovários para análise histológica.

#### 4.2. Ração Rica em Sacarose

A ração que constituiu a DRS foi produzida a partir do método proposto por Pinto e colaboradores (2016). Em primeiro lugar, a ração padrão (Nuvilab®) foi pulverizada em liquidificador e a ela adicionado leite condensado (Nestlé®), açúcar refinado e água nas proporções demonstradas a seguir, na Tabela 1, até formar uma mistura homogênea e pastosa. Essa massa foi manipulada para formar pellets semelhantes à ração padrão e dessecada em estufa (38 °C por 3 dias). Posteriormente, a ração produzida foi armazenada em geladeira por no máximo 7 dias. A composição centesimal comparativa entre as dietas se encontra na Tabela 2.

**Tabela 1. Quantidade relativa de componentes da dieta rica em sacarose**

<b>COMPOSIÇÃO</b>	<b>PERCENTUAL (%)</b>
Ração Nuvilab® pulverizada	40,0
Leite Condensado Nestlè®	40,0
Açúcar refinado	8,5
Água Filtrada	q.s.p.

Fonte: autor

**Tabela 2. Composição centesimal da dieta padrão e da rica em sacarose**

<b>COMPOSIÇÃO CENTESIMAL</b>	<b>RAÇÃO PADRÃO</b>	<b>RAÇÃO HSD</b>
Carboidratos	55,4%	65,0%
Sacarose	10,0%	25,0%
Proteínas	21,0%	12,3%
Lipídeos	05,2%	04,3%
Valor Energético	352Kcal/100g	348Kcal/100g

Fonte: autor

### **4.3. Animais**

Para os protocolos experimentais foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus* (21 dias, aproximadamente 45g) provenientes do Biotério Central da UFMA e aclimatadas no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia Experimental em gaiolas de polietileno forradas com xilana, à temperatura  $21 \pm 2$  °C, ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso livre à água e ração específica de cada grupo. Todos os protocolos experimentais realizados neste projeto fazem parte de um projeto maior intitulado "Potencialidade farmacológicas de Flavonoides isolados da folha de *Syzygium cumini* (L.) Skeels para tratamento de patologias associadas a síndrome metabólica: Investigação de mecanismos relacionados ao estresse do retículo endoplasmático" sob coordenação do professor Antonio Marcus de Andrade Paes e



previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMA (CEUA nº23115.007440/2016-71) (em anexo).

#### **4.4. Material botânico e preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini***

As folhas da espécie *S. cumini* foram coletadas no Campus Bacanga da Universidade Federal do Maranhão na cidade de São Luís MA- Brasil. Em adaptação ao trabalho de Sharma e colaboradores (2008), para manufatura do extrato, as folhas de *S. cumini* foram selecionadas e posteriormente secas a 38°C no forno de fluxo de ar. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas e pesado. O pó obtido foi submetido à maceração em etanol a 70%, no hidromódulo de 1:6 p/v, por 24 horas sob agitação mecânica a temperatura ambiente durante 3 dias, sendo que a cada 24 horas havia renovação do solvente. O extrato recolhido foi submetido à centrifugação à 3.500 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos e o sobrenadante concentrado em rotaevaporador à baixa pressão e temperatura de 45°C, seguido de liofilização. Para administração nos animais, o pó foi ressuspenso adequadamente em água destilada.

#### **4.5. Avaliação do desenvolvimento ponderal e caracterização dos efeitos da dieta rica em sacarose**

Ao longo de todo período de experimentação, os animais foram pesados duas vezes por semana para avaliação do progresso ponderal, consumo de ração e eficiência alimentar. Ademais, mensalmente, foi calculado o Índice de Lee dos animais, que é resultado do quociente da raiz cúbica do peso corporal (g), pelo comprimento nasoanal (cm) ( $[\text{peso}^{1/3}/\text{cNA}] \times 1000$ ) (BERNARDIS, PATTERSON, 1968).

#### **4.6. Análise Bioquímica**

O sangue coletado foi submetido ao processo de coagulação e centrifugação (3500 rpm, 10 min) para obtenção de soro, utilizado para determinação das concentrações de colesterol e triglicérides através de método colorimétrico, segundo as especificações descritas nos kits de dosagem (LabTest®).

#### **4.7. Índice TyG**

O índice TyG, uma fórmula matemática que utiliza glicemia e triglicérides de jejum para avaliação de resistência à insulina, foi determinado pelo  $\text{Ln} [\text{glicose (mg/dL)} \times \text{triglicerídeos (mg/dL)/2}]$  (GUERRERO-ROMERO et al., 2010).

#### **4.8. Verificação de abertura vaginal e determinação de ciclo estral**

A partir dos 30 dias de idade, as ratas foram observadas diariamente para registro da idade de abertura vaginal, indicativa do início da maturidade sexual desses roedores. A determinação das fases do ciclo estral foi realizada em adaptação à metodologia de Marcondes, Bianchi & Tanno (2002), diariamente, no horário da tarde entre 16:00 e 18:00 h, a partir dos 90 dias até o período da eutanásia. A coleta da secreção vaginal foi realizada com inserção de pipeta de plástico com ponteira contendo 20 $\mu$ L de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), na vagina do animal. O material aspirado foi colocado sobre lâmina de vidro e visualizado a fresco, em microscópio óptico de luz comum, em aumento de 40 vezes. A classificação das fases do ciclo estral de cada animal foi feita de acordo com tipo celular preeminente no lavado vaginal, sejam células cornificadas, células epiteliais nucleadas ou leucócitos em: proestro, estro, metaestro e diestro (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005). As fêmeas foram avaliadas como tendo ciclos regulares, ciclos irregulares e/ou estro prolongado. Ademais, a duração do ciclo foi definida por uma média de 5 dias (MARCONDES, BIANCHI & TANNO, 2002; MOORE et al., 2015).

#### **4.9. Análise Histológica dos Ovários**

Após a eutanásia, os ovários foram removidos, limpos, separando-se o ovário direito de cada animal, que fora fixado em paraformaldeído a 4% e, em seguida, armazenado em etanol a 70%. Os ovários passaram por processamento tecidual e posterior inclusão em parafina. Fizeram-se cortes em seções de 5  $\mu$ m selecionadas em triplicata como amostra representativa de um corte, sendo que 3 sequências de triplicata foram analisadas por ovário com um intervalo de 50  $\mu$ m entre cada corte. Cada corte foi corado com hematoxilina-eosina e analisado sob microscopia de luz.

Considerou-se apenas os folículos contendo um oócito. Os folículos foram classificados conforme metodologia de Gaspar e cols. (2016):

- Folículos primordiais: constituídos por uma camada achatada e não uniforme de células da granulosa em torno de um óvulo;

- Folículos primários: constituídos por uma ou menos do que duas camadas de células granulosas cubóides;
- Folículos secundários: constituídos por um oócito rodeado por uma camada superior de células da granulosa cubóides, sem antro visível;
- Folículos antrais: constituídos por um oócito rodeado por várias camadas de células da granulosa cubóides e que contenham um ou mais espaços antrais, cumulus oophorus e camada teca também podendo ser evidente;
- Folículos saudáveis: sem deformação nas camadas de células granulosas ou teca ou núcleos picnóticos;
- Folículos atresícos: caracterizados por encolhimento ou colapso, apresentando células da granulosa com pelo menos dois núcleos picnóticos ou, no caso dos antrais, com células da granulosa invadindo a cavidade no antro;
- Folículos císticos: caracterizados por ser grandes e cheios de fluido com uma camada diminuída das células da granulosa e a camada de células da teca interna espessada.

Para a análise estatística, o número total de cada folículo encontrado por ovário foi dividido pelo número de triplicatas avaliadas, obtendo-se um número médio.

#### **4.10. Mensuração da área dos adipócitos**

Depósitos de gordura perigonadal foram processadas em conjunto com o ovário direito e cortadas em seções de 5  $\mu\text{m}$ . Cem adipócitos foram analisados de cada animal. Micrografias foram tiradas com uma ampliação de 200X. A área de adipócitos foi calculada usando AxionVision (AxioVs40x64 V 4.9.1.0, Carl Zeiss Microscopy mBH). Posteriormente, calculou-se a frequência de adipócitos por classe de tamanho com intervalos de  $\mu\text{m}^2$  semelhantes.

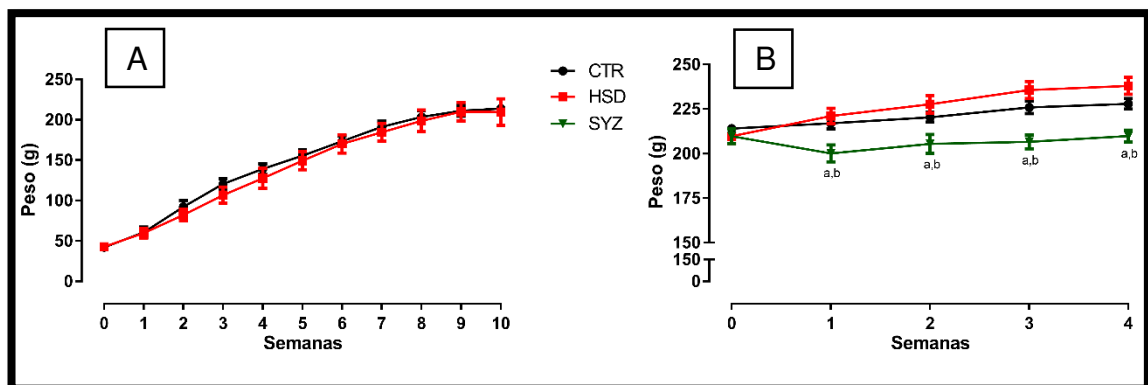
#### **4.11. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. A análise dos dados dos experimentos foi realizada por meio dos testes estatísticos paramétricos (teste t de Student não pareado) ou análise de variância (ANOVA One-way pós teste Newman-Keuls). As diferenças foram significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito protetor do extrato de *S. cumini* sobre o desenvolvimento de síndrome metabólica em ratas expostas a DRS

Nesse trabalho, ratas Wistar foram expostas à uma DRS durante 10 semanas antes do tratamento com o extrato de *S. cumini* (EHS), e por mais 4 semanas, totalizando 14 semanas em DRS. Diversos protocolos experimentais foram realizados para avaliação da capacidade da DRS em induzir obesidade e outras desordens metabólicas associadas. Dessa maneira, nossos resultados demonstram que a DRS não foi capaz de induzir diferenças de peso importantes quando comparada ao grupo controle ao longo das 14 semanas (**Figura 2A-B**). Algo semelhante ocorreu no trabalho de Pinto et al (2016), onde não observaram diferença no ganho de peso entre o grupo de animais expostos à DRS por 9 semanas quando comparados ao controle.

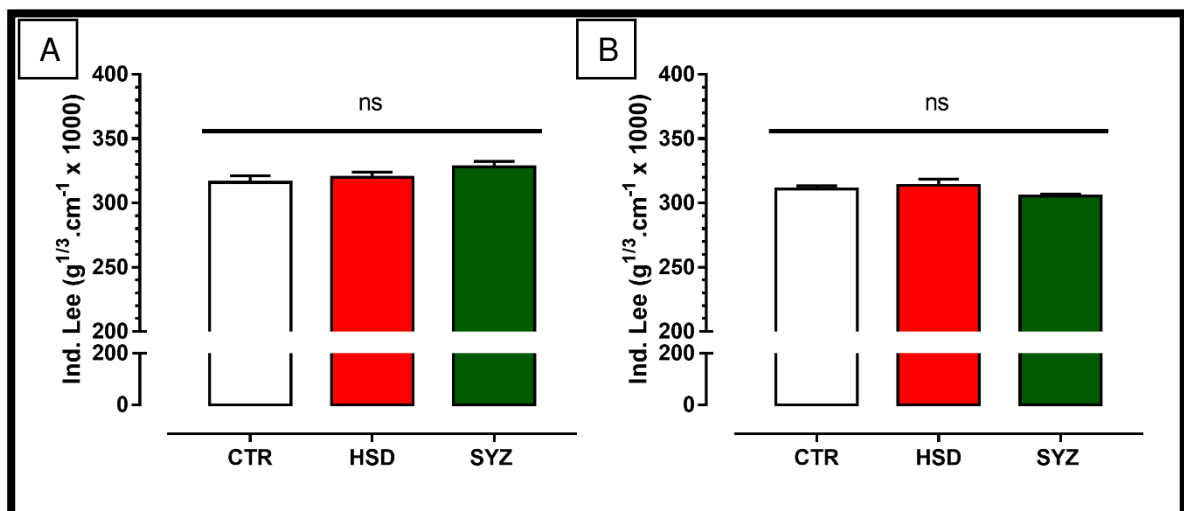


**Figura 2. Acompanhamento ponderal.** A - peso dos animais (g) antes da intervenção, avaliados nos grupos experimentais que receberam ração normal (CTR; n = 8), ração rica em sacarose (HSD; n = 16). B - peso dos animais (g) no tratamento, avaliados nos grupos experimentais que receberam ração normal (CTR; n = 8), ração rica em sacarose (HSD; n = 8) e com o grupo tratado com EHS (SYZ; n = 8). Em todos os grupos as intervenções dietéticas foram iniciadas logo no desmame (21 dias de vida), no entanto o grupo SYZ foi criado apenas a partir do 3<sup>o</sup> mês de vida. Os pontos representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por testes estatísticos paramétricos (teste t de Student one-tailed não pareado) e análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls). As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,05) vs. aCTR; bHSD.

Entretanto, o tratamento com EHS foi efetivo em reduzir o peso dos animais desde a primeira à última semana de tratamento (**Figura 2B**). Dados da literatura corroboram com os nossos, como o de Vale (2016), onde o tratamento com EHS em ratas obesas proporcionou retenção do ganho de peso logo nos primeiros 12 dias de intervenção. Já Benevides (2015) verificou que o EHS promoveu a redução de peso

verificada nos primeiros 10 dias de tratamento. Esta redução de peso pode estar associada à interferência causada pelo extrato de jambolão na absorção dos alimentos, por possuir fibras e outros compostos bioativos (SILVA et al., 2012).

Em continuidade, o índice de Lee pode ser usado como forma detalhada e rápida para determinar obesidade em ratos submetidos a um método de ganho de peso. Bernardis & Patterson (1968) descreveram a determinação da obesidade em ratos proposta por Lee em 1928. Cabe ressaltar que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HSD e SYZ em relação ao CTR (**Figura 3A,B**). Dado este que pode ser explicado por limitações do modelo experimental e a variação observada quanto à caracterização morfométrica e metabólica dos animais.

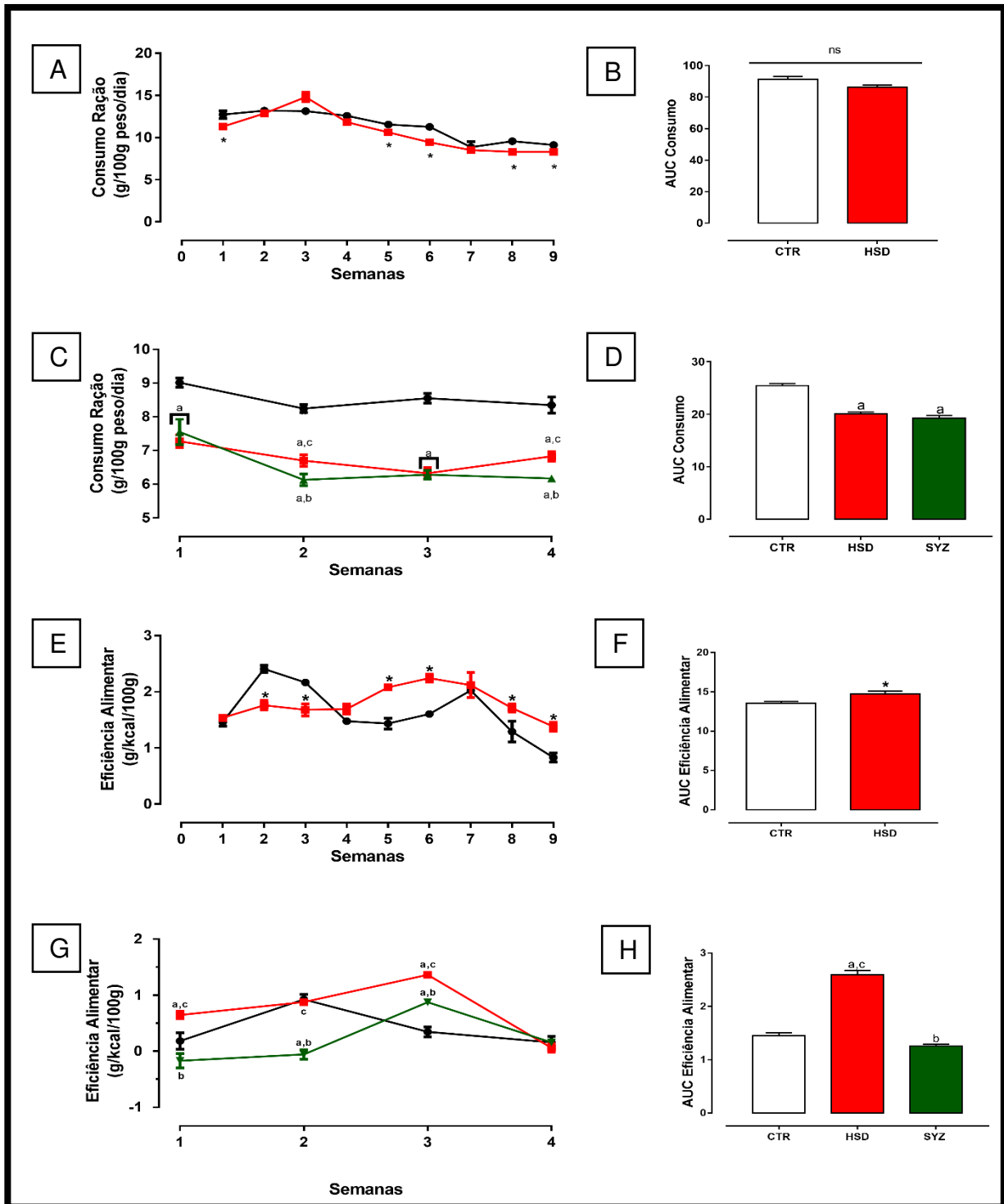


**Figura 3. Avaliação do índice de LEE.** A - índice de Lee ( $g^{1/3}/cm \times 1000$ ) antes do tratamento; e B - índice de Lee ( $g^{1/3}/cm \times 1000$ ) após 4 semanas de tratamento, avaliados nos grupos experimentais que receberam ração normal (CTR; n = 8), ração rica em sacarose (HSD; n = 8) e com o grupo tratado com EHS (SYZ; n = 8). As barras representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls). \* representa diferença de  $p < 0,05$ .

Ainda, os animais foram acompanhados para avaliação do consumo de ração e eficiência alimentar. Verificou-se que, ao longo das semanas precedentes à intervenção com EHS, averiguando o resultado da área sobre a curva do consumo alimentar dos grupos, não se obteve diferença estatisticamente significativa no consumo de ração (**Figura 4A-B**), mas a DRS proporcionou uma maior eficiência alimentar ao HSD (**Figura 4E-F**). Dados semelhantes foram encontrados por Pinto et

al (2016), onde ratos Wistar jovens alimentados com DRS, mostrando menor consumo em relação aos animais alimentados por dieta padrão, possivelmente pelo fato de a maior carga de carboidratos conferir uma maior saciedade nos animais, além de apresentar características organolépticas diferentes, necessitando de maior tempo para adaptação à alimentação.

Avaliando os mesmos parâmetros no fim do tratamento, constatou-se que os grupos HSD e SYZ demonstraram um menor consumo alimentar em comparação ao CTR (**Figura 4C-D**), e, apesar do menor consumo, a quantidade de ração ingerida proporcionou maior capacidade de ganho de peso ao grupo HSD, dado constatado pela maior eficiência alimentar exibida (**Figura 4G-H**), uma característica importante de indivíduos com obesidade. Além disso, os resultados da eficiência alimentar foram essenciais para complementar a constatação da ação antiobesogênica do EHS, levando-se em consideração que o grupo SYZ não diferiu do HSD quanto ao consumo de ração, mas demonstrou significativamente menor eficiência alimentar que esse grupo (**Figura 4G-H**). Resultado que pactua com trabalhos que analisaram o efeito do EHS sobre a obesidade, atestando que o EHS confere manutenção da massa corporal, com considerável redução de depósitos de gordura (BENEVIDES, 2015; SANCHES et al, 2016).



**Figura 4. Avaliação do Consumo e Eficiência Alimentar.** A – Consumo Alimentar no período anterior ao tratamento; B – Área sobre a curva (AUC) do Consumo Alimentar antes do tratamento; C – Consumo Alimentar no período do tratamento; D – AUC do Consumo Alimentar no tratamento; E – Eficiência Alimentar antes da intervenção; F – AUC da Eficiência Alimentar antes da intervenção; G – Eficiência Alimentar após intervenção; G – AUC da Eficiência Alimentar após intervenção. As barras representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por teste t de Student (unpaired e one-tailed) ou análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls). \* representa diferença de  $p < 0,05$  quando comparado ao CTR. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ( $p < 0,05$ ) vs. <sup>a</sup>CTR; <sup>b</sup>HSD; <sup>c</sup>SYZ.

Na sequência, têm-se os resultados da avaliação morfométrica de órgãos dos animais. Verificou-se que o grupo HSD apresentou um maior acúmulo de gordura nos coxins adiposos viscerais, representando um acréscimo de 53% na massa adiposa em relação ao CTR. Não se observaram diferenças entre os demais órgãos (**Tabela 3**). De forma similar, Sousa et al (2018), ao alimentar ratos Wistar com DRS por 32 semanas, verificaram que esses animais apresentaram depósitos de tecido adiposo visceral cerca de 152% superior ao controle. Informações obtidas por Malafaia et al. (2013) demonstram que animais submetidos à DRS com três meses de idade apresentaram, de forma marcante, um aumento de gordura retroperitoneal e perigonadal. O aumento adiposidade visceral também foi observado por Pawlak et al. (2004) após exposição de ratos a uma dieta hiperglicídica (45% de carboidratos) por um período de 32 semanas, e Kawasaki et al. (2005) por após 42 semanas de exposição a uma DRS.

Ao analisar o efeito do EHS sobre a morfometria dos órgãos, comprovou-se uma redução de 67% dos depósitos viscerais de gordura dos animais SYZ quando comparados aos HSD, comprovando ação anti-adipogênica do EHS.

**Tabela 3. Análise morfométrica dos órgãos**

TECIDOS	CTR (g/100g)	HSD (g/100g)	SYZ (g/100g)
<b>Gordura Visceral</b>	2,669 ± 0,2651	4,088 ± 0,4131 <sup>a,c</sup>	2,442 ± 0,2906 <sup>b</sup>
<b>Gordura Retroperitoneal</b>	1,3 ± 0,07796	1,672 ± 0,1106	1,273 ± 0,1159
<b>Fígado</b>	3,109 ± 0,07411	3,064 ± 0,1669	3,034 ± 0,08096
<b>Pâncreas</b>	0,3226 ± 0,02561	0,3409 ± 0,03195	0,344 ± 0,05219

Análise de variância (*One-Way* e pós-teste Newman-Keuls). **a** representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR, **b** representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo HSD e **c** quando comparado ao grupo SYZ.

Além disso, investigou-se alterações metabólicas do perfil bioquímico sérico, dosando e comparando taxas de triglicerídeos, colesterol e glicemia entre os grupos (**Figura 5**). Ao verificar o colesterol, observou-se que não houve diferença entre os grupos inicialmente e após o tratamento (**Figura 5A-B**). Já os níveis de triglicérides,

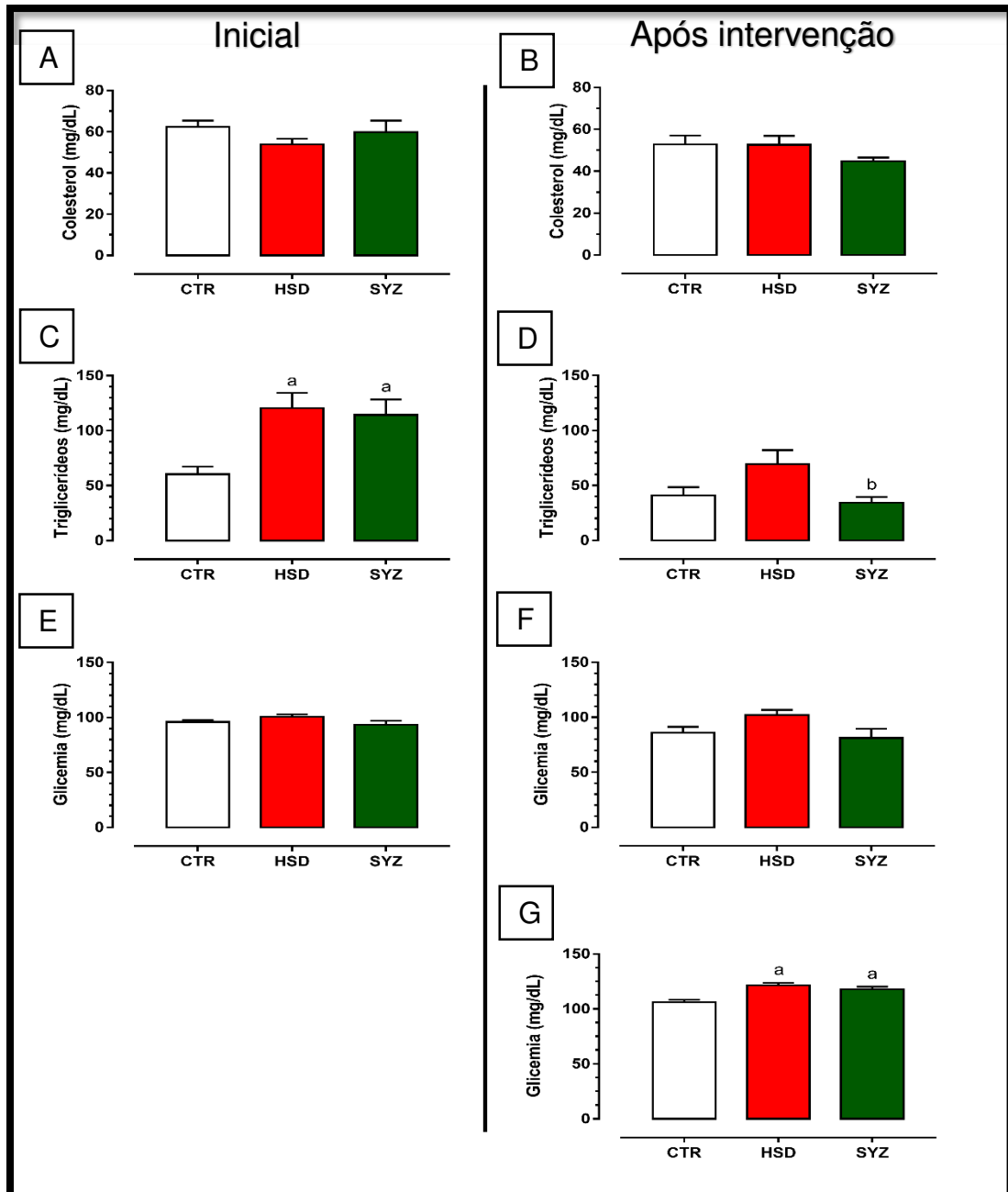


antes da intervenção com EHS, mostraram-se elevados nos animais alimentados com DRS quando comparados ao CTR (**Figura 5C**). Sabe-se que dislipidemia é frequentemente associada à RI. Conforme definido por Kaur (2014), a dislipidemia é caracterizada por espectro de anormalidades lipídicas qualitativas que refletem perturbações na estrutura, metabolismo e atividades biológicas das lipoproteínas aterogênicas e do colesterol HDL antiaterogênico. Estudos sugerem que dietas com aumento de açúcares de adição induzem dislipidemias marcadas por hipertrigliceridemia, produção/secreção de colesterol LDL e VLDL e redução das concentrações de HDL plasmático (KATAN, 1998; PARKS, 2001).

Porém, ao analisar os triglicérides após as 4 semanas de tratamento, verificou-se que o grupo SYZ exibiu níveis inferiores aos do HSD (**Figura 5D**). A este efeito anti-dislipidêmico, evidências atestam que o EHS leva à reversão do acúmulo de triglicérides na corrente sanguínea (KIRPICHNIKOV, MCFARLANE, SOWERS, 2002; SANCHES et al., 2016), tal qual extratos de sementes de *S. cumini* geram inibição da enzima responsável pela síntese de colesterol (SHARMA et al, 2012).

Também verificou-se as dosagens de glicose séricas antes do tratamento, em estado de jejum (**Figura 5E**) e não foi observada diferença entre os grupos. Após as 4 semanas de tratamento, foi realizada uma nova avaliação sérica dos níveis de glicose tanto em estado de jejum (**Figura 5F**) quanto alimentado (**Figura 5G**). Nenhum dos grupos exibiu diferença na glicemia de jejum ao fim tratamento em relação ao

CTR (**Figura 5**). Já no resultado da dosagem de glicemia pós-prandial, HSD e SYZ mostraram maior resultado quando comparados ao CTR.

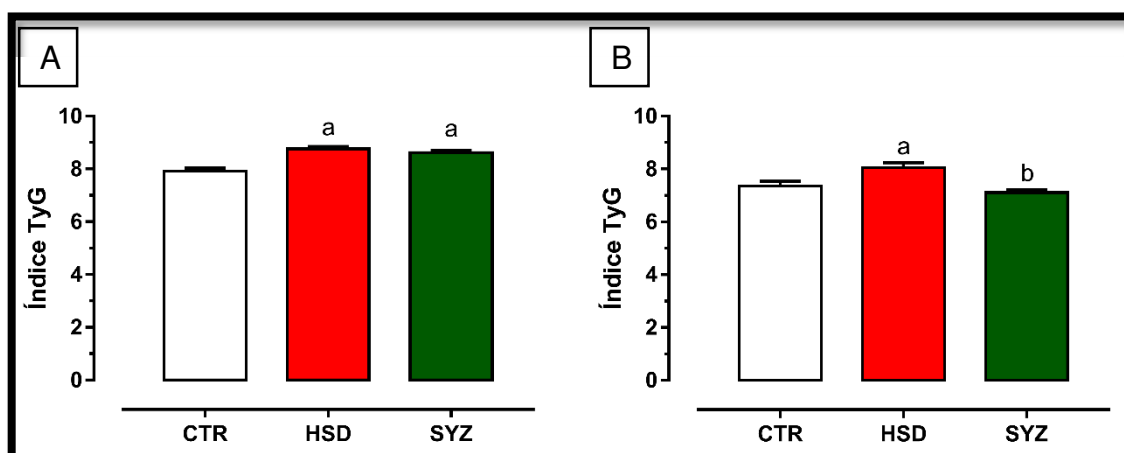


**Figura 5. Metabolismo glico-lipídico.** A – Colesterol precedente ao tratamento; B – Colesterol após o tratamento; C – Triglicérides precedentes ao tratamento; D – Triglicérides após o tratamento; E – Glicemia em jejum, antes do tratamento; F – Glicemia em jejum, tratamento; G – Glicemia em estado alimentado. As barras representam média ± erro padrão, comparadas por análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p < 0,05) vs. aCTR; bHSD.

Para mais, os dados da glicemia de jejum e triglicerídeos foram empregados para a determinação do índice TyG (**Figura 6**), um índice preditivo de resistência à insulina. Entre os motivos de se utilizar o índice TyG, enquandram-se sua alta sensibilidade e especificidade, sua derivação de estados de jejum, sendo menos dispendioso, além de usar aferições de glicose e triglicerídeos, que estão disponíveis em maior facilidade de acesso em laboratórios clínicos (GUERRERO-ROMERO et al., 2010; DU et al, 2014).

No período antecedente ao tratamento (**Figura 6A**), pode-se verificar que os animais alimentados com DRS apresentaram RI hepática em relação ao CTR. Nosso grupo de pesquisa, um trabalho já citado (PINTO *et al.*, 2016), demonstrou a eficiência da dieta HSD em induzir disglucemia em estado de jejum e alimentado, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e RI mesmo em um período de acompanhamento de 3 meses. Em roedores, o consumo elevado e crônico de açúcares leva à RI hepática e periférica, obesidade, DM2 e hipertensão. Dentre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desses distúrbios metabólicos estão a lipogênese *de novo* hepática e lipotoxicidade (TAPPY et al., 2010).

Em contrapartida, após o tratamento (**Figura 6B**), o grupo SYZ apontou valores menores contrapostos ao HSD, resultando na restauração à sensibilidade à insulina e exibindo valores semelhantes aos do CTR, inferindo-se que essa ação dá-se pela melhora do perfil lipídico dos animais.



**Figura 6. Avaliação do quadro de resistência insulínica.** TyG [ $\ln(\text{glicemia de jejum} \times \text{triglicerídeos})/2$ ]. A – Precedente ao tratamento; B – Tratamento. As barras representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ( $p < 0,05$ ) vs. aCTR; bHSD.

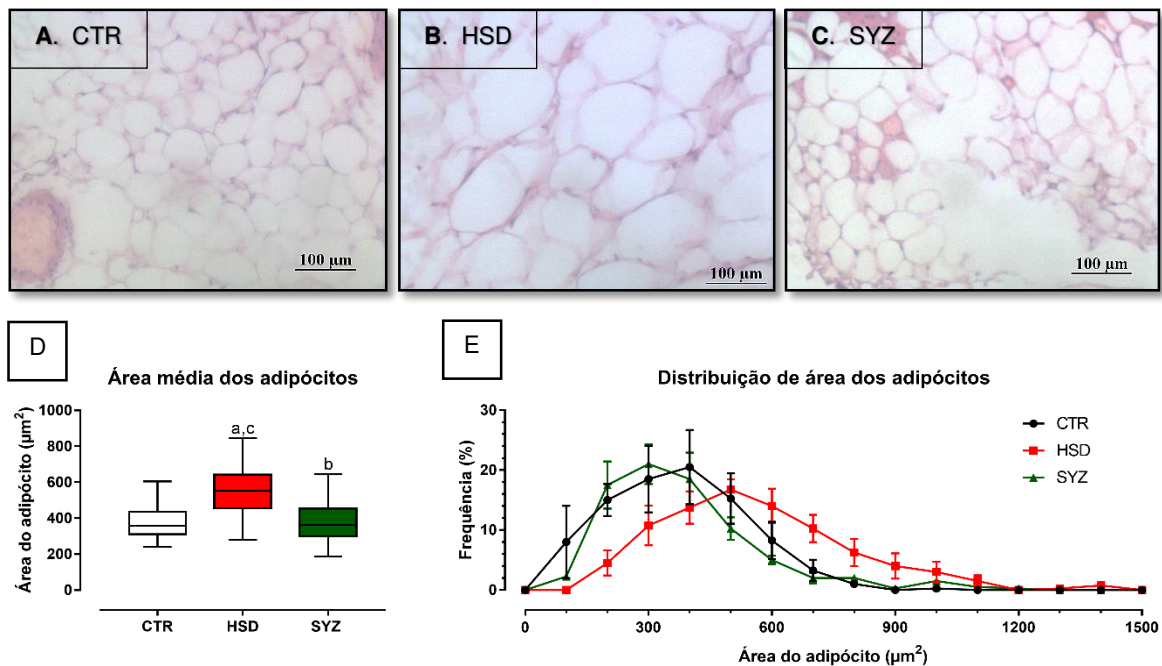
Fi

Em suma, esses dados dão suporte para defender que uma exposição precoce e sustentada de dieta rica em sacarose induziu disfunções metabólicas acentuadas peculiares à obesidade, tais como altas taxas de triglicérides, disglícemia em estado alimentado, acúmulo de gordura em depósitos viscerais e resistência à insulina.

## 5.2. Efeito do *S. cumini* sobre coxins adiposos periuterinos

As micrografias **A**, **B** e **C** da **Figura 7** mostram a gordura visceral ligada aos ovários corados com hematoxilina-eosina para CTR (A), HSD (B) e SYZ (C), respectivamente. Salvo as mudanças nos adipócitos viscerais, a análise histológica da gordura periuterinos demonstrou que a DRS gerou uma área média dos adipócitos aumentada em 47% vezes nos animais HSD quando comparados com CTR (CTR  $375,8 \pm 7,653$  vs HSD  $553 \pm 12,47$ ,  $p < 0,001$ ; **Figura 7D**). Vale ressaltar que o gráfico de distribuição da área dos adipócitos indicou que os animais HSD apresentaram maior tendência a possuir maiores adipócitos, deslocando a curva para a direita (**Figura 7E**). Esses achados corroboram com um desequilíbrio nos aspectos metabólicos de ratos alimentados com DRS, o que infere no prejuízo das funções reprodutivas desses animais. Dados semelhantes são encontrados em outros modelos de indução. Distúrbios metabólicos desenvolvidos pelo dano hipotalâmico com MSG, refletem na hipertrofia de adipócitos periuterinos (GASPAR et al, 2016; BENEVIDES, 2015), atuando diretamente no desenvolvimento da Handg e RI, e consequentemente disfunções ovarianas.

Em contrapartida, foi notória a ação antiadipogênica do EHS sobre o organismo desses animais, averiguando-se uma redução de 31% da área média dos adipócitos do grupo SYZ em relação ao HSD (HSD  $553 \pm 12,47$  vs SYZ  $378,6 \pm 10,12$ ,  $p < 0,001$ ; **Figura 7D**). Essa ação é atribuída à presença de compostos fenólicos na folha de *S. Cumini* (CHAGAS et al, 2015), que favorecem o emagrecimento, principalmente com atividade anti-lipidêmica, anti-hiperglicêmica e antioxidante, refletindo na redução da absorção de lipídios, aumento do gasto energético, diminuição da diferenciação e proliferação de pré-adipócitos diminuição da lipogênese e aumento da lipólise (YUN, 2010).



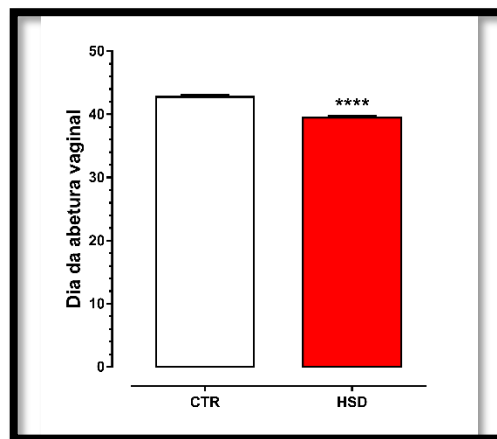
**Figura 7. Redução da área de adipócitos periovarianos em ratos expostos à DRS e tratados com EHS.** A, B e C – Seções representativas de coxins de gordura periovariana embebidas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina de animais CTR (A, n = 4), HSD (B, n = 4) e SYZ (C, n = 4), aumento de 200x. C – Área média dos adipócitos. D – Distribuição da área de adipócitos de ratos CTR (círculos pretos), HSD (quadrados vermelhos) e SYZ (triângulos verdes). As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,001) vs. aCTR; bHSD; cSYZ.

### 5.3. Influência da DRS sobre a puberdade e investigação da ação do EHS sobre a ciclicidade estral

A partir dos 30 dias de idade, as ratas foram observadas diariamente para registro da idade de abertura vaginal, variável indicativa do início da maturidade sexual. A **Figura 8** ilustra o efeito da DRS sobre a puberdade dos animais, constando que a alimentação induziu uma puberdade precoce no grupo HSD em comparação ao CTR. Consoante ao resultado, Kulie e cols. (2011) afirmam que garotas portadoras de obesidade entram na puberdade mais cedo e esse fato está associado principalmente à desregulação sexual.

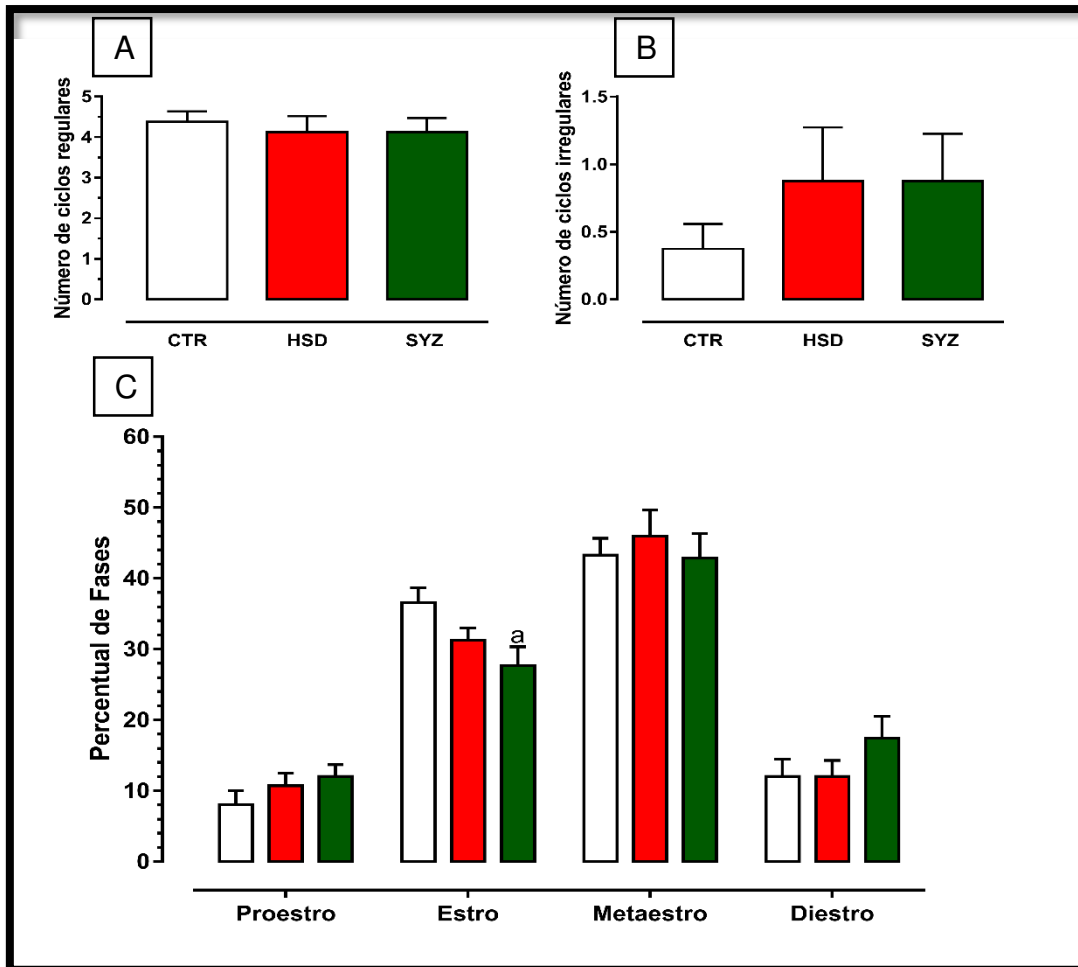
Acompanhando as tendências seculares, a adolescência precoce tem trazido consigo a puberdade precoce, principalmente a feminina, com meninas de nove anos de idade iniciando a menarca e desenvolvendo as mamas. Vários fatores têm contribuído para isto, num processo que envolve uma causalidade multifatorial. Como

tal, a incidência de crianças obesas tem aumentado muito e está associada à puberdade precoce. Estes eventos têm sido intensamente pesquisados e, até agora, sabe-se que o hormônio leptina, além de regular o apetite e o gasto energético, estimula o hipotálamo a produzir o hormônio liberador de gonadotrofinas e, conseqüentemente, a hipófise a produzir outros hormônios sexuais. Também, é necessária uma produção da leptina em níveis críticos para permitir o início da puberdade. Acredita-se que na obesidade há uma falta de resposta aos níveis de leptina no hipotálamo e devido a isto, o apetite não é diminuído e, assim, há uma maior quantidade deste hormônio, o que provavelmente pode ser um fator desencadeante da puberdade precoce (ZHANG et al, 1998; TANAKA et al, 2008; DAMIANI, 2002).



**Figura 8. Efeito da DRS sobre o início da puberdade.** Data abertura vaginal. As barras representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por teste t de Student (unpaired e one-tailed) \* representa diferença de  $p < 0,05$ .

Por fim, a ciclicidade estral das ratas foi averiguada quanto a regularidade do ciclo reprodutivo e verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos (**Figura 9A-C**). Reforçando nossos dados, conforme o estudo de Arcego (2017), que utilizou um modelo experimental com dieta hiperglicídica, não observou alterações no ciclo estral das ratas, possivelmente pelo período de indução ou limitações do modelo experimental na acentuação da obesidade sobre o perfil reprodutivo dos animais.



**Figura 9. Avaliação do efeito do EHS sobre a ciclicidade estral de ratas alimentadas com DRS.** A – Número de ciclos regulares; B – Número de ciclos irregulares; C – Percentual de fases do ciclo estral. As barras representam média  $\pm$  erro padrão, comparadas por análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls). As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ( $p < 0,05$ ) vs. aCTR.

Em síntese, tendo em vista a relação direta do metabolismo com o sistema reprodutor, pode-se perceber que as ratas HSD tiveram uma puberdade precoce induzida pela DRS. Todavia, as ratas HSD não apresentaram irregularidades no seu ciclo estral de forma discrepante às CTR. Ademais, o EHS não foi capaz de proporcionar uma redução da frequência de irregularidades estrais nos animais SYZ em relação aos HSD.

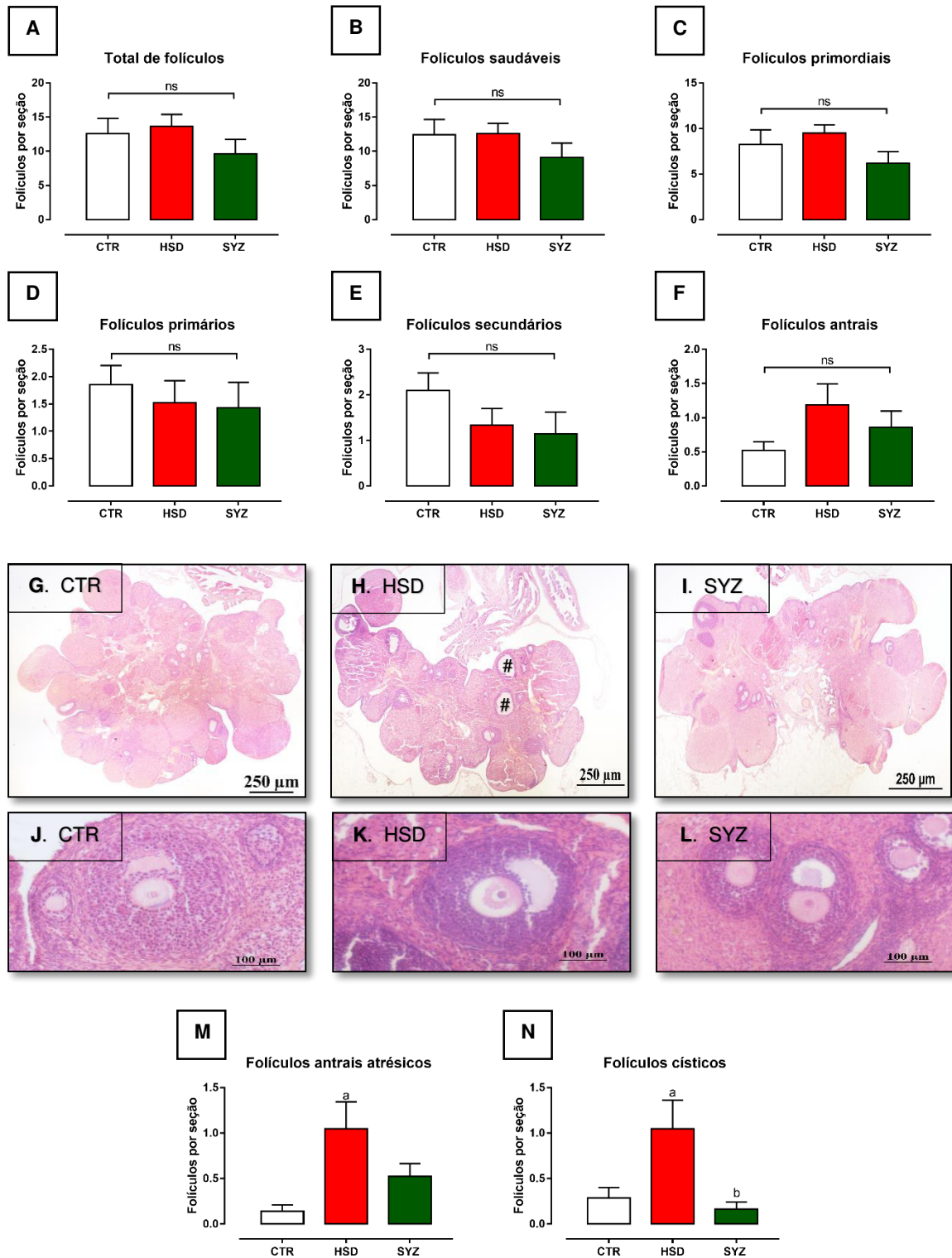
#### 5.4. Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre o desenvolvimento folicular ovariano em ratas alimentadas com DRS

Conforme observado na **Figura 10A**, não houve diferença no número total de folículos entre os grupos. Assim também foi observado na análise quantitativa de folículos saudáveis (**Figura 10B**). Embora não tenha havido diferença dos números de folículos primordiais, primários, secundários e antrais totais por seção (**Figura 10C-F**), observou-se diferença estatisticamente significativa dos números de folículos antrais atrésicos entre os grupos CTR e HSD, com uma média de  $0,1429 \pm 0,06734$  para o grupo CTR e uma média de  $1,048 \pm 0,2948$  de folículos antrais atrésicos por seção para o HSD, apresentando um quadro degenerativo dos folículos cerca de 86% maior que o grupo CTR (**Figura 10K,M**). Sabe-se que a atresia é um processo fisiológico de degeneração, que afeta todos os componentes foliculares e, paulatinamente, causa a eliminação do folículo. Em células da granulosa e da teca interna de folículos normais, a morte durante a atresia ocorre por apoptose (ROBKER, RICHARDS, 1998).

Gaspar e cols. (2016), ao utilizar um modelo de indução da obesidade com MSG, verificaram em seus resultados maior quantitativo de folículos atrésicos nos animais MSG em comparação ao grupo controle. Ilustraram algumas alterações peculiares nesses animais, tais como folículo antral atrésico com antro degenerado, infiltração granulosa e núcleos picnóticos. Esses dados fortalecem o papel crucial dos fatores disfuncionais desencadeados pela obesidade no desenvolvimento de alterações reprodutivas.

Em continuidade, observou-se a eficiência do *S. cumini* em reduzir o número de folículos antrais atrésicos (**Figura 10K,M**), com uma média de  $0,5238 \pm 0,1429$ . Isso pode ser demonstrado ao perceber que há diferença entre os grupos HSD e CTR, mas não há diferença entre SYZ e CTR (**Figura 10M**). Sugere-se que esse bom progresso do microambiente folicular seja atribuído às altas concentrações de compostos antioxidantes presentes no *S. cumini*, conferindo-o propriedades anti-inflamatórias (AYYANAR, SUBASH-BABU, IGNACIMUTHU, 2013).





**Figura 10. Análise histológica quantitativa de estruturas ovarianas em ratas alimentadas com ração DRS e tratadas com EHS.** A – Total de folículos por seção. B – Total de folículos saudáveis por seção. C – Total de folículos primordiais por seção. D – Total de folículos primários por seção. E – Total de folículos secundários por seção. F – Total de folículos antrais por seção. G, H e I – Representação de seções ovarianas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina de ratas CTR (G), HSD (H) e SYZ (I), aumento de 20x. J, K e L – Fotomicrografias de folículos antrais de ratas CTR (J, saudável), HSD (K, atrético) e SYZ (L, saudável), aumento de 200x. M – Total de folículos antrais atréticos por seção. N – Total de folículos císticos por seção. CTR: grupo controle, n=7; HSD: grupo dieta rica em sacarose, n=7; SYZ: grupo tratado com *S. cumini*, n=7. As barras representam média  $\pm$  erro das médias, comparadas por análise de variância (One-Way e pós-teste Newman-Keuls). Hashtags (#) em H indicam cistos foliculares. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,05) vs. aCTR; bHSD.

Ainda, analisou-se ainda a presença de folículos císticos, obtendo-se um resultado significativamente relevante. O grupo HSD exibiu um percentual de e uma média de  $1,048 \pm 0,3123$  de folículos císticos por seção, apresentando um quantitativo cístico maior que os grupos CTR e SYZ (CTR:  $0,2857 \pm 0,1134$  & SYZ:  $0,1667 \pm 0,07454$ ) (**Figura 10H,N**). Em mamíferos com obesidade induzida por dieta, relatou-se a presença de folículos císticos (NEWELL-FUGATE et al, 2014). Os folículos císticos originam-se de um folículo que respondeu anormalmente aos estímulos gonadotróficos não ovulando e acumulando uma maior quantidade de líquido folicular, ou pela falha de um folículo não dominante de sofrer o processo natural de atresia. No folículo cístico, ocorre baixa frequência de apoptose nas células da teca interna, o que pode estar relacionado ao atraso da regressão folicular que ocorre no cisto, que continua a crescer, e ao desequilíbrio na produção de hormônios esteroides (SPANOS, 1973; CASTILHOS, 2003).

Em se tratando de terapêutica, muitos se utilizam de medicamentos antidiabéticos com o objetivo de redução dos níveis séricos de insulina, sensibilização dos tecidos à insulina, manejo da disglucemia, e conseqüentemente diminuição dos níveis de andrógenos produzidos em excesso pela permanência da sensibilidade dos ovários à insulina mediante quadro de resistência periférica (MACHADO, 2008; WU et al, 2012). Sendo assim, propõe-se que a melhora da qualidade do microambiente folicular, instituída por um menor quantitativo cístico nos animais SYZ em relação aos HSD, deu-se pela administração do *S. cumini*, beneficiando o metabolismo com a restauração da sensibilidade insulínica e com ação redutora de triglicérides.

## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados são satisfatórios para concluir-se que a DRS exerce efeitos deletérios no metabolismo de ratos, induzindo aumento do ganho de peso, disglícemia pós-prandial, taxas mais altas de triglicérides, aumento de gordura nos depósitos viscerais e periuterinos, resistência à insulina e indução precoce da puberdade. Somado a isso, ao estudar o efeito do EHS sobre o metabolismo dos animais alimentados com a DRS, verificou-se que os animais apresentaram redução do ganho de peso, redução de triglicérides, restauração da sensibilidade à insulina e redução dos coxins de gordura visceral e periuterinas. Também, o uso do EHS proporcionou uma melhora na atresia antral das fêmeas, não diferindo quando comparadas ao controle. Não foi observada diferença na contagem dos folículos totais e saudáveis entre os grupos. Outro achado importante foi a avaliação de folículos císticos, onde o grupo HSD apresentou superior quantidade em relação aos outros grupos. Nesse sentido, os benéficos das ações terapêuticas do *S. cumini* são notórios sobre o perfil metabólico, trazendo melhora à morfologia ovariana, além de promover uma terapia alternativa ao uso da polimedicação.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, Fahim et al. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 937-943, 2002.

ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.

ARCEGO, Danusa Mar. Isolamento social precoce e consumo de uma dieta hiperlipídica: implicações no comportamento do tipo depressivo e em aspectos cognitivos em ratos adultos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. 2017.

ARIE, W.M.Y.; FONSECA, A.M.; BAGMOLI, V.R.; FASSOLAS, G.; BARACAT, E.C. Síndrome do ovário policístico e metformina: revisão baseada em evidências. **Femina**. 37(11):585-602. 2009.

ARTINI, Paolo G. et al. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 215-223, 2007.

AYYANAR, Muniappan; SUBASH-BABU, Pandurangan. Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.

BALIGA, Manjeshwar Shrinath et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of Eugenia jambolana Lam.(black plum): a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.

BENEVIDES, R.O.A. Efeitos do tratamento com *Syzygium cumini* (L.) SKEELS sobre as funções metabólicas e do sistema reprodutor de ratas obesas induzidas por L-glutamato monossódico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2015.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BONA, Karine dos Santos de. Efeito do Extrato de *Syzygium cumini*, in vitro, na atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e ésteres de colina e sobre o perfil oxidativo em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2011.

BOTEZELLI, J.D. et al. Fructose-rich diet leads to reduced aerobic capacity and to liver injury in rats. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 78, 2012.

BRASIL, VIGITEL. Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. 2016.

BRAY, George A.; NIELSEN, Samara Joy; POPKIN, Barry M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 4, p. 537-543, 2004.

BREGNHØJ, L. et al. Combined intervention programme reduces inappropriate prescribing in elderly patients exposed to polypharmacy in primary care. **European journal of clinical pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 199-207, 2009.

BUGIANESI, Elisabetta; MCCULLOUGH, Arthur J.; MARCHESINI, Giulio. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987-1000, 2005.

CASTILHOS, L. R. Avaliação da terapêutica homeopática nas ovariopatias císticas de bovinos leiteiros. **UFLA**, 2003.

CHAGAS, Vinicyus Teles et al. Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 259, 2015.

COSTA, Vinícius Moreira Gonçalves. Avaliação reprodutiva de ratas superalimentadas na infância expostas a diferentes tipos de treinamento físico. Dissertação de Mestrado em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2018.

DAĞ, Z.Ö.; DILBAZ, B. Impact of obesity on infertility in women. **Journal of the Turkish German Gynecological Association**, v. 16, n. 2, p. 111, 2015.

DAMIANI, Durval. Diagnóstico laboratorial da puberdade precoce. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 46, n. 1, p. 85-90, 2002.

DEHGHAN, M.; AKHTAR-DANESH, N.; MERCHANT, A.T. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutrition journal*, v. 4, n. 1, p. 24, 2005.

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia et al. A modern medical quandary: polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and oral contraceptive pills. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 5, p. 1927-1932, 2003.

DONNELLY, K.L.; SMITH, C.I.; SCHWARZENBERG, S.J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M.D.; PARKS, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DU, Tingting; YUAN, Gang; ZHANG, Muxun; ZHOU, Xinrong; SUN, Xingxing; YU, Xuefeng. Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposity indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, n. 1, p. 146, 2014.

DUBOIS, L.; OHM, KYVIK K.; GIRARD, M.; TATONE-TOKUDA, F.; PÉRUSSE, D.; HJELMBORG, J. Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. **PLOS one**, v. 7, n. 2, p. e30153, 2012.

EHRMANN, David A. Polycystic ovary syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 12, p. 1223-1236, 2005.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Herbal medicine. **Medical Clinics**, v. 86, n. 1, p. 149-161, 2002.

EGUCHI, Yuichiro et al. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of gastroenterology**, v. 41, n. 5, p. 462-469, 2006.

FARIAS, Luana Tajra; DE SABÓIA, Rocilda Cleide Bonfin; LIMA, Carlos Henrique Ribeiro. Obesidade e infertilidade: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Interdisciplinar**, v. 10, n. 3, p. 141-149, 2018.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; DURANTE-MONTIEL, I.; SÁNCHEZ-RIVERA, G.; VALADEZ-VEGA, C.; MORALES-GONZÁLEZ, J.A. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FERREIRA, J.A.S. et al. Síndrome dos ovários policísticos: uma visão atual. **Revista FEMINA**. Rio de Janeiro, v. 36, n. 8, 2008.

FREIXO, Carla Cristina Vellasco do Nascimento. Síndrome metabólica: A doença do homem moderno – uma abordagem sobre seu tratamento. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Rio de Janeiro, v. 94, n.4, p. 200-219, 2010.

GASPAR, R.S. et al. Polycystic Ovary Syndrome Phenotype in Hyperinsulinemic but Normoandrogenic Monosodium L-Glutamate Obese Rats. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1\_supplement, p. 1247.6-1247.6, 2016.

GONZÁLEZ-MUNIESA P, MÁRTINEZ-GONZÁLEZ M-A, HU FB, DESPRÉS J-P, MATSUZAWA Y, LOOS RJF. **Obesity. Nat Rev Dis Prim.** 3:17034. 2017.

GOSDEN, RG; BOLAND, NI; SPEARS, N; MURRAY, AA; CHAPMAN, M; WADE, JC; ZOHDY, NI. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. **Reproductive Medicine Review**, v. 2, n. 3, p. 129-152, 1993.

GRAY, S.H. Menstrual Disorders. **Pediatrics in Review**, v.34, n.1, p. 5-19, Jan 2013.

GUERRERO-ROMERO, Fernando et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347-3351, 2010.

HELMSTÄDTER, A. Syzygium cumini (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes—125 years of research. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 2, p. 91-101, 2008.

HIRSHFIELD, Anne Newman. Development of follicles in the mammalian ovary. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1991. p. 43-101.

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

JAKIMIUK, Artur J. et al. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1318-1323, 2001.



JULIANI, C. C. et al. Effects of atrazine on female Wistar rats: morphological alterations in ovarian follicles and immunocytochemical labeling of 90 kDa heat shock protein. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 607-616, 2008.

KATAN, Martijn B. Effect of low-fat diets on plasma high-density lipoprotein concentrations. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3, p. 573S-576S, 1998.

KAUR, Jaspinder. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, 2014.

KAWASAKI, Takahiro et al. Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. **British journal of nutrition**, v. 93, n. 5, p. 613-618, 2005.

KIRPICHNIKOV, Dmitri; MCFARLANE, Samy I.; SOWERS, James R. Metformin: an update. **Annals of internal medicine**, v. 137, n. 1, p. 25-33, 2002.

KULIE, Teresa et al. Obesity and women's health: an evidence-based review. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 24, n. 1, p. 75-85, 2011.

MACHADO, Roberto Carlos. Avaliação do uso da metformina no resultado ovulatório de pacientes portadoras da síndrome de ovários policísticos resistente ao uso isolado do citrato de clomifeno. **Belo Horizonte: UFMG**, 2008.

MACIEL, Gustavo A.R. et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5321-5327, 2004.

MAGOFFIN, Denis A. Ovarian enzyme activities in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 86, p. S9-S11, 2006.

MALAFAIA, Andressa Bressan et al. Obesity induction with high fat sucrose in rats. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 26, p. 17-21, 2013.

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

MARCONDES, JAM; HAYASHIDA, SY; BACHEGA, TASS (2007). Hirsutismo and Síndromes dos ovários policísticos. In: Mendonça BB, Maciel RMB, Saad M, editors. *Endocrinologia*. São Paulo, Brazil: Atheneu. 635–682.

MELO, M. E. Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade. Associação Brasileira para Estudos da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO), São Paulo (SP); 2010.

MENNITI-IPPOLITO, Francesca et al. Use of unconventional medicine in Italy: a nation-wide survey. **European journal of clinical pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 61-64, 2002.

MOORE, C. J. et al. Perinatal administration of a selective serotonin reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1297-1311, 2015.

MORALES, D.A.; VERDESIA, F.S. Uso de la metformina em pacientes com el síndrome del ovario poliquístico. **Acta Médica Costarricense**, v.49, n. 3, 2007.

MOREIRA, Ana Raquel da Silva. **Metformina no tratamento da infertilidade na síndrome do ovário poliquístico**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade da Beira Interior.

MOURA, Heloisa Helena Gonçalves De et al. Síndrome do ovário policístico: abordagem dermatológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.41, n. 2, pp.121-142, June, 2005.

NEWELL-FUGATE, A.E. et al. Effects of diet-induced obesity on metabolic parameters and reproductive function in female Ossabaw minipigs. **Comparative medicine**, v. 64, n. 1, p. 44-49, 2014.

OKTEM, O., OKTAY, K. The ovary. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1127, n. 1, p. 1-9, 2008.

PACKER, Milton. Is metformin beneficial for heart failure in patients with type 2 diabetes?. **Diabetes research and clinical practice**, v. 136, p. 168-170, 2018.

PARKS, E. J. Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. *The Journal of nutrition*, v. 131, n. 10, p. 2772S-2774S, 2001.

PASQUALI, Renato. Obesity, fat distribution and infertility. **Maturitas**, v. 54, n. 4, p. 363-371, 2006.

PASQUALI, Renato; PATTON, Laura; GAMBINERI, Alessandra. Obesity and infertility. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 14, n. 6, p. 482-487, 2007.

PASQUALI, R.; PELUSI, C.; GENGHINI, S.; CACCIARI, M.; GAMBINERI, A. Obesity and reproductive disorders in women. **Human reproduction update**, v. 9, n. 4, p. 359-372, 2003.

PASTOR, Carmen L. et al. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 2, p. 582-590, 1998.

PAWLAK, Dorota B.; KUSHNER, Jake A.; LUDWIG, David S. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. **The Lancet**, v. 364, n. 9436, p. 778-785, 2004.

PERRINI, Sebastio et al. Biological specificity of visceral adipose tissue and therapeutic intervention. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 114, n. 4, p. 277-286, 2008.

PENALVA, Daniele Q. Fucciolo. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 245-250, 2008.

PINTO, B.A.S. et al. Early exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal endoplasmic reticulum-stress in young rats. **Metabolic brain disease**, p. 1-11. ISSN 0885-7490. 2016.

PONTES, Anaglória et al. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: relação com as variáveis antropométricas e bioquímicas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, p. 74-79, 2012.

POPAT, Vaishali B. et al. The menstrual cycle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1135, n. 1, p. 43-51, 2008.

RAMOS, Viviane Wagner; BATISTA, Leandro Oliveira; ALBUQUERQUE, Kelse Tibau. Efeitos do consumo de frutose sobre ingestão alimentar, parâmetros bioquímicos e corporais em ratos Wistar. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 36, n. 12, p. 937-941, 2017.

ROBKER, L. K. et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. **J Clin Endocrinol Metab**. Washington, v. 94, n. 5, p. 1533–1540, 2009.

ROBKER, Rebecca L.; RICHARDS, JoAnne S. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 7, p. 924-940, 1998.

SANCHES, Jonas R. et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium l-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 48, 2016.

SANTOS, Carlos Eduardo; SCHRANK, Yolanda; KUPFER, Rosane. Análise crítica dos critérios da OMS, IDF e NCEP para síndrome metabólica em pacientes portadores de diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 9, p. 1096-1102, 2009.

SARAVANAN, G.; PARI, L. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Syzygium cumini* bark in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of pharmacology and toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2008.

SENAPHAN, Ketmanee et al. Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 6446-6464, 2015.

SHARMA, Ashok Kumar; BHARTI, Saurabh; KUMAR, Rajiv; KRISHNAMURTHY, Bhaskar; BHATIA, Jagriti; KUMARI, Santosh; ARYA, Dharamvir Singh. *Syzygium cumini* ameliorates insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction via modulation of PPAR $\gamma$ , dyslipidemia, oxidative stress, and TNF- $\alpha$  in type 2 diabetic rats. **Journal of pharmacological sciences**, v. 119, n. 3, p. 205-213, 2012.

SHARMA, Bhavna; BALOMAJUMDER, Chandrajeet; ROY, Partha. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.

SILVA, José Roberto Viana. **Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles**. 2005. Tese de Doutorado. Utrecht University.

SILVA, Selma do N. et al. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 102-108, 2012.

SOARES, J. J. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Uruguiana**. 2013. Tese de Doutorado. Dissertação [Mestrado em Bioquímica] - Universidade Federal do Pampa.

SOUSA, R.M.L. et al. Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats. **Nutrition & Metabolism**. 2018.

SPANOS, W.J. Preoperative hormonal therapy of cystic adnexal masses. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 116, n. 4, p. 551-556, 1973.

SPEROFF, Leon; FRITZ, Marc A. (Ed.). **Clinical gynecologic endocrinology and infertility**. lippincott Williams & wilkins, 2005.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

SUMAN, Rajesh Kumar et al. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2016, 2016.

TANAKA, Tânia Gnechi et al. Puberdade precoce e tardia: aspectos importantes no contexto da clínica ortodôntica. **Ortodontia**, v. 41, n. esp, p. 275-281, 2008.

TAPPY, Luc et al. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1044-1049, 2010.

ULLA, Anayt et al. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate

high fat diet induced obese rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 289, 2017.

VALE, Caroline Castro. Perfil metabólico e reprodutivo de ratas obesas tratadas com *Syzygium cumini* (L.) Skeels. 2016. 63 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

VAN DEN HURK, Robert; ZHAO, Jia. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VIEGAS, J. M, et al. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 619-627, 2007.

WU, L.L.-Y. et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus–oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438-5445, 2010.

WARRIER, Panniyampally Krishna; NAMBIAR, V. P. K. **Indian medicinal plants: a compendium of 500 species**. Orient Blackswan, 1993.

WU, Sheng et al. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v. 63, n. 4, p. 1270-1282, 2014.

WU, Sheng et al. Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 114-123, 2012.

YUN, Jong Won. Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. **phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1625-1641, 2010.

ZHANG, Yiyang et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425, 1998.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA  
 CIAEP:01.0341.2014

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencialidade farmacológicas de Flavonoides isolados da folha de Syzygium cumini (L) Skeels para tratamento de patologias associadas a síndrome metabólica: Investigação de mecanismos relacionados ao estresse do retículo endoplasmático**" registrada com o nº 23115.007440/2016-71, sob a responsabilidade de Antonio Marcus de Andrade Paes que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 19/08/2016.

FINALIDADE	( ) Ensino (X) Pesquisa ( ) Extensão
Vigência da autorização	2 Anos (01/07/2016 à 01/07/2018)
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (ratos) / WISTAR
Nº de animais	64
Peso/Idade	120-200g / 2 meses
Sexo	32 Machos e 32 fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

*Lucilene Amorim Silva*

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA  
 UFMA