

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DA DIETA HIPOCALÓRICA DE BAIXO ÍNDICE GLICÊMICO SOBRE
NÍVEIS DE GRELINA, LEPTINA, PARÂMETROS METABÓLICOS E DESFECHOS
REPRODUTIVOS EM MULHERES INFÉRTEIS COM EXCESSO DE PESO: UM
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

GEÓRGIA FRANCO BECKER

Porto Alegre, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DA DIETA HIPOCALÓRICA DE BAIXO ÍNDICE GLICÊMICO SOBRE
NÍVEIS DE GRELINA, LEPTINA, PARÂMETROS METABÓLICOS E DESFECHOS
REPRODUTIVOS EM MULHERES INFÉRTEIS COM EXCESSO DE PESO: UM
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

GEÓRGIA FRANCO BECKER

Orientador: EDUARDO PANDOLFI PASSOS

Co-Orientadora: CILEIDE CUNHA MOULIN

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor**

Porto Alegre, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Becker, Geórgia Franco

Efeito da dieta hipocalórica de baixo índice glicêmico sobre níveis de grelina, leptina, parâmetros metabólicos e desfechos reprodutivos em mulheres inférteis com excesso de peso: um ensaio clínico randomizado / Geórgia Franco Becker. -- 2015. 146 f.

Orientador: Eduardo Pandolfi Passos.
Coorientadora: Cileide Cunha Moulin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. infertilidade feminina. 2. índice glicêmico. 3. excesso de peso. 4. leptina. 5. grelina. I. Passos, Eduardo Pandolfi, orient. II. Moulin, Cileide Cunha, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

À minha FAMÍLIA, por compartilharem esta jornada de desafios, pelo apoio, paciência e incentivo oferecidos. Em especial à minha MÃE e ao meu PAI, por terem me ensinado o caminho da dedicação e da persistência. Não houve um só dia em que eu tenha caminhado sozinha, vocês estiveram sempre ao meu lado. Esta conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar minha gratidão e apreço a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos, pela oportunidade e confiança depositada em mim ao longo de todo o trabalho. Foste, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Cileide Cunha Moulin: muito obrigada pelo acolhimento no grupo de pesquisa, pelo incentivo, orientações, compreensão, amizade, e por ter caminhado “lado a lado” comigo nesta jornada. Foste incansável em tornar este projeto realidade.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores deste Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos passados ao longo do curso. Aos colegas do PPGCM, em especial as minhas queridas amigas nutris, Bruna e Larissa, e à nossa fisio-nutri Renata, pelo incentivo e por compartilharem muitos momentos e experiências ao longo desta caminhada.

À equipe de infertilidade e ao laboratório de embriologia do HCPA, em especial às biólogas Ana, Paula e Bel, aos R4s que passaram ou ainda estão na equipe de infertilidade Ivan, Mariana, Carolina, Roberta e Débora pela parceria, companheirismo e disposição empenhada. À minha querida Enf^a Suzana, que foi muito mais que uma colega de trabalho e dividiu comigo o “dia-a-dia” do desenvolvimento deste trabalho, e, de uma forma especial e carinhosa, me apoiou em todos os momentos. Aos funcionários do CPC, do CPE e da zona 6 do HCPA, em especial à Soleci, Viviane, Valquíria, Vera, Amélia, Ieda e Zé pela competência, atendimento atencioso, e pela convivência sempre alegre.

Às bolsistas de iniciação científica, Lucía, Marina, Pamella Petersen, Camila e Pâmela Müller: a participação e a dedicação de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

À Karina Monteiro, pela ajuda prestada na análise de parte dos dados deste projeto.

Às voluntárias que foram essenciais na elaboração desta pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e presteza.

Desde já aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“A árvore nascente aguarda-te a bondade e a tolerância,
para que te possa ofertar os próprios frutos
em tempo certo.”

Chico Xavier

RESUMO

Introdução: A resistência insulínica (RI) decorrente da obesidade está relacionada a distúrbios hormonais que afetam o sistema reprodutor. Leptina e grelina são hormônios que regulam o balanço energético; porém, informações acerca da relação destes hormônios com a infertilidade são escassas. A dieta de baixo índice glicêmico (BIG) parece exercer impacto positivo sobre as alterações metabólicas decorrentes da RI. **Objetivo:** Verificar o efeito de uma dieta hipocalórica de baixo índice/carga glicêmica sobre parâmetros antropométricos e metabólicos, níveis de grelina e leptina e desfechos reprodutivos em mulheres inférteis com excesso de peso candidatas à fertilização in vitro (FIV). **Métodos:** Ensaio clínico randomizado. Foram analisadas vinte e seis mulheres inférteis com obesidade Grau I ou II ou pré-obesidade associada à circunferência da cintura aumentada. As pacientes foram alocadas no grupo Dieta Hipocalórica de BIG, ou no grupo Controle (manutenção do hábito alimentar) e acompanhadas por 12 semanas. Parâmetros avaliados: peso corporal, índice de massa corporal (IMC), percentual de gordura (%G), glicose, insulina, HOMA-IR, lipídios séricos, hormônios reprodutivos, grelina acilada, leptina, dose de gonadotrofinas, número e qualidade oocitária e embrionária, taxa de fertilização e de gestação. **Resultados:** Houve redução de 5,5% do peso corporal e também do IMC ($p < 0,001$), do %G ($p = 0,002$), dos níveis de glicose ($p = 0,034$) e de leptina ($p = 0,013$) no grupo BIG quando comparado ao grupo controle. Houve um aumento de 18% nos níveis de grelina no grupo BIG quando comparado ao controle, mas esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$). O grupo BIG obteve 85,4% mais oócitos coletados, quando comparado ao grupo controle ($7,75 \pm 1,44$ vs. $4,18 \pm 0,87$, respectivamente, $p = 0.039$) no ciclo de FIV. Não houve diferença entre os grupos na dose de gonadotrofinas, na qualidade oocitária e embrionária, e na taxa de fertilização. Três (21,4%) pacientes do grupo BIG apresentaram gestação espontânea durante o acompanhamento, gerando três nascidos vivos. **Conclusões:** A perda de 5,5% do peso corporal através da dieta hipocalórica BIG foi capaz de melhorar parâmetros antropométricos, metabólicos, reprodutivos e os desfechos de FIV, quando comparado às mulheres que mantiveram o peso corporal. Estes resultados dão sustentação à recomendação clínica de aconselhar mulheres com sobrepeso ou obesas a perderem peso através de uma dieta balanceada, preferencialmente com baixo índice/carga glicêmica, antes de serem submetidas a procedimentos de reprodução assistida.

Palavras-Chave: infertilidade feminina, dieta, índice glicêmico, leptina, grelina, excesso de peso, fertilização in vitro.

ABSTRACT

Introduction: Insulin resistance (IR) resulting from obesity is related to hormonal disorders that affect reproductive system. Leptin and ghrelin are hormones that regulate energy balance; however, the relationship of these hormones with infertility is not clear. The low glycemic index (LGI) diet seems to exert a positive impact on obesity and metabolic changes resulting from IR. **Objective:** To verify the effect of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on anthropometric and metabolic parameters, ghrelin and leptin levels and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women candidates to *in vitro* fertilization (IVF). **Methods:** Randomized clinical trial. Twenty six infertile women with grade I and II obesity, or pre-obesity with increased waist circumference were analysed. Patients were assigned to hypocaloric LGI diet group or control group (maintenance of usual diet), and followed the protocol for 12 weeks. Parameters evaluated: body weight, body mass index (BMI), body fat percentage (%BF), glucose, insulin, HOMA-IR, serum lipids, reproductive hormones, leptin, acylated ghrelin, gonadotrophin doses, number and quality of oocytes and embryos, fertilization and pregnancy rates **Results:** There was a 5.5% weight loss and also a reduction in BMI ($p < 0.001$), BF% ($p = 0.002$), glucose ($p = 0.034$) and leptin levels ($p = 0.013$) in the LGI group compared to control. There was a 18% increase in ghrelin levels in the LGI group compared to control, but this increase was not significant ($p > 0.05$). The LGI diet group had 85.4% more oocytes retrieved compared to control group (7.75 ± 1.44 vs. 4.18 ± 0.87 , respectively, $p = 0.039$) in the IVF cycle. The gonadotrophin dose, oocyte and embryo quality, and fertilization rate were similar between groups ($p > 0.05$). Three (21.4%) patients in the LGI group experienced spontaneous pregnancy during the follow-up, generating three live births. **Conclusion:** The 5.5% weight loss through the hypocaloric LGI diet was able to improve anthropometric, metabolic, reproductive and IVF outcomes when compared with women that not lose weight. These results support the clinical recommendation to advise overweight and obese women to lose weight through a balanced diet, preferably with low glycemic index/load, prior to be submitted to assisted reproduction technologies.

Key words: female infertility, diet, glycemic index, leptin, ghrelin, overweight, in vitro fertilization

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1: Impacto da obesidade sobre o Processo Reprodutivo.....	25
--	----

MANUSCRITO ORIGINAL 1

Table 1: Intervention Diet food composition.....	93
Table 2: Baseline characteristics of the study participants.....	94
Table 3: Antropometric, hormonal and metabolic characteristics of the study participants post intervention.....	96
Table 4: Reproductive and IVF Outcomes.....	97
Table 5: Target and actual diet energy, macronutrients, dietary fiber and glycemic load.....	98

MANUSCRITO ORIGINAL 2

Table 1: Intervention Diet food composition.....	122
Table 2: Baseline characteristics of the study participants.....	123
Table 3: Antropometric, hormonal and metabolic characteristics of the study participants post intervention.....	125
Table 4: Target and actual diet energy, macronutrients, dietary fiber and glycemic load.....	126

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO ORIGINAL 1

Figure 1: Flow of participants through the trials comparing a low glycemic index (LGI) diet group with a control group.....	92
Figure 2: BMI (A), % Body Fat (B) and Glucose levels (C) in the LGI and control groups, pre and post intervention.....	95

MANUSCRITO ORIGINAL 2

Figure 1: Flow of participants through the trials comparing a low glycemic index (LGI) diet group with a control group.....	121
Figure 2: % Body Fat (A), Glucose levels (B) and Leptin levels (C) in the LGI and control groups, pre and post intervention.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

%BF	-	<i>body fat percentage</i>
AgRP	-	Proteína relacionada ao Agouti
AIG	-	alto índice glicêmico
AR	-	<i>assisted reproduction</i>
ART	-	<i>assisted reproduction technology</i>
BIG	-	baixo índice glicêmico
BMI	-	<i>body mass index</i>
CART	-	transcrição regulada por cocaína e anfetamina
CG	-	carga glicêmica
CHO	-	<i>carbohydrates</i>
CL	-	corpo lúteo
CNS	-	<i>central nervous system</i>
DCNT	-	doenças crônicas não transmissíveis
FIV	-	fertilização in vitro
FSH	-	hormônio folículo estimulante (<i>follicle stimulating hormone</i>)
GHS-R1	-	receptor do hormônio de crescimento
GI	-	<i>glycemic index</i>
GL	-	<i>glycemic load</i>
GnRH	-	hormônio liberador de gonadotrofinas
HC	-	<i>hip circumference</i>
HDL	-	<i>low density lipoprotein</i>
HMG	-	<i>human menopausal gonadotrophin</i>
HOMA	-	<i>homeostasis model assessment</i>
ICSI	-	injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IG	-	índice glicêmico
IGF-1	-	fator de crescimento semelhante à insulina-1
IMC	-	índice de massa corporal
IR	-	<i>insulin resistance</i>
IVF	-	<i>in vitro fertilization</i>
LDL	-	lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein)
LepR	-	receptor de leptina
LGI	-	<i>low glycemic index</i>

LH	-	hormônio luteinizante (<i>luteinizing hormone</i>)
MEV	-	mudanças no estilo de vida
mRNA	-	RNA mensageiro
NPY	-	Neuropeptídeo Y
PCOS	-	síndrome dos ovários policísticos (<i>polycystic ovary syndrome</i>)
POMC	-	pró-opiomelanocortina
RA	-	reprodução assistida
RCQ	-	razão cintura-quadril
r-FSH	-	<i>recombinant FSH</i>
RI	-	resistência à insulina
SHBG	-	proteína ligadora hormônios sexuais (<i>sex hormone binding globulin</i>)
SNC	-	sistema nervoso central
TNF-α	-	fator de necrose tumoral- α
VLDL	-	lipoproteína de muito baixa densidade
VLED	-	muito baixa densidade calórica (<i>very low energy density</i>)
WC	-	<i>waist circumference</i>
WHO	-	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
WHR	-	<i>waist/hip ratio</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO II	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO	17
2.2 INFERTILIDADE - CONCEITO	17
2.3 OBESIDADE – CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS E METABÓLICAS	17
2.4 OBESIDADE – CONSEQUÊNCIAS REPRODUTIVAS	21
2.5 OBESIDADE, INFERTILIDADE, ADIPOCINAS E ENTEROCINAS	26
2.5.1 LEPTINA	26
2.5.1.1 LEPTINA E FERTILIDADE	28
2.5.2 GRELINA	32
2.5.2.1 GRELINA E FERTILIDADE	34
2.6 DIETA E FERTILIDADE: INFLUÊNCIA DO ÍNDICE E CARGA GLICÊMICA	37
2.7 CONCEITOS DE ÍNDICE GLICÊMICO E CARGA GLICÊMICA DA DIETA	46
2.8 INTERVENÇÃO DIETÉTICA E MEDIDAS DE ADESÃO	47
CAPÍTULO III	49
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
CAPÍTULO IV	50
4. HIPÓTESES	50
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO V	69
5. MANUSCRITO ORIGINAL 1	69
Effects of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on body adiposity and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women undergoing IVF treatment: a randomized clinical trial	
CAPÍTULO VI	99
6. MANUSCRITO ORIGINAL 2	99

Effects of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on body adiposity, metabolic parameters, acylated ghrelin, leptin and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized clinical trial

CAPÍTULO VII	127
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
CAPÍTULO VIII	129
8. ANEXOS	129
8.1 ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO	129
8.2 ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO	131
8.3 ANEXO 3 - CARTA AO PESQUISADOR.....	132
8.4 ANEXO 4 - FLUXO CONSORT	133
8.5 ANEXO 5 - REGISTRO ENSAIO CLÍNICO	134
8.6 ANEXO 6 - CHECK LIST CONSORT: MANUSCRITO 1	135
8.7 ANEXO 7 - CHECK LIST CONSORT: MANUSCRITO 2	137
8.8 ANEXO 8 - REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS	139
8.9 ANEXO 9 - PLANOS ALIMENTARES	143
8.10 ANEXO 10 – LISTA DE EQUIVALENTES	146

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada da seguinte forma:

- Uma introdução apresentando a justificativa, os aspectos relevantes e o problema de pesquisa;
- Um referencial teórico abordando os principais estudos publicados em literatura científica e que apresentam relação com o assunto do trabalho, onde são enfocadas informações importantes para a contextualização do tema de pesquisa;
- Objetivos e Hipóteses de pesquisa;
- Apresentação do Manuscrito Original 1 intitulado: “ Effects of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on body adiposity and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women undergoing IVF treatment: a randomized clinical trial”, que será submetido à Revista *Human Reproduction*.
- Apresentação do Manuscrito Original 2 intitulado: “Effects of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on body adiposity, metabolic parameters, acylated ghrelin, leptin and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized clinical trial”, que será submetido à Revista *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Considerações Finais.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A manutenção de um equilíbrio entre a disponibilidade de fontes energéticas e as necessidades metabólicas do organismo é um fator essencial para manter a função gonadotrófica. Portanto, a nutrição pode influenciar a fertilidade de homens e mulheres. No entanto, os caminhos metabólicos e hormonais implicados nesta associação necessitam ser mais esclarecidos (Hammoud et al., 2008).

A infertilidade tem sido reconhecida como uma das desordens relacionadas à obesidade tanto em homens como em mulheres (Loret de Mola, 2009). Dentre as diversas alterações metabólicas decorrentes da obesidade, a resistência à insulina (RI) parece estar ligada aos distúrbios hormonais que afetam o sistema reprodutor (Singla et al. 2010; Sliwowska et al., 2014). A hiperinsulinemia decorrente da obesidade abdominal leva à alterações nos pulsos de hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) no sistema nervoso central (SNC) e ao aumento da estereoidogênese nos ovários. Além disto, leva à supressão da síntese hepática da proteína ligadora de hormônios sexuais (SHBG), aumentando a proporção de androgênios livres para aromatização e conversão em estrogênio no tecido adiposo periférico, ocasionando, também, o aumento da biodisponibilidade de estrogênio livre circulante. Todas estas alterações tem efeitos deletérios sobre oócitos, folículos e endométrio, e conseqüentemente, sobre a capacidade reprodutiva (Parihar, 2003; Michalakis et al., 2013).

Nos últimos anos, crescente atenção tem sido dada a vários elementos envolvidos na regulação do balanço energético. Na coordenação da ingestão dietética e do gasto energético, o sistema nervoso central (SNC) recebe inúmeros impulsos e sinais periféricos. Tais sinais são provenientes especialmente do trato gastrintestinal, onde vários hormônios são liberados por estímulo de nutrientes como, por exemplo, a grelina, a colecistoquinina, o peptídeo YY, o peptídeo semelhante ao glucagon-1 e o polipeptídeo pancreático, e também provenientes do tecido adiposo como, por exemplo, a leptina e a adiponectina, em resposta a um balanço energético constantemente alterado (Cummings et al., 2005). Dentre estes, podemos destacar a grelina e a leptina. O estudo destes dois peptídeos tem contribuído de forma considerável para o entendimento da endocrinologia da obesidade e suas comorbidades. Trabalhos têm evidenciado a presença de receptores celulares para leptina e grelina ao nível de gônadas, o que sugere haver, além da influência indireta (hipotalâmica), a influência direta destes hormônios sobre a fisiologia reprodutora (Caminos et al., 2003; Cervero et al., 2005;

Metwally et al., 2008a). Entretanto, informações acerca da sua relação com a infertilidade são escassas.

A perda de peso parece ser um fator importante para aprimorar a resposta insulínica em indivíduos obesos. Tratando-se especificamente de mulheres, a perda de peso também parece aumentar as chances de gravidez espontânea ou a resposta aos procedimentos de fertilização *in vitro*. Dentre as diversas estratégias para a redução de peso, está a dieta de baixo índice glicêmico (BIG), que tem sido um instrumento no manejo da obesidade. Além disto, a dieta BIG, quando comparada a dietas convencionais, parece exercer maior impacto sobre as alterações metabólicas decorrentes da RI. Estudos têm examinado de forma isolada o efeito da dieta hipocalórica ou do índice glicêmico (IG) da dieta sobre parâmetros nutricionais, clínicos e metabólicos. No entanto, de nosso conhecimento, trabalhos examinando o potencial efeito interativo da dieta hipocalórica e do IG da dieta sobre estes mesmos parâmetros, e também sobre parâmetros de fertilidade são inexistentes na literatura.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO

Esta revisão de literatura está focada nos aspectos relacionados à fertilidade feminina, excesso de peso (sobrepeso e obesidade), dieta para perda de peso, índice glicêmico da dieta, níveis de grelina, leptina e fisiologia reprodutiva feminina. A estratégia de busca de estudos envolveu duas bases de dados - PubMed e Scielo, consideradas como as mais importantes e abrangentes em pesquisa no país. A busca de dados se deu no período entre 1930 e 2014. Foram realizadas buscas através dos termos: “women reproduction”, “women fertility”, “women infertility”, “obesity”, “overweight”, “weight loss diet”, “diet glycemic index”, “leptin”, “ghrelin”, “in vitro fertilization”, “assisted reproduction technology”, “women”, “diet compliance”, “diet intervention” e suas combinações.

Foram levantados 667 artigos, os quais foram revisados, selecionados e agrupados nesta revisão por subitens: “infertilidade”, “obesidade, consequências clínicas e metabólicas”, “obesidade, consequências reprodutivas”, “obesidade, infertilidade, adipocinas e enterocinas”, “leptina”, “leptina e fertilidade”, “grelina”, “grelina e fertilidade”, “dieta e fertilidade: influência do índice e carga glicêmica”, “conceitos de índice glicêmico e carga glicêmica da dieta”, “intervenção dietética e medidas de adesão”, a fim de organizar e facilitar o entendimento dos fatores envolvidos nesta questão de pesquisa.

2.2 INFERTILIDADE - CONCEITO

A infertilidade é uma desordem do sistema reprodutor que pode ser definida como uma condição onde um casal, após pelo menos um ano de relacionamento sexual regular e na ausência do uso de qualquer método anticoncepcional, não observa gestação clínica (Zegers-Hochschild et al., 2009; WHO, 2014a).

2.3 OBESIDADE – CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS E METABÓLICAS

O sobrepeso e a obesidade são definidos como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo que pode prejudicar a saúde (WHO, 2014b). Estimativas da Organização Mundial

de Saúde (WHO) de 2007 apontam para mais de 1,4 bilhões de pessoas adultas, com 20 anos ou mais, apresentando sobrepeso. Destes adultos com sobrepeso, mais de 200 milhões de homens e cerca de 300 milhões de mulheres são obesos. De uma forma geral, mais de 10% da população mundial adulta é obesa. No Brasil, os índices para excesso de peso na população brasileira com 20 ou mais anos de idade, são de 50,1% em homens e 48,0% em mulheres, já os índices de obesidade são 12,4% para homens e 16,9% para mulheres (IBGE, 2009). A obesidade é uma patologia de etiologia complexa influenciada pela idade, sexo, fatores comportamentais, ambientais, hormonais e também por fatores genéticos (Kopelman, 2000). O índice de massa corporal (IMC) é um índice simples de relação peso-altura que é comumente utilizado para a classificação de sobrepeso e obesidade em adultos, e representa a medida mais comumente utilizada a nível populacional para mensurar sobrepeso e obesidade, já que é a mesma para ambos os sexos e para todas as idades entre os adultos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), os pontos de corte e a classificação do IMC de adultos são feitos da seguinte maneira: $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ - baixo peso; $IMC \geq 18,5$ e $< 25,0 \text{ kg/m}^2$ - eutrofia; $IMC \geq 25,0$ e $< 30,0 \text{ kg/m}^2$ – sobrepeso; $IMC \geq 30,0$ e $< 35,0 \text{ kg/m}^2$ – obesidade grau I; $IMC \geq 35,0$ e $< 40,0 \text{ kg/m}^2$ – obesidade grau II; e $IMC \geq 40,0 \text{ kg/m}^2$ – obesidade grau III (WHO, 1998). O aumento do IMC é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (principalmente doenças do coração e infarto); diabetes; desordens músculo-esqueléticas (especialmente osteoartrite); e alguns tipos de câncer, como o de endométrio, mama e o de cólon (WHO, 2014b; Rose, 2007).

Os casos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) estão crescendo em todo o mundo. Acredita-se que a proporção de casos de DCNT aumente para 57% da população até 2020 (WHO, 2014b). O sobrepeso e a obesidade são importantes fatores ligados a mortes em geral. Cerca de 3,4 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado de estarem com sobrepeso ou obesidade. Adicionalmente 44% dos casos de diabetes mellitus, 23% dos casos de doença cardíaca isquêmica, e entre 7 a 41% dos casos de certos tipos de câncer são atribuídos ao sobrepeso e a obesidade (WHO, 2014b). Quase metade dos casos de morte por doenças crônicas são atribuídas a doenças cardiovasculares quase sempre associadas à obesidade e diabetes mellitus. Este panorama epidemiológico de saúde é preocupante não só porque já afeta grande parte da população, mas também porque começa a aparecer mais cedo na vida (WHO, 2002).

A obesidade se desenvolve quando a ingestão energética excede o gasto energético (Bray, 2004). Os estoques de energia do nosso organismo são regulados através de uma complexa interação entre os centros de controle da ingestão alimentar no sistema nervoso

central (SNC), localizados particularmente no hipotálamo, e a regulação do armazenamento e mobilização dos estoques de gordura no tecido adiposo, afim de manter as reservas de energia do organismo (Singla et al., 2010).

O tecido adiposo é o maior órgão endócrino do organismo, produzindo vários hormônios que regulam o metabolismo - influenciam a homeostase energética, a resposta imune, a função reprodutiva entre outros (Singla et al., 2010). Um aumento na massa de células de gordura leva a um desequilíbrio na liberação destes hormônios, o que pode acarretar diversas consequências metabólicas. Uma complicação metabólica frequente da obesidade, também referida como síndrome metabólica, consiste em resistência à insulina (frequentemente culminando em falência das células β do pâncreas), tolerância diminuída à glicose, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doença cardíaca prematura (Singla et al., 2010).

A insulina é um regulador crítico de todos os aspectos envolvidos na biologia das células de gordura, e os adipócitos são um dos tipos celulares mais responsivos à ação da insulina. Dentre os papéis fisiológicos da insulina destaca-se sua influência sobre o metabolismo de macronutrientes assim como sobre o crescimento celular. A ação da insulina no metabolismo de lipídios e carboidratos é análoga e abrange, entre outros aspectos, a promoção do anabolismo e a inibição do catabolismo. A insulina estimula o transporte de glicose e a síntese de triglicerídeos (lipogênese), assim como a inibição da lipólise no organismo (Boden, 1997).

O termo “resistência à insulina” é definido como a resistência aos efeitos da insulina sobre a captação, metabolismo e armazenamento de glicose. A resistência à insulina na obesidade manifesta-se pela redução do transporte e metabolismo de glicose induzido por insulina nos adipócitos e no músculo esquelético e pela comprometida supressão da liberação de glicose pelo fígado (Maeda et al., 2002).

Os defeitos funcionais ocorridos na resistência à insulina podem ser devido ao comprometimento da sinalização da insulina nos seus tecidos-alvos, como por exemplo, no tecido adiposo, esquelético e hepático. Tanto no tecido adiposo quanto no muscular, a ligação da insulina a seus receptores, a fosforilação do receptor, e a atividade de tirosina quinase estão reduzidas na obesidade. Estudos demonstram que defeitos na sinalização do receptor de insulina são um importante componente envolvido na resistência à insulina associada à obesidade em humanos (Rondione, 1997; Kim et al., 1999).

A ação hipoglicemiante da insulina de baixar os níveis de glicose sanguínea resulta da supressão da produção hepática de glicose e do aumento da captação de glicose a nível

muscular e no tecido adiposo através do GLUT4. Em obesos existe uma sub-regulação do GLUT4, e isto representa a maior contribuição para o comprometimento do transporte de glicose induzido por insulina nos adipócitos (Sheperd et al., 1993), acarretando uma disponibilidade reduzida de glicose no tecido adiposo. Moléculas como os ácidos graxos livres, a leptina, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), todas elas secretadas pelo tecido adiposo, afetam a homeostase da glicose indiretamente. Acredita-se que outras moléculas derivadas do tecido adiposo também devem estar envolvidas e influenciando o metabolismo (Singla et al., 2010).

Além de seus efeitos sobre o metabolismo de glicose e insulina, a obesidade também está associada com o aumento da lipólise basal no tecido adiposo e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação (van Hall et al., 2003). A concentração de triglicerídeos plasmáticos é outra variável metabólica muito afetada na obesidade. A resistência tecidual à captação de glicose induzida por insulina acelera a taxa de produção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), triglicerídeos, e acaba levando à hipertrigliceridemia endógena (Reaven et al., 1967; Barter; Nestel 1973; Kissebah et al., 1976). Na obesidade existe uma redução da lipólise mediada pela enzima lípase-lipoprotéica nos quilomícrons e uma inibição inefetiva da lipólise mediada pela lipase hormônio-sensível no tecido adiposo (Lewis et al., 1993). A lipemia pós-prandial e os níveis de ácidos graxos elevados são anormalidades bem reconhecidas da obesidade. A disponibilidade excessiva de ácidos graxos no período pós-prandial imediato (quando normalmente seria suprimido pela insulina) parece influenciar a captação de glicose a uma taxa de aproximadamente 50% (Yu; Cooper 2001). A obesidade também parece comprometer a função da lipoproteína de baixa densidade (HDL) como molécula anti-aterogênica e facilitar a sua degradação (Wu et al., 2004). Portanto, a obesidade uma vez instalada, confere ao indivíduo um perfil metabólico altamente aterogênico, o qual está vinculado a uma maior prevalência de DCNT. No Brasil, as DCNT representam hoje a 1^o causa de óbito ajustado para a idade, onde o acidente vascular cerebral é principal causa de morte, seguido pelo infarto agudo do miocárdio (Malachias, 2010).

O estado nutricional e a dieta são importantes fatores relacionados com a promoção e a manutenção da boa saúde ao longo de todo o curso da vida. Seu papel como determinante no desenvolvimento de DCNT já está bem estabelecido e ocupa uma posição importante nas estratégias preventivas destas doenças (WHO, 2002). Seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos, no entanto, precisam ser mais estudados.

2.4 OBESIDADE – CONSEQUÊNCIAS REPRODUTIVAS

Além das causas etiológicas citadas anteriormente, o sobrepeso e a obesidade são atribuídos a mudanças sociais, que envolvem um estilo de vida mais sedentário, com um declínio nos níveis de atividade física e mudanças na densidade energética e na composição da dieta (Rich-Edwards et al., 2002; ESHRE, 2006). Como o processo reprodutivo envolve gasto energético, ele é sensível a mecanismos fisiológicos ligados àqueles envolvidos no controle do apetite e consumo alimentar (Wade; Jones 2004). A função reprodutiva, assim como o apetite, responde rapidamente a mudanças na oxidação metabólica de alimentos (Martin et al., 2004) e deve envolver mecanismos de controle tanto central, quanto periférico (ESHRE, 2006). A interação entre hormônios metabólicos e sinais provenientes de neurônios específicos no hipotálamo, impacta a quantidade e o tipo de substrato metabólico disponível para os órgãos periféricos, inclusive os ovários (Seli et al., 2014). Desta forma, parece existir uma complexa interação entre a glândula pituitária, o pâncreas e os ovários, e sua adequada interação, é fundamental para a saúde reprodutiva.

Em mulheres, a reprodução é um processo que requer um grande investimento metabólico, com necessidades energéticas aumentadas para o organismo durante toda a gestação e o período de amamentação e, como um mecanismo de proteção contra a subnutrição, o eixo reprodutivo tem uma ligação estreita com o estado nutricional (Seli et al., 2014). As mulheres necessitam de uma quantidade mínima de gordura para a eficiência reprodutiva; por outro lado, o excesso de gordura pode conduzir a anormalidades na fisiologia reprodutiva. O balanço energético, mais do que a perda ou o ganho absoluto de peso, parece ser um fator chave nesta relação (ESHRE, 2006).

Stein e Leventhal, já em 1934, foram os primeiros a reconhecer a relação entre a obesidade e distúrbios reprodutivos (ESHRE, 2006). Eles descreveram a hoje chamada síndrome “O”: supernutrição, superprodução de insulina, “confusão” ovariana e desregulação da ovulação. Atualmente sabe-se que o impacto da obesidade sobre o processo reprodutivo envolve, dentre outros aspectos, alterações menstruais, sub ou infertilidade, abortos, e maior risco de complicações gestacionais (Jungheim et al., 2013).

A obesidade é uma importante causa de sub-fertilidade em muitas sociedades modernas. Dentre os muitos processos de síntese que ocorrem no tecido adiposo, talvez um dos mais importantes com relação à reprodução, seja a modificação dos hormônios esteroides e a secreção de adipocinas (Ahima; Flier 2000a). O tecido adiposo contém um grande número de enzimas para a ativação, interconversão e inativação de hormônios esteroides, contribuindo

substancialmente para o metabolismo da quantidade total de esteroides corporais. Por exemplo, mais de 50% da testosterona circulante em mulheres pré-menopáusicas provém do tecido adiposo (Weisberg et al., 2003; Wellen; Hotamisligil 2003).

Ainda não está claro se é o tecido adiposo visceral, o subcutâneo ou ambos, que estão relacionados com as alterações reprodutivas. Sabe-se que a obesidade abdominal é particularmente preocupante, e está mais claramente associada a problemas de saúde e mortes prematuras do que a obesidade periférica (WHO, 1997). Mulheres com gordura central em excesso têm níveis alterados de hormônios sexuais, insulina e lipídios circulantes. Uma razão cintura-quadril (RCQ) elevada está associada a distúrbios hormonais, e algumas destas alterações parecem estar associadas a anormalidades menstruais, maior tempo para engravidar, e maior prevalência de infertilidade (Zaadstra et al., 1993; Norman et al., 1995; Hollmann et al., 1997). Por outro lado, sabe-se que muitas múltiparas são obesas e, de fato, muitas obesas estão aptas a gestar facilmente. Entretanto, a visão geral mostra que estar com excesso de peso está correlacionado com dificuldades de engravidar (Norman et al., 2004), e também interferem na resposta aos tratamentos de fertilidade (ESHRE, 2006). Os mecanismos pelos quais isto acontece ainda não estão claros, mas a associação entre resistência à insulina e anovulação pode contribuir para este entendimento (ESHRE, 2006).

Evidências recentes e consistentes mostram que a insulina exerce um papel na regulação do processo reprodutivo e pode representar a principal sinalização ligando o metabolismo e a reprodução (Sliwowska et al., 2014). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é a principal molécula envolvida no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em mamíferos, é sensível a sinais metabólicos e dependente do balanço energético normal (Hill et al., 2008).

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória (Hollmann et al., 1997), estão relacionadas a distúrbios no padrão de liberação dos pulsos e surtos de GnRH/LH (hormônio liberador de gonadotrofinas/hormônio luteinizante) (Hill et al., 2008). Apesar dos diferentes resultados encontrados, os estudos sugerem que a ação da insulina parece exercer um papel permissivo primário no controle dos pulsos de GnRH e este efeito parece ser devido a diferentes aspectos (amplitude vs. tempo) da geração do surto de GnRH/LH responsável pela ovulação (Sliwowska et al., 2014). Na presença da resistência insulínica este processo parece estar comprometido. As mulheres que apresentam $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ têm uma maior concentração de LH e hormônio folículo estimulante (FSH) durante o ciclo menstrual total quando comparadas às mais pesadas (Santoro et al., 2004). Outro estudo comparou 22 mulheres férteis com sobrepeso ou obesidade a 10 mulheres férteis de peso normal. Nas

mulheres com excesso de peso foram observadas menores concentrações de LH e FSH quando comparadas às mulheres de peso normal. Além disso, os níveis de LH e FSH mostraram uma correlação negativa com os valores de IMC e de circunferência da cintura (De Pergola et al., 2006). A amplitude dos pulsos de LH parece estar reduzida na obesidade resultando em uma estimulação lútea reduzida (Jain et al., 2007).

Em nível periférico, a insulina aumenta a esteroidogênese ovariana diretamente ou indiretamente por estimular a liberação de LH e por aumentar o número de receptores de LH no ovário (Adashi et al., 1981; Bergh et al., 1993). O excesso de tecido adiposo aumenta a aromatização periférica de androgênio e estrogênio. A insulina diminui a síntese hepática de SHBG (proteína ligadora de hormônios sexuais), aumentando os níveis de andrógenos livres. A diminuição do SHBG aumenta a biodisponibilidade de testosterona e estradiol. O *feedback* negativo central do excesso de estrogênio pode contribuir para a diminuição da sinalização hipofisária e hipotalâmica. A biodisponibilidade excessiva de estrogênio tem efeitos deletérios sobre oócitos, folículos e endométrio, e conseqüentemente, sobre a capacidade reprodutiva (Parihar, 2003; Ehrmann, 2004).

Irregularidades menstruais demonstraram estar associadas com IMC, circunferência da cintura e níveis de insulina elevados (Lambert-Messerlian et al., 2011). Santoro et al. (2004), demonstraram que mulheres com sobrepeso apresentaram ciclos menstruais mais longos e irregulares, sustentando a hipótese de que a obesidade tem efeitos negativos na função do corpo lúteo. De Pergola et al. (2009) encontraram uma relação significativa entre a circunferência da cintura aumentada e a ocorrência de oligomenorreia em mulheres com sobrepeso ou obesidade. Um estudo envolvendo mulheres que apresentavam gestações consecutivas observou que o IMC > 25 kg/m² foi correlacionado com um tempo prolongado para obter a concepção (Hassan et al., 2004). Outro estudo, concluiu que a fecundidade estava reduzida em mulheres com sobrepeso e obesidade quando comparadas às mulheres de peso normal (Gesink et al., 2007). Uma meta-análise recente demonstrou que entre as mulheres que engravidavam espontaneamente, existia um risco aumentado de aborto entre as mulheres obesas, quando comparadas as mulheres de peso normal (Boots; Stephenson 2011). Conseqüentemente, quando comparadas a mulheres com o IMC normal (18,5 – 24,9 kg/m²), mulheres com o IMC aumentado têm uma maior chance de desenvolver infertilidade (Linne, 2004; Catalano; Ehrenberg 2006; Stothard et al., 2009; Shirazian; Raghaven 2009; Metwally et al., 2010). Com o aumento global do sobrepeso e da obesidade, um número aumentado de mulheres com sobrepeso e obesidade tem buscado a fertilidade através de procedimentos de reprodução assistida. No entanto, existem evidências conflitantes no que diz respeito ao efeito

do IMC aumentado sobre desfechos de procedimentos de reprodução assistida. Apesar de alguns estudos não terem demonstrado efeitos adversos do IMC aumentado sobre desfechos de FIV, outros têm relacionado o IMC aumentado com um impacto negativo sobre os desfechos destes tratamentos. Tais desfechos negativos incluem a necessidade de maiores doses de gonadotrofinas, um menor número de oócitos coletados, uma maior taxa de cancelamento de ciclo, taxas reduzidas de gravidez e nascidos vivos, assim como maiores taxas de aborto (Wittemer et al., 2000; Jungheim et al., 2009; Jungheim; Moley 2010; Rittenberg et al., 2011a; Rittenberg et al. 2011b; Luke et al., 2011a; Jungheim et al., 2013).

Uma meta-análise recente demonstrou que mulheres com sobrepeso e obesidade (IMC > 25,0 kg/m²) têm desfechos mais pobres após seguirem tratamento de FIV quando comparadas àquelas mulheres com IMC normal. Este estudo foi capaz de demonstrar que o IMC aumentado está relacionado a uma redução significativa na taxa de nascidos vivos e a uma taxa aumentada de abortos após tratamento de FIV (Rittenberg et al., 2011a). Confirmando estes achados, outra meta-análise também demonstrou o impacto negativo do IMC aumentado sobre desfechos de FIV. Este estudo demonstrou que para cada unidade de aumento do IMC, a probabilidade de ocorrer o nascimento de um pré-termo de ≤ 32 semanas aumenta em 16% (McLernon et al., 2010).

Mulheres com sobrepeso e obesidade apresentam alterações metabólicas séricas, que levam a níveis séricos elevados de colesterol e ácidos graxos livres, além de modificação dos níveis de glicose e insulina circulantes (Lebovitz, 2006). Trabalhos envolvendo captação de oócitos em modelos animais demonstraram que as mudanças metabólicas séricas se refletem no líquido folicular (Leroy et al., 2004, 2005). O fluido folicular é um líquido que existe no ovário e exerce um papel importante no desenvolvimento do oócito, na fertilidade feminina e no desenvolvimento embrionário. Sabendo que ambos, o oócito e o embrião são vulneráveis a mudanças em seu micro-ambiente (Leroy et al., 2012), alguns trabalhos têm sido realizados afim de avaliar o micro-ambiente folicular de mulheres submetidas a procedimentos de reprodução assistida. Estes estudos demonstram que a alteração deste micro-ambiente pode impactar a qualidade do oócito e da célula do *cumulus*. O excesso calórico observado na obesidade impede, em grande parte, o processo reprodutivo em nível do complexo oócito-célula do *cumulus* e o desenvolvimento embrionário inicial, onde o excesso de metabólitos leva a anormalidades mitocondriais e defeitos na meiose, com conseqüente redução das taxas de implantação ou anormalidades de desenvolvimento subsequentes (Robker et al., 2009; Jungheim et al., 2013; Seli et al., 2014).

O líquido folicular de mulheres obesas tem níveis aumentados de insulina e lipídios, os quais estão associados a uma qualidade embrionária ruim (Robker et al., 2009). Os efeitos deste problema se manifestam como subinfertilidade quando se está tentando engravidar espontaneamente durante um ciclo ovulatório (Bolúmar et al., 2000); sucesso reduzido na concepção após procedimentos de FIV, com menor número de oócitos coletados (Esinler et al., 2008); maiores taxas de cancelamentos de ciclo (Luke et al., 2011a); taxas reduzidas de gestações clínicas e nascidos vivos (Luke et al., 2011b); e uma maior taxa de abortos em mulheres com sobrepeso e obesas (Metwally et al., 2008b; Boots; Stephenson 2011).

Um trabalho mais recente demonstrou que as mudanças nos parâmetros metabólicos circulantes avaliados no estudo como, por exemplo, a quantidade de apolipoproteína A e de proteínas totais, se refletem no líquido folicular, afetando potencialmente a qualidade do oócito. No entanto, este efeito foi independente do IMC (Valckx et al., 2012). Apesar de haver pouca informação a respeito deste aspecto na literatura, estes trabalhos apontam os primeiros indícios de que há uma relação entre o perfil metabólico sérico alterado e o comprometimento da saúde reprodutiva. Isto demonstra que não só o peso e a adiposidade corporal, mas também a qualidade da alimentação e da dieta parecem ser essenciais para a manutenção da fisiologia reprodutiva normal. A possibilidade de que dislipidemias, alterações nos níveis de glicose e insulina, ou até mesmo na quantidade de micronutrientes circulantes poderiam contribuir para a infertilidade feminina em seres humanos, sugere que, futuramente, focar o tratamento nutricional nestes aspectos poderia prover uma nova abordagem para complementar a terapêutica atual para infertilidade.

A Tabela 1 resume as principais alterações reprodutivas relacionadas à obesidade.

Tabela 1. Impacto da obesidade sobre o Processo Reprodutivo

Condição	Risco Associado
Menstruação	Risco de disfunção menstrual: amenorreia, oligomenorreia e menorragia;
Infertilidade	Risco de infertilidade ovulatória e anovulatória: anovulação, resposta fraca às medicações para fertilidade;
Aborto	Risco de aborto, espontaneamente ou após tratamento para infertilidade;
Glicose	Risco de tolerância diminuída à glicose e diabetes mellitus tipo 2;
Tratamento para Infertilidade	Necessidade de indução da ovulação com citrato de clomifeno/gonadotrofinas; taxas de sucesso gestacionais por FIV/ICSI;

Gestação	Prevalência de hipertensão induzida pela gravidez, diabetes gestacional, cesarianas e Síndrome de Down.
----------	---

Adaptado de Pasquali et al., 2003. FIV – fertilização in vitro; ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

2.5 OBESIDADE, INFERTILIDADE, ADIPOCINAS E ENTEROCINAS

O entendimento da endocrinologia da obesidade e suas comorbidades tem se expandido com a descoberta das adipocinas, secretadas pelo tecido adiposo, e das enterocinas, secretadas pelo intestino. Estas substâncias têm uma vasta gama de efeitos sobre os processos metabólicos, incluindo aqueles sobre o apetite, o metabolismo energético, a ação da insulina, o metabolismo de lipídios, a pressão arterial, a coagulação, e a reprodução (Gosman et al., 2006; Metwally et al., 2008a; Muccioli et al., 2011; Repaci et al., 2011; Tong; Xu 2012; Evans; Anderson 2012; Michalakis et al., 2013; Reverchon et al, 2014). Quase todas as adipocinas e enterocinas identificadas até o momento têm receptores no hipotálamo, demonstrando que este é um tecido alvo importante para esses hormônios. Além disto, os receptores para esses sinais são encontrados em uma variedade de tecidos, permitindo também efeitos em tecidos específicos. Dentre as adipocinas podemos destacar a leptina, e dentre as enterocinas, a grelina. Informações sobre o papel desses hormônios no tratamento da obesidade e sua relação com a infertilidade são escassas.

2.5.1 LEPTINA

Atualmente reconhece-se o tecido adiposo branco como um órgão multifuncional. Adicionalmente à sua ação na reserva de energia, o tecido adiposo branco é fonte de sinais endócrinos críticos para o controle do peso corporal e uma gama de outros diversos fatores hormonais, chamados de adipocinas, as quais são consideradas a ligação essencial na comunicação entre o sistema nervoso central e os tecidos periféricos (Kershaw; Flier 2004). Estas moléculas são citocinas produzidas principalmente pelos adipócitos ou pelas células do estroma adiposo. Variações nas quantidades de tecido adiposo branco modulam o nível de expressão e as quantidades séricas de adipocinas. À medida que a massa corporal aumenta, um estado de hipóxia relativa ocorre dentro dos adipócitos, gerando uma resposta inflamatória que resulta na liberação de adipocinas. A adipocina leptina, em conjunto com a enterocina

grelina, estão entre os fatores mais investigados que podem ter um impacto no processo reprodutivo de mulheres obesas (Metwally et al., 2008a).

A leptina (originada da palavra grega que significa “magro”) é um peptídeo não-glicosilado de 146 aminoácidos e 16 kDa (Ahima; Flier 2000b). A leptina é produzida, principalmente, no tecido adiposo branco e, além dos adipócitos, também é expressa, em menor quantidade, no hipotálamo, hipófise, epitélio gástrico, placenta, glândulas mamárias e gônadas (Budak et al., 2006). Uma de suas funções está relacionada ao controle da ingestão alimentar, atuando em células do núcleo arqueado do hipotálamo, no SNC. A leptina promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, e regula a função neuroendócrina e o metabolismo de glicose e lipídios (Friedman, 2002). Além de seu importante papel no metabolismo, a leptina também parece participar no controle dos sistemas hematopoiético (Umemoto et al., 1997), imune (Faggioni et al., 2001), reprodutor (Metwally et al., 2008a; Tong; Xu 2012; Evans; Anderson 2012; Michalakis et al., 2013; Reverchon et al., 2014), cardiovascular (Sader et al., 2003), no metabolismo ósseo (Thomas et al., 2002), entre outros.

A leptina tem uma extensiva interação com outros peptídeos relacionados ao controle do apetite no SNC. No núcleo arqueado os receptores de leptina (LepR) estão co-localizados com neurônios secretores de pró-opiomelanocortina (POMC), Neuropeptídeo Y / Proteína Relacionada ao Agouti (NPY/AgRP) e Kiss1, que secreta kisspeptina (Donato et al., 2011). Há duas populações distintas principais de células receptoras de leptina no núcleo arqueado; uma destas co-expressa NPY e AgRP, e a outra co-expressa POMC e CART (transcrição regulada por cocaína e anfetamina). Estes correspondem, aparentemente, aos dois principais caminhos para a regulação energética e outras funções pela leptina (Evans; Anderson 2012). A ação da leptina é feita a partir da ativação de receptores específicos presentes nos órgãos alvos (ObRb, de cadeia longa, com maior expressão no hipotálamo, e os receptores de cadeia curta ObRa, encontrados no pâncreas, e mais especificamente nas células α e δ das ilhotas de Langerhans (Sandoval; Davis 2003; Moreno-Aliaga et al., 2010).

Em humanos, a concentração plasmática de leptina está relacionada principalmente com massa total de tecido adiposo do organismo, sendo maiores em mulheres do que em homens (Kennedy et al., 1997). A maior deposição de gordura em mulheres poderia explicar parcialmente a diferença nos níveis de leptina entre os dois sexos (Ostlund et al., 1996). Assim como a leptina, os níveis de insulina são positivamente correlacionados com a adiposidade e o peso corporais (Woods; Seeley 2000). A chegada da insulina ao SNC reduz a ingestão alimentar e o peso corporal em camundongos (Brown et al., 2006) e em humanos

(Hallschmid et al., 2004). Tem sido proposto que a insulina modula a expressão de leptina (Malmstrom et al., 1996) e têm-se reportado que ela aumenta a síntese de leptina (Gettys et al., 1996; Leroy et al., 1996). Uma exposição prolongada ao jejum e a exercícios físicos intensos diminuem os níveis plasmáticos de leptina, ao passo que a alimentação excessiva aumenta sua concentração (Kolaczynski et al., 1996). Alguns trabalhos sugerem que a composição da dieta também pode influenciar os níveis de leptina (Jenkins et al., 1997; Mantzoros et al., 1998).

A hiperleptinemia, encontrada em pessoas obesas, é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina. Os mecanismos pelos quais o aumento de tecido adiposo é traduzido em aumento da concentração sérica de leptina, envolvem tanto o número de células adiposas quanto a indução do RNAm *ob*. Indivíduos obesos apresentam um aumento do número de células adiposas, o que significa uma maior quantidade de RNAm *ob* encontrada em seus adipócitos do que em sujeitos eutróficos (Maffei et al., 1995). Entretanto, a concentração sérica de leptina não é dependente somente do tamanho do tecido adiposo, uma vez que a redução de 10% do peso corporal provoca diminuição de cerca de 53% de leptina plasmática, sugerindo que outros fatores, além da adiposidade tecidual, estão envolvidos na regulação de sua produção (Sandoval; Davis 2003; Adami et al., 2002).

A grande maioria das pessoas obesas apresenta quadro de resistência à leptina, ou seja, apresentam grandes quantidades de leptina na circulação, mas seu efeito de saciedade e inibição do apetite não ocorre. Dessa forma, a eficácia da administração de leptina a esses indivíduos permanece duvidosa e sua eficácia ainda não foi comprovada. Estudos são necessários para identificar quais os possíveis defeitos nos receptores e mecanismos pós-receptores de ação da leptina no hipotálamo, que poderiam ser responsáveis pela resistência à leptina, encontrada em humanos obesos (Bray, 1997, Steinberg et al., 2004).

2.5.1.1 LEPTINA E FERTILIDADE

Está bem estabelecido que o excesso ou a deficiência de tecido adiposo branco afeta a puberdade, a maturação sexual, e a fertilidade em diferentes espécies (Mircea et al., 2007). A obesidade e o excesso de peso estão significativamente envolvidos na redução da fertilidade natural em mamíferos. Novos papéis para as adipocinas têm emergido recentemente no campo da fertilidade e reprodução (Budak et al., 2006).

Uma associação estreita é inferida entre leptina e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Sugere-se que a leptina poderia ser o gatilho, representando o principal sinal chave na modulação da relação entre as reservas energéticas e a função reprodutiva (Gonzalez et al., 1999). Acredita-se que a leptina tenha o papel de informar ao cérebro que as reservas energéticas na forma de gordura são suficientes para manter a reprodução (Cunningham et al., 1999). Os efeitos reprodutivos da leptina são diversos, e os órgãos alvo variam desde o hipotálamo até o ovário e o endométrio (Metwally et al., 2008a).

O modelo dos camundongos ob/ob ajudou a revelar muitas das ações da leptina no sistema reprodutor. Estes camundongos *knock-out* para leptina (ob/ob) ou para o receptor de leptina (LepR, db/db) apresentam secreção de GnRH prejudicada, baixos níveis de gonadotrofinas, desenvolvimento incompleto dos órgãos reprodutores e da maturação sexual. A obesidade observada em animais com falta de leptina ou com a falta do receptor de leptina LepR também está acompanhada de infertilidade (Zhang et al., 1994; Tartaglia et al., 1995). Ambos, ratos machos ou fêmeas, com deficiência de leptina são estéreis, e isto pode ser corrigido pela reposição de leptina (Barash et al., 1996; Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997). Humanos com deficiência de leptina desenvolvem fenótipos reprodutivos semelhantes aos observados em camundongos ob/ob (Montague et al., 1997). Nestes pacientes a reposição de leptina induz o aumento dos níveis de gonadotrofinas e esteroides sexuais, assim como o aumento das gônadas e o desenvolvimento puberal normal (Farooqi et al., 1999; Farooqi et al., 2002). Claramente, a leptina atua como uma molécula circulante chave que reflete as reservas energéticas internas e, desta forma, produz um sinal permissivo para as funções reprodutivas normais (Tong; Xu 2012).

O efeito da leptina a nível central no eixo hipotálamo-hipófise é estimulatório (Moschos et al., 2002). Os níveis de leptina parecem apresentar uma variação circadiana e estas variações têm sido associadas às variações minuto-à-minuto do LH. A leptina pode, portanto, ser responsável por informar ao cérebro a quantidade crítica de reservas de gordura necessária para a secreção do hormônio liberador de LH, do próprio LH, e para a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Mantzoros, 2000).

O uso de soro antileptina injetado no ventrículo cerebral de ratos levou a uma diminuição dos pulsos de LH (Carro et al., 1997). A leptina está relacionada não só com a manutenção da pulsatilidade do LH (Licinio et al., 1998; Fenichel et al., 2008), mas também com o surto pré-ovulatório que leva à ovulação (Quennell et al., 2009). Dentro do ciclo diário existe uma relação estreita entre a taxa de metabolismo e a pulsatilidade de LH. Este padrão parece ser resultado da mudança na disponibilidade de combustíveis metabólicos (Fenichel et

al., 2008) pois a resposta do eixo reprodutivo à mudanças no estado nutricional parece ser rápida (Sullivan et al., 2003). Por exemplo, o jejum acompanhado da queda nos níveis de leptina está associado à redução da atividade secretória do LH em várias espécies (Cunningham et al., 1999). Um estudo demonstrou que a cepa transgênica de camundongos que expressa leptina exageradamente tem a sua puberdade acelerada (Yura et al., 2000). Os autores notaram, porém, o aparecimento de hipogonadismo hipogonadotrófico de início tardio nestes mesmos animais. Tal estudo confirma a importância da leptina na reprodução, mas aponta para os possíveis efeitos deletérios da hiperleptinemia à longo prazo sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Em nível periférico os receptores de leptina são encontrados nas células da granulosa e da teca, nos oócitos, nos embriões pré-implantados e no endométrio de humanos (Cervero et al., 2005). O mRNA da leptina e a leptina *per se* são expressos na teca, na célula da granulosa, trompas de falópio e endométrio (Cioffi et al., 1997; Cervero et al., 2005; Craig et al., 2005). A leptina tem mostrado influenciar os efeitos das gonadotrofinas, da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), sobre a esteroidogênese ocorrida em células ovarianas humanas isoladas (Agarwal et al., 1999). A leptina correlaciona-se com os níveis de progesterona ao longo de todo o ciclo menstrual (Hardie et al., 1997), e os receptores de leptina nos oócitos devem influenciar o desenvolvimento e a maturação oocitária (Craig et al., 2005). No ovário acredita-se que a leptina possa afetar o ciclo menstrual através de um efeito inibitório direto no desenvolvimento dos folículos (Moschos et al., 2002). Este efeito é sustentado por haver receptores de leptina nas células foliculares. Estes receptores parecem mediar a redução da esteroidogênese induzida por leptina *in vitro* em ambos, célula da granulosa e da teca, em estudos com animais (Moschos et al., 2002; Metwally et al., 2008a). Os níveis séricos de leptina variam ao longo do curso do ciclo menstrual, aumentando durante a fase folicular tardia e a fase lútea. A razão para este aumento não está clara, mas isto pode ser o resultado de um aumento na produção de leptina pelos adipócitos em resposta a uma ingestão calórica aumentada, pela liberação hipotalâmica de neuropeptídeo Y, ou pela liberação de leptina do folículo maduro (Riad-Gabriel et al., 1998).

Após a puberdade, a quantidade de leptina que chega ao cérebro é maior em mulheres do que em homens, como um resultado da maior concentração de leptina no líquido cerebrospinal de mulheres (Schwartz et al., 1996). Isto sugere que mulheres podem ser mais resistentes à ação da leptina e, portanto, necessitam de níveis maiores para atingir uma resposta adequada (Schwartz et al., 1996). Adicionalmente, o excesso de leptina, característico da obesidade, tem importantes efeitos reprodutivos. O excesso de leptina tem

mostrado ser detrimental à reprodução em múltiplos níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Ambos, os ovários e os testículos, expressam número adequado de receptores de leptina. No entanto, se as concentrações de leptina no sangue excedem certo nível, a esteroidogênese dos hormônios sexuais é reduzida por supressão direta das gônadas (Baldelli et al., 2002). Existem múltiplos outros mecanismos propostos para a falência reprodutiva em consequência dos níveis alterados de leptina, incluindo, além da secreção anormal de gonadotrofinas, o impedimento da foliculogênese, a apoptose da célula da granulosa e a implantação defeituosa (Malik et al., 2001; Hamm et al., 2004).

Em mulheres obesas, a exposição dos ovários a concentrações mais elevadas de leptina inibem a produção de estradiol pelas células da granulosa, como uma resposta ao FSH e ao IGF-1. Além disto, a produção de androstenediona pelas células internas da teca, como um resultado da estimulação do LH e do IGF-1, também está inibida. Isto resulta em um déficit de maturação do folículo, causando ciclos anovulatórios (Michalakis et al. 2013).

A hiperleptinemia reduz o desenvolvimento de oócitos desnudados a metáfase II em culturas de folículos de ratos *in vitro* (Swain et al., 2004). Entretanto, embriões expostos à leptina não alteraram o desenvolvimento ou a incubação do blastócito (Swain et al., 2004). Os dados em animais e humanos não são inteiramente consistentes a respeito dos efeitos da leptina sobre a esteroidogênese ovariana/folicular, meiose do oócito ou desenvolvimento embrionário. Entretanto, estes dados demonstram que o excesso de leptina, característica da obesidade, ou a administração exógena de leptina para perda de peso tem impacto em uma variedade de tecidos reprodutivos.

Além destes aspectos, a influência da leptina sobre o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária também pode ter importantes implicações para a indução oocitária em procedimentos de reprodução assistida (Brannian; Hansen 2002; Spicer, 2001). Os níveis de leptina têm mostrado ser significativamente mais elevados durante protocolos de hiperestimulação ovariana controlada (Lindheim et al., 2000), conseqüentemente, níveis mais elevados de leptina em pacientes obesas que são submetidas a ciclos de fertilização *in vitro* podem inibir a resposta ovariana ao estímulo das gonadotrofinas e, desta forma, explicar porque pacientes obesas apresentam respostas precárias durante hiperestimulações ovarianas (Karlsson et al., 1997; Spicer, 2001).

A leptina também parece exercer um papel importante no desenvolvimento e clivagem primária do embrião (Brannian; Hansen 2002), na regulação do crescimento e desenvolvimento fetal, na hematopoiese embrionária, e na angiogênese fetal e placentária

(Metwally et al., 2008a). Outros estudos têm sugerido um efeito negativo da obesidade sobre a qualidade do oócito e do embrião (Wittermer et al., 2000; Metwally et al., 2007). É possível que a obesidade tenha um efeito adverso em ambos, sobre o endométrio e sobre o oócito ou o embrião. Entretanto, este efeito precisa ser melhor investigado (Metwally et al., 2008a). Por fim, outros trabalhos sugerem que a leptina deve exercer um papel importante em outros órgãos-alvo reprodutivos, como o endométrio e as glândulas mamárias, e também influenciar importantes funções como a lactação e a prevenção de abortos (Moschos et al., 2002; Henson; Castracane 2000).

2.5.2 GRELINA

A grelina é um hormônio que foi identificado em ratos por Kojima et al., em 1999. Origina-se da palavra Ghre, que significa *growth hormone release*, e revela sua primeira função identificada, que consiste na sua ligação ao Receptor do Hormônio de Crescimento (GHS-R1), estimulando sua liberação. Os receptores GHS-R1 estão particularmente concentrados no SNC, mas estão presentes também em outras áreas como em tecidos periféricos, endócrinos e não endócrinos (Kojima et al., 2001; Muccioli et al., 2002; Gnanapavan et al., 2002). Assim, a grelina apresenta efeitos que incluem: 1) regulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, e do eixo gonadal; 2) atividade orexígena acoplada ao controle do gasto energético; 3) controle da motilidade gástrica e secreção de ácido; 4) controle da função pancreática exócrina e endócrina (Muccioli et al., 2002; Yoshihara et al., 2002), entre outras. Apesar de a grelina poder exercer várias ações biológicas, seu papel na regulação da homeostase energética é geralmente visto como sua função mais importante (Cummings, 2006).

A grelina é um peptídeo composto por 28 aminoácidos e encontrada sob duas isoformas, a forma acilada e a não-acilada. A acilação sofrida pela molécula é exclusiva da grelina e é necessária para o peptídeo atravessar a barreira hemato-encefálica e essencial para ligar-se a seu receptor clássico, o GHS-R1. Conseqüentemente, muitas das ações biológicas da grelina, especialmente aquelas envolvendo efeitos endócrinos e anabólicos, requerem a acilação da grelina (van der Lely et al., 2004). O estômago é o principal sítio de síntese de grelina. Este peptídeo também é encontrado em outras porções do trato gastrointestinal, incluindo o duodeno, o íleo e o cólon (Sato et al., 2005; Volante et al., 2002; Iglesia et al., 2004), com a concentração diminuindo em direção ao cólon. Uma quantidade menor de grelina é produzida em outros diversos tecidos como os pulmões, as ilhotas pancreáticas,

gônadas, córtex adrenal, placenta, rins e outros (Mota; Zanesco 2007; Kojima et al., 1999; van Der Lely et al., 2004).

O SNC recebe os sinais relacionados à saciedade proveniente do trato gastrintestinal via aferentes vagais e humoralmente através de peptídeos derivados do trato gastrintestinal. A grelina acilada atravessa a barreira hemato-encefálica e estimula a ingestão de alimentos atuando nestes sítios do sistema nervoso central (Karhunen et al., 2008). O efeito da grelina na ingestão de alimentos é independente da secreção de GH e parece ser mediado via AgRP, pelo caminho dos receptores de melanocortina e pela ativação do caminho dos receptores de NPY no hipotálamo (Muccioli et al., 2002; Shintani et al., 2001; Monteleone et al., 2003).

A grelina estimula a ingestão alimentar de curto prazo mais do que qualquer outra molécula exceto o NPY, ao qual ela é aproximadamente equípote (Asakawa et al., 2001; Wren et al., 2001) e é a única que tem a habilidade de estender seu efeito se injetada tanto central como periféricamente. É também a única substância dos mamíferos que tem mostrado aumentar o apetite e a ingestão alimentar quando liberada, em humanos (Wren et al., 2001; Neary et al., 2004). Além disto, os níveis de grelina em humanos são rapidamente suprimidos pela ingestão de nutrientes (Tschop et al., 2001a), e perfis plasmáticos de 24 horas revelam um marcante aumento pré-prandial e diminuição pós-prandial de grelina a cada refeição (Cummings; Purnell 2001; Cummings et al., 2002; Weigle et al., 2003). Sua administração crônica aumenta de forma duradoura o peso corporal, como resultado de seu efeito anabólico na ingestão de alimentos, gasto energético e utilização de combustíveis (Tschop et al., 2001b; Asakawa et al., 2001; Wren et al., 2001). Tem sido estabelecido que os níveis circulantes de grelina estão associados ao estado nutricional e deve servir como um indicador de balanço energético de curto prazo (Shintani et al., 2001; Tschop et al., 2001b).

As concentrações de grelina variam no organismo de acordo com o estado nutricional. Seus níveis estão reduzidos em indivíduos obesos, elevados em indivíduos magros e muito elevados em pacientes com caquexia, refletindo as diferentes necessidades de consumo alimentar (Gibson et al., 2010; Otto et al., 2001). Tem sido sugerido que os baixos níveis de grelina em obesos devem refletir uma adaptação compensatória visando a redução da ingestão alimentar (Tschop et al., 2001a). Portanto, a resistência à grelina não existe claramente em indivíduos obesos (Druce et al., 2005), assim como ocorre com a leptina. No entanto, a queda pós-prandial nos níveis de grelina está reduzida em pacientes obesos (English et al., 2002), comprometendo potencialmente o término da refeição e, conseqüentemente, a redução do consumo alimentar (Cummings et al., 2002).

Adicionalmente, trabalhos mostram que os níveis de grelina flutuam não apenas em resposta ao estado nutricional, jejum e à alimentação, mas também sensivelmente à composição da dieta (Erdmann et al., 2004; Al Awar et al., 2005; Tannous dit El Khoury et al., 2006). Mudanças pós-prandiais na grelina plasmática parecem ser dependentes da composição de macronutrientes da refeição (Erdmann et al., 2004; Al Awar et al., 2005). Acredita-se que a ingestão de energia suprima a grelina, em ratos e seres humanos, em uma ordem de eficácia de: carboidratos > proteínas > lipídios (Cummings, 2005). Além disto, quando o aporte calórico das refeições é variado, mas o volume, a distribuição de macronutrientes, e todos os outros componentes são mantidos constantes, a intensidade e a duração da supressão da grelina prandial é dose-dependente relacionada com o aporte de calorias ingeridas (Le Roux et al., 2005).

Tem sido sugerido que em termos de resposta metabólica à ingestão de alimentos, as mudanças nos níveis de glicose e insulina seriam o principal mecanismo determinante da supressão de grelina. A ingestão de açúcar suprime a secreção de grelina (Tschop et al., 2000) o que indica o efeito inibitório direto da glicose sobre a grelina. A observação de que a insulina e a grelina tem perfis de secreção de 24 horas inversos, e que as duas estão envolvidas na resposta fisiológica à ingestão de alimentos, tem levado à hipótese de que a insulina regula a secreção de grelina e vice-versa (Cummings, 2005). Existe uma associação negativa entre a secreção de grelina e insulina (Cummings; Purnell 2001; Tschop et al., 2001b) que deve refletir a influência inibitória da insulina sobre a secreção e a síntese de grelina (Saad et al., 2002).

Embora a insulina e a glicose sanguínea tenham um papel relevante no controle da secreção de grelina, outros mediadores fisiológicos parecem estar envolvidos. (Cummings; Schwartz 2003; Gelling et al., 2004). A verdadeira causa da supressão de grelina induzida pela refeição ainda é incerta, não se sabe se é a resposta metabólica, fatores mecânicos, a presença de nutrientes no intestino, o estímulo do sabor induzido pelo alimento ou a liberação de hormônios entéricos (Overduin et al., 2005). Portanto, até o momento, não é possível determinar o mecanismo preciso responsável pelas diferentes ações supressivas da dieta sobre a grelina circulante.

2.5.2.1 GRELINA E FERTILIDADE

O efeito da grelina como sinalizador periférico de reserva energética e o efeito reprodutivo comprovado de outros reguladores do balanço energético como a leptina,

demonstram ser possível que a grelina possa contribuir para o controle funcional do eixo reprodutivo e sua integração com o balanço energético (Barreiro; Tena-Sempere 2004).

Uma grande quantidade de evidências indica que a grelina participa da regulação da fisiologia reprodutiva com efeitos sistemáticos em diversos níveis do sistema reprodutivo, e também com ação direta em nível de gônadas onde a expressão de grelina e a expressão do receptor GHS-R1 de grelina têm sido reportados (Tanaka et al., 2003; Tena-Sempere et al., 2002, 2008; Barreiro; Tena-Sempere 2004; Tena-Sempere, 2005).

Têm sido demonstradas ações diretas da grelina no eixo hipotálamo-hipófise. A administração central de grelina suprimiu a secreção pulsátil de LH em ratas ovariectomizadas (Furuta et al., 2001). Um trabalho de Fernandez-Fernandez et al. (2006), demonstrou que a grelina inibiu a secreção de LH in vivo em diferentes estágios do ciclo menstrual de ratas, e em ratas ovariectomizadas. Adicionalmente, a grelina reduz a liberação hipotalâmica de GnRH e a resposta de LH ao GnRH in vitro (Fernandez-Fernandez et al., 2006; Furuta et al., 2001; Iqbal et al., 2006). Em contraste, outros estudos têm mostrado que a grelina estimula de uma maneira dose-dependente a secreção basal de LH e FSH pela hipófise (Fernandez-Fernandez et al., 2006).

Em humanos, os efeitos específicos da administração de grelina sobre a secreção de LH ainda não foram muito estudados. Kluge et al. (2007), demonstraram que a grelina é capaz de causar atraso e supressão da amplitude dos pulsos de LH em humanos. Também em humanos, a grelina inibe significativamente o FSH (Kluge et al., 2009), mas assim como os achados em ratos, a supressão de LH parece ser mais forte que a de FSH (Kluge et al., 2007). Outros trabalhos com análises mais detalhadas da pulsatilidade de LH após administração de grelina poderão ajudar a revelar o efeito da grelina sobre o controle da secreção de gonadotrofinas em humanos.

Em nível periférico, evidências recentes indicam fortemente que a grelina e os receptores de grelina (GHS-R1a e GHS-R1b) estão presentes no ovário de mamíferos e não mamíferos (Camino et al., 2003; Gaytan et al., 2003; Miller et al., 2005; Sirotkin et al., 2006; Zhang et al., 2008). Dados mostraram informações conclusivas sobre a expressão da grelina (do RNAm e níveis do peptídeo) em ovários de ratos adultos. Para confirmar a regulação fisiológica da expressão do gene da grelina no ovário foi conduzida uma avaliação dos níveis de mRNA nos diferentes estágios do ciclo menstrual de ratas (Camino et al., 2003). Foi descoberto que, embora fosse encontrada a expressão em todos os estágios testados, os níveis de mRNA variavam significativamente dependendo da fase do ciclo, com o menor valor visto na fase proestrus e o máximo durante a fase diestrus (1º dia). Paralelamente, um perfil cíclico

parecido da expressão da grelina foi encontrado, com valores de pico durante a fase lútea. Estes valores sugerem uma expressão predominante de grelina na formação do corpo lúteo (CL), principalmente quando este entra na sua fase funcional, e os valores começam a decrescer à medida que ocorre regressão ou nova formação do mesmo. Estes valores foram obtidos e confirmados por análises imunohistoquímicas realizadas no citoplasma de células na fase lútea (Caminos et al., 2003). O padrão de crescimento ascendente mostrado pela grelina na fase lútea também foi verificado para a progesterona. O perfil da expressão de grelina no CL coincide com o pico de sua atividade funcional e é paralelo ao padrão de secreção de progesterona (Caminos et al., 2003).

No ovário humano, as células intersticiais do hilo e o corpo lúteo jovem e maduro são imunoreagentes para grelina (Gaytan et al., 2003). A presença do GHS-R1a nos folículos ovarianos e no corpo lúteo sugere um papel regulatório potencial da grelina produzida localmente e sistematicamente no controle direto do desenvolvimento folicular e no funcionamento das células ovarianas. De fato, em cultura de células lúteas da granulosa humana, a grelina exerce um efeito inibitório sobre a esteroidogênese - produção de progesterona e estradiol - atuando através do seu receptor funcional GHS-R1a (Viani et al., 2008; Tropea et al., 2007). A expressão do receptor GHS-R1a mostrou um padrão mais amplo de distribuição nos tecidos, com sinais específicos no ovário, células foliculares somáticas, células intersticiais do hilo e célula lútea em seus diversos estágios de desenvolvimento (Gaytan et al., 2003). Apesar dos dados obtidos, a maneira como a grelina se envolve em processos tais como esteroidogênese, angiogênese, remodelação dos tecidos e crescimento do corpo lúteo ainda não estão bem estabelecidos.

Além de todos estes achados, demonstrou-se que a grelina também atua como um mensageiro químico que realiza a mediação da comunicação intracelular. Desta forma, a grelina pode estar envolvida no processo de transdução de sinal. O mRNA de ambos, da grelina e de seu receptor, têm sido detectados na mórula e em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário (Kawamura et al., 2003). Os dados sugerem que níveis elevados de grelina podem impedir o desenvolvimento de embriões pré-implantados de camundongos (Muccioli et al., 2011). Adicionalmente, a implantação do embrião é um mecanismo regulado rigidamente e se inicia com mudanças no ambiente uterino, como no endométrio, para promover uma ótima relação feto-mãe. Enquanto o mRNA do GHS-R1a é detectado no endométrio ao longo de todo o ciclo menstrual normal, a expressão de grelina é observada apenas na fase secretória do endométrio, principalmente nas células epiteliais luminiais e glandulares (Tanaka et al., 2003). Estes dados apontam para uma possível função

da grelina como um regulador da receptividade endometrial humana. Por fim, também foi observado que o tratamento com níveis elevados de grelina durante a primeira metade da gestação em ratos, reduz o tamanho da ninhada (Barreiro; Tena-Sempere 2004; Fernandez-Fernandez et al., 2005), sugerindo que a grelina também possa ter relação com o desenvolvimento fetal.

O efeito orexígeno líquido da grelina resulta funcionalmente em oposição àqueles produzidos pela leptina (Wynne et al., 2005), e muitos dados suportam a noção de que ambos os hormônios atuam de maneira complementar, informando o SNC sobre as reservas do organismo para a manutenção da homeostase energética (Muccioli et al., 2011). O mesmo pode ser verdadeiro para o controle da função reprodutiva. Então, levando em conta o fato de o eixo reprodutivo ser altamente dependente do estado energético do corpo, a grelina e a leptina, agindo tanto central quanto periféricamente, podem representar um dos mecanismos de sinalização ligando o balanço nutricional e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

2.6 DIETA E FERTILIDADE: A INFLUÊNCIA DO ÍNDICE E CARGA GLICÊMICA

Quando a fertilidade é um problema associado à obesidade, a primeira meta de tratamento é normalizar os níveis séricos de androgênios e restaurar a função reprodutiva, pela normalização da resistência à insulina que pode ser obtida pela perda de peso e gordura abdominal. A primeira linha de tratamento de mulheres obesas inférteis com ou sem a síndrome dos ovários policísticos (PCOS) é, portanto, a mudança no estilo de vida – MEV (Pasquali et al., 2003). As MEVs melhoram a fertilidade por que: diminuem o tecido adiposo (melhorando a sensibilidade à insulina, aumentando os níveis de SHBG, aumentando os ciclos ovulatórios, melhorando a farmacodinâmica das medicações e melhorando a função hipotalâmica); melhoram a função metabólica do tecido adiposo restante; reduzem a inflamação (Huber-Buchholz et al., 1999; Robker et al., 2011; Gleeson et al., 2011; Thompson et al., 2012). Uma pequena redução de 5 a 10% no IMC de mulheres obesas inférteis resulta em melhora nos desfechos de todas as formas de tratamento para fertilidade (Clarck et al., 1998). As mulheres obesas devem ser encorajadas a perder peso por três razões: 1) há uma chance significativa de recuperar a fertilidade natural; 2) há maior chance de sucesso nos procedimentos de reprodução assistida; e 3) a morbidade e a mortalidade materna se reduzirão (Wilkes; Murdoch 2009).

A quase totalidade dos estudos relacionando MEVs e desfechos reprodutivos envolvem pacientes com PCOS e demonstram que as MEVs (intervenção de dieta e/ou

aumento de atividade física), permanecem, de fato, sendo a estratégia ótima de tratamento para estas mulheres PCOS obesas ou com sobrepeso. Estudos demonstram que uma perda de peso relativamente pequena (entre 5 a 10%), obtida através de restrição calórica em longo prazo (5 a 6 meses), podem melhorar a resistência à insulina, o hiperandrogenismo, os níveis de IGF e SHBG, a função menstrual e a fertilidade (Moran et al., 2011a; Parihar, 2003).

Apesar de existir uma explicação biológica plausível para a MEV melhorar a fertilidade, existem poucos estudos randomizados bem controlados que avaliaram o efeito das MEVs especificamente sobre a fertilidade. Em uma revisão McLean e Wellons (2012), descreveram que muitos dos estudos realizados para avaliar a função reprodutiva são estudos de coorte pequenos ou protocolos observacionais sem grupo placebo, com altas taxas de desistência e marcadores de fertilidade de “segunda linha”.

Os estudos avaliando a perda de peso em pacientes obesas com PCOS incluem de 6 a 143 pacientes, e duração de 1 semana até 15 meses. Estes estudos avaliaram diferentes dietas e reportaram perdas de peso variáveis desde <5 até >15% do peso corporal inicial (Moran et al., 2009). A maioria dos estudos avaliou dietas de muito baixa caloria (VLED) ou dietas provendo de 1000 a 1500 kcal/dia (Moran et al., 2009). Além da perda de peso os estudos também relatam efeitos como: redução da gordura visceral, do hiperandrogenismo, da resistência à insulina; aumento do SHBG; melhora na regularidade dos ciclos menstruais; e aumento nas taxas de ovulação e gestação (Clark et al., 1998; Huber-Buchholz et al., 1999; Moran et al., 2009; Tolino et al., 2005; Holte et al., 1995; Bützow et al., 2000).

Clark et al. (1995) completaram um estudo de cohort com 13 obesas resistentes ao citrato de clomifeno e com história de pelo menos 2 anos de infertilidade. Todas as pacientes atrasaram seus tratamentos convencionais para participar de um programa de 6 meses de dieta e exercícios. Após 4 meses, as pacientes apresentaram uma perda de peso média de 4,3 kg e 92% do grupo obteve ovulação neste período. Kiddy et al. (1992) demonstraram melhora da fertilidade após perda de peso modesta. Eles avaliaram 24 pacientes obesas com PCOS e as submetem a uma dieta de 1000 kcal, baixa em gorduras, por um período de 6 a 7 meses. Cinco das 11 mulheres que tinham disfunção ovulatória no início do estudo engravidaram após perder 5% de seu peso corporal total. Da mesma forma, Crosignani et al. (2003), encontraram melhoras nas taxas de gestação em um grupo de mulheres obesas, anovulatórias, com perda de peso de apenas 5% de seu peso corporal total. Galletly et al. (1996a) também encontrou melhoras similares nas taxas de gestação durante tratamentos de fertilidade após MEV em mulheres que tiveram uma perda de peso modesta (cerca de 6kg). Parihar et al. (2003) observou que mulheres em um programa de perda de peso apresentaram o retorno da

fertilidade e da responsividade ao citrato de clomifeno associado à melhora na resistência insulínica e à redução na adiposidade central.

Os estudos demonstram que o fator determinante mais importante em uma intervenção dietética para perda de peso em mulheres obesas com PCOS parece ser o balanço energético (Moran et al., 2013). Mas, de uma forma geral, a restrição calórica, com ou sem perda de peso, parece melhorar a resistência à insulina e reduzir os androgênios circulantes em pacientes PCOS com sobrepeso/obesas e deve ser recomendada para estas pacientes, associada a uma ingestão alimentar adequada, com escolha de alimentos saudáveis, independente da composição da dieta (Moran et al., 2013). A perda de peso substancial, apesar de desejável, não é essencial para o sucesso da restauração da função reprodutiva nestas pacientes, pois a redução da resistência a insulina parece estar correlacionada de uma forma mais próxima com a restauração do sucesso dos desfechos reprodutivos (Parihar, 2003). As dietas que provêm de 1200 a 1500 kcal/dia parecem ser igualmente benéficas quando comparadas à dietas mais restritivas, e apresentam melhores taxas de adesão (Moran et al., 2009). Apesar de a literatura sustentar a restrição energética como um método para melhorar o metabolismo e a fertilidade, ainda não existem informações acerca da quantidade ótima das calorias a serem restringidas e fertilidade (ACOG, 2005). No entanto, uma dieta hipocalórica (com redução de 500 a 1000 kcal/dia) costuma ser a recomendação para pacientes PCOS com sobrepeso e obesidade (ESHRE/ASRM, 2008; Moran et al., 2009; Panidis et al., 2013).

Aproximadamente 15% das mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida estão obesas ou com sobrepeso (Lintsen et al., 2005). A taxa de gestação para a população fértil normal é de aproximadamente 20 a 30% por ciclo de tentativa (Taylor, 2003; Wilcox et al., 1995), com uma taxa cumulativa de sucesso de 84% em um ano (NICE, 2008). Taxas de sucesso semelhantes também são observadas em resposta a procedimentos de reprodução assistida - RA (Rowell; Braude 2003), porém o excesso de peso das pacientes pode comprometer estes valores.

O acesso a procedimentos de RA em alguns países é restrito e como a perda de peso em mulheres com sobrepeso/obesas tem demonstrado aumentar as taxas de gestação natural e melhorar o curso da gestação (Hollmann et al., 1996), as mulheres que apresentam um IMC acima do limite vêm sendo aconselhadas a perderem peso antes de se submetem a procedimentos de RA. No entanto, as evidências são limitadas quanto à segurança e a efetividade dessa recomendação (Sim et al., 2014a).

Uma revisão sistemática recente (Sim et al., 2014a) identificou sete estudos que investigaram o efeito de uma intervenção dietética em mulheres obesas ou com sobrepeso antes do tratamento com técnicas de RA (Sim et al., 2014b; Moran et al., 2011b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996b; van Veen et al., 2011; Awartani et al., 2012). Quatro destes sete estudos reportaram uma melhora significativa nas taxas de gestação e/ou nascidos vivos quando comparados aos grupos controle (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996b). Dos estudos restantes, dois reportaram uma tendência não significativa de aumento nas taxas de gestação (Moran et al., 2011b; Awartani et al., 2012) e um estudo reportou uma pequena redução nestes valores (van Veen et al., 2011). Benefícios clínicos adicionais reportados em consequência da perda de peso pela dieta ou por MEVs incluem a regularização do padrão menstrual (Clark et al., 1995; Clark et al., 1998), a redução do número de ciclos de RA necessários para conseguir a gestação (Sim et al., 2014b; Awartani et al., 2012) e uma redução nas taxas de cancelamento de ciclos (Awartani et al., 2012). Também houve um aumento no número de gestações naturais naquelas participantes que comparativamente perderam mais peso (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996b), com exceção de um estudo (van Veen et al., 2011).

Um ensaio clínico randomizado (Sim et al., 2014b), realizou um protocolo de dieta VLED por 6 semanas, seguida por uma dieta hipocalórica como parte de uma intervenção multidisciplinar em mulheres obesas. A taxa de gestação no grupo intervenção foi significativamente maior que no grupo de comparação (e incluiu gestações naturais), entretanto as respostas não foram tão boas quando comparadas às MEVs que não incluem VLED. Outro estudo usando VLED (Tsagareli et al., 2006) envolveu 10 mulheres obesas ou com sobrepeso, das quais, 4 desistiram de seguir no estudo. As demais seguiram uma intervenção de VLED parcial seguida por uma VLED completa, ou somente uma VLED completa por 27-41 dias imediatamente antes da coleta de seus oócitos e subsequente procedimento de FIV. Este estudo reportou um desfecho de fertilidade pouco promissor; apesar de as mulheres terem atingido uma perda de peso de 5,6 kg em média, nenhuma das 6 participantes do estudo engravidou e metade das participantes não conseguiu nem ao menos uma simples fertilização.

Apesar de a qualidade geral dos estudos disponíveis ser fraca, essa revisão sistemática mostra que a perda de peso obtida através de dieta ou MEVs com ou sem suporte comportamental (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996b) relaciona-se com um aumento significativo nas taxas de gestação e/ou nascidos vivos em mulheres obesas ou com sobrepeso submetidas a procedimentos de RA. O estudo que

envolveu o uso de VLED completa ou VLED parcial seguida por VLDE completa, sugeriu um desfecho detrimental para a fertilidade em comparação com as taxas de gestação e fertilização usuais em resposta a procedimentos de RA. Uma hipótese seria a de que o perfil hormonal e metabólico da adesão a VLED, que envolve uma cetose leve, deve afetar adversamente a reserva ovariana, o desenvolvimento dos oócitos e/ou a atividade dos eixos hipotálamo-hipófise-gonadas e hipotálamo-hipófise-adrenal (Sainsbury et al., 2012; Seimon et al., 2013), os quais regulam a função reprodutiva e a fertilidade.

Por outro lado, observou-se que a perda de peso associou-se com aumento nas gestações naturais (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996b), eliminando a necessidade de tratamento de fertilidade. Além disto, benefícios adicionais como a regularização do padrão menstrual, a redução do número de ciclos de RA necessários para obter a gestação, e a redução das taxas de cancelamento de ciclo também foram reportados após intervenções para perda de peso. Essa revisão também sugere algumas diferenças nos desfechos de procedimentos de RA em resposta a diferentes intervenções para perda de peso. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar se algum método em particular para redução de peso é mais adequado para promover desfechos positivos em procedimentos de RA. No entanto, de uma forma geral, os resultados sustentam a recomendação clínica de aconselhar mulheres obesas e/ou com sobrepeso a perder peso previamente ao procedimento de RA.

Apesar de os benefícios da perda de peso sobre a melhora do perfil metabólico e de fertilidade estar melhor estabelecido, dados em relação à melhor composição da dieta não estão claros. Reduzir a ingestão de gordura tem sido o foco primário na prevenção e tratamento dietético do sobrepeso e da obesidade por mais de vinte anos. No entanto, alimentos ricos em gordura proporcionam relativamente menos saciedade do que porções isoenergéticas de alimentos ricos em carboidrato ou proteína (Blundell et al., 1995; Holt et al., 1995). Estudos de intervenção têm mostrado que dietas ricas em carboidratos ad libitum promovem uma maior perda de peso quando comparadas a dietas ricas em gordura ad libitum (Astrup et al., 2000). Em uma revisão, Seidell et al. (1998) descreveram que em muitos estudos epidemiológicos observou-se que a alta ingestão de gordura na dieta correlaciona-se com o aumento das taxas de obesidade. Por outro lado, a adesão aos aconselhamentos dietéticos padrões para redução da ingestão de gorduras e aumento da ingestão de carboidratos na dieta, geralmente associam-se com o aumento da carga glicêmica da dieta.

Ambos, a quantidade e a qualidade do carboidrato influenciam a glicemia pós-prandial, e a interação entre estes dois fatores provavelmente é sinérgica. Uma dieta ocidental

típica é rica em carboidratos e inclui alimentos de alto IG, os quais são digeridos e absorvidos rapidamente, resultando em uma elevada carga glicêmica e uma demanda aumentada de secreção de insulina (Foster-Powell; Brand-Miller 1995; Holt et al., 1997). Em pessoas resistentes à insulina, que consomem alimentos de alto IG, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia pós-prandial encontram-se aumentadas, possivelmente contribuindo para a exaustão das células β -pancreáticas e para o desenvolvimento de DM tipo 2 (Salmeron et al., 1997a, 1997b). Além disto, também se hipotetiza que a carga glicêmica elevada da dieta aumenta a dificuldade de controlar o peso, pois a rápida digestibilidade dos carboidratos podem causar flutuações marcantes nos níveis sanguíneos de glicose e insulina, por sua vez estimulando a fome (Ludwig et al., 1999) e inibindo a oxidação de gordura.

Apesar de a dieta rica em carboidratos e pobre em gordura seguir sendo a “melhor recomendação”, muitos estudos sugerem que dietas ricas em carboidratos e pobre em proteínas ou com baixa carga glicêmica trariam benefício para a redução do peso corporal e do risco cardiovascular (Ebbeling et al., 2003; Bouche et al., 2002; Pereira et al., 2004; Brynes et al., 2003; Stern et al., 2004; Sloth et al., 2004; Ebbeling et al., 2005; Noakes et al., 2005). Comparada à dietas padrão, a restrição ou a modificação da ingestão de carboidratos pode trazer benefícios no gasto energético (Pereira et al., 2004), concentrações de triglicerídeos, níveis de colesterol HDL e homeostase de glicose (Hu, 2005). Além disto, alimentos ricos em carboidratos com baixo IG são capazes de manter a sensibilidade à insulina e aumentar o potencial de perda de peso quando comparadas a dietas baixas em gordura ad libitum (Hu, 2005).

Alimentos com baixo IG podem beneficiar o controle do peso de duas maneiras: 1) por promoverem a saciedade - um aumento de 50% no IG da refeição resulta em uma redução de 50% na saciedade (Brand-Miller et al., 2002) e 2) por promoverem a oxidação de gordura ao invés de oxidar carboidratos (Brand-Miller et al., 2002). Uma revisão realizada por Ludwig et al. (2000), demonstrou que 16 de 17 estudos analisados confirmaram que refeições com baixo IG aumentaram a plenitude de forma mais extensa quando comparada a refeições de alto IG.

Após o consumo de uma refeição de alto IG, as concentrações de insulina aumentam dramaticamente, com o objetivo de reduzir rapidamente os níveis de glicose e ácidos graxos livres, frequentemente a níveis mais baixos que os de jejum. Assim, entre 3 a 5h após o consumo, a concentração de dois dos maiores combustíveis metabólicos circulantes está reduzida simultaneamente, uma situação que pode ser interpretada pelo sistema nervoso central como um “estado baixo de combustível” (Ludwig et al., 2000). A solicitação espontânea por refeições (cegada para o tempo), em humanos, teve correspondência com o

declínio transitório nas concentrações sanguíneas de glicose durante o período pós-absortivo (Melanson et al., 1999). Além disto, a exposição prolongada à hiperglicemia e a hiperinsulinemia crônica resulta na expressão reduzida de enzimas limitantes e altera o potencial para oxidação de gorduras. Uma capacidade reduzida de oxidar ácidos graxos está presente em alguns humanos obesos e também em ratos propensos à obesidade (Simoneau et al., 1999; Commerford et al., 2000), e isto, em longo prazo, pode levar ao acúmulo de gordura corporal.

O consumo de dietas ricas em carboidratos resulta em hiperglicemia e hiperinsulinemia pós-prandial recorrente. Isto é acentuado em pessoas sedentárias que estão com sobrepeso, são insulino-resistentes, ou ambos. Como consequência, a oxidação de carboidratos é maior, e a oxidação de gorduras é menor ao longo do período pós-prandial. A expressão de enzimas envolvidas na síntese de lipídios está aumentada e a expressão daquelas envolvidas na oxidação de lipídios está reduzida. Os estoques de glicogênio no fígado e no músculo são mantidos em níveis mais altos com dietas de alto IG, mas o uso de glicogênio e também a gliconeogênese podem estar elevadas. As respostas dos hormônios contrarregulatórios (por exemplo, cortisol e noradrenalina) também estão elevadas devido ao rebote hiperglicemia-hipoglicemia no período pós-prandial. Isto estimula a gliconeogênese a partir de aminoácidos gliconeogênicos, assim como estimula o início da refeição em indivíduos que se alimentam livremente. Desta forma, o período de 0-6 horas após o consumo de uma dieta de alto IG está caracterizado por uma maior dependência de carboidrato e proteína como fonte de combustível e menos dependente de gordura. Como os estoques de carboidratos e proteínas são limitados, a sua maior taxa de utilização possivelmente estimula o apetite e encoraja o consumo excessivo de alimentos (Brand-Miller et al., 2002).

Estudos de curto e longo prazo em humanos e animais trazem evidências de que a dieta de alto IG, de fato, afeta o apetite e a metabolização de nutrientes de forma a promover o acúmulo de gordura corporal. Agus et al. (2000) avaliou o efeito de dietas hipocalóricas, uma com alto e outra com baixo IG sobre os perfis hormonal e fisiológico de indivíduos com sobrepeso, por 9 dias. Os autores demonstraram que houve maior declínio no gasto energético, o balanço nitrogenado teve uma tendência a ser mais negativo e o apetite maior em resposta a dieta de alto IG. Howe et al. (1996) demonstraram que uma dieta de baixo IG à base de amido rico em amilose por 14 semanas pareceu aumentar a retenção protéica quando comparada com a dieta à base de amido de alto IG, em ambos homens normais e hiperinsulinêmico. Em uma revisão, Brand-Miller et al. (2002) descreve que em alguns estudos com modelos animais demonstrou-se que o amido de alto IG causa aumento no

acúmulo de gordura visceral e reduz a capacidade lipolítica apesar de a ingestão de energia e macronutrientes terem sido precisamente controladas.

Um estudo realizado por McMillan-Price et al. (2006), testou o efeito de 4 dietas com diferentes cargas glicêmicas sobre o risco cardiovascular em adultos com sobrepeso/obesidade. A dieta 1 consistia em 55% carboidrato, 15% proteína e alto IG; a dieta 2 consistia em 55% carboidrato, 15% proteína e baixo IG; a dieta 3 consistia em 45% carboidrato, 25% proteína e alto IG; e a dieta 4 consistia em 45% carboidrato, 25% proteína e baixo IG. Os autores observaram que a perda de peso percentual foi semelhante em todos os grupos, entretanto, as dietas 2 e 3 tiveram uma maior proporção de indivíduos que atingiram a meta de perder 5% ou mais do peso corporal. Ocorreu aumento dos níveis de LDL na dieta 3, porém, a dieta 2 reduziu os níveis de LDL. Os autores concluíram que ambas, as dietas ricas em proteínas e as com baixo IG aumentaram a perda de peso, mas a redução do risco cardiovascular foi otimizada pela dieta rica em carboidrato e baixo IG.

Existem poucos estudos que avaliaram a fertilidade e dietas com diferentes macronutrientes. Em teoria, dietas com baixo índice glicêmico ou altas em proteínas, as quais melhorariam a resistência à insulina, poderiam ser mais efetivas para mulheres com PCOS (Anderson et al., 2010). Dietas ricas em carboidratos, especialmente aquelas com alto índice glicêmico, estão associadas com risco aumentado de infertilidade anovulatória (Chavarro et al., 2009), assim como dietas ricas em gorduras trans (Chavarro et al., 2007) e proteína animal (Chavarro et al., 2008). Apesar de a dieta de alto IG poder mediar seus efeitos diretamente como resultado da hiperglicemia ou indiretamente pelos níveis alterados de sensibilidade a insulina e androgênios, a dieta rica em gordura trans parece impedir a fertilidade via lipoperoxidação (Wu et al., 2010).

Estudos envolvendo pacientes com PCOS mostraram que a substituição dos carboidratos por proteínas não resultou em nenhuma melhora adicional na sensibilidade à insulina quando comparada a dieta rica em carboidratos (Marsh et al., 2005; Farshchi et al., 2007; Liepa et al., 2008; Moran et al., 2003; Stamets et al., 2004). Por outro lado, um estudo cruzado conduzido por Douglas et al., (2006) demonstraram que uma dieta moderada a baixa em carboidratos (43%) conduzida por 16 dias, reduziu os níveis de insulina das mulheres PCOS, o qual pode, ao longo do tempo, melhorar os desfechos endócrinos e reprodutivos. Um estudo realizado em seguida, por Marsh et al., (2010), em 96 mulheres com PCOS confirmou estes achados: com uma perda de peso apenas modesta (4-5% do peso corporal), a dieta moderada em carboidrato e de baixo IG proporcionou uma melhora na sensibilidade à

insulina, melhorou a regularidade menstrual e os escores emocionais quando comparada a dieta hipocalórica convencional.

Outro trabalho, um ensaio clínico randomizado cegado simples de 12 semanas, recrutou 60 mulheres PCOS obesas ou com sobrepeso, as quais foram alocadas randomicamente para: 1) dieta convencional hipocalórica (15% de proteína); ou 2) dieta hipocalórica modificada, rica em proteína e com baixa carga glicêmica (30% de proteína e alimentos com baixa carga e IG). O trabalho demonstrou que ambas as dietas reduziram significativamente o peso corporal e os níveis de androgênios, mas a combinação de alta proteína mais baixa carga glicêmica na dieta modificada levou a um aumento na sensibilidade a insulina e uma redução nos níveis de PCR quando comparada à dieta convencional (Mehrabani et al., 2012).

Moran et al. (2003) randomizaram 45 mulheres obesas com PCOS para uma dieta rica em proteínas (30% de proteína, 40% de carboidrato, e 30% de lipídio) ou dieta pobre em proteína (55% de carboidrato, 15% de proteína e 30% de lipídio) e as seguiram por 16 semanas. Não houve diferença no peso corporal ou nas mudanças da composição corporal entre as dietas. Adicionalmente, não houve diferença entre as dietas na capacidade da restauração da ovulação. Entretanto, devido a uma taxa de desistência de 37%, o estudo perdeu o poder para detectar a diferença.

Chavarro et al (2007b) investigaram o estilo de vida e a função reprodutiva usando dados do estudo Nurses Health II, um estudo prospectivo de longo prazo sobre o estilo de vida e doenças crônicas em enfermeiras. O autor observou que aquelas mulheres que tinham um maior percentual de ingestão alimentar diária provinda de carboidratos tinham um maior risco de infertilidade ovulatória do que aquelas mulheres que limitavam o seu consumo de carboidratos. Além disto, o alto índice glicêmico da dieta foi diretamente relacionado à infertilidade ovulatória. Os autores também observaram que o consumo elevado de gordura saturada estava relacionado com o aumento no risco de infertilidade ovulatória, e que obter proteínas de fontes vegetais ao invés de fontes animais reduziria este risco. Resumidamente, Chavarro et al. (2007b), fazem as seguintes recomendações nutricionais para melhorar a ovulação e a fertilidade: cortar gorduras trans da dieta, escolher gorduras insaturadas para cozinhar, escolher fontes de proteínas vegetais em detrimento das animais, e escolher grãos integrais ao invés de carboidratos simples e refinados.

De uma forma geral, parece que uma dieta com 50% das calorias totais provindas de carboidratos (preferencialmente com baixo IG), 30% de lipídios (preferencialmente gordura mono ou poliinsaturada, e menos de 10% de gordura saturada), 20% de proteínas e alta

quantidade de fibras, seria a mais apropriada para pacientes com PCOS (Moran et al., 2009; Panidis et al., 2013). Além disto, mesmo que os estudos realizados com dietas específicas sejam heterogêneos e uma conclusão final não possa ser tomada, parece eficiente limitar o consumo de açúcar e carboidratos refinados, dando preferência à produtos com baixo IG, com o objetivo de favorecer melhoras metabólicas. Possivelmente, os efeitos positivos destas recomendações beneficiem também indivíduos obesos, aprimorando seu controle metabólico. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor estabelecer e confirmar estes achados.

2.7 CONCEITOS DE ÍNDICE GLICÊMICO E CARGA GLICÊMICA DA DIETA

O índice glicêmico (IG) é um “ranking” de alimentos contendo carboidratos que foi desenvolvido para classificar sistematicamente estes macronutrientes de diferentes alimentos de acordo com seus efeitos sob a glicemia pós-prandial. É determinado pela relação entre a área abaixo da curva de resposta glicêmica duas horas após o consumo de uma porção do alimento teste e a área abaixo da curva de resposta glicêmica correspondente ao consumo de uma porção do alimento referência. O valor obtido nessa relação é multiplicado por 100 e o IG é expresso em porcentagem (Liu, Willett, 2005). Tanto a glicose como o pão branco podem ser utilizados como alimento referência na determinação do IG e a porção do alimento teste e do alimento referência devem conter a mesma quantidade de carboidrato disponível (normalmente 50 gramas) (FAO/WHO, 1998). Alimentos com alto IG (AIG) são digeridos e absorvidos mais rapidamente do que os alimentos com baixo IG (BIG) e promovem, portanto, maior aumento nas concentrações plasmáticas de glicose (Jenkins et al., 1986).

Por comparar quantidades iguais de carboidrato, o IG representa uma medida da qualidade do carboidrato (Foster-Powell et al., 2002). Tendo em vista que a resposta glicêmica é influenciada pela quantidade e pela qualidade do carboidrato consumido (Sartorelli, Cardoso, 2006), o conceito de carga glicêmica (CG) foi introduzido em 1997 na Universidade de Harvard. A CG é uma medida da quantidade e da qualidade do carboidrato consumido, sendo obtida pelo produto do IG do alimento e o seu conteúdo de carboidrato disponível (Liu, Willett, 2005). Quanto maior a CG, maior é a resposta glicêmica e insulinêmica provocada pelo alimento (Foster-Powell et al., 2002).

Os valores de IG e CG têm sido compilados em tabelas. A mais recente e completa delas foi publicada em 2008 e engloba 2487 itens (Atkinson et al., 2008). Os alimentos podem ser classificados de acordo com o IG em alto ($IG \geq 70\%$), médio (IG entre 56 e 69%) ou baixo ($IG \leq 55\%$). Em relação à CG, os alimentos são classificados como tendo alta ($CG \geq 20g$),

média (CG entre 11 e 19g) ou baixa CG ($CG \leq 10g$). Não existem valores definidos para a classificação do IG diário, enquanto que a CG diária maior do que 120 é classificada como alta e a CG diária menor do que 80 é classificada com baixa (www.glycemicindex.com).

A CG diária ou de uma refeição é obtida pela soma da CG de todos os alimentos que compõe a refeição ou a dieta em questão. Para o cálculo do IG de uma refeição ou diário a FAO propôs um padrão a ser seguido (FAO/WHO, 1998): determina-se primeiramente a porcentagem de cada alimento em relação ao carboidrato total da refeição/ dieta, multiplica-se este valor pelo IG de cada alimento e divide-se esse valor por 100. Somam-se os valores obtidos para prever o IG da refeição/ dieta. Há consenso na literatura quanto à utilização desse padrão para a determinação do IG de refeições ou dietas, sendo que sua acurácia depende da fidedignidade dos valores de IG de seus componentes (Howlett, Ashwell 2008).

2.8 INTERVENÇÃO DIETÉTICA E MEDIDAS DE ADESÃO

Qualquer intervenção dietética requer monitoramento contínuo da ingestão alimentar para verificar a adesão ao tratamento. Os métodos mais utilizados para avaliação da dieta ingerida são: questionário de frequência alimentar; recordatório de 24 h; registro alimentar com ou sem pesagem de alimentos. No entanto, como a informação depende exclusivamente da pessoa que está sendo avaliada, há necessidade, na maioria das vezes, de desenvolver certas habilidades no indivíduo em estudo para diminuir ao máximo a margem de erros nas informações. A dificuldade de obter confiabilidade plena da ingestão alimentar é uma questão antiga que vem sendo debatida ao longo de muitas décadas. No entanto, apesar dos esforços para desenvolver métodos com mais acurácia para monitorar a ingestão alimentar, todos são incapazes de evitar o sub-relato (Macdiarmid, Blundell 1998). Black et al. (1991) definem um registro alimentar válido como sendo “aquele no qual o sujeito se alimenta da mesma forma como teria feito se não estivesse sob observação”, o que é extremamente difícil, pois a situação de “observação” por si artificializa o processo – é o chamado efeito “Hawthorne” ou “experimentador” (Rosenthal, Rosnow 1991). Registros alimentares inválidos surgem de diferentes tipos de comportamento, incluindo:

1. Alimento sendo consumido, mas deliberadamente não registrado (subregistro intencional);
2. Consumo alimentar sendo reduzido, ou certos alimentos sendo evitados durante o período do estudo (alteração intencional da dieta);

3. Alimentos sendo consumidos, mas não registrados por esquecimento (subregistro não intencional) (Macdiarmid, Blundell 1998).

Diversos estudos mais antigos observaram que o subregistro de consumo alimentar é mais prevalente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade; do sexo feminino e com mais idade (Macdiarmid, Blundell 1998). Esta é uma realidade que ainda persiste em estudos mais recentes (Bothwell et al., 2009; Bartholome et al., 2013), constituindo um constante desafio para os ensaios clínicos baseados em mudanças dietéticas que precisam assegurar a causalidade dos desfechos encontrados.

Biomarcadores são comumente utilizados para a validação de registros alimentares em relação a nutrientes específicos, por exemplo: nitrogênio urinário, para validar o registro do consumo proteico; ácidos graxos do tecido adiposo para validar o consumo de diferentes ácidos graxos; potássio urinário; vitamina C sérica; e carotenoides séricos. Entretanto, não existem biomarcadores validados para consumo de carboidratos e índice glicêmico dos mesmos. Um dos biomarcadores mais comumente utilizados é o nitrogênio urinário. Moulin et al. (1998), em um ensaio clínico randomizado com pacientes com diabetes mellitus tipo 2 submetidos à intervenção dietética com mudança na qualidade e quantidade de proteínas, validaram os registros alimentares com pesagem de alimentos através da validação do consumo proteico utilizando nitrogênio urinário. Não havendo biomarcadores para tipos de proteínas consumidas, foi assumido neste estudo que, não havendo subregistro do consumo quantitativo de proteínas, provavelmente o registro do tipo de proteína consumida e dos demais macro e micronutrientes também foi fidedigno. No entanto, este método não pode ser aplicado a mulheres em idade reprodutiva quando a coleta da urina de 24 h e o registro alimentar precisam coincidir com o período menstrual. Isso é particularmente limitante em estudos delineados para períodos pré FIV.

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da dieta hipocalórica de baixo índice e carga glicêmica sobre parâmetros antropométricos e metabólicos, níveis de grelina e leptina e desfechos reprodutivos em mulheres inférteis com excesso de peso candidatas à fertilização in vitro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis sanguíneos de grelina acilada, leptina, glicose, insulina, colesterol total e frações, triglicerídeos e hormônios sexuais antes e após o tratamento com dieta;
- Comparar os níveis sanguíneos de grelina acilada, leptina, glicose, insulina, colesterol total e frações, triglicerídeos e hormônios sexuais entre o grupo controle e o grupo com intervenção dietética;
- Analisar a correlação entre índice de massa corporal, percentual de gordura corporal, insulinemia, glicemia, perfil lipídico e hormônios sexuais com os níveis sanguíneos de leptina, grelina acilada e desfechos reprodutivos;
- Verificar e comparar a quantidade de gonadotrofinas necessária para estimular a ovulação nas pacientes do grupo intervenção e grupo controle;
- Descrever e comparar resposta ovariana, qualidade oocitária e embrionária, taxa de fertilização e gestação de cada grupo após o período de intervenção.

CAPÍTULO IV

4. HIPÓTESES

Com base na literatura, levantam-se as seguintes hipóteses:

H1 – A intervenção dietética será eficaz para a perda de peso e diminuição dos níveis de gordura corporal.

H2 – A intervenção dietética será eficaz em aprimorar a insulinemia, o perfil glicêmico e lipídico;

H3 – Ocorrerá aumento nos níveis de grelina acilada e diminuição dos níveis de leptina ao final do período de intervenção no grupo com intervenção dietética;

H4 - Haverá correlação dos níveis de grelina acilada, leptina e dos desfechos reprodutivos com os parâmetros antropométricos, metabólicos e hormonais.

H5 - As pacientes que foram submetidas à intervenção dietética necessitarão de quantidades menores de gonadotrofinas para estimular a ovulação quando comparadas às pacientes do grupo controle;

H6 – Haverá desfechos reprodutivos mais favoráveis no grupo com intervenção dietética quando comparado ao sem intervenção.

REFERÊNCIAS

1. ACOG Committee on Gynecologic Practice. ACOG committee opinion. Number 319, October 2005. The role of obstetrician-gynecologist in the assessment and management of obesity. *Obstet Gynecol.* 2005;106(4):895–9.
2. Adami GF, Civalleri D, Cella F, Marinari G, Camerine G, Papadia F, et al. Relationship of serum leptin to clinical and anthropometric findings in obese patients. *Obesity Surgery.* 2002;12(5):623–7.
3. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology.* 1981;108:1441–9.
4. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR and Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I upregulation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1072–1076.
5. Agus MSD, Swain JF, Larson CL, Eckert EA, Ludwig DS. Dietary composition and physiologic adaptations to energy restriction. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:901–7.
6. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000a;11:327–332.
7. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000b;62:413–37.
8. Al Awar R, Obeid O, Hwalla N, Azar S. Postprandial acylated ghrelin status following fat and protein manipulation of meals in healthy young women. *Clin Sci.* 2005;109:405–11.
9. Anderson K, Norman RJ, Middleton P. Preconception lifestyle advice for people with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(4):CD008189.
10. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology.* 2001;120:337–45.
11. Astrup A, Grunwald GK, Melanson EL, Saris WH, Hill JO. The role of low-fat diets in body weight control: a meta-analysis of ad libitum dietary intervention studies. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:1545–52.
12. Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller J.C. International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values: 2008. *Diabetes Care.* 2008;31(12):2281–2283.
13. Awartani KA, Al-Sahan N, Al-Hassan SH, Coskun S. Effect of weight loss in morbidly obese infertile women on IVF outcome. *Fertil Steril.* 2012;98: S204.
14. Baldelli R, Dieguez C, Casanueva FF. The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med.* 2002;34(1):5–18.
15. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996;137(7):3144–3147.
16. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol.* 2004;226:1–9. Barter PJ, Nestel PJ. Precursors of plasma triglyceride fatty acids in obesity. *Metabolism.* 1973;22:779–783.
17. Bartholome LT, Peterson RE, Ratz SK, Raymond NC. A comparison of the accuracy of self-reported intake with measured intake of a laboratory overeating episode in

- overweight and obese women with and without binge eating disorder. *Eur J Nutr.* 2013;52(1):193–202.
18. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjö T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril.* 1993;59(2):323–31.
 19. Black AE, Goldberg GR, Jebb SA, Livingstone MBE, Cole TJ, Prentice AM. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology 2. Evaluating the results of published surveys. *Eur J Clin Nutr.* 1991;45:583–599.
 20. Blundell JE, Cotton JR, Delargy H, Green S, Greenough A, King NA, Lawton CL. The fat paradox: fat-induced satiety signals versus high fat overconsumption. *Int J Obes.* 1995;19:832–5.
 21. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997;46:3–10.
 22. Bolúmar F, Olsen J, Rebagliato M, Saez-Lloret I, Bisanti L. Body mass index and delayed conception: a European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol.* 2000;151(11):1072–1079.
 23. Boots C, Stephenson MD. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med.* 2011;29:507–513.
 24. Bothwell EKG, Ayala GX, Conway TL, Rock CL, Gallo LC, Elder JP. Underreporting of Food Intake among Mexican/Mexican-American Women: Rates and Correlates. *J Am Diet Asso.* 2009;109(4):624–632.
 25. Bouche C, Rizkalla SW, Luo J, et al. Five-week, low-glycemic index diet decreases total fat mass and improves plasma lipid profile in moderately overweight nondiabetic men. *Diabetes Care.* 2002;25:822–828.
 26. Brand-Miller JC, Holt SHA, Pawlak DB, McMillan J. Glycemic index and obesity. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(suppl):281S–5S.
 27. Brannian JD, Hansen KA. Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin. Reprod. Med.* 2002;20: 103–112.
 28. Bray G. Progress in understanding the genetics of obesity. *J Nutr.* 1997;127:940S–42.
 29. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89: 2583–2589.
 30. Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 2006;89:687–691.
 31. Brynes AE, Mark Edwards C, Ghatei MA, Dornhorst A, Morgan LM, Bloom SR, Frost GS. A randomised four-intervention crossover study investigating the effect of carbohydrates on daytime profiles of insulin, glucose, non-esterified fatty acids and triacylglycerols in middle-aged men. *Br J Nutr.* 2003;89:207–218.
 32. Budak E, Fernandez SM, Bellver J, Cerveró A, Simón C, Pellicer A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril.* 2006;85(6):1563–81.
 33. Bützow TL, Lehtovirta M, Siegborg R, Hovatta O, Koistinen R, Seppälä M, Apter D. The decrease in luteinizing hormone secretion in response to weight reduction is inversely

- related to the severity of insulin resistance in overweight women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85:3271–3275.
34. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology.* 2003;144:1594–602.
 35. Carro E, Pinilla L, Seoane LM, Considine RV, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology.* 1997;66:375-7.
 36. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short-and long-term implications of maternal obesity o the mother and her offspring. *BJOG.* 2006;113:1126–1133.
 37. Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simón C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005;10(2):217–23.
 38. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility. *Am J Clin Nutr.* 2007a;85(1):231–237.
 39. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. *Obstet Gynecol.* 2007b;110:1050–58.
 40. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Protein intake and ovulatory infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(2):210 e211–217.
 41. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. A prospective study of dietary carbohydrate quantity and quality in relation to risk of ovulatory infertility. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63(1):78–86.
 42. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.* 1996; 12(3):318–320.
 43. Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(6):467–72.
 44. Clark AM, Ledger W, Galletly C, Tomlinson L, Blaney F, Wang X, Norman RJ. Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2705–12.
 45. Clark AM, Thornley B, Tomlinson L, Galletley C, Norman RJ. Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of fertility treatment. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1502–1505.
 46. Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:E875–85.
 47. Craig JA, Zhu H, Dyce PW, Zhu H, Dyce PW, Wen L, Li J. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;229(1–2):141–7.
 48. Crosignani PG, Colombo M, Vegetti W, Somigliana E, Gessati A, Ragni G. Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Hum Reprod.* 2003;18(9):1928–32.

49. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50:1714-19.
50. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002;346:1623-30.
51. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med*. 2003;54:453-71
52. Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets*. 2005;6(2):153-69.
53. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav*. 2006;89:71-84.
54. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*. 1999;60:216-22.
55. De Pergola G, Maldera S, Tartagni M, Pannacciulli N, Loverro G, Giorgino R. Inhibitory effect of obesity on gonadotropin, estradiol, and inhibin B levels infertile women. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(11):1954-60.
56. De Pergola G, Tartagni M, d'Angelo F, Centoducati C, Guida P, Giorgino R. Abdominal fat accumulation, and not insulin resistance, is associated to oligomenorrhea in non-hyperandrogenic overweight/obese women. *J Endocrinol Invest*. 2009;32(2):98-101.
57. Donato J Jr, Cravo RM, Frazao R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S Jr, Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest*. 2011;121:355-368.
58. Douglas CC, Gower BA, Darnell BE, Ovalle F, Oster RA, Azziz R. Role of diet in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;85:679-688.
59. Druce MR, Wren AM, Park AJ, et al. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(9):1130-6.
60. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Hangen JP, Ludwig DS. A reduced glycemic load diet in the treatment of adolescent obesity. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157:773-779.
61. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Seger-Shippe LG, Feldman HA, Ludwig DS. Effects of an ad libitum reduced glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:976-982.
62. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2004;352(12):1223-36.
63. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2984.
64. Erdmann J, Topsch R, Lippl F, Gussmann P, Schusdziarra V. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):3048-54.
65. ESHRE/ASRM - Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23(3):462-477.

66. ESHRE - The ESHRE Capri Workshop Group. Nutrition and reproduction in women. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):193–207.
67. Esinler I, Bozdag G, Yarali H. Impact of isolated obesity on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(4):583–587.
68. Evans JJ, Anderson GM. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update*. 2012;18(3):313–332.
69. Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J*. 2001;15:2565-71.
70. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO). Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation. *FAO Food and Nutrition Paper* 1998;66:1–140.
71. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999; 341(12):879–884.
72. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002; 110(8):1093–1103.
73. Farshchi H, Rane A, Love A, Kennedy RL. Diet and nutrition in polycystic ovary syndrome (PCOS): pointers for nutritional management. *J Obstet Gynaecol*. 2007;27:762–773.
74. Fenichel RM, Dominguez JE, Mayer L, Walsh BT, Boozer C, Warren MP. Leptin levels and luteinizing hormone pulsatility in normal cycling women and their relationship to daily changes in metabolic rate. *Fertil Steril*. 2008;90:1161–1168.
75. Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006;254–255:127–132.
76. Foster-Powell K, Brand-Miller J. International tables of glycemic index. *Am J Clin Nutr*. 1995;62(suppl):871S–93S.
77. Foster-Powell K, Holt SHA, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:5-56.
78. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutrition Rev*. 2002;60(10):S1-14.
79. Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001;288:780–785.
80. Galletly C, Clark A, Tomlinson L, Blaney F. Improved pregnancy rates for obese, infertile women following a group treatment program. An open pilot study. *Gen Hosp Psychiatry* 1996a;18(3):192–5.
81. Galletly C, Clark A, Tomlinson L, Blaney F. A group program for obese, infertile women: weight loss and improved psychological health. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 1996b;17:125-128.

82. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:879–887.
83. Gelling RW, Overduin J, Morrison CD, Morton GJ, Frayo RS, Cummings DE, Schwartz MW. Effect of uncontrolled diabetes on plasma ghrelin concentrations and ghrelin-induced feeding. *Endocrinology.* 2004;145:4575–82.
84. Gesink Law DC, Maclehose RF, Longnecker MP. Obesity and time to pregnancy. *Hum Reprod.* 2007;22(2):414–20.
85. Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM. The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology.* 1996;137:4054–4057.
86. Gibson W, Liu J, Gaylinn B, Thorner MO, Meneilly GS, Babich SL, Thompson D, Chanoine JP. Effects of glucose and insulin on acyl ghrelin and desacyl ghrelin, leptin, and adiponectin in pregnant women with diabetes. *Metabolism.* 2010;59(6):841–7.
87. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):607–15.
88. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2988–91.
89. Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology.* 1999;70:213–220.
90. Gosman GG, Katcher HI, Legro RS. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2006;12(5):585–601.
91. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes.* 2004;53:3024–3029.
92. Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE and Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod.* 2004;71:66–72.
93. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril.* 2008;90(4):897-904.
94. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47(1):101–6.
95. Hassan MA, Killick SR. Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril.* 2004;81(2):384–92.
96. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod.* 2000;63: 1219–1228.
97. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E827-32.

98. Hollmann M, Runnebaum B, Gerhard I. Effects of weight loss on the hormonal profile in obese, infertile women. *Hum Reprod.* 1996;11:1884–1891.
99. Hollmann M, Runnebaum B, Gerhard I. Impact of waist-hip-ratio and body-mass-index on hormonal and metabolic parameters in young, obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:476-483.
100. Holt SH, Brand-Miller JC, Petocz P, Farmakalidis E. A satiety index of common foods. *Eur J Clin Nutr.* 1995;49:675–90.
101. Holt SH, Brand-Miller JC, Petocz P. An insulin index of common foods: the insulin demand generated by 1000-kJ portions of common foods. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:1264–76.
102. Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lithell H. Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80:2586–2593.
103. Howe JC, Rumpler WV, Behall KM. Dietary starch composition and level of energy intake alter nutrient oxidation in ‘carbohydrate-sensitive’ men. *J Nutr.* 1996;126:2120–9.
104. Howlett J, Ashwell, M. Glycemic response and health: summary of a workshop. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(suppl):212-216.
105. Hu FB. Protein, body weight and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(suppl):242S-247S.
106. Huber-Buchholz M, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1470–4.
107. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009. Acessado em 11/08/2014: <http://cod.ibge.gov.br/23BNJ>. 2009.
108. Iglesia MJ, Pineiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2004;62:442–48.
109. Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke IJ. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology.* 2006;147:510–519.
110. Jain A, Polotsky P, Rochester D, Berga SL, Loucks T, Zeitlian G, Gibbs K, Polotsky HN, Feng S, Isaac B, Santoro N. Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2468–2473.
111. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *A J Clin Nutr.* 1986;32:362-366.
112. Jenkins AB, Markovic TP, Fleury A, Campbell LV. Carbohydrate intake and short-term regulation of leptin in humans. *Diabetologia.* 1997;40:348-51.
113. Jungheim E, Lanzendorf S, Odem R, Moley K, Chang A, Ratts V. Morbid obesity is associated with lower clinical pregnancy rates after in vitro fertilization in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2009;92:256–261.

114. Jungheim ES, Moley KH. Current knowledge of obesity's effects in the pre- and periconceptual periods and avenues for future research. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:525–530.
115. Jungheim ES, Travieso JL, Hopeman MM. Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutrition Reviews.* 2013;71(Suppl. 1):S3–S8.
116. Karhunen LJ, Juvone KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH. Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept.* 2008;149:70-78.
117. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82: 4144–4148.
118. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. Ghrelin inhibits the Development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology.* 2003;144:2623–33.
119. Kennedy A, Gettys TW, Watson P, Wallace P, Ganaway E, Pan Q, Garvey WT. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1293-300.
120. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–2556.
121. Kiddy DS, et al. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992;36(1):105–11.
122. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999;104:733-741
123. Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park, KS, Kim SY, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport.* 2003;14:1317-20.
124. Kissebah AH, Alfarsi S, Adams PW, Wynn V. The metabolic fate of plasma lipoproteins in normal subjects and in patients with insulin resistance and endogenous hypertriglyceridaemia. *Diabetologia.* 1976;12:501-509.
125. Kluge M, Schüssler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocrinol. Metab.* 2007;92:3202–5.
126. Kluge M, Uhr M, Bleninger P, Yassouridis A, Steiger A. Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70:920–3.
127. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402:656-60.
128. Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res.* 2001;56(1):S93–S97.
129. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. *Diabetes.* 1996;45:1511-5.

130. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-643.
131. Lambert-Messerlian G, Roberts MB, Urlacher SS, et al. First assessment of menstrual cycle function and reproductive endocrine status in Samoan women. *Hum Reprod*. 2011;26(9):2518–24.
132. Le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal caloric content in normal weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1068–71.
133. Lebovitz HE. Insulin resistance - a common link between type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8:237–249.
134. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem*. 1996;271:2365–2368.
135. Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 2004;62:1131–1143.
136. Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*. 2005;130:485–495.
137. Leroy JLMR, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reprod Fert Develop*. 2012;24:1–12.
138. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. 1993;42:833-842.
139. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Mulla A, Cearnal L, Veldhuis JD, Flier JS et al. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:2541–2546.
140. Liepa GU, Sengupta A, Karsies D. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and other androgen excess-related conditions: can changes in dietary intake make a difference? *Nutr. Clin. Pract*. 2008;23:63–71.
141. Lindheim SR, Sauer MV, Carmina E, Chang PL, Zimmerman R, Lobo RA. Circulating leptin levels during ovulation induction: relation to adiposity and ovarian morphology. *Fertil. Steril*. 2000;73:493–498.
142. Linne Y. Effects of obesity on women's reproduction and complications during pregnancy. *Obes. Rev*. 2004;5:137–143.
143. Lintsen AME, Pasker-de Jong PCM, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, van Leeuwen FE. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod*. 2005; 20:1867–1875.
144. Liu S, Willett WC. Dietary carbohydrates. Disponível em UpToDate®: <https://store.uptodate.com/app/index.asp>.> Acesso em: 29 ago. 2005.
145. Loret de Mola JR. Obesity and its relationship to infertility in men and women. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2009;36(2):333-46.

- 146.Ludwig DS, Majzoub JA, Al-Zahrani A, Dallal GE, Blanco I, Roberts SB. High glycemic index foods, overeating, and obesity. *Pediatrics*. 1999;103:E26.
- 147.Ludwig DS. Dietary glycemic index and obesity. *J Nutr*. 2000;130(suppl):280S–3S.
- 148.Luke B, Brown MB, Missmer SA, Bukulmez O, Leach R, Stern JE. The effect of increasing obesity on the response to and outcome of assisted reproductive technology: a national study. *Fertil Steril*. 2011;96(4):820–825.
- 149.Luke B, Brown MB, Stern JE, Missmer SA, Fujimoto VY, Leach R; SART Writing Group. Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates. *Hum Reprod*. 2011b;26(1):245–252.
- 150.Macdiarmid J, Blundell J. Assessing dietary intake: Who, what and why of under-reporting. *Nutr Res Rev*. 1998;11: 231-253.
- 151.Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8:731-737.
- 152.Maffei MJ, Haalas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in humans and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med*. 1995;11(1):1155-61.
- 153.Malachias, MVB. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, Palavra do Presidente. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 2010;17(1):2-3.
- 154.Malik NM, Carter ND, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Wilson CA, Stock MJ. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology*. 2001;142:5198–5202.
- 155.Malmstrom R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Jarvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996;39:993–996.
- 156.Mantzoros CS, Prasad AS, Beck F, Grabowski S, Kaplan J, Adair C, et al. Zinc may regulate serum leptin concentration in humans. *J Am Coll Nutr*. 1998;17:270-5.
- 157.Mantzoros CS. 2000. Role of leptin in reproduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2000;900:174–183.
- 158.Marsh K, Brand-Miller J. The optimal diet for women with polycystic ovary syndrome? *Br J Nutr*. 2005;94:154–165.
- 159.Marsh JA, Steinbeck KS, Atkinson FS, Petocz P, Brand-Miller JC. Effect of a low glycemic index compared with a conventional healthy diet on polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2010;92:83–92.
- 160.Martin GB, Rodger J, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*. 2004;16:491–501.
- 161.McLean M, Wellons MF. Optimizing Natural Fertility: The Role of Lifestyle Modification. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2012;39:465–477.
- 162.McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JCM, Gerris J, et al. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomized trials. *BMJ*. 2010;341:c6945.

163. McMillan-Price J, Petocz P, PhD; Atkinson F, O'Neill K, Samman S, Steinbeck K, Caterson I, Brand-Miller J. Comparison of 4 Diets of Varying Glycemic Load on Weight Loss and Cardiovascular Risk Reduction in Overweight and Obese Young Adults. A Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med.* 2006;166:1466-1475.
164. Mehrabani HH, Salehpour S, Amiri Z, Farahani SJ, Meyer BJ, Tahbaz F. Beneficial effects of a high-protein, low-glycemic-load hypocaloric diet in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled intervention study. *J. Am Coll Nutr.* 2012;31:117–125.
165. Melanson KJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH, Smith FJ, Campfield LA. Blood glucose patterns and appetite in time-blinded humans: carbohydrate versus fat. *Am J Physiol.* 1999;277:R337–45.
166. Metwally M, Cutting R, Tipton A, Skull J, Ledger WL, Li TC. The effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in patients undergoing in vitro fertilisation. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(5):532-8.
167. Metwally M, Ledger WL, Chiu Li T. Reproductive Endocrinology and Clinical Aspects of Obesity in Women. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008a;1127: 140–146.
168. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril.* 2008b;90(3):714–726.
169. Metwally M, Saravelos S, Ledger WL, Li, TC. Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2010;94:290–295.
170. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2013;62:457–478.
171. Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, et al. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:60.
172. Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007;29:887–902.
173. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997; 387(6636):903–908.
174. Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5510-14.
175. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:812–819.
176. Moran LJ, Pasquali R, Teede HJ, Hoeger KM, Norman RJ. Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Fertil. Steril.* 2009;92:1966–1982.

177. Moran LJ, Hutchison SK, Norman RJ, Teede HJ. Life-style changes in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 7:CD007506. doi:10.1002/14651858.CD007506. 2011a.
178. Moran L, Tsagareli V, Norman R, Noakes M. Diet and IVF pilot study: short-term weight loss improves pregnancy rates in overweight/obese women undertaking IVF. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011b; 51: 455–459.
179. Moran LJ, Ko H, Misso M, Marsh K, Noakes M, Talbot M, Frearson M, Thondan M, Stepto N, Teede HJ. Dietary composition in the treatment of polycystic ovary syndrome: a systematic review to inform evidence-based guidelines. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113(4):520–545.
180. Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3):324–32.
181. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil. Steril.* 2002;77:433–444.
182. Mota GR, Zanesco A. Leptina, Grelina e Exercício Físico. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(1):25-33.
183. Moulin CC, Tiskievicz F, Zelmanovitz T, Oliveira J, Azevedo MJ, Gross, JL. Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:853-857.
184. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology.* 1997;138(3):1190–1193.
185. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002;440:235–54.
186. Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, Ghè C, Arnoletti E, Raso GM, Castellucci M, Gualillo O, Meli R. Beyond the metabolic role of ghrelin: A new player in the regulation of reproductive function. *Peptides.* 2011;32:2514–2521.
187. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems (Clinical Guideline N°. 11). <http://www.nice.org.uk/CG011> [Accessed 14 July 2008].
188. Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2832-36.
189. Noakes M, Keogh JB, Foster PR, Clifton PM. Effect of an energy-restricted, high-protein, low-fat diet relative to a conventional high-carbohydrate, low fat diet on weight loss, body composition, nutritional status, and markers of cardiovascular health in obese women. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:1298-1306.
190. Norman RJ, Masters SC, Hague W, Beng C, Pannall P, Wang JX. Metabolic approaches to the subclassification of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1995;63:329-335.
191. Norman RJ, Noakes M, Wu R, Davies MJ, Moran L, Wang JX. Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. *Hum Reprod Update.* 2004;10:267–280.

192. Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:3909-13.
193. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 2001;145(5):669–73.
194. Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology.* 2005;146:845–50.
195. Panidis D, Tziomalos K, Papadakis E, Vosnakis C, Chatzis P, Katsikis I. Lifestyle intervention and anti-obesity therapies in the polycystic ovary syndrome: impact on metabolism and fertility. *Endocrine.* 2013;44:583–590.
196. Parihar M. Obesity and infertility. *Reviews in Gynaecological Practice* 2003; 3:120–126.
197. Pasquali R, Petrusi C, Gerghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update.* 2003;9:359–372.
198. Pereira MA, Swain J, Goldfine AB, Rifai N, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load diet on resting energy expenditure and heart disease risk factors during weight loss. *JAMA.* 2004;292:2482-2490.
199. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology.* 2009;150:2805–2812.
200. Reaven GM, Lerner RL, Stern MP, Farquhar JW. Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* 1967;46:1756-1767.
201. Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R. Ghrelin and reproductive disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2011;340:70-79.
202. Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M, Dupont J. Adipokines and the Female Reproductive Tract. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:232454.
203. Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, et al. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur. J. Endocrinol.* 1998;139:528–531.
204. Rich-Edwards JW, Spiegelman D, Garland M, Hertzmark E, Hunter DJ, Colditz GA, Willett WC, Wand H, Manson JE. Physical activity, body mass index and ovulatory disorder infertility. *Epidemiology.* 2002;13:184-190.
205. Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, Sobaleva S, Oteng-Ntim E, El-Toukhy T. Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reprod BioMed Online.* 2011a;23:421–439.
206. Rittenberg V, Sobaleva S, Ahmad A, Oteng-ntim E, Bolton V, Khalaf Y, Braude P, El-Toukhy T. Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 2011b;26(10):2642–2650.
207. Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1533–1540.
208. Robker RL, Wu LL, Yang X. Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction. *J Reprod Immunol* 2011;88(2):142–8.

209. Rondinone CM. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:4171-4175.
210. Rose DP, Haffner SM, Baillargeon J. Adiposity, the metabolic syndrome, and breast cancer in African-American and white American women. *Endocr Ver*. 2007; 28:763-777.
211. Rosenthal R, Rosnow RL. *Essentials of behavioral research: methods and data analysis*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc, 1991.
212. Rowell P, Braude P. Assisted conception. I – General principles. *BMJ*. 2003;327:799–801.
213. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3997–4000.
214. Sader S, Nian M, Liu P. Leptin a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108:644-6.
215. Sainsbury A, Zhang L. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev*. 2012;13:234–257.
216. Salmeron J, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Spiegelman D, Jenkins DJ, Stampfer MJ, Wing AL, Willett WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care*. 1997a;20:545–50.
217. Salmeron J, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Wing AL, Willett WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *JAMA*. 1997b;277:472–7.
218. Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diab Compl*. 2003;17(2):108-13.
219. Santoro N, Lasley B, McConnell D, et al. Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2622–31.
220. Sartorelli DS, Cardoso MA. Associação entre Carboidratos da Dieta Habitual e Diabetes Mellitus Tipo 2: Evidências epidemiológicas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2006;50(3):415-426.
221. Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-dglucose administration. *Endocrinology*. 2005;146:2510–16.
222. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med*. 1996;2: 589–593.
223. Seidell JC. Dietary fat and obesity: an epidemiologic perspective. *Am J Clin Nutr* 1998;67(suppl):546S–50S.
224. Seimon RV, Hostland N, Silveira SL, Gibson AA, Sainsbury A. Effects of energy restriction on activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in obese humans and rodents: implications for diet-induced changes in body composition. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013;15:71–80.

- 225.Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, Horvath TL. Minireview: Metabolism of Female Reproduction: Regulatory Mechanisms and Clinical Implications. *Mol Endocrinol*. 2014;28: 790–804.
- 226.Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem*. 1993;268:22243-22246.
- 227.Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001;50:227-32.
- 228.Shirazian T, Raghaven S. Obesity and pregnancy: implications and management strategies for providers. *Mt. Sinai J. Med*. 2009;76:539–545.
- 229.Sim KA, Partridge SR, Sainsbury A. Does weight loss in overweight or obese women improve fertility treatment outcomes? A systematic review. *Obesity Reviews* 2014a;15:839–850.
- 230.Sim KA, Dezarnaulds GM, Denyer GS, Skilton MR, Caterson ID. Weight loss improves reproductive outcomes for obese women undergoing assisted reproductive technology: a randomised controlled trial. *Clin Obes* 2014b;14:792–805.
- 231.Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and effects of weight loss. *FASEB J*. 1999;13:2051–60.
- 232.Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*. 2010;1(3):76-88.
- 233.Sirotkin AV, Grossmann R, María-Peon MT, Roa J, Tena-Sempere M, Klein S. Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;257–258:15–25.
- 234.Sliwowska JH, Fergani C, Gawalek M, Skowronska B, Fichna P, Lehman MN. Insulin: Its role in the central control of reproduction. *Physiol Behav*. 2014;133:197–206.
- 235.Sloth B, Krog-Mikkelsen I, Flint A, Tetens I, Björck I, Vinoy S, Elmståhl H, Astrup A, Lang V, Raben A. No difference in body weight decrease between a low-glycemic-index and a high-glycemic-index diet but reduced LDL cholesterol after 10-wk ad libitum intake of the low-glycemic-index diet. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:337-347.
- 236.Spicer, LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest. Anim. Endocrinol*. 2001;21: 251–270.
- 237.Stamets K, Taylor DS, Kunselman A, Demers LM, Pelkman CL, Legro RS. A randomized trial of the effects of two types of short-term hypocaloric diets on weight loss in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril*. 2004;81:630–637.
- 238.Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E57-63.
- 239.Stern L, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams M, Gracely EJ, Samaha FF. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomised trial. *Ann Intern Med*. 2004;140:778-785.

240. Stothard K, Tennant P, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;301:636–650.
241. Sullivan SD, Defazio RA, Moenter SM. Metabolic regulation of fertility through presynaptic and postsynaptic signaling to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*. 2003;23:8578–8585.
242. Swain JE, Dunn RL, McConnell D, Gonzalez-Martinez J, Smith GD. Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. *Biol Reprod*. 2004;71:1446–1452.
243. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2003;88:2335–2340.
244. Tannous dit El Khoury D, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. Variations in postprandial ghrelin status following ingestion of high-carbohydrate, high-fat, and high-protein meals in males. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(3):260-9.
245. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83(7):1263–1271.
246. Taylor A. ABC of subfertility: extent of the problem. *BMJ*. 2003;327: 434–436.
247. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002;143:717–25.
248. Tena-Sempere M. Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J. Endocrinol. Invest*. 2005;28:26–29.
249. Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction, ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm*. 2008;77:285–300.
250. Thomas T, Burguera B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res*. 2002;17(9):1563-9.
251. Thompson D, Karpe F, Lafontan M, Frayn K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev* 2012;92(1):157–91.
252. Tolino A, Gambardella V, Caccavale C, D’Ettore A, Giannotti F, D’Anto V, De Falco CL. Evaluation of ovarian functionality after a dietary treatment in obese women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2005;119:87–93.
253. Tong Q, Xu Y. Central Leptin Regulation of Obesity and Fertility. *Curr Obes Rep*. 2012;1(4):236–244.
254. Tropea A, Tiberi F, Minici F, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Miceli F, Catino S, Mancuso S, Sanguinetti M, Lanzzone A, Apa, R. Ghrelin affects the release of luteolytic and luteotropic factors in human luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2007;92:3239–3245.
255. Tzagareli V, Noakes M, Norman RJ. Effect of a very-low-calorie diet on in vitro fertilization outcomes. *Fertil Steril*. 2006;86:227–229.
256. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407:908-13.

257. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Postprandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001a;24:RC19–RC21.
258. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 2001b;50:707–9.
259. Umemoto Y, Tsuji K, Yang FC, Ebihara Y, Kaneko A, Furukawa S, et al. Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1997;90(9):3438–43.
260. Valckx SDM, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Fransen E, Bols PEJ, Leroy JLMR. BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod.* 2012;27(12):3531–3539.
261. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 2004;25(3):426–57.
262. van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Møller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3005–3010.
263. van Veen LJ, van den Dool GC, Rijnsaardt HGM, Lambers MDA. The development of a life style program aimed at weight reduction in obese patients with subfertility in a large district hospital, results after five years. *European Society of Human Reproduction and Embryology: Stockholm, 2011.*
264. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi S, Ferrari B, Ghizzoni L. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1476–81.
265. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant and adult human. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:1013–21.
266. Wade GN, Jones JE. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R1277–R1296.
267. Weigle DS, Cummings DE, Newby PD, Breen PA, Frayo RS, Matthys CC, Callahan HS, Purnell JQ. Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1577–86.
268. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr. AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796–1808.
269. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1785–1788.
270. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med.* 1995;333(23):1517–21.
271. Wilkes S, Murdoch A. Obesity and female fertility: a primary care perspective. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2009; 35(3):181–185.

272. Wittemer C, Ohl J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K, Nisand, I. Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome? *J. Assist Reprod Genet.* 2000;10:547–552.
273. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition.* 2000;16:894–902.
274. World Health Organization (WHO). *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic – Report of a WHO consultation on Obesity.* Geneva, 1998.
275. World Health Organisation (WHO). *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity.* Geneva, 2007.
276. World Health Organization (WHO). Acessado em 11/08/2014. <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/#.U9wy5lzdWw.e mail>. 2014a
277. World Health Organization (WHO). Acessado em 11/08/2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. 2014b.
278. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5992-95.
279. Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 2004;21:210-221.
280. Wu LL, Dunning KR, Yang X, et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology.* 2010;151(11):5438–5445.
281. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol.* 2005;184:291–318.
282. Yoshihara F, Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Kangawa K. Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:391–95.
283. Yu KC, Cooper AD. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001;6:D332-D354.
284. Yura S, Ogawa Y, Sagawa N, Masuzaki H, Itoh H, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Fujii S, Nakao K. Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J Clin Invest.* 2000;105:749-55.
285. Zaadstra BM, Seidell JC, Van Noord PA, te Velde ER, Habbema JD, Vrieswijk B, Karbaat J. Fat and female fecundity: prospective study of effect of body fat distribution on conception rates. *Br Med J.* 1993;306:484-487.
286. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S. ICMART/WHO. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO). Revised Glossary on ART Terminology. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683–2687.
287. Zhang W, Lei Z, Su J, Chen S. Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo–pituitary–ovary axis during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2008;109:356–67.
288. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–432.

CAPÍTULO V

5. MANUSCRITO ORIGINAL 1

EFFECTS OF A HYPOCALORIC DIET WITH LOW GLYCEMIC INDEX/LOAD ON BODY ADIPOSITY AND REPRODUCTIVE OUTCOMES IN OVERWEIGHT AND OBESE INFERTILE WOMEN UNDERGOING IVF TREATMENT: A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL

ABSTRACT

Introduction: Insulin resistance (IR) resulting from obesity is related to hormonal disorders that affect reproductive system. The low glycemic index (LGI) diet seems to exert a positive impact on obesity and the metabolic changes resulting from IR. **Objective:** To investigate the effect of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on anthropometric and metabolic parameters, ghrelin and leptin levels and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women candidates to *in vitro* fertilization (IVF). **Methods:** Randomized clinical trial analysing 26 infertile women with grade I and II obesity, or pre-obesity associated with increased waist circumference. Patients were assigned in the hypocaloric LGI diet group or control group (maintenance of usual diet), and followed the protocol for 12 weeks. Parameters evaluated: body weight, body mass index (BMI), body fat percentage (%BF), waist/hip ratio (WHR), glucose, insulin, HOMA-IR, serum lipids, reproductive hormones, gonadotrophin doses, number and quality of oocytes and embryos, fertilization and pregnancy rates. Compliance to the diets were evaluated by means of a 3-day food record assessed at baseline, week 6 (middle) and week 12 (completion of the study). **Results:** There was 5.5% weight loss and also reductions in BMI ($p < 0.001$), BF% ($p = 0.002$), WHR ($p < 0.001$) and glucose ($p = 0.034$) in the LGI group compared to control. The LGI diet group had 85.4% more oocytes

retrieved compared to the control group (7.75 ± 1.44 vs. 4.18 ± 0.87 , respectively, $p = 0.039$). The dose of gonadotrophins, the oocyte and embryo quality, and fertilization rate were similar between groups ($p > 0.05$). Three (21.4%) patients in the LGI group experienced spontaneous pregnancy during the follow-up, generating 3 live births. **Conclusion:** The 5.5% weight loss through the hypocaloric LGI diet was able to improve metabolic, reproductive and IVF outcomes when compared with women that not lose weight. These results support the clinical recommendation to advise overweight and obese women to lose weight through a balanced diet, preferably with low glycemic index/load, prior to be submitted to assisted reproduction technologies.

Key words: female infertility, diet, glycemic index, overweight, in vitro fertilization

INTRODUCTION

Infertility has been currently recognized as a disorder related to obesity (Loret de Mola, 2009). The impact of obesity on reproductive process involves, among others, sub or infertility, menstrual abnormalities, miscarriages, and increased risk of pregnancy complications (Pasquali et al., 2003; Jungheim et al., 2013). Furthermore, many studies have linked the increased body mass index (BMI) with negative impact on assisted reproduction technology (ART) outcomes. These negative outcomes include the need for higher doses of gonadotropins, a small number of oocytes retrieved, reduced pregnancy and live birth rates, and higher rates of miscarriages (Maheshwari et al., 2007; Metwally et al., 2007; Jungheim et al., 2009; Zang et al., 2010; Pandey et al., 2010; Jungheim; Moley 2010; Rittenberg et al., 2011a; Rittenberg et al. 2011b; Luke et al., 2011; Jungheim et al., 2013).

Among several metabolic changes associated with obesity, insulin resistance (IR) appears to be linked to hormonal disorders that affect reproductive system (Singla et al. 2010; Sliwowska et al., 2014). Hyperinsulinemia, resulting from abdominal obesity, leads to changes on LH and FSH pulses in the central nervous system (CNS) and increases steroidogenesis in the ovaries. In addition, leads to suppression of the hepatic synthesis of sex hormone binding globulin (SHBG), increasing the proportion of free androgen for aromatization and conversion to estrogen in the adipose tissue, leading, also, to increased free circulating estrogen bioavailability. All these changes have deleterious effects on oocytes, follicles and endometrium, and consequently on reproductive capacity (Parihar, 2003; Michalakis et al., 2013). Thus, when infertility is a problem associated with obesity, one of the main goals of the treatment to restore reproductive function is the normalization of IR, which can be obtained by weight loss and visceral fat reduction. According to McLean and Wellons (2012), there are few well-controlled randomized trials that have evaluated the effect of lifestyle modification specifically on fertility. Although limited, these studies demonstrate,

in addition to weight loss, effects such as improvements in the regularity of the menstrual cycle, reduction on visceral fat, hyperandrogenism and insulin resistance; increase in sex hormone binding globulin (SHBG) and on ovulation and pregnancy rates (Clark et al., 1998; Huber-Buchholz et al., 1999; Parihar, 2003; ESHRE/ASRM, 2008; Moran et al., 2009).

Approximately 15% of women undergoing ARTs are overweight or obese (Lintsen et al., 2005). Access to ARTs is restricted in some countries, and as weight loss in overweight/obese women has been shown to increase rates of pregnancy and improve the natural course of pregnancy (Hollmann et al., 1996), women who have an increased BMI have been advised to lose weight before undergoing ARTs.

Despite of the benefits of weight loss for obese infertile women be well established in the literature, there are few studies that evaluated the relationship between fertility and diets with different compositions. Compared to standard diets, restriction or modification of carbohydrates quality seems to reflect benefits in some parameters such as energy expenditure (Pereira et al., 2004), triglyceride and HDL-cholesterol levels, and glucose homeostasis (Hu, 2005). In addition, carbohydrate-rich foods with low glycemic index (LGI) seem to improve insulin sensitivity and increase the potential for weight loss when compared to low fat diets ad libitum (Hu, 2005). Thus, LGI foods can benefit body weight control mainly by promoting satiety and fat oxidation instead of carbohydrate oxidation (Brand-Miller et al., 2002).

Among several strategies to reduce body weight, the LGI diet has been a strategy in the management of obesity. However, there are limited studies on the effect of the LGI diet on reproductive outcomes, especially during ARTs. We hypothesized that, in infertile overweight women, the LGI diet would reflect an additional benefit, mainly because of its positive effect on glucose and insulin levels that this type of diet seems to have. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on

anthropometric and metabolic parameters, ghrelin and leptin levels and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women candidates to *in vitro* fertilization (IVF).

SUBJECTS AND METHODS

Women diagnosed with female infertility (irrespective of their infertility diagnosis), body mass index (BMI) $> 30 \text{ kg/m}^2$ or BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$ associated with waist circumference $> 80 \text{ cm}$, and undergoing IVF were eligible for the study. In addition, participants should have stable body weight in the last three months prior to the study, have no stomach/digestive problems, have no cardiovascular disease, not smoking, and not being on medication. Exclusion criteria were: BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, following any other type of nutritional intervention, comorbidities that could interfere in reproductive ability (genetic and endocrine disorders, diabetes mellitus, cancer, liver or kidney failure), alcoholics, patients who have contact (work) with heavy metals or chemicals (exposure to solvents and pesticides). The patients were questioned about their level of physical exercise on the topics: modality, frequency (number of times/week), and duration (in minutes). In this study, all patients analysed did not practice any physical exercise and were advised not to start any activity during the study follow-up, in order to maintain the same level of caloric expenditure and isolate the effect of the dietary intervention. Thirty-five women commenced the intervention and were randomised to LGI diet group (16) or control group (19). Nine women dropped out of the study (two diet LGI group, seven control). Fourteen women completed the diet intervention, and twelve women completed the control protocol (Figure 1). Of the 26 patients analyzed, 4 had polycystic ovary syndrome - PCOS (1 patient in the control and 3 in LGI diet group), but in all cases associated with one or more other causes of female infertility. The study protocol complied with the Declaration of Helsinki, was approved by the Hospital de Clínicas de Porto

Alegre Ethics Committee, and all subjects gave written informed consent to participate in the study.

*****INSERT FIGURE 1.*****

Study Design

Randomized Clinical Trial (RCT). This study followed the randomized block design. Blinding was not possible to perform in this RCT, because of the active participation of the patients and the care providers, that were necessary throughout the study protocol.

Patients were referred from Public Primary Care Units to the Unit of Obstetrics and Gynecology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. After their medical diagnose of infertility, the patients were organized on a waiting list to perform the IVF cycle. Patients were recruited from this list, in chronological order of entrance. The patients selected were participating on their first cycle of IVF. The period of recruitment and follow-up was between January 2012 and December 2013. All dietary advices were provided by a qualified nutritionist.

Preliminary visit: personal data and anthropometric measures to assess the inclusion/exclusion criteria were collected. Patients who met the criteria and accepted to participate on the study received general advice about the follow-up protocol and were instructed to complete their first Three-Day Food Record (3DFR).

Basal Visit (week 0): to start the study protocol, patients should attend the hospital between the 2nd and the 4th day of their menstrual cycle. In this day, blood samples were drawn after twelve hours overnight fast to asses hormonal and metabolic parameters; anthropometric data was also performed. Body mass and height were recorded for the calculation of BMI (body mass (kg)/height(m²)). Waist circumference (WC) was measured in the midway position between the lowest rib margin and the iliac crest, near the umbilicus. Hip

circumference (HC) was taken at the maximal gluteal protrusion (lateral view). The skinfolds were measured at seven sites (triceps, subscapular, pectoral, axillary, abdomen, suprailiac, and thigh) using a Lange caliper (Beta Technology Inc., Cambridge, Md., USA), according to the method recommended by the International Society for the Advancement of Kinanthropometry (Marfell-Jones et al., 2006), and were used to calculate the body fat percentage (Jackson; Pollock 1978). Patients presented their first 3DFR (baseline) and were randomized into one of two groups: 1) LGI diet group; or 2) control group. From this visit, patient began to follow the proposed protocols, which should be maintained for the next 12 weeks.

Intermediate visit (week 6): nutritional advices were reinforced, anthropometric measurements were collected (body mass, waist and hip circumferences) and the adherence of the patients to proposed diets was verified through another 3DFR (intermediate).

Final visit (week 12): To finalize the follow-up protocol patients should attend the hospital between the 2nd and the 3rd day of their menstrual cycle. In this day, the same protocol of the Basal Visit was repeated. Patients presented their last 3DFR (final). Immediately after the end of the follow-up, patients started the ovarian stimulation protocol to perform the IVF cycle.

Dietary intervention

Patients were randomized to: 1) control group - patients were instructed to maintain their food intake habits; or 2) hypocaloric diet with low glycemic index (GI)/load (GL) - LGI diet group. In this study, foods with $GI < 55$ were classified as being of low GI. A low GL was classified as a daily value < 80 (www.glycemicindex.com). The intervention diet was designed as a moderate reduced-energy, moderate-to-high fiber, low GI/GL diet. The diet was planned to provide around 50% of calories from carbohydrate, 20% from proteins and 30% from lipids. Calorie content of the diet was individualized, each patient received an equivalent

of 20 kcal/kg of current body weight (Martins; Cardoso 2000). Diet was prescribed by using household measures or kitchen utensils to quantify food portions in each meal. Portion size of foods varied on the menu according to the caloric intake offered to each patient. Participants received a list of equivalents, separated by categories of foods to replace foods prescribed in the diet according to food category (eg, dairy products, fruits, etc). All food contained in the list of equivalents had low glycemic index. Researchers provided olive oil and dried fruits (Uniagro®, RS, Brazil) to patients in the LGI diet group during all the 12-week intervention. A high intake of vegetables (mainly raw) and salads was encouraged, and the intake of added sugars and alcohol was discouraged. The food composition of the intervention diet is presented in Table 1.

*****INSERT TABLE 1.*****

All participants were asked to keep a 3-day food record - including two week days and one weekend day - at baseline, 6-weeks after starting the dietary intervention, and at the completion of the study. To detail accurately and standardize the description of food portions, all patients received a portfolio with photos, that was prepared based on the Photo-Registry for Dietary Surveys (Zabotto, 1996). The energy, macronutrients and dietary fiber content of the diets were calculated by a nutritionist with the assistance of the software Nutribase 7 (USDA, 2008). Commonly eaten branded foods for which nutritional data were available, were added to the database of the software. Carbohydrate-intake data were exported from the software and used to measure the dietary GI and GL. The GI of individual foods was assigned according to published values on the basis of glucose as the reference food (Atkinson et al., 2008). When a published value was not available, the GI was estimated according to van Bakel et al. (2009). The GI for each food item was multiplied by the proportion of total carbohydrate contributed by the food to obtain a GL. The daily GL was calculated by summing the GL values for each food item for that day.

Blood biochemistry

Blood samples for the analysis of glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, progesterone, prolactin, testosterone, and sex hormone-binding globulin (SHBG), were stored in tubes without anti-clotting and determined at the Laboratory of Patologia Clínica of HCPA, using conventional methods. Insulin Resistance was determined using the *Homeostasis Model Assessment* (HOMA1-IR): $\text{HOMA1-IR} = \text{fasting glucose (mg/dl/18)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml})/22,5$ (Mattews et al., 1985); and the HOMA2-IR, obtained by the program HOMA Calculator v2.2.2 (OCD, 2014). Free testosterone was estimated as total testosterone (nmol/l)/SHBG (nmol/l) x 100.

Reproductive Outcomes

An ultrasound scan was performed early in the cycle to ensure the absence of ovarian cysts, then a dose of 200 UI of recombinant FSH (r-FSH) were administered for four days (days 3, 4, 5 and 6 of the menstrual cycle), followed by 150 UI of human menopausal gonadotrophin (HMG) daily. Follicular growth was monitored by ultrasound and when at least one follicle reached an average diameter of 14 mm, a daily dose of 0.25 mg of cetrorelix acetate was administered. The ultrasonographic monitoring of follicle growth continued until the day when at least one follicle reached an average diameter of 17 mm. On this day a dose of 250 µg of alfacorionadotropin was administered to promote oocyte maturation. The ovarian follicle aspiration was made 34-36 hours after alfacorionadotropin application.

Oocyte quality was classified as follows: **Immature (M1)**: small or large cumulus with little filament. Compact corona forming a dense cover around the oocyte; **Intermediate (M2)**: large cumulus, dispersed and filamented. Corona still dark and compact around the

oocyte, but starting dispersion; **Mature (M3)**: large cumulus, dispersed and filamented. Characteristic corona, with no space between cells, with no ray format, the limits of the oocyte can be seen. M3 is the one with the best chance of fertilization and development; **Post-mature (M4)**: highly dispersed cumulus, large or small by its fragmentation. Very filamented and non existent corona. Oocyte can be clearly identified, the first polar body can be observed (RedLara, 2006).

The quality of the embryos was determined by calculating the Embryo Score, wich was obtained by observing the **cleavage** (presence - 1; absence - 0); **embryo stage** (four cells - 1; other stages - 0); **cell irregularity** (absence - 1; presence - 0); **cell fragmentation > 20%** (absence - 1; presence - 0), where the top quality embryo receives note 4 (Terriou et al., 2001).

The fertilization, clinical pregnancy and live birth rates were determined, respectively, as follows: number of embryos obtained/total number of oocytes x 100; number of clinical pregnancies/total number of patients in the group x 100; and number of live births/total number of pregnancies in the group x 100.

Statistical analyses

All data were analyzed with the assistance of the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). To compare the means of metabolic, hormonal, anthropometric and reproductive outcomes of the two groups (intervention and control) measured at two moments (pre and post) the Generalized Estimation Equation (GEE) with unstructured work correlation was performed, to be able to handle the dependency between observations of the same subject. Because of the small sample size we did not use the factorial model (group + moment + group + moment) instead we used control-pre + control-post + intervention-post and took as reference, measurements

made in the “pre” moment of the intervention group. GEE was also conducted to analyze diet composition in both groups. Relationships were explored using the coefficient of linear correlation of Pearson or Spearman. Independent t test or Mann-Whitney test were conducted when relevant. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm standard error.

RESULTS

Baseline characteristics of participants were similar in both groups (Table 2), except for the waist/hip ratio (WHR) that was higher in the LGI diet group in the beginning of the study.

*****INSERT TABLE 2.*****

Antropometric, Metabolic and Hormonal Parameters

There was a reduction of 5.5% of body weight in patients of the LGI group, while patients in the control group had an increase in body weight of 0.9% (-4.51 ± 0.83 vs. 0.72 ± 0.75 kg, respectively, $p < 0.001$). There were also reductions in BMI (Figure 2A), %BF (Figure 2B), WHR (-0.03 ± 0.00 vs. 0.01 ± 0.00 , respectively, $p < 0,001$), hip circumference (-3.99 ± 0.85 vs. -0.25 ± 0.59 , respectively, $p < 0.001$) and glucose (Figure 2C); and estradiol levels were higher (44.90 ± 3.96 vs. 41.72 ± 2.45 , respectively, $p = 0,049$) in the LGI diet group compared to control group. The remaining variables showed no significant differences between groups (Table 3).

*****INSERT FIGURE 2.*****

*****INSERT TABLE 3.*****

Reproductive and IVF Outcomes

The LGI diet group had 85.4% more oocytes retrieved compared to control group (7.75 ± 1.44 vs. 4.18 ± 0.87 , respectively, $p = 0.039$). There was a negative correlation between the number of oocytes retrieved with BMI ($r^2 = -0.542$, $p = 0.020$) and %BF ($r^2 = -0.475$, $p = 0.040$). The dose of gonadotrophins, the oocyte and embryo quality, and fertilization rate were similar ($p > 0.05$) between groups (Table 4). Clinical pregnancy rate was 21.4% in the LGI diet group, since three of fourteen patients experienced spontaneous pregnancy during the follow-up, generating three live births – live birth rate of 100%. There were no pregnancies, and consequently, there were no live births in the control group.

*****INSERT TABLE 4.*****

Diet compliance

Analysis of dietary food records showed that, in the control group, there were no differences in diet composition (caloric intake, macronutrients distribution, dietary fiber and glycemic load) between the target diet (usual diet) and the actual diet (Table 5). In the LGI diet group, there were no differences in macronutrients distribution and glycemic load between the target and the actual diet, but the caloric intake was a little lower than the target basically due to a protein intake (grams) below of the target (Table 5). The average dietary fiber intake was also below of the target in LGI diet group, although higher than the patient's habitual (baseline) consumption ($p = 0.016$). Comparing the actual diet consumed in both groups the analysis showed, as expected, that the caloric intake and glycemic load were lower, and the dietary fiber intake was higher in LGI diet group compared to control. The macronutrients distribution was similar between groups, except for protein. It was also expected, since the protein target planned in the diet of the LGI diet group, provided an increase in the proportion of protein compared to the patient's usual consumption (Table 5).

*****INSERT TABLE 5.*****

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that demonstrated the positive effect of a hypocaloric diet composed by low glycemic index/load foods not only on metabolic and hormonal parameters (body adiposity, fasting glycemia, estradiol levels) but also on reproductive and IVF outcomes (improvement of the number of oocytes retrieved, pregnancy and live birth rates).

Overweight and obesity are related to infertility. Lifestyle modification programs (especially diet programs) have been shown to be associated with poor levels of compliance (Moran et al., 2003). This is particularly complicated in stressful situations, as infertility. The individualization of the program, the monitoring and support by an expert health professional are aspects that increase treatment compliance (Moran et al., 2009). In this study we offered to overweight infertile women a diet with moderate calorie restriction and low glycemic index/load foods. The proposal was to provide a diet that: patients could have a good compliance (as it was not a highly restricted calorie diet), that could be easy to apply in clinical practice, composed by foods easily to acquire by patients from a public hospital and that offers, in theory, the additional benefit of a better quality carbohydrates.

Diet histories, 24-h recalls, food-frequency questionnaires, weighed diet records, and food diaries have been used in epidemiologic and clinical research to assess the dietary intake of individuals (Eppright et al., 1952; Viberti et al., 1987; Azevedo et al., 1990; MacDowell et al., 1994; Willett, 1994). However, all the information must be given by the subjects themselves, and this information may be incorrect. The measurement of 24-h urinary nitrogen excretion is a reliable index that could be used to evaluate protein intake. However, there is no biochemical index for analyzing the type of carbohydrate eaten or its glycemic index.

Therefore, one must rely on the patient's information to assess the glycaemic index/load of the foods eaten. Moulin et al. (1998) conducted a randomized clinical trial with diabetes mellitus type 2 patients that consumed diets with different types and quantities of protein. The authors assumed accord between total protein intake evaluated by dietary assessment methods and that calculated by nitrogen output, and the study indicates that the patient's information is reliable. The underreporting is more prevalent among women, overweight or obesity subjects and increases with age (Macdiarmi, Blundell 1998) and this was, therefore, a challenge for this trial. During this study it was not possible to measure 24-h urinary nitrogen to validate the diet records due to the menstrual cycle and consequently blood cells nitrogen contamination. However, patients lost weight and several metabolic and anthropometric parameters have changed after the intervention, which seems to indicate diet compliance. Maybe the counseling with a clinical nutritionist over the diet period could have helped to have a better compliance to the dietetic treatment.

Substantial weight loss, although desirable, is not essential for the success of the restoration of reproductive function in obese patients (Parihar, 2003). The available studies demonstrate that a relatively small weight loss (from 5 to 10%), obtained by caloric restriction in the long term (5 to 6 months) may improve metabolic and reproductive parameters of obese infertile women (Parihar, 2003; ESHRE/ASRM, 2008, Moran et al., 2009). Diets that offer between 1200-1500 kcal/day appear to be equally beneficial when compared to more restrictive diets and have better compliance rates (Moran et al., 2009). In addition, a very fast weight loss achieved by very low calorie diets (VLED) or excessive exercise appear to be detrimental to reproductive outcomes during fertility treatments. In this way, for the effectiveness of weight loss it must be gradual and sustained (Pandey et al., 2010). The total calories consumed in the dietary intervention of this study, i.e. 1332 kcal in average, were according to those proposed in most studies and was effective for achieving 5.5% of weight

loss, an important goal proposed by the main guidelines, in the 12 weeks prior to IVF cycle. The dropout rate of only 12.5% (2 of the 16 patients randomized) throughout the study in the intervention group evidenced a good compliance to the proposed treatment.

Many studies suggest that high carbohydrates-low protein diets with a low glycemic load shows benefits for body weight and cardiovascular risk reduction (Bouche et al., 2002; Pereira et al., 2004; Brynes et al., 2003; Ebbeling et al., 2005). Some of these results were also observed in this study; i.e, the proposed low glycemic index/load diet was effective in promoting weight loss, reduction of %BF, WHR, and fasting glucose levels in the intervention group. However, the study failed in evidence reduction in insulin levels and HOMA-IR indexes. Similar studies analysing the effect of the glycemic index of the diet (high vs. low) on weight loss of non PCOS women, with a similar duration of our study, also failed in demonstrate changes in insulin levels and/or HOMA-IR, independent of the group (McMiller-Price et al., 2006; Schieri et al., 2007). Other studies with the same objective were able to demonstrate this effect, but the duration of the intervention was longer (≥ 6 months) than this work (Juanola-Falgarona et al., 2014; Schwingshackl e Hoffmann, 2013). In the present study, only 15% of the patients evaluated had PCOS. Analyzing the effect of diets for weight loss, regardless of composition, studies with similar or greater duration than ours, were able to demonstrate improvements in insulin levels, HOMA-IR and insulin sensitivity index calculated using the oral glucose tolerance test - ISI_{OGTT} (Clark et al., 1995; Moran et al., 2003; Stamets et al., 2004; Marsh et al., 2010; Mehrabani et al., 2012) in PCOS patients, women who have different characteristics of our patients. Thus, both, the duration of the intervention and the characteristics of the patients seem to influence the responses of insulin and insulin sensitivity in studies involving dietary interventions.

Few studies have evaluated fertility and diets with different glycemic indexes/ loads. Marsh et al. (2010) conducted a study in 96 PCOS women and showed that with a modest

weight loss (4-5% of body weight) a moderate carbohydrate diet with low GI provided an improvement on menstrual regularity when compared to conventional low-calorie diet. On the other hand, high carbohydrates diets with high glycemic index appear to be associated with increased risk of anovulatory infertility (Chavarro et al., 2009). Thus, the type of carbohydrates offered on the diet appears to result in different effects on reproductive outcomes. The study of Marsh et al. (2010) offered in their intervention group diet a quite similar glycemic load as prescribed to the intervention group in our study (74 vs. 75). The weight loss associated to the LGI diet in our study, as in the cited study, was able to promote substantial improvements on reproductive outcomes on the intervention group, compared to control group.

After losing weight, patients in the LGI diet group had 85.4% more oocytes retrieved and higher levels of estradiol compared to patients in the control group. We also found a moderate negative correlation between the number of oocytes retrieved with BMI and %BF. A study evaluating morbidly obese women also found that the group who lost weight had a greater number of oocytes when compared to women who did not lose weight (Awartani et al., 2012). A systematic review and a large cohort study showed that in comparison with women of normal weight, overweight women have significantly fewer oocytes retrieved (Maheshwari et al., 2007; Zang et al., 2010). Some studies have shown that although they may produce the same number of visible follicles during controlled ovarian hyperstimulation, obese women have significantly lower estradiol levels than women of normal weight. This suggests that there is something different involved in the way how the ovary of obese women respond to gonadotrophins stimulation (Shah et al., 2011; Jungheim et al., 2009). The control group had lower levels of estradiol in the beginning of ovarian stimulation compared to the LGI group, suggesting a lower oocyte recruitment, and this may be a possible explanation for the patients in this group have had lower number of oocytes retrieved. Chavarro et al., (2012)

demonstrated that losing weight prior to initiation of ART was related to higher yield metaphase II oocytes, particularly among women who were overweight or obese at baseline. However, in the present study, the quality of the oocytes retrieved did not differ between groups. This is confirmed by Metwally et al. (2007), that suggest in their study that oocyte quality appear not be affected by BMI.

A systematic review and a large cohort study of IVF outcomes showed that overweight women required higher doses of gonadotrophin compared with normal weight patients (Maheshwari et al., 2007; Li et al., 2010). We were not able to demonstrate this effect in our study, since there were no differences in gonotrophin doses used in both groups. The exactly why patients with greater body mass appear to require higher doses of gonadotrophin, despite some hypotheses, remains unclear. In the present study, although not observing differences in dose, the effect of the gonadotrophin on ovary may have been different, since the patients who lost weight had more oocytes developed than those who maintained their body weight.

Despite of the higher number of oocytes retrieved in the LGI group, there were no differences in fertilization rate and quality of embryos between the groups. Although some studies showed that comparing with women of normal weight, overweight women have lower fertilization rates, fewer cleaved embryos and fewer high-grade embryos (Zang e tal., 2010; Metwally et al., 2007), other studies concluded that the embryo quality was not impaired in overweight and obese women (Dechaud et al., 2006; Bellver et al., 2010, Shah et al., 2011). Chavarro et al., (2012) demonstarted that losing weight prior to the beginning of ART was unrelated to the proportion of poor quality embryos and found no relation between BMI and fertilization rate. Simirlarly, the present study, is consistent with the literature, showing the lack of association between the BMI with fertilization rate and embryo quality. Although large studies have already been conducted to verify the effect of overweight and obesity on

assisted reproduction outcomes, the literature have a lack of studies on the effects of weight loss on these same outcomes and many of them remains unclear. Our work contributes to elucidate at least in part, some of these aspects.

In the present study there were three spontaneous pregnancies (21.4%) and these pregnancies generated three live births (100%) in the LGI diet group. A recent systematic review (Sim et al., 2014a) identified seven studies investigating the effect of a dietary intervention in overweight or obese women before treatment with ARTs (Sim et al., 2014b; Moran et al., 2011b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996; van Veen et al., 2011; Awartani et al., 2012). Four of these seven studies reported a significant improvement in pregnancy rates and/or live births compared to the control groups (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996). Of the remaining studies, two reported a non-significant trend towards an increase in pregnancy rates (Moran et al., 2011b; Awartani et al., 2012) and one study reported a small reduction in these values (van Veen et al., 2011). It was also observed that, as in our study, weight loss was associated with increases in natural pregnancies (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al., 1996), eliminating the need for fertility treatment.

This study has some limitations. The small sample size and the relative short duration of the intervention, may have limited the power to detect changes in some outcomes, including changes in HOMA-IR, oocyte and embryo quality and fertilization rate. Thus, future studies with a larger sample and a longer time of intervention are needed to confirm our results. In addition, it would also be desirable in the future to evaluate these same outcomes counting with an additional group of a conventional diet for weight loss (ie, a high glycemic index diet) to access the isolated effect of the glycemic index/load of the diet, independent of weight loss, on the study outcomes.

CONCLUSION

This study, despite the relative short time of intervention and have been developed immediately before the beginning of the IVF cycle, showed that the 5.5% weight loss through the LGI diet with moderate reduction in calories, was able to improve metabolic, reproductive and IVF outcomes when compared with women in the control group who did not lose weight. These results support the clinical recommendation to advise overweight and obese women to lose weight through a balanced diet, preferably with low glycemic index/load, prior to be submitted to assisted reproduction technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) of HCPA for their financial support. We also thank to Uniagro® for providing some of the foods used during the study intervention, to Karina Monteiro for her technical support, and the volunteers who participated in this study.

REFERENCES

1. Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care*. 2008;31:2281–3.
2. Awartani KA, Al-Sahan N, Al-Hassan SH, Coskun S. Effect of weight loss in morbidly obese infertile women on IVF outcome. *Fertil Steril*. 2012; 98: S204.
3. Azevedo MJ, Padilha LM, Gross JL. A short-term low-protein diet reduces glomerular filtration rate in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Braz J Med Biol Res* 1990;23:647–54.
4. Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, et al. Female obesity impairs *in vitro* fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril*. 2010;93:447–54.
5. Bouche C, Rizkalla SW, Luo J, Vidal H, Veronese A, Pacher N, Fouquet C, Lang V, Slama G. Five-week, low-glycemic index diet decreases total fat mass and improves plasma lipid profile in moderately overweight nondiabetic men. *Diabetes Care*. 2002;25:822-828.
6. Brand-Miller JC, Holt SHA, Pawlak DB, McMillan J. Glycemic index and obesity. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(suppl):281S–5S.
7. Brynes AE, Mark Edwards C, Ghatei MA, Dornhorst A, Morgan LM, Bloom SR, Frost GS. A randomised four-intervention crossover study investigating the effect of carbohydrates on daytime profiles of insulin, glucose, non-esterified fatty acids and triacylglycerols in middle-aged men. *Br J Nutr*. 2003;89:207-218.
8. Chavarro JE, Ehrlich S, Colaci DS, Wright DL, Toth TL, Petrozza JC, Hauser R. Body mass index and short-term weight change in relation to treatment outcomes in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2012;98(1):109–116
9. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. A prospective study of dietary carbohydrate quantity and quality in relation to risk of ovulatory infertility. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63(1):78–86.
10. Clark AM, Ledger W, Galletly C, Tomlinson L, Blaney F, Wang X, Norman RJ. Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod*. 1995;10(10):2705–12.
11. Clark AM, Thornley B, Tomlinson L, Galletley C, Norman RJ. Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of fertility treatment. *Hum Reprod*. 1998; 13: 1502–1505.
12. Dechaud H, Anahory T, Reyftmann L, Loup V, Hamamah S, Hedon B. Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 2006; 127:88–93.
13. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Seger-Shippe LG, Feldman HA, Ludwig DS. Effects of an ad libitum reduced glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:976-982.
14. Eppright ES, Patton MB, Marlatt AL, Hathaway ML. Dietary study methods v. some problems in collecting dietary information about groups of children. *J Am Diet Assoc* 1952;28:43–8.
15. ESHRE/ASRM - Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23(3):462–477.
16. Galletly C, Clark A, Tomlinson L, Blaney F. A group program for obese, infertile women: weight loss and improved psychological health. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 1996;17:125–128.
17. Hollmann M, Runnebaum B, Gerhard I. Effects of weight loss on the hormonal profile in obese, infertile women. *Hum Reprod*. 1996;11:1884–1891.

18. Hu FB. Protein, body weight and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(suppl.):242S-247S.
19. Huber-Buchholz M, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1470-4.
20. Jackson, AS, Pollock, ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* 1978;40(3): 497-504.
21. Juanola-Falgarona M, Salas-Salvado J, Ibarrola-Jurado N, Rabassa-Soler A, Díaz-Lopez A, Guasch-Ferre M, Hernandez-Alonso P, Balanza R, Bullo M. Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014;100:27-35.
22. Jungheim E, Lanzendorf S, Odem R, Moley K, Chang A, Ratts V. Morbid obesity is associated with lower clinical pregnancy rates after in vitro fertilization in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2009;92:256-261.
23. Jungheim ES, Moley KH. Current knowledge of obesity's effects in the pre- and periconceptional periods and avenues for future research. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:525-530.
24. Jungheim ES, Travieso JL, Hopeman MM. Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutrition Reviews* 2013;71(Suppl.1):S3-S8.
25. Li Y, Yang D, Zhang Q. Impact of overweight and underweight on IVF treatment in Chinese women. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26:416-22.
26. Lintsen AME, Pasker-de Jong PCM, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, van Leeuwen FE. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod.* 2005; 20:1867-1875.
27. Loret de Mola, JR. Obesity and its relationship to infertility in men and women. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2009;36(2):333-46.
28. Luke B, Brown MB, Missmer SA, Bukulmez O, Leach R, Stern JE. The effect of increasing obesity on the response to and outcome of assisted reproductive technology: a national study. *Fertil Steril.* 2011;96(4):820-825.
29. Macdiarmid J, Blundell J. Assessing dietary intake: Who, what and why of under-reporting. *Nutr Res Rev.* 1998;11: 231-253.
30. MacDowell MA. The NHANES III Supplemental Nutrition Survey of Older Americans. *Am J Clin Nutr* 1994;59(suppl):224S-6S.
31. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology - A systematic review. *Hum Reprod Update* 2007;13:433-44.
32. Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A., and Carter, J.E.L. 2006. International standards for anthropometric assessment. North-West University, Potchefstroom, RSA.
33. Marsh JA, Steinbeck KS, Atkinson FS, Petocz P, Brand-Miller JC. Effect of a low glycemic index compared with a conventional healthy diet on polycystic ovary syndrome. *Am. J Clin Nutr.* 2010;92:83-92.
34. Martins C, Cardoso SP. *Terapia Nutricional Enteral e Parenteral. Manual de rotina técnica.* METHA, Curitiba, Brazil. 2000.
35. Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Trecher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-9.
36. McLean M, Wellons MF. *Optimizing Natural Fertility: The Role of Lifestyle Modification.* *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2012;39:465-477.
37. McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, O'Neill K, Samman S, Steinbeck K, Caterson I, Brand-Miller J. Comparison of 4 Diets of Varying Glycemic Load on Weight Loss and

- Cardiovascular Risk Reduction in Overweight and Obese Young Adults: A Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med.* 2006;166:1466-1475.
38. Mehrabani HH, Salehpour S, Amiri Z, Farahani SJ, Meyer BJ, Tahbaz F. Beneficial effects of a high-protein, low-glycemic-load hypocaloric diet in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled intervention study. *J Am Coll Nutr.* 2012;31(2):117-25.
 39. Metwally M, Cutting R, Tipton A, Skull J, Ledger WL, Li TC. Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:532–8.
 40. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2013;62:457–478.
 41. Moran L, Tsagareli V, Norman R, Noakes M. Diet and IVF pilot study: short-term weight loss improves pregnancy rates in overweight/obese women undertaking IVF. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011;51:455–459.
 42. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:812-9.
 43. Moran LJ, Pasquali R, Teede HJ, Hoeger KM, Norman RJ. Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Fertil. Steril.* 2009;92:1966–1982.
 44. Moulin CC, Tiskievicz F, Zelmanovitz T, Oliveira J, Azevedo MJ, Gross, JL. Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:853-857.
 45. Oxford Centre for Diabetes - OCD. Endocrinology and Metabolism. Diabetes Trial Unit. HOMA Calculator. Available from: <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/> Accessed October 2014.
 46. Pandey S, Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *J Hum Reprod Sci.* 2010;3(2):62-67.
 47. Parihar M. Obesity and infertility. *Reviews in Gynaecological Practice.* 2003;3:120–126.
 48. Pasquali R, Petrusi C, Gerghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update.* 2003;9:359–372.
 49. Pereira MA, Swain J, Goldfine AB, Rifai N, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load diet on resting energy expenditure and heart disease risk factors during weight loss. *JAMA.* 2004;292:2482-2490.
 50. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida – RedLara. Manual de Procedimientos Laboratorio de Reprodução Assistida. 2006. Available on: http://www.redlara.com/images/arq/livreto_port_01_2007.pdf
 51. Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, Sobaleva S, Oteng-Ntim E, El-Toukhy T. Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reprod BioMed Online.* 2011a;23:421–439.
 52. Rittenberg V, Sobaleva S, Ahmad A, Oteng-ntim E, Bolton V, Khalaf Y, Braude P, El-Toukhy T. Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 2011b;26(10):2642–2650.
 53. Schwingshackl L, Hoffmann G. Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23:699-706.
 54. Shah DK, Missmer SA, Berry KF, Racowsky C, Ginsburg ES. Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gynecol.* 2011;118:63-70.

55. Sichieri R, Moura AS, Genelhu V, Hu F, Willett WC. An 18-mo randomized trial of a low-glycemic-index diet and weight change in Brazilian women. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:707–13.
56. Sim KA, Partridge SR, Sainsbury A. Does weight loss in overweight or obese women improve fertility treatment outcomes? A systematic review. *Obesity Reviews.* 2014a;15:839–850.
57. Sim KA, Dezarnaulds GM, Denyer GS, Skilton MR, Caterson ID. Weight loss improves reproductive outcomes for obese women undergoing assisted reproductive technology: a randomised controlled trial. *Clin Obes.* 2014b; 14: 792–805.
58. Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes.* 2010;1(3):76-88.
59. Sliwowska JH, Fergani C, Gawalek M, Skowronska B, Fichna P, Lehman MN. Insulin: Its role in the central control of reproduction. *Physiol Behav.* 2014;133:197–206.
60. Stamets K, Taylor DS, Kunselman A, Demers LM, Pelkman CL, Legro RS. A randomized trial of the effects of two types of short-term hypocaloric diets on weight loss in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81:630–7.
61. Terriou P, Sapin C, Giorgette C, Hans E, Spach JL, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age, fertility and sterility 75: 525-531, 2001.
62. van Bakel MME, Slimani N, Feskens EJ, et al. Methodological challenges in the application of the glycemic index in epidemiological studies using data from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *J Nutr.* 2009;139:568–75.
63. van Veen LJ, van den Dool GC, Rijnsaardt HGM, Lambers MDA. The Development of a Life Style Program Aimed at Weight Reduction in Obese Patients with Subfertility in a Large District Hospital, Results After Five Years. *European Society of Human Reproduction and Embryology: Stockholm, 2011.*
64. Viberti GC, Boggetti E, Wiseman MJ, Dodds R, Gross JL, Keen H. Effect of protein-restricted diet on renal response to a meat meal in humans. *Am J Physiol* 1987;253:F388–93.
65. Willett WC. Future directions in the development of food-frequency questionnaires. *Am J Clin Nutr* 1994;59(suppl):171S–4S.
66. Zabotto, CB. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos: utensílios e porções. UNICAMP, São Paulo, Brazil. 1996.
67. Zhang D, Zhu Y, Gao H, Zhou B, Zhang R, Wang T, Ding G, Qu F, Huang H, Lu X. Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and invitro fertilization: A cohort study of 2628 Chinese women. *Gynecological Endocrinology.* 2010;26:325–32.

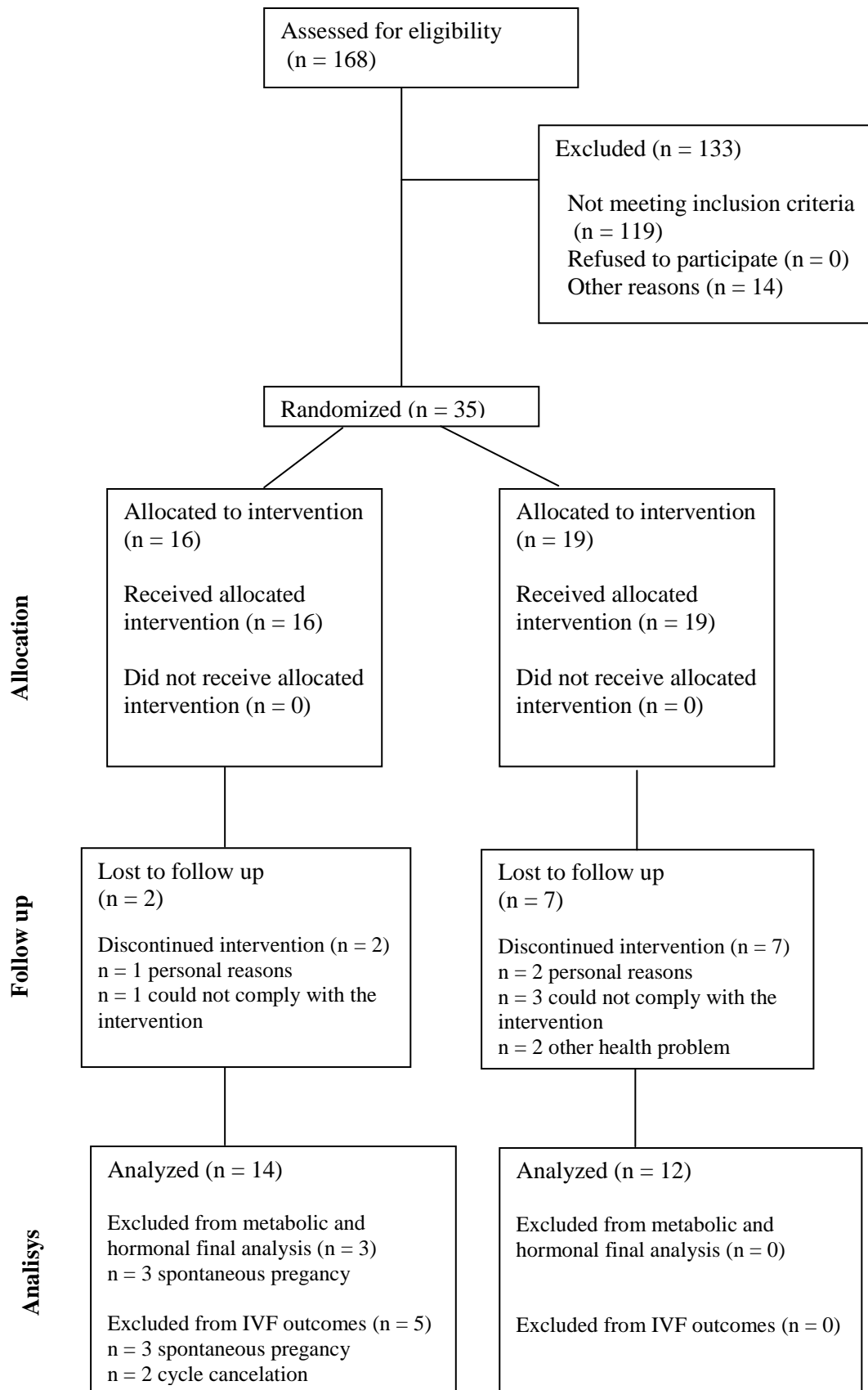


Figure 1. Flow of participants through the trials comparing a low glycemic index (LGI) diet group with a control group.

Table 1. Intervention Diet food composition

Meal	Composition
Breakfast	1 cup (200 ml) of milk 1-2 slices of whole-grain bread 1-2 tea spoon of margarine 1 portion of a low glycemic index fruit (2 slices of ricotta cheese) ¹
Snack	1 portion of a low glycemic index fruit
Lunch	3-5 table spoons of brown rice 1-1 and ½ ladle of black beans 1 portion of a lean meat free vegetables of A ² group 2-4 table spoons of raw vegetables of B ³ group 1 tea spoon of olive oil
Snack	1 portion of a low glycemic index fruit (1-2 table spoon of rolled oats) ¹
Dinner – Option 1	equal to lunch, without black beans
Dinner – Option 2	2-3 slices of whole-grain bread 2-3 tea spoon of margarine 2 slices of ricotta cheese (1 slice of ham) ¹ free vegetables of A ² group 1 portion of a low glycemic index fruit (1-2 table spoon o rolled oats) ¹
Snack	1 portion of dried fruits

¹Food between brackets, were present or not on the menu, according to the calorie intake that should be provided to each patient.

²Vegetables of A group were considered those vegetables containing around 5% of its content of carbohydrates.

³Vegetables of B group were considered those vegetables containing around 10% of its content of carbohydrates.

Table 2. Baseline characteristics of the study participants

Parameter	Control Group (mean±SE)	LGI Group (mean±SE)	p
Subjects (n)	12	14	
Age (years)	31.25 ± 0.78	31.36 ± 0.89	0.930
Body Mass (kg)	74.45 ± 2.70	77.03 ± 2.06	0.429
Height (m)	1.60 ± 0.01	1.63 ± 0.00	0.081
BMI (kg/m ²)	28.82 ± 0.98	28.67 ± 0.60	0.894
Body Fat (%)	38.94 ± 0.95	39.66 ± 0.96	0.579
Waist Circumference (cm)	91.10 ± 2.28	95.28 ± 1.76	0.132
Hip Circumference (cm)	110.62 ± 2.20	109.03 ± 1.59	0.543
Waist/Hip Ratio	0.82 ± 0.014	0.87 ± 0.013	0.010
Total Cholesterol (mg/dl)	174.75 ± 5.08	178.21 ± 8.71	0.721
HDL (mg/dl)	48.83 ± 2.61	48.14 ± 2.40	0.701
LDL (mg/dl)	111.41 ± 4.69	107.67 ± 6.04	0.611
Triglycerides (mg/dl)	82.50 ± 10.50	112.00 ± 19.87	0.173
Glucose (mg/dl)	85.16 ± 2.68	90.54 ± 2.53	0.485
Insulin (μUI/dl)	10.77 ± 1.53	13.93 ± 2.03	0.197
HOMA1-IR	2.30 ± 0.36	3.14 ± 0.56	0.193
HOMA2-IR	1.39 ± 0.18	1.90 ± 0.31	0.202
FSH (mIU/dl)	7.28 ± 2.11	6.61 ± 1.87	0.373
LH (mIU/dl)	4.74 ± 0.83	3.70 ± 0.23	0.211
Estradiol (pg/ml)	59.70 ± 8.31	54.44 ± 6.54	0.604
Progesterone (ng/ml)	0.47 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.877
Free Testosterone (nmol/l)	0.043 ± 0.007	0.032 ± 0.005	0.091
Prolactin (ng/ml)	11.52 ± 1.63	12.29 ± 1.22	0.695
SHBG (nmol/l)	50.93 ± 7.63	46.03 ± 3.31	0.539

LGI – low glycemic index; BMI – body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; FSH - follicle stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; SHBG - sex hormone-binding globulin.

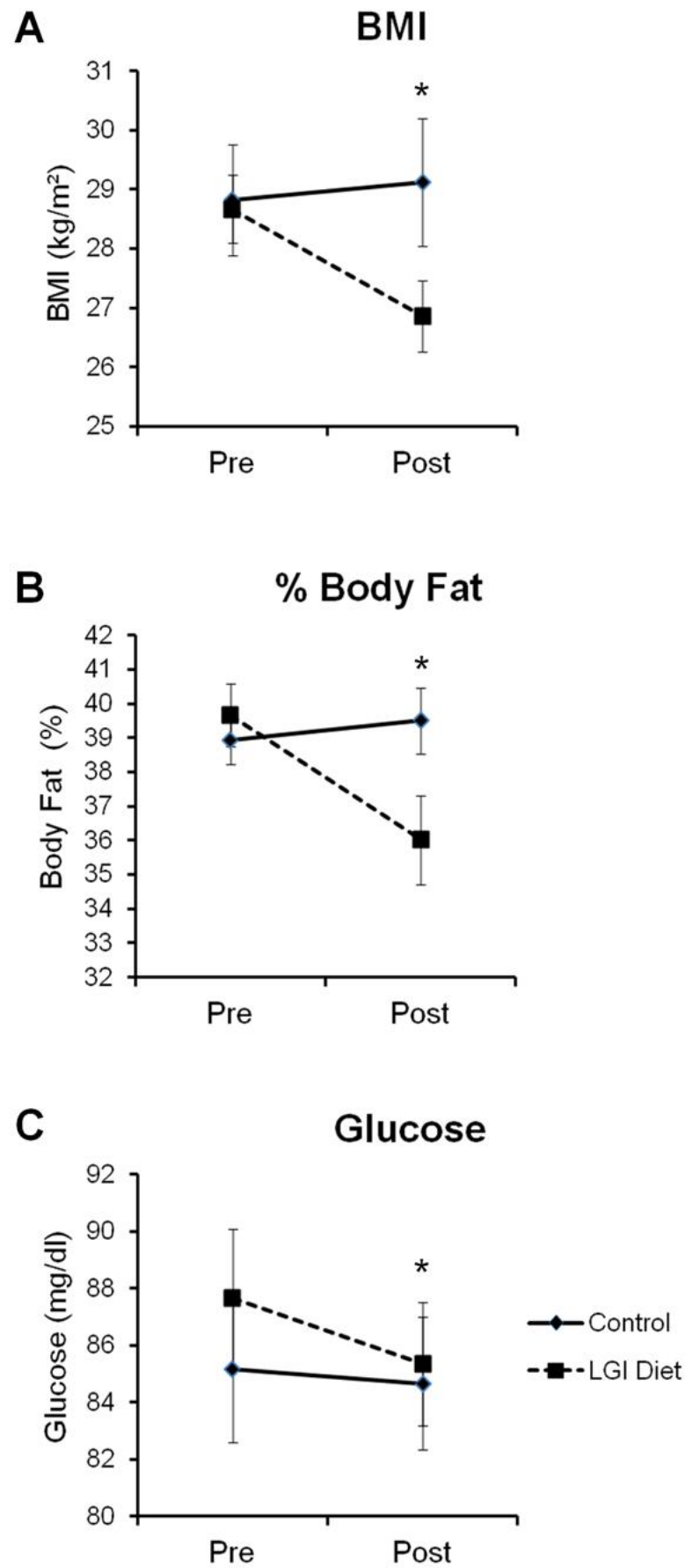


Figure 2. BMI (A), % Body Fat (B) and Glucose levels (C) in the LGI (n=11) and control (n=12) groups, pre and post intervention. Values are in mean \pm SE. *Significantly different from the intervention group, $p < 0.05$. Levels of glucose were adjusted for insulin.

Table 3. Antropometric, hormonal and metabolic characteristics of the study participants post intervention

Parameter	Control Group (mean±SE)	Δ Control Group (mean±SE)	LGI Group (mean±SE)	Δ LGI Group (mean±SE)	p ¹
Subjects (n)	12	12	11	11	
Body Mass (kg)	75.17 ± 2.87	0.72 ± 0.75	72.77 ± 2.13 ^c	- 4.51 ± 0.83 ^c	<0.001
BMI (kg/m ²)	29.12 ± 1.13	0.30 ± 0.31	27.19 ± 0.76 ^c	- 1.95 ± 0.45 ^c	<0.001
Body Fat (%)	39.50 ± 0.79	0.56 ± 0.45	36.24 ± 1.48 ^c	- 3.69 ± 1.25 ^c	0.002
Waist Circumference (cm)	95.00 ± 2.23	0.01 ± 0.00	92.67 ± 2.08 ^c	- 1.31 ± 2.83 ^c	0.243
Hip Circumference (cm)	110.37 ± 2.17	- 0.25 ± 0.59	105.25 ± 1.47 ^c	- 3.99 ± 0.85 ^c	<0.001
Waist/Hip Ratio	0.83 ± 0.017	0.01 ± 0.005	0.83 ± 0.013 ^c	-0.03 ± 0.009 ^c	<0.001
Total Cholesterol (mg/dl)	177.91 ± 5.96	3.16 ± 4.98	185.18 ± 7.83	- 0.90 ± 6.32	0.864
HDL (mg/dl)	50.83 ± 3.24	4.00 ± 1.66	50.00 ± 4.00	2.00 ± 2.32	0.370
LDL (mg/dl)	110.23 ± 4.36	- 1.18 ± 4.34	114.60 ± 5.06	1.89 ± 5.25	0.446
Triglycerides (mg/dl)	84.25 ± 13.48	1.75 ± 8.68	102.90 ± 15.77	- 24.00 ± 15.97	0.155
Glucose (mg/dl)	84.66 ± 8.43	-0.50 ± 2.50	87.27 ± 2.26	- 3.27 ± 1.76	0.034 ^a
Insulin (μUI/dl)	10.62 ± 0.72	- 0.15 ± 1.00	14.57 ± 2.75	- 0.25 ± 1.23	0.848
HOMA1-IR	2.22 ± 0.17	- 0.07 ± 0.25	3.27 ± 0.73	- 0.17 ± 0.31	0.589
HOMA2-IR	1.35 ± 0.09	- 0.04 ± 0.12	1.90 ± 0.34	0.009 ± 0.13	0.994
FSH (mIU/dl)	7.48 ± 0.62	0.19 ± 0.29	7.13 ± 0.76	0.89 ± 0.59	0.174
LH (mIU/dl)	4.73 ± 1.10	- 0.008 ± 0.74	3.24 ± 0.42	- 0.31 ± 0.42	0.386
Estradiol (pg/ml)	41.72 ± 2.45	- 17.98 ± 7.47	44.90 ± 3.96	- 7.95 ± 6.40	0.049 ^b
Progesterone (ng/ml)	0.58 ± 0.05	0.11 ± 0.07	0.49 ± 0.07	0.11 ± 0.06	0.414
Free Testosterone (nmol/l)	0.035 ± 0.006	- 0.006 ± 0.006	0.028 ± 0.006	- 0.006 ± 0.005	0.482
Prolactin (ng/ml)	11.65 ± 2.01	0.13 ± 0.60	12.23 ± 1.73	- 1.01 ± 1.24	0.412
SHBG (nmol/l)	46.04 ± 7.10	- 4.89 ± 2.19	45.50 ± 4.81	1.73 ± 3.01	0.546

LGI – low glycemic index; BMI – body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; FSH - follicle stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; SHBG - sex hormone-binding globulin. ^aadjusted for insulin. ^badjusted for SHBG; ^crelative to 14 subjects. ¹values for GEE of variables mean ± SE, comparing the LGI diet and the control group.

Table 4. Reproductive and IVF Outcomes

Parameter	Control Group	LGI Diet	p ¹
Subjects (n)	12	9	
Total Dose of Gonadotrophin (UI)	886.36 ± 58.81	850.00 ± 79.05	0.527
Mean number of oocytes retrieved	4.18 ± 0.87	7.75 ± 1.44	0.039
Oocyte Quality: M4 oocytes % (n)	11.40% (5/44)	12.90% (8/62)	0.813
M3 oocytes % (n)	29.50% (13/44)	27.40% (17/62)	0.812
M2 oocytes % (n)	25.00% (11/44)	32.30% (20/62)	0.420
M1 oocytes % (n)	34.10% (15/44)	27.40% (17/62)	0.463
Fertilization Rate % (n)	45.45% (20/44)	45.16% (28/62)	0.976
Embryo Quality: Top grade (4) embryos % (n)	10.00% (2/20)	-	0.091
Average grade (3) embryos % (n)	45.00% (9/20)	35.71% (10/28)	0.521
Average grade (2) embryos % (n)	45.00% (9/20)	50.00% (14/28)	0.735
Poor grade (1) embryos % (n)	-	14.29% (4/28)	0.081

IVF - in vitro fertilization; LGI – low glycemic index.

Values are in mean±SE or % (n).

¹Comparison between the control and LGI diet group (Independent sample t test or Mann-Whitney test).

Table 5. Target and actual diet energy, macronutrients, dietary fiber and glycemic load

Parameter	LGI Diet Group		p ³	Control Group		p ⁵	p ⁶
	Target ¹ (mean±SE)	Actual ² (mean±SE)		Target ⁴ (mean±SE)	Actual ² (mean±SE)		
Subjects (n)	14	14		12	12		
Energy (kcal)	1537.49 ± 31.34	1332.04 ± 89.44	0.045	1983.14 ± 116.70	1909.17 ± 161.07	0.531	0.001
CHO (% energy)	48.53 ± 0.23	50.99 ± 2.07	0.259	52.93 ± 1.72	52.64 ± 1.15	0.889	0.471
CHO (g)	189.48 ± 4.24	173.53 ± 14.78	0.316	264.67 ± 22.33	153.92 ± 24.02	0.680	0.003
Protein (% energy)	21.77 ± 0.16	19.77 ± 0.95	0.058	17.40 ± 0.67	17.39 ± 0.66	0.986	0.033
Protein (g)	85.11 ± 1.68	65.05 ± 3.91	<0.001	83.13 ± 4.56	80.93 ± 6.37	0.497	0.027
Fat (% energy)	29.69 ± 0.07	29.23 ± 1.48	0.759	29.66 ± 1.71	29.89 ± 1.07	0.644	0.710
Fat (g)	51.55 ± 0.94	48.89 ± 3.33	0.062	65.10 ± 5.58	63.88 ± 5.65	0.801	0.002
Dietary Fiber (g)	31.87 ± 0.80	21.41 ± 1.65	<0.001	12.83 ± 1.09	14.22 ± 1.72	0.347	0.002
GL	75.00 ± 2.01	72.00 ± 6.51	0.666	134.26 ± 12.01	127.57 ± 16.08	0.421	<0.001

LGI - low glycemic index; CHO - carbohydrate; GL - glycemic load

¹Values (means ± SE) were calculated from sample menus.

²Actual values (means ± SE) were calculated from the 3d-food records completed during the intervention.

³Comparison between the target and actual values in the LGI diet group (independent t test).

⁴The target for control group was considered the composition of the usual diet of the patients at the baseline of the study.

⁵Comparison between the target and actual values in the control group (GEE).

⁶Comparison of the actual diets between the LGI diet and the control group (GEE).

CAPÍTULO VI

6. MANUSCRITO ORIGINAL 2

EFFECTS OF A A HYPOCALORIC DIET WITH LOW GLYCEMIC INDEX/LOAD ON BODY ADIPOSITY, METABOLIC PARAMETERS, ACYLATED GHRELIN, LEPTIN AND PREGNANCY RATE IN OVERWEIGHT AND OBESE INFERTILE WOMEN: A RANDOMIZED CLINICAL TRIAL

ABSTRACT

Introduction: Insulin resistance (IR) resulting from obesity is related to hormonal disorders that affect reproductive system. Leptin and ghrelin are hormones that regulate energy balance; however, the relationship of these hormones with infertility is not clear. The low glycemic index (LGI) diet seems to exert a positive impact on obesity and metabolic changes resulting from IR. **Objective:** To verify the effect of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on anthropometric and metabolic parameters, ghrelin and leptin levels and pregnancy rate in overweight and obese infertile women candidates to *in vitro* fertilization (IVF). **Methods:** Randomized clinical trial analysing 26 infertile women with grade I and II obesity, or pre-obesity associated with increased waist circumference. Patients were assigned in the hypocaloric LGI diet group or control group (maintenance of usual diet), and followed the protocol for 12 weeks. Parameters evaluated: body weight, body mass index (BMI), body fat percentage (%BF), glucose, insulin, HOMA-IR, serum lipids, reproductive hormones, leptin, acylated ghrelin, number of oocytes retrieved in the IVF cycle and pregnancy rate. Compliance to the diets were evaluated by means of a 3-day food record assessed at baseline, week 6 (middle) and week 12 (completion of the study). **Results:** There was 5.5% weight loss and also reductions in BMI ($p < 0.001$), BF% ($p = 0.002$), glucose ($p = 0.034$) and leptin

levels ($p = 0.013$) in the LGI group compared to control. There was a 18% increase in ghrelin levels in the LGI group after the intervention (86.60 ± 12.00 pg/dl vs. 97.33 ± 12.27 pg/dl), but this increase was not significant ($p = 0.215$). The LGI diet group had 85.4% more oocytes retrieved compared to control group (7.75 ± 1.44 vs. 4.18 ± 0.87 , respectively, $p = 0.039$) in the IVF cycle. Three (21.4%) patients in the LGI group experienced spontaneous pregnancy during the follow-up, generating three live births. **Conclusion:** The hypocaloric LGI diet promoted a decrease in BMI, % BF, glucose and leptin levels. It is possible that these effects have favored oocyte development and improved the pregnancy and live birth rates in the intervention group. These results support the clinical recommendation to advise overweight and obese women to lose weight through a balanced diet, preferably with low glycemic index/load, prior to be submitted to assisted reproduction technologies.

Key words: female infertility, diet, glycemic index, leptin, ghrelin, overweight

INTRODUCTION

Infertility has been currently recognized as a disorder related to obesity (Loret de Mola, 2009). The impact of obesity on reproductive process involves, among others, sub or infertility, menstrual abnormalities, miscarriages, and increased risk of pregnancy complications (Pasquali et al., 2003; Jungheim et al., 2013).

Among several metabolic changes associated with obesity, insulin resistance (IR) appears to be linked to hormonal disorders that affect reproductive system (Singla et al. 2010; Sliwowska et al., 2014). Hyperinsulinemia, resulting from abdominal obesity, leads to changes on LH and FSH pulses in the central nervous system (CNS) and increases steroidogenesis in the ovaries. In addition, leads to suppression of the hepatic synthesis of sex hormone binding globulin (SHBG), increasing the proportion of free androgen for aromatization and conversion to estrogen in the adipose tissue, leading, also, to increased free circulating estrogen bioavailability. All these changes have deleterious effects on oocytes, follicles and endometrium, and consequently on reproductive capacity (Parihar, 2003; Michalakis et al., 2013). Thus, when infertility is a problem associated with obesity, one of the main goals of the treatment to restore reproductive function is the normalization of IR, which can be obtained by weight loss and visceral fat reduction. According to McLean and Wellons (2012), there are few well-controlled randomized trials that have evaluated the effect of lifestyle modification specifically on fertility. Although limited, these studies demonstrate, in addition to weight loss, effects such as improvements in the regularity of the menstrual cycle, reduction on visceral fat, hyperandrogenism and insulin resistance; increase in sex hormone binding globulin (SHBG) and on ovulation and pregnancy rates (Clark et al., 1998; Huber-Buchholz et al., 1999; Moran et al., 2009).

Despite of the benefits of weight loss for obese infertile women be well established in the literature, there are few studies that evaluated the relationship between fertility and diets

with different compositions. Compared to standard diets, restriction or modification of carbohydrates quality seems to reflect benefits in some parameters such as energy expenditure (Pereira et al., 2004), triglyceride and HDL-cholesterol levels, and glucose homeostasis (Hu, 2005). In addition, carbohydrate-rich foods with low glycemic index (LGI) seem to improve insulin sensitivity and increase the potential for weight loss when compared to low fat diets ad libitum (Hu, 2005). Thus, LGI foods can benefit body weight control mainly by promoting satiety and fat oxidation instead of carbohydrate oxidation (Brand-Miller et al., 2002).

Several elements are involved in the regulation of body energy balance. In the coordination of dietary intake and energy expenditure, the central nervous system (CNS) receives numerous peripheral impulses and signals in response to a constantly altered energy balance (Cummings et al., 2005). Among these elements, we can emphasize the hormones leptin and ghrelin. The study of these two peptides has contributed considerably to the understanding of endocrinology of obesity and its comorbidities. Recent studies have reported the presence of cellular receptors for leptin and ghrelin at the gonads level, which suggests that there is, in addition to an indirect influence (hypothalamic), a direct influence of these hormones on reproductive physiology (Metwally et al., 2008). However, information about their relationship with infertility are scarce.

Among several strategies to reduce body weight, the LGI diet has been a strategy in the management of obesity. However, there are limited studies on the effect of the LGI diet on reproductive outcomes and on the levels of leptin and ghrelin in overweight infertile women. We hypothesized that, in overweight infertile women, the LGI diet would reflect an additional benefit than a conventional diet, mainly because of its positive effect on metabolic parameters and on the levels of leptin and ghrelin. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of a hypocaloric diet with low glycemic index/load on anthropometric and metabolic

parameters, leptin and ghrelin levels and reproductive outcomes in overweight and obese infertile women candidates to in vitro fertilization (IVF).

SUBJECTS AND METHODS

Women diagnosed with female infertility (irrespective of their infertility diagnosis), body mass index (BMI) $> 30 \text{ kg/m}^2$ or BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$ associated with waist circumference $> 80 \text{ cm}$, and undergoing IVF were eligible for the study. In addition, participants should have stable body weight in the last three months prior to the study, have no stomach/digestive problems, have no cardiovascular disease, not smoking, and not being on medication. Exclusion criteria were: BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, following any other type of nutritional intervention, comorbidities that could interfere in reproductive ability (genetic and endocrine disorders, diabetes mellitus, cancer, liver or kidney failure), alcoholics, patients who have contact (work) with heavy metals or chemicals (exposure to solvents and pesticides). The patients were questioned about their level of physical exercise on the topics: modality, frequency (number of times/week), and duration (in minutes). In this study, all patients analysed did not practice any physical exercise and were advised not to start any activity during the study follow-up, in order to maintain the same level of caloric expenditure and isolate the effect of the dietary intervention. Thirty-five women commenced the intervention and were randomised to LGI diet group (16) or control group (19). Nine women dropped out of the study (two diet LGI group, seven control). Fourteen women completed the diet intervention, and twelve women completed the control protocol (Figure 1). Of the 26 patients analyzed, 4 had polycystic ovary syndrome - PCOS (1 patient in the control and 3 in LGI diet group), but in all cases associated with one or more other causes of female infertility. The study protocol complied with the Declaration of Helsinki, was approved by the Hospital de Clínicas de Porto

Alegre Ethics Committee, and all subjects gave written informed consent to participate in the study.

*****INSERT FIGURE 1.*****

Study Design

Randomized Clinical Trial (RCT). This study followed the randomized block design. Blinding was not possible to perform in this RCT, because of the active participation of the patients and the care providers, that were necessary throughout the study protocol.

Patients were referred from Public Primary Care Units to the Unit of Obstetrics and Gynecology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. After their medical diagnose of infertility, the patients were organized on a waiting list to perform the IVF cycle. Patients were recruited from this list, in chronological order of entrance. The patients selected were participating on their first cycle of IVF. The period of recruitment and follow-up was between January 2012 and December 2013. All dietary advices were provided by a qualified nutritionist.

Preliminary visit: personal data and anthropometric measures to assess the inclusion/exclusion criteria were collected. Patients who met the criteria and accepted to participate on the study received general advice about the follow-up protocol and were instructed to complete their first Three-Day Food Record (3DFR).

Basal Visit (week 0): to start the study protocol, patients should attend the hospital between the 2nd and the 4th day of their menstrual cycle. In this day, blood samples were drawn after twelve hours overnight fast to asses hormonal and metabolic parameters; anthropometric data was also performed. Body mass and height were recorded for the calculation of BMI (body mass (kg)/height(m²)). Waist circumference (WC) was measured in the midway position between the lowest rib margin and the iliac crest, near the umbilicus. Hip

circumference (HC) was taken at the maximal gluteal protrusion (lateral view). The skinfolds were measured at seven sites (triceps, subscapular, pectoral, axillary, abdomen, suprailiac, and thigh) using a Lange caliper (Beta Technology Inc., Cambridge, Md., USA), according to the method recommended by the International Society for the Advancement of Kinanthropometry (Marfell-Jones et al., 2006), and were used to calculate the body fat percentage (Jackson; Pollock 1978). Patients presented their first 3DFR (baseline) and were randomized into one of two groups: 1) LGI diet group; or 2) control group. From this visit, patient began to follow the proposed protocols, which should be maintained for the next 12 weeks.

Intermediate visit (week 6): nutritional advices were reinforced, anthropometric measurements were collected (body mass, waist and hip circumferences) and the adherence of the patients to proposed diets was verified through another 3DFR (intermediate).

Final visit (week 12): To finalize the follow-up protocol patients should attend the hospital between the 2nd and the 3rd day of their menstrual cycle. In this day, the same protocol of the Basal Visit was repeated. Patients presented their last 3DFR (final). Immediately after the end of the follow-up, patients started the ovarian stimulation protocol to perform the IVF cycle.

Dietary intervention

Patients were randomized to: 1) control group - patients were instructed to maintain their food intake habits; or 2) hypocaloric diet with low glycemic index (GI)/load (GL) - LGI diet group. In this study, foods with $GI < 55$ were classified as being of low GI. A low GL was classified as a daily value < 80 (www.glycemicindex.com). The intervention diet was designed as a moderate reduced-energy, moderate-to-high fiber, low GI/GL diet. The diet was planned to provide around 50% of calories from carbohydrate, 20% from proteins and 30% from lipids. Calorie content of the diet was individualized, each patient received an equivalent

of 20 kcal/kg of current body weight (Martins; Cardoso 2000). Diet was prescribed by using household measures or kitchen utensils to quantify food portions in each meal. Portion size of foods varied on the menu according to the caloric intake offered to each patient. Participants received a list of equivalents, separated by categories of foods to replace foods prescribed in the diet according to food category (eg, dairy products, fruits, etc). All food contained in the list of equivalents had low glycemic index. Researchers provided olive oil and dried fruits (Uniagro®, RS, Brazil) to patients in the LGI diet group during all the 12-week intervention. A high intake of vegetables (mainly raw) and salads was encouraged, and the intake of added sugars and alcohol was discouraged. The food composition of the intervention diet is presented in Table 1.

*****INSERT TABLE 1.*****

All participants were asked to keep a 3-day food record - including two week days and one weekend day - at baseline, 6-weeks after starting the dietary intervention, and at the completion of the study. To detail accurately and standardize the description of food portions, all patients received a portfolio with photos, that was prepared based on the Photo-Registry for Dietary Surveys (Zabotto, 1996). The energy, macronutrients and dietary fiber content of the diets were calculated by a nutritionist with the assistance of the software Nutribase 7 (USDA, 2008). Commonly eaten branded foods for which nutritional data were available, were added to the database of the software. Carbohydrate-intake data were exported from the software and used to measure the dietary GI and GL. The GI of individual foods was assigned according to published values on the basis of glucose as the reference food (Atkinson et al., 2008). When a published value was not available, the GI was estimated according to van Bakel et al. (2009). The GI for each food item was multiplied by the proportion of total carbohydrate contributed by the food to obtain a GL. The daily GL was calculated by summing the GL values for each food item for that day.

Blood biochemistry

Blood samples for the analysis of glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, progesterone, prolactin, testosterone, and sex hormone-binding globulin (SHBG), were stored in tubes without anti-clotting and determined at the Laboratory of Patologia Clínica of HCPA, using conventional methods. Blood samples for leptin analysis were stored in tubes without anti-clotting. These samples were centrifuged at $3.500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. The respective supernatants were aliquoted and frozen at $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ for later analysis. Blood samples for analysis of acylated ghrelin were stored in tubes with EDTA anti-clotting. Immediately after collection, $40 \text{ }\mu\text{L}$ of p-hydroxymercuribenzoic acid was added to blood sample. Then the sample was centrifuged at $3.500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. After centrifugation the plasma was aliquoted in 1.5 mL microtubes and $100 \text{ }\mu\text{L}$ of hydrochloric acid (1 N) for each 1 mL of plasma was added. Samples were again centrifuged for 5 min. After centrifugation the supernatant was aliquoted into 1.5 mL microtubes and frozen at $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ for later analysis. Leptin and acylated ghrelin were determined by enzyme immunoassay (SPI BIO, Montigny le Bretonneux, France) using a plate reader (Biochrom Anthos MultiRead 400, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Insulin Resistance was determined using the *Homeostasis Model Assessment* (HOMA1-IR): $\text{HOMA1-IR} = \text{fasting glucose (mg/dl)/18} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml})/22,5$ (Matthews et al., 1985); and the HOMA2-IR index, obtained by the program HOMA Calculator v2.2.2 (OCD, 2014). Free testosterone was estimated as total testosterone (nmol/l)/SHBG (nmol/l) $\times 100$.

Reproductive Outcomes

An ultrasound scan was performed early in the cycle to ensure the absence of ovarian cysts, then a dose of 200 UI of recombinant FSH (r-FSH) were administered for four days

(days 3, 4, 5 and 6 of the menstrual cycle), followed by 150 UI of human menopausal gonadotrophin (HMG) daily. Follicular growth was monitored by ultrasound and when at least one follicle reached an average diameter of 14 mm, a daily dose of 0.25 mg of cetrorelix acetate was administered. The ultrasonographic monitoring of follicle growth continued until the day when at least one follicle reached an average diameter of 17 mm. On this day a dose of 250 µg of alfacoriogonadotropin was administered to promote oocyte maturation. The ovarian follicle aspiration was made 34-36 hours after alfacoriogonadotropin application.

The clinical pregnancy and live birth rates were determined, respectively, as follows: number of clinical pregnancies/total number of patients in the group x 100; and number of live births/total number of pregnancies in the group x 100.

Statistical analyses

All data were analyzed with the assistance of the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). To compare the means of metabolic, hormonal, anthropometric and reproductive outcomes of the two groups (intervention and control) measured at two moments (pre and post) the Generalized Estimation Equation (GEE) with unstructured work correlation was performed, to be able to handle the dependency between observations of the same subject. Because of the small sample size we did not use the factorial model (group + moment + group + moment) instead we used control-pre + control-post + intervention-post and took as reference, measurements made in the “pre” moment of the intervention group. GEE was also conducted to analyze diet composition in both groups. Relationships were explored using the coefficient of linear correlation of Pearson or Spearman. Independent t test or Mann-Whitney test were conducted when relevant. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm standard error.

RESULTS

Baseline characteristics of participants were similar in both groups (Table 2), except for the waist/hip ratio (WHR) that was higher in the LGI diet group in the beginning of the study.

*****INSERT TABLE 2.*****

Antropometric, Metabolic and Hormonal Parameters

There was a reduction of 5.5% of body weight in patients of the LGI group, while patients in the control group had an increase in body weight of 0.9% (-4.51 ± 0.83 vs. 0.72 ± 0.75 kg, respectively, $p < 0.001$). There were also reductions in BMI (27.19 ± 0.76 vs. 29.12 ± 1.13 , respectively, $p < 0.001$), %BF (Figure 2A), WHR (-0.03 ± 0.00 vs. 0.01 ± 0.00 , respectively, $p < 0.001$), hip circumference (-3.99 ± 0.85 vs. -0.25 ± 0.59 , respectively, $p < 0.001$) and glucose (Figure 2B); and estradiol levels were higher (44.90 ± 3.96 vs. 41.72 ± 2.45 , respectively, $p = 0.049$) in the LGI diet group compared to control group. There was a reduction of 26% in leptin levels in the LGI diet group and remain stable in the control group (Figure 2C). There was an 18% increase in ghrelin levels in the LGI group after the intervention, but this increase was not significant ($p = 0.215$). The remaining variables showed no significant differences between groups (Table 3).

*****INSERT FIGURE 2.*****

*****INSERT TABLE 3.*****

Reproductive and IVF Outcomes

The LGI diet group had 85.4% more oocytes retrieved compared to control group (7.75 ± 1.44 vs. 4.18 ± 0.87 , respectively, $p = 0.039$). There was a moderate negative correlation between the number of oocytes retrieved with BMI ($r^2 = -0.542$, $p = 0.020$), %BF

($r^2 = -0.475$, $p = 0.040$) and leptin levels ($r^2 = -0.515$, $p = 0.024$). Clinical pregnancy rate was 21.4% in the LGI diet group, since three of fourteen patients experienced spontaneous pregnancy during the follow-up, generating three live births – live birth rate of 100%. There were no pregnancies, and consequently, there were no live births in the control group.

Diet compliance

Analysis of dietary food records showed that, in the control group, there were no differences in diet composition (caloric intake, macronutrients distribution, dietary fiber and glycemic load) between the target diet (usual diet) and the actual diet (Table 4). In the LGI diet group, there were no differences in macronutrients distribution and glycemic load between the target and the actual diet, but the caloric intake was a little lower than the target basically due to a protein intake (grams) below of the target (Table 4). The average dietary fiber intake was also below of the target in LGI diet group, although higher than the patient's habitual (baseline) consumption ($p = 0.016$). Comparing the actual diet consumed in both groups the analysis showed, as expected, that the caloric intake and glycemic load were lower, and the dietary fiber intake was higher in LGI diet group compared to control. The macronutrients distribution was similar between groups, except for protein. It was also expected, since the protein target planned in the diet of the LGI diet group, provided an increase in the proportion of protein compared to the patient's usual consumption (Table 4).

*****INSERT TABLE 4.*****

DISCUSSION

This study demonstrated the positive effect of a hypocaloric diet composed by low glycemic index/load foods not only on metabolic and hormonal parameters (body adiposity,

fasting glycemia, estradiol and leptin levels) but also on reproductive and IVF outcomes (improvement of the number of oocytes retrieved, pregnancy and live birth rates).

Overweight and obesity are related to infertility. Substantial weight loss, although desirable, is not essential for the success of the restoration of reproductive function in obese patients (Parihar, 2003). The available studies demonstrate that a relatively small weight loss (from 5 to 10%), obtained by caloric restriction in the long term (5 to 6 months) may improve metabolic and reproductive parameters of obese infertile women (Parihar, 2003; ESHRE/ASRM, 2008, Moran et al., 2009). Diets that offer between 1200-1500 kcal/day appear to be equally beneficial when compared to more restrictive diets and have better compliance rates (Moran et al., 2009). In addition, a very fast weight loss achieved by very low calorie diets (VLED) or excessive exercise appear to be detrimental to reproductive outcomes during fertility treatments. In this way, for the effectiveness of weight loss it must be gradual and sustained (Pandey et al., 2010). The total calories consumed in the dietary intervention of this study, i.e. 1332 kcal in average, were according to those proposed in most studies and was effective for achieving 5.5% of weight loss, an important goal proposed by the main guidelines, in the 12 weeks prior to IVF cycle. The dropout rate of only 12.5% (2 of the 6 patients randomized) throughout the study in the intervention group evidenced a good compliance to the proposed treatment.

Diet histories, 24-h recalls, food-frequency questionnaires, weighed diet records, and food diaries have been used in epidemiologic and clinical research to assess the dietary intake of individuals (Eppright et al., 1952; Viberti et al., 1987; Azevedo et al., 1990; MacDowell et al., 1994; Willett, 1994). However, all the information must be given by the subjects themselves, and this information may be incorrect. The measurement of 24-h urinary nitrogen excretion is a reliable index that could be used to evaluate protein intake. However, there is no biochemical index for analyzing the type of carbohydrate eaten or its glycemic index.

Therefore, one must rely on the patient's information to assess the glyceamic index/load of the foods eaten. Moulin et al (1998) conducted a randomized clinical trial with diabetes mellitus type 2 patients that consumed diets with diferentes types and quantities of protein. The authors assumed accord between total protein intake evaluated by dietary assessment methods and that calculated by nitrogen output, and the study indicates that the patient's information is reliable. The underreporting is more prevalent among women, overweight or obesity subjects and increases with age (Macdiarmi, Blundell 1998) and this was, therefore, a challenge for this trial. During this study it was not possible to measure 24-h urinary nitrogen to validate the diet records due to the menstrual cycle and consequently blood cells nitrogen contamination. However, patients lost weight and several metabolic and anthropometric parameters have changed after the intervention, which seems to indicate diet compliance. Maybe the counseling with a clinical nutritionist over the diet period could had helped to have a better compliance to the dietetic treatment

Many studies suggest that high carbohydrates-low protein diets with a low glyceamic load shows benefits for body weight and cardiovascular risk reduction (Bouche et al., 2002; Pereira et al., 2004; Brynes et al., 2003; Ebbeling et al., 2005). Some of these results were also observed in this study; i.e, the proposed low glyceamic index/load diet was effective in promoting weight loss, reduction of %BF, WHR, and fasting glucose levels in the intervention group. However, the study failed in evidence reduction in insulin levels and HOMA-IR indexes. Similar studies analysing the effect of the glyceamic index of the diet (high vs. low) on weight loss of non PCOS women, with a similar duration of our study, also failed in demonstrate changes in insulin levels and/or HOMA-IR, independent of the group (McMiller-Price et al., 2006; Schieri et al., 2007). Other studies with the same objective were able to demonstrate this effect, but the duration of the intervention was longer (≥ 6 months) than this work (Juanola-Falgarona et al., 2014; Schwingshackl e Hoffmann, 2013). In the

present study, only 15% of the patients evaluated had PCOS. Analyzing the effect of diets for weight loss, regardless of composition, studies with similar or greater duration than ours, were able to demonstrate improvements in insulin levels, HOMA-IR and insulin sensitivity index calculated using the oral glucose tolerance test - ISI_{OGTT} (Clark et al., 1995; Moran et al., 2003; Stamets et al., 2004; Marsh et al., 2010; Mehrabani et al., 2012) in PCOS patients, women who have different characteristics of our patients. Thus, both, the duration of the intervention and the characteristics of the patients seem to influence the responses of insulin and insulin sensitivity in studies involving dietary interventions.

Few studies have evaluated fertility and diets with different glycemic indexes/ loads. Marsh et al. (2010) conducted a study in 96 PCOS women and showed that with a modest weight loss (4-5% of body weight) a moderate carbohydrate diet with low GI provided an improvement on menstrual regularity when compared to conventional low-calorie diet. On the other hand, high carbohydrates diets with high glycemic index appear to be associated with increased risk of anovulatory infertility (Chavarro et al., 2009). Thus, the type of carbohydrates offered on the diet appears to result in different effects on reproductive outcomes. The study of Marsh et al. (2010) offered in their intervention group diet a quite similar glycemic load as prescribed to the intervention group in our study (74 vs. 75). The weight loss associated to the LGI diet in our study, as in the cited study, was able to promote substantial improvements on reproductive outcomes on the intervention group, compared to control group.

In this study, after weight loss, there was a reduction of 26% in leptin levels in the LGI diet group, and leptin remains stable in the control group. In addition, leptin levels had a moderate negative correlation with the number of oocytes retrieved in the IVF cycle. The number of oocytes retrieved was 85.4% higher in the LGI diet group compared to control. In peripheral level, leptin receptors are found in granulosa and theca cells, in oocytes, and others

(Cervero et al., 2005). Leptin excess, characteristic of the obesity, has important effects on reproduction. The ovaries express an appropriate number of leptin receptors. However, if leptin concentration exceeds a certain level in the blood, steroidogenesis of sex hormones is reduced by direct suppression of gonads (Baldelli et al., 2002). In obese women, the exposure of the ovaries to higher concentrations of leptin inhibits the production of estradiol by the granulosa cells (Michalakis et al. 2013). In fact, in our study the estradiol levels were lower in the control group compared to intervention group in the beginning of the IVF cycle. Additionally, the influence of leptin on follicular development and oocyte maturation may also have important implications for oocyte induction in assisted reproduction procedures (Brannian e Hansen, 2002; Spicer, 2001). Leptin levels have been shown to be significantly higher during controlled ovarian hyperstimulation protocols (Lindheim et al., 2000), therefore higher levels of leptin in obese patients who are undergoing IVF cycles can inhibit ovarian response to gonadotropin stimulation and thus explain why obese patients have a poorer response during ovarian hyperstimulation (Karlsson et al., 1997; Spicer, 2001).

Ghrelin levels showed a non-significant increase of 18% in LGI diet group. The absence of statistical significance was probably due to the small sample size and the large inter-individual variability of this parameter. As leptin, ghrelin concentrations vary according to the nutritional status. Ghrelin levels are reduced in obese individuals (Gibson et al., 2010; Otto et al., 2001) and diets that induce weight loss increase its levels (Cummings et al., 2002). Many evidences indicate that ghrelin participates in the reproductive physiology regulation with systemic effects and also direct actions on gonad levels, where ghrelin and GHS-R1 ghrelin receptor expression have been reported (Barreiro, Tena-Sempere 2004; Caminos et al., 2003; Fernandez-Fernandez et al., 2004,2006; Tena-Sempere, 2005; 2008). The presence of GHS-R1a in ovarian follicular cells, corpora lutea and interstitial hilus cells, suggests a potential regulatory role of ghrelin produced locally and systematically in the direct control of

follicular development and ovarian cells action (Gaytan et al., 2003). Thus, although not statistically significant, we hypothesize that the increase in ghrelin levels in the LGI diet group may have had clinical importance for these patients, and may have been involved in the the metabolic and reproductive outcomes improvement. Many data support that leptin and ghrelin act in a complementary manner on energy balance regulation (Metwally et al., 2008), and the same could be true for reproductive axis regulation. Then, taking into account the fact that the reproductive axis is highly dependent on the energy state of the body, leptin and ghrelin acting both, central and peripherally, may represent one of the signaling mechanisms that link the nutrient balance and the hypothalamic-pituitary-gonads axis.

In the present study there were three spontaneous pregnancies (21.4%) and these pregnancies generated three live births (100%) in the LGI diet group. There are few well-controlled randomized trials that have evaluated the effect of lifestyle modification specifically on reproductive outcomes (McLean; Wellons 2012). Although limited, these studies demonstrate, in addition to weight loss, increases in pregnancy rates (Moran et al., 2009). A recent systematic review (Sim et al., 2014a) analysed studies that investigate the effect of a dietary intervention in overweight or obese women before treatment with assisted reproduction technologies and also observed that in some studies (Sim et al., 2014b; Clark et al., 1995; Clark et al., 1998; Galletly et al, 1996), as in our study, the weight loss was associated with increase in natural pregnancies and live birth rates, eliminating the need for fertility treatment.

This study has some limitations. The small sample size and the relative short duration of the intervention, may have limited the power to detect changes in some outcomes, including changes in HOMA-IR, oocyte and embryo quality and fertilization rate. Thus, future studies with a larger sample and a longer time of intervention are needed to confirm our results. In addition, it would also be desirable in the future to evaluate these same outcomes

counting with an additional group of a conventional diet for weight loss (ie, a high glycemic index diet) to access the isolated effect of the glycemic index/load of the diet, independent of weight loss, on the study outcomes.

CONCLUSION

The hypocaloric LGI diet, despite the relative short time of intervention and have been developed immediately before the beginning of the IVF cycle, promoted a decrease in BMI, % BF, blood glucose and leptin levels, admittedly altered in IR. It is possible that these effects have favored oocyte development and improved pregnancy and live birth rates in the intervention group. These results support the clinical recommendation to advise overweight and obese women to lose weight through a balanced diet, preferably with low glycemic index/load, prior to be submitted to assisted reproduction technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) of HCPA for their financial support. We also thank to Uniagro® for providing some of the foods used during the study intervention, to Karina Monteiro for her technical support, and the volunteers who participated in this study.

REFERENCES

1. Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care*. 2008;31:2281–3.
2. Azevedo MJ, Padilha LM, Gross JL. A short-term low-protein diet reduces glomerular filtration rate in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Braz J Med Biol Res* 1990;23:647–54.
3. Baldelli R, Dieguez C, Casanueva FF. The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med*. 2002;34(1):5–18.
4. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol*. 2004;226:1–9.
5. Bouche C, Rizkalla SW, Luo J, Vidal H, Veronese A, Pacher N, Fouquet C, Lang V, Slama G. Five-week, low-glycemic index diet decreases total fat mass and improves plasma lipid profile in moderately overweight nondiabetic men. *Diabetes Care*. 2002;25:822–828.
6. Brand-Miller JC, Holt SHA, Pawlak DB, McMillan J. Glycemic index and obesity. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(suppl):281S–5S.
7. Brannian JD, Hansen KA. Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin Reprod. Med*. 2002;20:103–112.
8. Brynes AE, Mark Edwards C, Ghatei MA, Dornhorst A, Morgan LM, Bloom SR, Frost GS. A randomised four-intervention crossover study investigating the effect of carbohydrates on daytime profiles of insulin, glucose, non-esterified fatty acids and triacylglycerols in middle-aged men. *Br J Nutr*. 2003;89:207–218.
9. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. 2003;144:1594–602.
10. Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simón C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005;10(2):217–23.
11. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. A prospective study of dietary carbohydrate quantity and quality in relation to risk of ovulatory infertility. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63(1):78–86.
12. Clark AM, Ledger W, Galletly C, Tomlinson L, Blaney F, Wang X, Norman RJ. Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod*. 1995;10(10):2705–12.
13. Clark AM, Thornley B, Tomlinson L, Galletley C, Norman RJ. Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of fertility treatment. *Hum Reprod*. 1998; 13: 1502–1505.
14. Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets*. 2005;6(2):153–69.
15. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JP. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002;346:1623–30.
16. Ebbeling CB, Leidig MM, Sinclair KB, Seger-Shippe LG, Feldman HA, Ludwig DS. Effects of an ad libitum reduced glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:976–982.
17. Eppright ES, Patton MB, Marlatt AL, Hathaway ML. Dietary study methods v. some problems in collecting dietary information about groups of children. *J Am Diet Assoc* 1952;28:43–8.

18. ESHRE/ASRM - Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2008;23(3):462–477.
19. Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254–255:127–132.
20. Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett.* 2004;362:103–107.
21. Galletly C, Clark A, Tomlinson L, Blaney F. A group program for obese, infertile women: weight loss and improved psychological health. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 1996;17:125–128.
22. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:879–887.
23. Gibson W, Liu J, Gaylinn B, Thorner MO, Meneilly GS, Babich SL, Thompson D, Chanoine JP. Effects of glucose and insulin on acyl ghrelin and desacyl ghrelin, leptin, and adiponectin in pregnant women with diabetes. *Metabolism.* 2010;59(6):841–7.
24. Hu FB. Protein, body weight and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(suppl.):242S-247S.
25. Huber-Buchholz M, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1470–4.
26. Jackson, AS, Pollock, ML. 1978. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* 40(3): 497–504.
27. Juanola-Falgarona M, Salas-Salvado J, Ibarrola-Jurado N, Rabassa-Soler A, Díaz-Lopez A, Guasch-Ferre M, Hernandez-Alonso P, Balanza R, Bullo M. Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014;100:27–35.
28. Jungheim ES, Travieso JL, Hopeman MM. Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutrition Reviews* 2013;71(Suppl.1):S3–S8.
29. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82: 4144–4148.
30. Lindheim SR, Sauer MV, Carmina E, Chang PL, Zimmerman R, Lobo RA. Circulating leptin levels during ovulation induction: relation to adiposity and ovarian morphology. *Fertil. Steril.* 2000;73:493–498.
31. Loret de Mola, JR. Obesity and its relationship to infertility in men and women. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2009;36(2):333-46.
32. Macdiarmid J, Blundell J. Assessing dietary intake: Who, what and why of under-reporting. *Nutr Res Rev.* 1998;11: 231-253.
33. MacDowell MA. The NHANES III Supplemental Nutrition Survey of Older Americans. *Am J Clin Nutr* 1994;59(suppl):224S–6S.
34. Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A., and Carter, J.E.L. 2006. International standards for anthropometric assessment. North-West University, Potchefstroom, RSA.
35. Marsh JA, Steinbeck KS, Atkinson FS, Petocz P, Brand-Miller JC. Effect of a low glycemic index compared with a conventional healthy diet on polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:83–92.
36. Martins C, Cardoso SP. Terapia Nutricional Enteral e Parenteral. Manual de rotina técnica. METHA, Curitiba, Brazil. 2000.

37. Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Trecher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
38. McLean M, Wellons MF. Optimizing Natural Fertility: The Role of Lifestyle Modification. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2012;39:465–477.
39. McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, O'Neill K, Samman S, Steinbeck K, Caterson I, Brand-Miller J. Comparison of 4 Diets of Varying Glycemic Load on Weight Loss and Cardiovascular Risk Reduction in Overweight and Obese Young Adults: A Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med*. 2006;166:1466-1475.
40. Mehrabani HH, Salehpour S, Amiri Z, Farahani SJ, Meyer BJ, Tahbaz F. Beneficial effects of a high-protein, low-glycemic-load hypocaloric diet in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled intervention study. *J Am Coll Nutr*. 2012;31(2):117-25.
41. Metwally M, Ledger WL, Chiu Li T. Reproductive Endocrinology and Clinical Aspects of Obesity in Women. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1127: 140–146.
42. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2013;62:457–478.
43. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:812-9.
44. Moran LJ, Pasquali R, Teede HJ, Hoeger KM, Norman RJ. Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Fertil Steril*. 2009;92:1966–1982.
45. Moulin CC, Tiskievicz F, Zelmanovitz T, Oliveira J, Azevedo MJ, Gross, JL. Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67:853-857.
46. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(5):669–73.
47. Oxford Centre for Diabetes - OCD. Endocrinology and Metabolism. Diabetes Trial Unit. HOMA Calculator. Available from: <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/> Accessed October 2014.
48. Pandey S, Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *J Hum Reprod Sci*. 2010;3(2):62-67.
49. Parihar M. Obesity and infertility. *Reviews in Gynaecological Practice*. 2003;3:120–126.
50. Pasquali R, Petrusi C, Gerghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 2003;9:359–372.
51. Pereira MA, Swain J, Goldfine AB, Rifai N, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load diet on resting energy expenditure and heart disease risk factors during weight loss. *JAMA*. 2004;292:2482-2490.
52. Schwingshackl L, Hoffmann G. Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23:699-706.
53. Sichieri R, Moura AS, Genelhu V, Hu F, Willett WC. An 18-mo randomized trial of a low-glycemic-index diet and weight change in Brazilian women. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:707–13.
54. Sim KA, Partridge SR, Sainsbury A. Does weight loss in overweight or obese women improve fertility treatment outcomes? A systematic review. *Obesity Reviews*. 2014a;15:839–850.

55. Sim KA, Dezarnaulds GM, Denyer GS, Skilton MR, Caterson ID. Weight loss improves reproductive outcomes for obese women undergoing assisted reproductive technology: a randomised controlled trial. *Clin Obes.* 2014b; 14: 792–805.
56. Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes.* 2010;1(3):76-88.
57. Sliwowska JH, Fergani C, Gawalek M, Skowronska B, Fichna P, Lehman MN. Insulin: Its role in the central control of reproduction. *Physiol Behav.* 2014;133:197–206.
58. Spicer, LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 2001;21: 251–270.
59. Stamets K, Taylor DS, Kunselman A, Demers LM, Pelkman CL, Legro RS. A randomized trial of the effects of two types of short-term hypocaloric diets on weight loss in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81:630–7.
60. Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction, ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm.* 2008;77:285–300.
61. Tena-Sempere M. Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:26–29.
62. van Bakel MME, Slimani N, Feskens EJM, et al. Methodological challenges in the application of the glycemic index in epidemiological studies using data from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *J Nutr.* 2009;139:568–75.
63. Viberti GC, Boggetti E, Wiseman MJ, Dodds R, Gross JL, Keen H. Effect of protein-restricted diet on renal response to a meat meal in humans. *Am J Physiol* 1987;253:F388–93.
64. Willett WC. Future directions in the development of food-frequency questionnaires. *Am J Clin Nutr* 1994;59(suppl):171S–4S.
65. Zabotto, CB. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos: utensílios e porções. UNICAMP, São Paulo, Brazil. 1996.

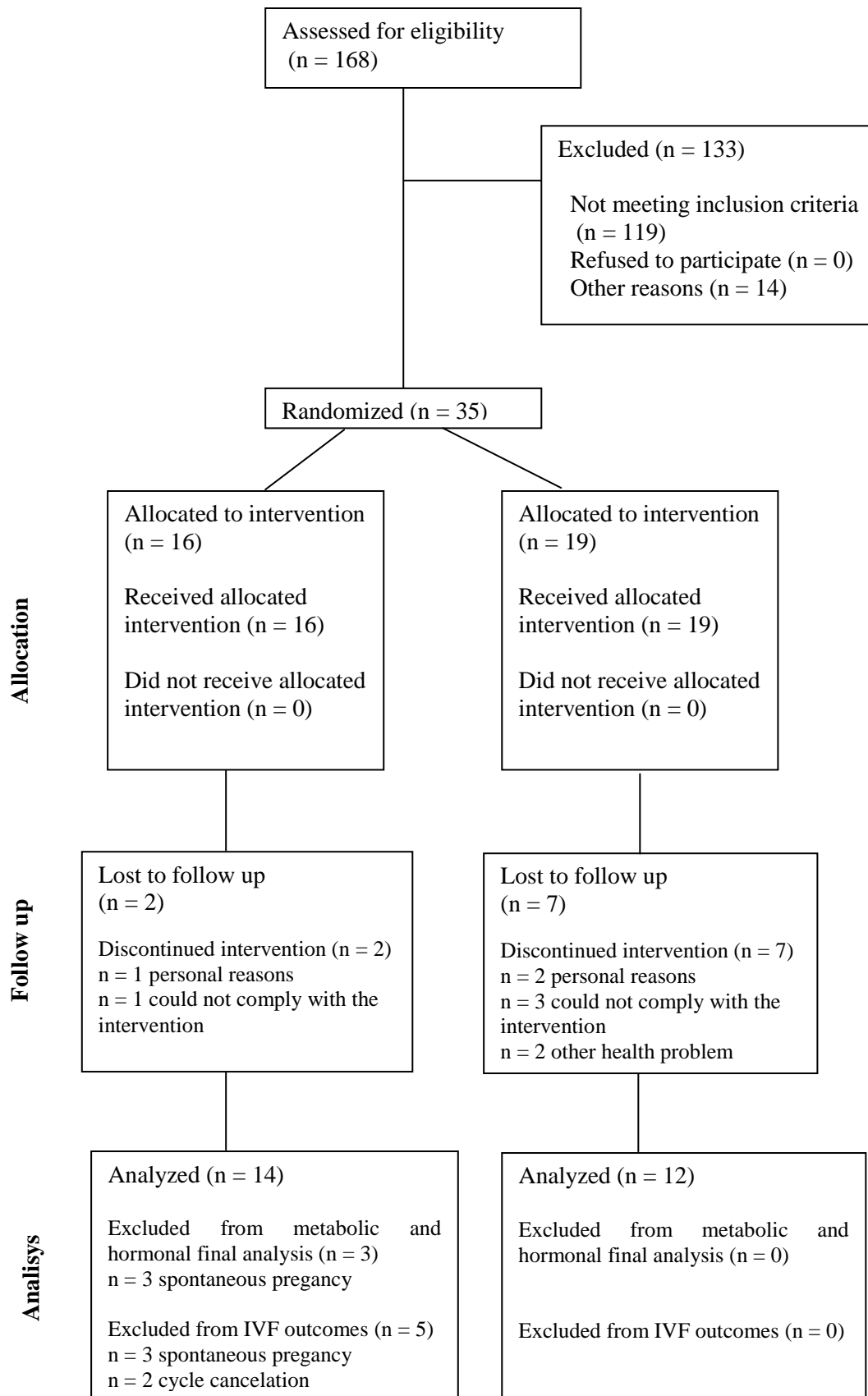


Figure 1. Flow of participants through the trials comparing a low glycemic index (LGI) diet group with a control group.

Table 1. Intervention Diet food composition

Meal	Composition
Breakfast	1 cup (200 ml) of milk 1-2 slices of whole-grain bread 1-2 tea spoon of margarine 1 portion of a low glycemic index fruit (2 slices of ricotta cheese) ¹
Snack	1 portion of a low glycemic index fruit
Lunch	3-5 table spoons of brown rice 1-2 and ½ ladle of black beans 1 portion of a lean meat free vegetables of A ² group 2-4 table spoons of raw vegetables of B ³ group 1 tea spoon of olive oil
Snack	1 portion of a low glycemic index fruit (1-2 table spoon of rolled oats) ¹
Dinner – Option 1	equal to lunch, without black beans
Dinner – Option 2	2-3 slices of whole-grain bread 2-3 tea spoon of margarine 2 slices of ricotta cheese (1 slice of ham) ¹ free vegetables of A ² group 1 portion of a low glycemic index fruit (1-2 table spoon o rolled oats) ¹
Snack	1 portion of dried fruits

¹Food between brackets, were present or not on the menu, according to the calorie intake that should be provided to each patient.

²Vegetables of A group were considered those vegetables containing around 5% of its content of carbohydrates.

³Vegetables of B group were considered those vegetables containing around 10% of its content of carbohydrates.

Table 2. Baseline characteristics of the study participants

Parameter	Control Group (mean±SE)	LGI Group (mean±SE)	p
Subjects (n)	12	14	
Age (years)	31.25 ± 0.78	31.36 ± 0.89	0.930
Body Mass (kg)	74.45 ± 2.70	77.03 ± 2.06	0.429
Height (m)	1.60 ± 0.01	1.63 ± 0.00	0.081
BMI (kg/m ²)	28.82 ± 0.98	28.67 ± 0.60	0.894
Body Fat (%)	38.94 ± 0.95	39.66 ± 0.96	0.579
Waist Circumference (cm)	91.10 ± 2.28	95.28 ± 1.76	0.132
Hip Circumference (cm)	110.62 ± 2.20	109.03 ± 1.59	0.543
Waist/Hip Ratio	0.82 ± 0.014	0.87 ± 0.013	0.010
Total Cholesterol (mg/dl)	174.75 ± 5.08	178.21 ± 8.71	0.721
HDL (mg/dl)	48.83 ± 2.61	48.14 ± 2.40	0.701
LDL (mg/dl)	111.41 ± 4.69	107.67 ± 6.04	0.611
Triglycerides (mg/dl)	82.50 ± 10.50	112.00 ± 19.87	0.173
Glucose (mg/dl)	85.16 ± 2.68	90.54 ± 2.53	0.485
Insulin (μUI/dl)	10.77 ± 1.53	13.93 ± 2.03	0.197
HOMA1-IR	2.30 ± 0.36	3.14 ± 0.56	0.193
HOMA2-IR	1.39 ± 0.18	1.90 ± 0.31	0.202
FSH (mIU/dl)	7.28 ± 2.11	6.61 ± 1.87	0.373
LH (mIU/dl)	4.74 ± 0.83	3.70 ± 0.23	0.211
Estradiol (pg/ml)	59.70 ± 8.31	54.44 ± 6.54	0.604
Progesterone (ng/ml)	0.47 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.877
Free Testosterone (nmol/l)	0.043 ± 0.007	0.032 ± 0.005	0.091
Prolactin (ng/ml)	11.52 ± 1.63	12.29 ± 1.22	0.695
SHBG (nmol/l)	50.93 ± 7.63	46.03 ± 3.31	0.539
Leptin (ng/ml)	69.42 ± 11.02	82.22 ± 12.99	0.676
Acyated Ghrelin (pg/dl)	87.27 ± 21.23	86.60 ± 12.00	0.831

LGI – low glycemic index; BMI – body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; FSH - follicle stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; SHBG - sex hormone-binding globulin.

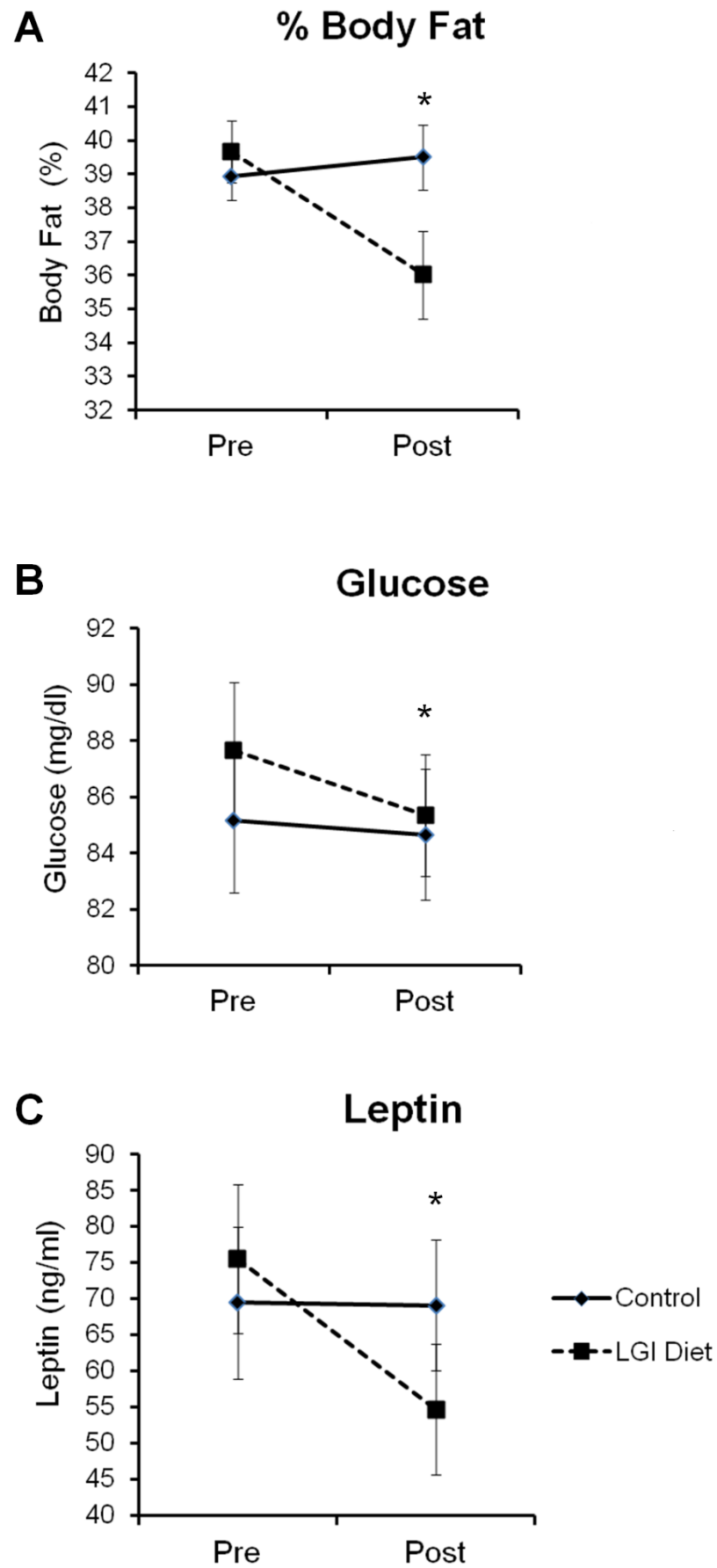


Figure 2. % Body Fat (A), Glucose levels (B) and Leptin levels (C) in the LGI (n=11) and control (n=12) groups, pre and post intervention. Values are in mean \pm SE. *Significantly different from the intervention group, $p < 0.05$. Levels of glucose were adjusted for insulin.

Table 3. Antropometric, hormonal and metabolic characteristics of the study participants post intervention

Parameter	Control Group (mean±SE)	Δ Control Group (mean±SE)	LGI Group (mean±SE)	Δ LGI Group (mean±SE)	p ¹
Subjects (n)	12	12	11	11	
Body Mass (kg)	75.17 ± 2.87	0.72 ± 0.75	72.77 ± 2.13 ^c	- 4.51 ± 0.83 ^c	<0.001
BMI (kg/m ²)	29.12 ± 1.13	0.30 ± 0.31	27.19 ± 0.76 ^c	- 1.95 ± 0.45 ^c	<0.001
Body Fat (%)	39.50 ± 0.79	0.56 ± 0.45	36.24 ± 1.48 ^c	- 3.69 ± 1.25 ^c	0.002
Waist Circumference (cm)	95.00 ± 2.23	0.01 ± 0.00	92.67 ± 2.08 ^c	- 1.31 ± 2.83 ^c	0.243
Hip Circumference (cm)	110.37 ± 2.17	- 0.25 ± 0.59	105.25 ± 1.47 ^c	- 3.99 ± 0.85 ^c	<0.001
Waist/Hip Ratio	0.83 ± 0.017	0.01 ± 0.005	0.83 ± 0.013 ^c	-0.03 ± 0.009 ^c	<0.001
Total Cholesterol (mg/dl)	177.91 ± 5.96	3.16 ± 4.98	185.18 ± 7.83	- 0.90 ± 6.32	0.864
HDL (mg/dl)	50.83 ± 3.24	4.00 ± 1.66	50.00 ± 4.00	2.00 ± 2.32	0.370
LDL (mg/dl)	110.23 ± 4.36	- 1.18 ± 4.34	114.60 ± 5.06	1.89 ± 5.25	0.446
Triglycerides (mg/dl)	84.25 ± 13.48	1.75 ± 8.68	102.90 ± 15.77	- 24.00 ± 15.97	0.155
Glucose (mg/dl)	84.66 ± 8.43	-0.50 ± 2.50	87.27 ± 2.26	- 3.27 ± 1.76	0.034 ^a
Insulin (μUI/dl)	10.62 ± 0.72	- 0.15 ± 1.00	14.57 ± 2.75	- 0.25 ± 1.23	0.848
HOMA1-IR	2.22 ± 0.17	- 0.07 ± 0.25	3.27 ± 0.73	- 0.17 ± 0.31	0.589
HOMA2-IR	1.35 ± 0.09	- 0.04 ± 0.12	1.90 ± 0.34	0.009 ± 0.13	0.994
FSH (mIU/dl)	7.48 ± 0.62	0.19 ± 0.29	7.13 ± 0.76	0.89 ± 0.59	0.174
LH (mIU/dl)	4.73 ± 1.10	- 0.008 ± 0.74	3.24 ± 0.42	- 0.31 ± 0.42	0.386
Estradiol (pg/ml)	41.72 ± 2.45	- 17.98 ± 7.47	44.90 ± 3.96	- 7.95 ± 6.40	0.049 ^b
Progesterone (ng/ml)	0.58 ± 0.05	0.11 ± 0.07	0.49 ± 0.07	0.11 ± 0.06	0.414
Free Testosterone (nmol/l)	0.035 ± 0.006	- 0.006 ± 0.006	0.028 ± 0.006	- 0.006 ± 0.005	0.482
Prolactin (ng/ml)	11.65 ± 2.01	0.13 ± 0.60	12.23 ± 1.73	- 1.01 ± 1.24	0.412
SHBG (nmol/l)	46.04 ± 7.10	- 4.89 ± 2.19	45.50 ± 4.81	1.73 ± 3.01	0.546
Leptin (ng/ml)	69.11 ± 9.52	-0.30 ± 4.63	60.78 ± 10.61	-21.43 ± 8.94	0.013
Acylated Ghrelin (pg/dl)	87.02 ± 22.65	-0.24 ± 9.04	97.33 ± 12.27	10.72 ± 9.07	0.215

LGI – low glycemic index; BMI – body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; FSH - follicle stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; SHBG - sex hormone-binding globulin. ^aadjusted for insulin. ^badjusted for SHBG; ^crelative to 14 subjects. ¹values for GEE of variables mean ± SE, comparing the LGI diet and the control group.

Table 4. Target and actual diet energy, macronutrients, dietary fiber and glycemic load

Parameter	LGI Diet Group		p ³	Control Group		p ⁵	p ⁶
	Target ¹ (mean±SE)	Actual ² (mean±SE)		Target ⁴ (mean±SE)	Actual ² (mean±SE)		
Subjects (n)	14	14		12	12		
Energy (kcal)	1537.49 ± 31.34	1332.04 ± 89.44	0.045	1983.14 ± 116.70	1909.17 ± 161.07	0.531	0.001
CHO (% energy)	48.53 ± 0.23	50.99 ± 2.07	0.259	52.93 ± 1.72	52.64 ± 1.15	0.889	0.471
CHO (g)	189.48 ± 4.24	173.53 ± 14.78	0.316	264.67 ± 22.33	153.92 ± 24.02	0.680	0.003
Protein (% energy)	21.77 ± 0.16	19.77 ± 0.95	0.058	17.40 ± 0.67	17.39 ± 0.66	0.986	0.033
Protein (g)	85.11 ± 1.68	65.05 ± 3.91	<0.001	83.13 ± 4.56	80.93 ± 6.37	0.497	0.027
Fat (% energy)	29.69 ± 0.07	29.23 ± 1.48	0.759	29.66 ± 1.71	29.89 ± 1.07	0.644	0.710
Fat (g)	51.55 ± 0.94	48.89 ± 3.33	0.062	65.10 ± 5.58	63.88 ± 5.65	0.801	0.002
Dietary Fiber (g)	31.87 ± 0.80	21.41 ± 1.65	<0.001	12.83 ± 1.09	14.22 ± 1.72	0.347	0.002
GL	75.00 ± 2.01	72.00 ± 6.51	0.666	134.26 ± 12.01	127.57 ± 16.08	0.421	<0.001

LGI - low glycemic index; CHO - carbohydrate; GL - glycemic load

¹Values (means ± SE) were calculated from sample menus.

²Actual values (means ± SE) were calculated from the 3d-food records completed during the intervention.

³Comparison between the target and actual values in the LGI diet group (independent t test).

⁴The target for control group was considered the composition of the usual diet of the patients at the baseline of the study.

⁵Comparison between the target and actual values in the control group (GEE).

⁶Comparison of the actual diets between the LGI diet and the control group (GEE).

CAPÍTULO VII

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Setor de Reprodução Assistida do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCPA é um dos cinco centros do país a oferecer este serviço à comunidade de forma gratuita, uma vez que não é subsidiado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, todas as formas de intervenção que possam levar a melhoras nos desfechos reprodutivos irão colaborar para a aplicação racional dos recursos financeiros destinados a este fim. Neste estudo nós oferecemos às pacientes inférteis com excesso de peso uma dieta hipocalórica, composta por alimentos de baixo índice/carga glicêmica. A proposta era oferecer uma dieta que: pudesse ter uma boa taxa de adesão (já que não era uma dieta muito restrita em calorias); que pudesse ser facilmente aplicada na prática clínica, que fosse composta por alimentos de fácil obtenção pelas pacientes de um hospital público; e que oferecesse, em teoria, o benefício adicional de um carboidrato de melhor qualidade.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a dieta de baixo índice glicêmico, com moderada redução de calorias, consumida nas 12 semanas que antecederam o ciclo de FIV foi eficaz para a perda de 5,5% do peso corporal, também com redução do percentual de gordura, da razão cintura/quadril, da glicemia, da leptinemia, e melhora no número de oócitos coletados e nas taxas de gestação e nascidos vivos, quando comparado às mulheres que mantiveram o peso corporal.

Em relação às hipóteses de pesquisa: a hipótese 1 foi confirmada integralmente, pois a intervenção dietética foi eficaz para a perda de peso e diminuição dos níveis de gordura corporal das pacientes no grupo dieta BIG; a hipótese 2 foi confirmada parcialmente, pois houve melhora nos níveis de glicemia das pacientes no grupo dieta BIG, mas a intervenção dietética não foi capaz de evidenciar melhoras significativas nos níveis de insulinemia e perfil lipídico; a hipótese 3 foi confirmada integralmente, já que o grupo dieta BIG apresentou redução de 26% nos níveis de leptina e um aumento, embora não significativo, de 18% nos níveis de grelina acilada; a hipótese 4 foi confirmada, já que os resultados apontaram diversas correlações entre as variáveis avaliadas, dentre as quais podemos destacar as correlações negativas moderadas entre o número de oócitos coletados com IMC, percentual de gordura e níveis de leptina; a hipótese 5 não foi confirmada já que não houve diferença nas doses de gonadotrofinas utilizadas em cada grupo para a estimulação ovariana ao longo do ciclo de FIV; e a hipótese 6 foi confirmada, pois as pacientes do grupo BIG apresentaram melhores

desfechos reprodutivos, como um maior número de oócitos coletados e uma maior taxa de gestação e nascidos vivos, quando comparadas ao grupo controle.

Os resultados deste trabalho dão sustentação à recomendação clínica de aconselhar mulheres com sobrepeso ou obesas a perderem peso através de uma dieta balanceada, preferencialmente com baixo índice/carga glicêmica, antes de serem submetidas a procedimentos de reprodução assistida. Entretanto, outros estudos são necessários com amostras mais expressivas e um maior tempo de intervenção para a confirmação dos resultados deste estudo. Trabalhos futuros avaliando os mesmos desfechos, mas contando com um grupo adicional de dieta convencional para perda de peso (por ex. uma dieta de alto índice glicêmico), seria desejável para avaliar o efeito isolado do índice/carga glicêmica, independente da perda de peso, nos desfechos do estudo. Além disto, também seria interessante o desenvolvimento de outros estudos avaliando dietas com diferentes proporções de macronutrientes, ou verificando os efeitos de nutrientes específicos: como por exemplo, o tipo de saturação dos lipídios oferecidos, os tipos de aminoácidos que compõem as proteínas da dieta, ou o efeito da suplementação de micronutrientes. Um melhor entendimento do papel da dieta, dos nutrientes, e da relação das reservas energéticas com a reprodução, possibilitará uma prescrição nutricional mais efetiva para o controle do peso corporal e melhora dos parâmetros metabólicos e hormonais que favorecem o processo reprodutivo.

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – HCPA TERMO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidada a participar de um estudo intitulado “*Efeito do índice glicêmico da dieta sobre os níveis de grelina, leptina, parâmetros metabólicos e de fertilidade em mulheres com excesso de peso atendidas no setor de Reprodução Assistida do HCPA*”, que será desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O excesso de gordura corporal e algumas alterações metabólicas associadas à quantidade e tipo de gordura depositada no corpo, alteração de gordura e de insulina no sangue podem influenciar a qualidade do ciclo menstrual e os níveis dos hormônios sexuais femininos e, conseqüentemente, a fertilidade feminina e a chance de sucesso nos procedimentos de reprodução assistida (fertilização *in vitro*, por exemplo). Este estudo visa analisar os efeitos do tipo de alimentação sobre hormônios reguladores do apetite, hormônios sexuais, gorduras e glicose sanguíneos, assim como descrever os resultados relacionados ao procedimento de reprodução assistida após a realização da dieta (número de óvulos puncionados, percentual de óvulos fertilizados, assim como qualidade dos embriões formados). Você fará parte de um de 3 grupos de tratamento: Grupo 1 – dieta I; Grupo 2: dieta II; ou Grupo 3: dieta habitual (você fará todos os exames e avaliações, mas manterá o seu padrão alimentar habitual). A escolha do grupo será feita através de sorteio e você será informada em qual grupo foi incluída apenas ao final do estudo. Para a medida da gordura corporal será utilizado um aparelho portátil em forma de pinça (adipômetro) que fará uma leve pressão por cerca de 2-3 segundos no ponto a ser medido. Além destas medidas, haverá coleta de sangue em duas ocasiões, com um intervalo de três meses entre elas. Em relação às coletas de sangue, você sentirá o desconforto da picada da agulha e poderá haver rompimento de vaso e hematomas, situações que podem ocorrer em qualquer coleta de sangue. Sua presença também será necessária em no mínimo três e no máximo cinco visitas (dependendo do tipo de tratamento), onde os pesquisadores farão o acompanhamento do tratamento dietético proposto e lhe darão algumas orientações nutricionais. Os únicos gastos que você

terá serão os relativos aos deslocamentos para estas consultas e para a sua alimentação, que poderá conter alguns alimentos especiais, dependendo do tipo de dieta que for sorteada.

Eu fui informada dos objetivos especificados acima e da justificativa deste estudo de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos previstos tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que serei livre para realizar perguntas antes, durante ou após o estudo, estando livre para desistir do mesmo em qualquer momento, sem prejuízo algum ao meu atendimento. Fui informada de que a participação neste estudo é absolutamente voluntária, sem, portanto, qualquer tipo de gratificação, tendo direito aos meus resultados no final do estudo. Fui certificada que os resultados deste estudo serão mantidos confidenciais, tendo acesso a eles somente os profissionais envolvidos no trabalho e o voluntário analisado, e quando divulgados preservarão o anonimato dos participantes.

Este termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser preenchido em duas vias, sendo uma para você e a outra arquivada pelo pesquisador, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (Fone: 51 33597640).

O profissionalcertificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Assinatura do paciente:.....

Assinatura do investigador:.....

Pesquisadores Responsáveis

Prof. Dra. Cileide Cunha Moulin (Fones: 51 33085122)

Nut^a Geórgia Franco Becker (Fone: 51 3359 8103)

Porto Alegre, ____ de _____ de ____

8.2 ANEXO 2

CARTA DE APROVAÇÃO



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110326

Data da Versão do Projeto: 22/09/2011

Data da Versão do TCLE: 22/09/2011

Pesquisadores:

EDUARDO PANDOLFI PASSOS

LARISSA PETRY DOS SANTOS

GEORGIA FRANCO BECKER

CILEIDE CUNHA MOULIN

Título: Efeito do índice glicêmico da dieta sobre resposta ovariana, escore embrionário e taxa de fertilização de mulheres com excesso de peso em reprodução assistida

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 14 de outubro de 2011.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

8.3 ANEXO 3

CARTA AO PESQUISADOR



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

Carta Nº: 20957

Ao pesquisador responsável

Projeto: 110326

Reg. CONEP:

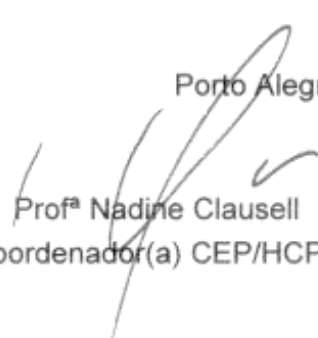
CAAE: 0260.0.001.165-11

Título: Efeito do índice glicêmico da dieta sobre níveis de grelina, leptina, parâmetros metabólicos e de fertilidade em mulheres com excesso de peso atendidas no setor de reprodução assistida do HCPA.

Pesquisador Responsável: CILEIDE CUNHA MOULIN

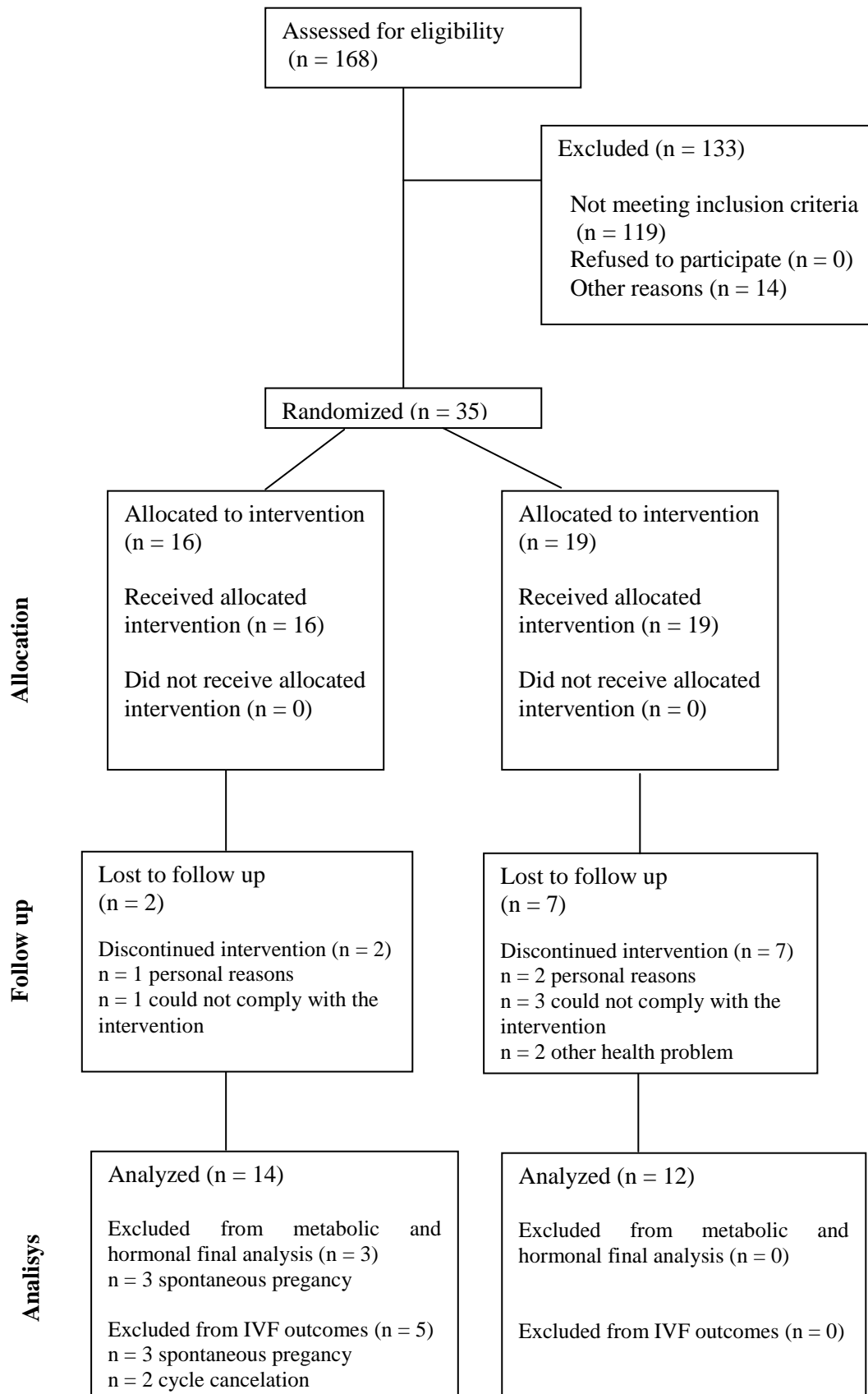
Informamos que a carta de aprovação emitida em 14/10/2011 pelo CEP-HCPA é referente ao projeto "Efeito do índice glicêmico da dieta sobre níveis de grelina, leptina, parâmetros metabólicos e de fertilidade em mulheres com excesso de peso atendidas no setor de Reprodução Assistida do HCPA".

Porto Alegre, 05 de dezembro de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenador(a) CEP/HCPA

8.4 ANEXO 4

FLUXO CONSORT



8.5 ANEXO 5

REGISTRO ENSAIO CLÍNICO

Saúde
Ministério da Saúde

REGISTRO BRASILEIRO DE
Ensaio Clínicos

USUÁRIO: cmoutin | SUBMISSÕES: 001 | PENDÊNCIAS: 000 | Perfil Painel | SAIR

PT | ES | EN

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

HOME / PAINEL

Submissões

NOVA SUBMISSÃO

Data	Título	Situação
2012/03/19 14:26	Efeito do índice glicêmico da dieta sobre níveis de grelina, leptina, parâmetros metabólicos e de fertilidade em...	pendente

Observações

Data	Submissão	Contexto	Texto
2013/09/05 00:10	Efeito do índice glicêmico da dieta ...	health-conditions	Incluir nos descritores específicos da condição de saúde ou...
2013/09/05	Efeito do índice	health-	Incluir nos descritores específicos

Você não pode modificar esse ensaio porque ele está sendo revisado.

Parte	Nome do formulário	Situação (en)	Situação (pt-br)
1	Identificação do ensaio	Parcial	Parcial
2	Patrocinadores	Concluído	Concluído
3	Condições de saúde	Concluído	Concluído
4	Intervenções	Concluído	Concluído
5	Recrutamento	Concluído	Concluído
6	Tipo do estudo	Concluído	Concluído
7	Desfechos	Concluído	Concluído
8	Contatos	Concluído	Concluído
9	Anexos	Concluído	Concluído

Enviar para Revisão

Todos os campos obrigatórios foram preenchidos.

Upload XML da Plataforma Brasil No file selected.

BIREME CPAS OMS | Ministério da Saúde | SUS | Ministério da Saúde | GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

8.6 ANEXO 6



CHECK LIST CONSORT – MANUSCRITO 1

CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No	
Title and abstract				
	1a	Identification as a randomised trial in the title	Pág. 69	
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	Pág. 69	
Introduction				
Background objectives	and	2a	Scientific background and explanation of rationale	Pág. 71
		2b	Specific objectives or hypotheses	Pág. 72-73
Methods				
Trial design		3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	Pág.74
		3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	Não se aplica
Participants		4a	Eligibility criteria for participants	Pág. 73
		4b	Settings and locations where the data were collected	Pág. 74
Interventions		5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	Pág. 74-77
Outcomes		6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	Pág. 74-79
		6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	Não se aplica
Sample size		7a	How sample size was determined	Projeto HCPA n° 11-0326
		7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	Não se aplica
Randomisation:				
Sequence generation		8a	Method used to generate the random allocation sequence	Pág. 74
		8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	Pág. 74
Allocation concealment mechanism		9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	Pág. 74
Implementation		10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	Projeto HCPA n° 11-0326
Blinding		11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and	

		how	Não se aplica
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	Não se aplica
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	Pág. 79-78
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	Pág. 78-79
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	Pág. 92
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	Pág. 92
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	Pág. 74
	14b	Why the trial ended or was stopped	Não se aplica
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	Pág. 94
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	Pág. 92
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	Pág. 79-81; 95-98
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	Pág. 97
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	Pág. 79-81; 95-98
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	Não se aplica
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	Pág. 86
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	Pág. 86
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	Pág. 86
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	Pág. 134
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	Projeto HCPA n° 11-0326
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	Pág. 87

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org

8.7 ANEXO 7



CHECK LIST CONSORT – MANUSCRITO 2

CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No	
Title and abstract				
	1a	Identification as a randomised trial in the title	Pág. 99	
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	Pág. 99	
Introduction				
Background objectives	and	2a	Scientific background and explanation of rationale	Pág. 101
		2b	Specific objectives or hypotheses	Pág. 102-103
Methods				
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	Pág. 104	
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	Não se aplica	
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	Pág. 103-104	
	4b	Settings and locations where the data were collected	Pág.104	
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	Pág. 104-106	
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	Pág. 104-108	
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	Não se aplica	
Sample size	7a	How sample size was determined	Projeto HCPA nº 11-0326	
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	Não se aplica	
Randomisation:				
Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	Pág. 104	
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	Pág. 104	
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	Pág. 104	
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	Projeto HCPA nº 11-0326	
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and	Não se aplica	

		how	
Statistical methods	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	Não se aplica
	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	Pág. 108
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	Pág. 108
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	Pág. 121
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	Pág. 121
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	Pág. 104
	14b	Why the trial ended or was stopped	Não se aplica
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	Pág. 123
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	Pág. 123
Outcomes estimation and	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	Pág. 109-110; 124-126
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	Não se aplica
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	Pág. 109-110; 124-126
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	Não se aplica
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	Pág. 115-116
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	Pág. 115-116
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	Pág. 115-116
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	Pág. 134
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	Projeto HCPA n° 11-0326
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	Pág. 116

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

8.8 ANEXO 8

REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS

O objetivo deste registro é conhecer os seus hábitos alimentares. Para que eles estejam o mais próximo possível da sua realidade, é importante que você anote TUDO o que comer e beber neste dia, durante as refeições e entre elas. Anote as quantidades (raso, cheio), as medidas caseiras (copo de requeijão, xícara, colher de sopa/chá, concha média, prato raso/fundo). Detalhe o tipo de alimento consumido, se o pão é integral ou branco, se o suco é artificial ou natural, se adoçou com açúcar ou adoçante, se o leite é desnatado ou integral, se comeu alguma fruta ou salada, especificar qual (por exemplo maçã, banana, rúcula, tomate, etc). Sempre que possível, procure anotar as marcas dos fabricantes (por exemplo, requeijão *nestlé*, pão de sanduíche *nutrella*, etc.), indicar quando o alimento for *light* ou *diet*. Seja o mais preciso e honesto possível, é melhor superestimar a quantidade de alimento consumido do que subestimar ou não fazer nenhuma estimativa. Preencher o registro alimentar em dois dias da semana e um dia do final de semana.

Exemplo de preenchimento:

Hora	Lugar	Alimento	Medida Caseira	Marca	
7:00	Casa	Leite Integral	1 copo de requeijão	Santa Clara	
		Achocolatado	1 colher de sopa cheia	Nescau	
		Pão de Sanduíche	2 fatias	Seven Boys	
		Margarina	1 colher de sopa rasa	Becel	
		Queijo lanche	1 fatia média		
10:00	Fora	Barra Cereal Banana	1 unidade	Nutry	
13:00	Fora	Carne de gado magra	1 bife grande		
		Arroz	8 colheres de sopa		
		Feijão	1 concha média		
		Vagem Cozida	2 colheres sopa cheias		
		Alface	3 folhas médias		
		Azeite de Oliva	1 colher sopa rasa		
		Batata Frita	2 pegadores		
16:00	Fora	Maçã	1 unidade média	Elegê	
		Iogurte de Morango	1 pote 200 ml		
18:00	Casa	Bolacha Cream Craker	6 unidades	Nestlé	
		Coca Cola Light	1 lata		
20:30	Casa	Macarrão Cozido	1 prato raso cheio	Pomarola	
		Molho de Tomate	6 colheres de sopa		
		Peito de Frango	1 bife médio		
		Cenoura crua ralada	½ unidade		
		Tomate	2 rodela grandes		
		Suco de Uva	1 copo requeijão		Tang
		Bombom Sonho de Valsa	2 unidades		Lacta

NOME:

	DATA: / /
DESJEJUM _____h	
COLAÇÃO _____h	
ALMOÇO _____h	
LANCHE _____h	
MERENDA _____h	
JANTAR _____h	
CEIA _____h	

NOME:

	DATA: / /
DESJEJUM _____h	
COLAÇÃO _____h	
ALMOÇO _____h	
LANCHE _____h	
MERENDA _____h	
JANTAR _____h	
CEIA _____h	

NOME:

	DATA: / /
DESJEJUM _____h	
COLAÇÃO _____h	
ALMOÇO _____h	
LANCHE _____h	
MERENDA _____h	
JANTAR _____h	
CEIA _____h	

8.9 ANEXO 9

PLANOS ALIMENTARES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS



PLANO ALIMENTAR (1400-1500 kcal)

CAFÉ DA MANHÃ:

- 1 xícara (200ml) de leite integral OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 1 fatia de pão integral OU 1 porção do grupo carboidratos
- 1 colher de chá rasa de margarina OU 1 porção do grupo gordura
- 1 porção de fruta

LANCHE DA MANHÃ:

- 1 porção de fruta

ALMOÇO:

- 3 colheres de sopa de arroz integral cozido OU
- 1 concha de feijão cozido OU 1 porção do grupo leguminosas
- 1 porção média de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 2 colheres de sopa Vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gordura

LANCHE DA TARDE

- 1 porção de fruta

JANTAR

OPÇÃO 1:

- 4 colheres de sopa de arroz integral cozido OU 2 porções do grupo carboidratos
- 1 porção pequena de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 2 colheres de sopa de vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gordura
- 1 porção de fruta

OPÇÃO 2:

- 2 fatias de pão integral OU 2 porções do grupo carboidratos
- 2 colheres de chá rasas de margarina OU 2 porções do grupo gordura
- 2 fatias média de queijo branco OU 1 porção do grupo leites e derivados
- Vegetais A à vontade
- 1 porção de fruta
- 2 colheres de sopa de aveia OU 2 porções do grupo carboidratos

CEIA:

- 1 porção de frutas secas

PLANO ALIMENTAR (1600-1700 kcal)

CAFÉ DA MANHÃ:

- 1 xícara (200ml) de leite integral OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 2 fatias de pão integral OU 2 porções do grupo carboidratos
- 2 colheres de chá rasas de margarina OU 2 porções do grupo gorduras
- 1 porção de fruta

LANCHE DA MANHÃ:

- 1 porção de fruta

ALMOÇO:

- 4 colheres de sopa de arroz integral cozido OU 2 porções do grupo carboidratos
- 1 concha de feijão cozido OU 1 porção do grupo leguminosas
- 1 porção média de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 3 colheres de sopa de Vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gorduras

LANCHE DA TARDE

- 1 porção de fruta
- 2 colheres de sopa de aveia em flocos OU 2 porções do grupo carboidratos

JANTAR

OPÇÃO 1:

- 4 colheres de sopa de arroz integral cozido OU 2 porções do grupo carboidratos
- 1 porção pequena de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 3 colheres de sopa de Vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gorduras
- 1 porção de fruta

OPÇÃO 2:

- 2 fatias de pão integral OU 2 porções do grupo carboidratos
- 2 colheres de chá rasas de margarina OU 2 porções do grupo gorduras
- 2 fatias médias de queijo branco OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 1 fatia de presunto magro OU meia porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 1 porção de fruta

CEIA:

- 1 porção de frutas secas

PLANO ALIMENTAR (1800-1900 kcal)

CAFÉ DA MANHÃ:

- 1 xícara (200ml) de leite integral OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 2 fatias de pão integral OU 2 porções do grupo carboidratos
- 2 colheres de chá rasas de margarina OU 2 porções do grupo gorduras
- 2 fatias médias de queijo branco OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 1 porção de fruta

LANCHE DA MANHÃ:

- 1 porção de fruta

ALMOÇO:

- 5 colheres de sopa de arroz integral cozido OU 2 e ½ porção do grupo carboidratos
- 1 e ½ concha de feijão cozido ou 1 e ½ porção do grupo leguminosas
- 1 porção média de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 4 colheres de sopa de Vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gorduras

LANCHE DA TARDE

- 1 porção de fruta
- 1 colher de sopa de aveia em flocos OU 1 porção do grupo carboidratos

JANTAR

OPÇÃO 1:

- 4 colheres de sopa de arroz integral cozido OU 2 porções do grupo carboidratos
- 1 porção pequena de carne branca ou de gado magra OU 1 porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 2 colheres de sopa de Vegetais B (Crus)
- 1 colher de chá de azeite de oliva OU 1 porção do grupo gorduras

OPÇÃO 2:

- 3 fatias de pão integral OU 3 porções do grupo carboidratos
- 3 colheres de chá rasas de margarina OU 3 porções do grupo gorduras
- 2 fatias médias de queijo branco OU 1 porção do grupo leites e derivados
- 1 fatia de presunto magro OU ½ porção do grupo carnes
- Vegetais A à vontade
- 2 colheres de sopa de Vegetais B (Crus)

CEIA:

- 1 porção de frutas secas

8.10 ANEXO 10



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS



LISTA DE PORÇÕES

Carboidratos	
Arroz integral	2 colheres sopa
Macarrão	1 pegador
Pão integral	1 fatia
Aveia	1 colh sopa
Biscoito integral	3 unidades

Leites e Derivados	
Leite integral	200 ml
Iogurte integral	200 ml
Leite soja	200 ml
Minas/ Ricota	2 Fatias médias
Mussarela/Prato	2 Fatias médias

Gorduras	
Azeite	1 colh chá
Margarina/Manteiga	1 colh chá
Nata	2 colh chá
Maionese	2 colh chá
Creme de Leite	1 colh sopa
Requeijão	1 colh chá cheia
Patê	1 colh sobremesa

Carnes	
Almôndegas caseiras	2 unidades
Atum em água	1 lata
Atum em óleo	1/2 lata
Carne bovina	1 porção (80g)
Carne porco	1 porção (80g)
Coração frango	15 unidades médias
Coxa/Sobrecoxa s/ pele	1 unidade grande
Fígado de boi	1 porção (80g)
Língua de boi	1 porção (80g)
Ovo de codorna	8 unidades
Ovo galinha cozido	2 unidades
Peito frango s/ pele	1 porção (100g)
Peito peru	2 fatias
Peixes	1 porção (140g)
Presunto ou frios	2 fatias
Sardinha em óleo	2 unidades

Leguminosas	
Feijão	1 concha
Lentilha	1 concha
Grão de soja	4 colh sopa
Ervilha cozida	4 colh sopa

Vegetais A - à vontade	
Alface, agrião, aspargo, acelga, alho, abobrinha verde, berinjela, brócolis, cebola, broto de feijão, couve, chicória, couve-flor, cebolinha, escarola, espinafre, mostarda, palmito, pimentão, pepino, rabanete, radite, repolho, rúcula, salsa, salsaão, tomate	

Vegetais B	
Cenoura crua	1 colh sopa
Beterraba crua	1 colh sopa

Frutas secas	
Ameixa	4 unidades
Damasco	5 unidades

Frutas	
Abacate	2 colh sopa
Ameixa	2 unidades
Bergamota	2 unidades
Kiwi	1 unidade
Laranja	1 unidade
Maçã	1 unidade
Mamão	1 fatia
Morango	10 unidades
Pêra	1 unidade
Pêssego	1 unidade
Salada fruta	1 copo peq

Doces	
Bolo branco	1 fatia peq
Bolo chocolate	1 fatia peq
Bombom	1 unidade
Chocolate	1 tirinha
Coca cola	1 copo
Doce leite	1 c. sobremesa
Geléia	1 c. sobremesa
Mel	1 c. sobremesa
Sorvete	1 bola

*1 porção Doces = 2 de Carboidratos