Luísa Pinheiro Pimenta Neves

**Avaliação metabólica e reprodutiva do jejum
intermitente em modelo animal de síndrome dos
ovários policísticos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em
Ciências

Programa de Obstetrícia e
Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Arantes Rosa Maciel

Versão corrigida e definitiva de acordo com a Resolução CoPGr 6018
de 13/10/2011

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Luísa Pinheiro Pimenta

Avaliação metabólica e reprodutiva do jejum
intermitente em modelo animal de síndrome dos
ovários policísticos / Luísa Pinheiro Pimenta Neves. -
- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico
2.Jejum 3.Dieta 4.Ratos wistar 5.Gorduras
6.Glicemia

USP/FM/DBD-445/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando e Núbia, ao meu irmão Fábio e ao meu namorado Juliano. Com todo o apoio, amor, e educação que me proporcionaram conquistei mais uma etapa!

Agradeço ao Professor Edmund Chada Baracat, pela confiança em minha capacidade, por proporcionar minha evolução pessoal e profissional, e também pelos incansáveis incentivos e orientações. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador Prof. Dr Gustavo Arantes Rosa Maciel, pela confiança e ensinamentos que me levaram a concluir este trabalho.

À Dra. Kátia C. Carvalho, pela paciência e toda ajuda que foi dada quando mais precisei.

Ao meu amigo Rodrigo Rodrigues Marcondes, pessoa essencial para a execução deste trabalho. Foi um verdadeiro professor, que me orientou em todas as etapas, do início ao fim, sem hesitar. Agradeço pela amizade, paciência e por toda confiança depositada em mim.

À minha amiga Giovana Maffazioli, um dos pilares deste trabalho. A sua amizade, cumplicidade, sabedoria e paciência foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço fortemente aos colaboradores de outros laboratórios que me auxiliaram: Dr Sérgio Catanozi, Dra Luzia Furukawa, Dra Daniele Faria e Dra Caroline Real e aos funcionários do Biotério Central da FMUSP. Agradeço pelos ensinamentos e orientações.

À todos os meus amigos do LIM 58: Juciara, Thiago, Leonardo, Giulia, Natalia, Bruna, Kelly, Anamaria e Marinalva, que não hesitaram em ajudar em nenhum momento e sempre demonstraram total apoio.

Agradeço a todos meus familiares, em especial meus pais Fernando e Núbia, que são minha base e batalharam muito para que eu pudesse concluir a pós-graduação. Ao meu irmão Fábio, que é uma das minhas maiores inspirações pessoais e profissionais. Também agradeço ao Juliano Lourenço, meu companheiro que esteve presente nestes anos de Mestrado, me apoiando sempre com muita paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pós-graduação concedida.

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*

(Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha< Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Resumo

1. Introdução	1
1.1 Síndrome dos ovários policísticos	2
1.2 Aspectos nutricionais e o papel da dieta na SOP	3
Figura 2. Distribuição de adipócitos brancos e marrons, em roedores e humanos. a) Adipócitos marrons interescapulares e brancos nas regiões gonadal e inguinal, em roedores; b) Adipócitos brancos subcutâneos e supraclaviculares, e marrons na região interna do pescoço e supraclavicular. Modificado de Bartelt e Heeren (30) (2016).	8
1.3 Modelos experimentais de síndrome dos ovários policísticos	8
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1 Animais	14
3.2 Tratamento dos animais e grupos experimentais	14
3.3 Protocolo de jejum intermitente	14
3.4 Pesagem dos animais e ingestão alimentar	15
3.5 Teste de tolerância à glicose	15
3.6 Teste de tolerância à insulina	16
3.7 Avaliação da atividade do tecido adiposo marrom por Tomografia por Emissão de Positrons (PET)	16
3.8 Esfregaço vaginal	17
3.9 Eutanásia	17
3.10 Análise estatística	18
4. Resultados	20
4.1 Ingestão alimentar	21
4.2 Peso corporal	21
4.3 Gaiola Metabólica	22
4.3.1 Ingestão alimentar	22

4.3.2 Ingestão hídrica	23
4.3.3 Peso fecal	23
4.3.4 Urina	24
4.4 Teste de tolerância à Insulina.....	24
4.5 Teste de tolerância à glicose	25
4.6 Peso dos órgãos.....	27
4.6.1 Gordura inguinal	27
4.6.2 Gordura mesentérica	27
4.6.3 Gordura perigonadal	28
4.6.4 Coração.....	29
4.6.5 Adrenal	29
4.6.6 Ovários	30
4.6.7 Útero	30
4.7 Ciclo estral.....	31
4.8 Dados murinométricos.....	31
4.8.1 Distância ano-genital	31
4.9 Atividade do Tecido Adiposo Marrom	32
5. Discussão.....	33
6. Conclusões.....	38
7. Anexos	40
7.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional	41
8. Referências Bibliográficas.....	42

Lista de Abreviaturas

ADL	Ad libitum
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CC	Corpos cetônicos
CHO	Carboidrato
cm ³	Centímetros cúbicos
DCV	Doença cardiovasculares
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i>
FBP	<i>Filtered Back Projection</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	Grama
HDL	Lipoproteína de alta densidade
JI	Jejum Intermitente
Kcal	Quilocalorias
LH	Hormônio Luteinizante
LIP	Lipídio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PET	Tomografia Computadorizada por Emissão de Positrons
PTN	Proteína
RI	Resistência à insulina
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
TAB	Tecido adiposo branco

TAM	Tecido adiposo marrom
TP	Propionato de testosterona
VET	Valor energético total
Vs	Versus

Figura 1. Cetogênese.....	6
Figura 2. Distribuição de adipócitos brancos e marrons em roedores e humanos.....	8
Figura 3. Desenho de estudo.....	18
Figura 4. Ingestão alimentar dos grupos experimentais, antes e ao final do jejum intermitente.....	21
Figura 5. Trajetória do peso corporal dos grupos experimentais....	21
Figura 6. Peso corporal final.....	22
Figura 7. Ingestão alimentar nas gaiolas metabólicas antes e ao final do jejum intermitente.....	22
Figura 8. Ingestão hídrica nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente.....	23
Figura 9. Peso fecal durante o tempo nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente.....	23
Figura 10. Excreção de urina nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente.....	24
Figura 11. Trajetória da glicemia dos grupos experimentais.....	24
Figura 12. Glicemia basal após jejum de 4 horas dos grupos experimentais.....	25
Figura 13. Área sob a curva do ITT dos grupos experimentais.....	25
Figura 14. Trajetória da glicemia dos grupos experimentais.....	26

Figura 15. Glicemia basal após jejum de 16 horas dos grupos experimentais.....	26
Figura 16. Área sob a curva do GTT dos grupos experimentais....	26
Figura 17. Peso da gordura inguinal.....	27
Figura 18. Peso da gordura mesentérica.....	28
Figura 19. Peso da gordura perigonadal.....	28
Figura 20. Peso do coração.....	29
Figura 21. Peso da adrenal.....	29
Figura 22. Peso dos ovários.....	30
Figura 23. Peso do útero.....	30
Figura 24. Distância ano-genital dos grupos experimentais.....	31
Figura 25. Atividade do tecido adiposo marrom.....	32
Figura 26. Ciclo estral dos animais Controle <i>ad libitum</i> e jejum intermitente.....	32

Neves LPP. Avaliação metabólica e reprodutiva do jejum intermitente em modelo animal de síndrome dos ovários policísticos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O tratamento para síndrome dos ovários policísticos (SOP) inclui como primeira linha de cuidados a mudança de estilo de vida com dieta balanceada e exercícios físicos. Dentre as intervenções nutricionais o jejum intermitente (JI) é uma estratégia alternativa. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do JI em aspectos metabólicos e reprodutivos em modelo animal de SOP. A SOP experimental foi induzida por injeção subcutânea de propionato de testosterona, em período neonatal. Os animais do grupo Controle receberam injeção subcutânea de óleo de girassol. Após 90 dias de idade, instituiu-se a intervenção: grupo JI recebeu ração padrão em dias alternados enquanto o grupo controle manteve a dieta no esquema habitual. Os grupos experimentais foram: Controle *ad libitum* (n=10), Controle JI (n=10), SOP *ad libitum* (n=11) e SOP JI (n=15). Foram realizados: teste de tolerância à insulina (ITT) e à glicose (GTT), esfregaço vaginal, passagem por gaiolas metabólicas e PET/CT para avaliar atividade metabólica de tecido gorduroso. Após 4 semanas de JI, os animais foram eutanasiados e coletados tecido adiposo em região inguinal, perigonadal e mesentérica, adrenal, coração, ovários e útero. Como resultados, identificamos que a ingestão alimentar no grupo SOP foi maior em relação ao Controle, antes e depois da intervenção, assim como a sua massa corporal. Nas gaiolas metabólicas pré-jejum, a ingestão alimentar e hídrica, excreção fecal e urinária foram maiores nos animais SOP. No ITT, a glicemia basal dos animais SOP ADL apresentou-se maior que os Controle ADL. No GTT, a glicemia de jejum das ratas Controle JI era maior que as ratas Controle ADL. O peso da inguinal do grupo SOP JI era menor que SOP ADL. A gordura mesentérica se apresentou menor nos animais Controle JI em relação ao Controle ADL. Controle e SOP JI possuíam menores quantidades de perigonadal quando comparadas as ADL. O peso do coração dos animais SOP ADL era maior que os SOP JI. Grupos SOP apresentaram maior adrenal que os Controle. SOP JI possuía menor peso de ovário em relação aos grupos Controle ADL e JI. Em conclusão, o jejum intermitente reduziu os depósitos de

gordura perigonadal e mesentérica dos animais Controle, e inguinal e perigonadal dos animais SOP. Além disso, o JI aumentou a glicemia basal das ratas Controle.

Descritores: Síndrome dos Ovários Policísticos; Jejum intermitente; Dieta.

Neves LPP. Evaluation of metabolic and reproductive effects of intermittent fasting in polycystic ovary syndrome model in rats [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Treatment for polycystic ovary syndrome (PCOS) includes as first line of care lifestyle change with balanced diet and exercise. Among the nutritional interventions, intermittent fasting (IF) is an alternative strategy. The objective of this study was to evaluate the impact of IF on metabolic and reproductive aspects in animal models of PCOS. Experimental PCOS was induced by subcutaneous injection of testosterone propionate in the neonatal period. Control animals received subcutaneous injection of sunflower oil. After 90 days of age, the intervention was instituted: IF group received standard ration on alternate days while the control group maintained the diet in the usual scheme. The experimental groups were: Control *ad libitum* (n = 10), Control IF (n = 10), PCOS *ad libitum* (n = 11) and PCOS IF (n = 15). The following tests were performed: insulin tolerance test (ITT) and glucose (GTT), vaginal smear, passage through metabolic cages and PET / CT to evaluate the metabolic activity of fatty tissue. After 4 weeks of IF, the animals were euthanized and collected adipose tissue in inguinal region, perigonadal and mesenteric, adrenal, heart, ovaries and uterus. As results, we identified that the food intake in the PCOS group was higher in relation to the Control, before and after the intervention, as well as their body mass. In the pre-fast metabolic cages, food and water intake, fecal and urinary excretion were higher in PCOS animals. In ITT, the basal glycemia of the PCOS ADL animals was higher than the Control ADL. In GTT, the fasting glycemia of Control IF rats was greater than the Control ADL rats. The inguinal weight of the PCOS IF group was less than PCOS ADL. Mesenteric fat was lower in Control IF animals than in Control ADL. Control and PCOS IF had smaller amounts of perigonadal when compared to ADL. The heart weight of the PCOS ADL animals was higher than the PCOS IFs. PCOS groups presented greater adrenal than Control. PCOS IF had lower ovary weight in relation to the ADL and IF Control groups. In conclusion, intermittent fasting reduced deposits of perigonadal and mesenteric fat in

Control animals, and inguinal and perigonadal in PCOS animals. In addition, IF increased basal glycemia of Control rats.

Descriptors: Polycystic Ovary Syndrome, Fasting; Diet; Rats, Wistar; Fats; Blood Glucose.

1.1 Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma endocrinopatia complexa com aspectos reprodutivos e metabólicos que atinge de 6 a 20% das mulheres em idade reprodutiva. É considerada como a endocrinopatia mais comum em pacientes nessa faixa etária (1).

A SOP é caracterizada por alterações clínicas como anovulação crônica (ciclos menstruais irregulares, amenorreia ou oligomenoréia), hiperandrogenismo clínico ou laboratorial (hirsutismo, acne e alopecia) e a presença de ovários de padrão policístico à ultrassonografia. Associa-se frequentemente à resistência insulínica, alterações metabólicas, excesso de peso, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (2). A prevalência da obesidade é maior em mulheres com SOP do que na população geral, podendo chegar a 60%, podendo agravar o quadro de resistência insulínica e piorar as complicações metabólicas e reprodutivas (3).

A etiologia da síndrome é complexa, porém, sabe-se que há contribuição de fatores ambientais e genéticos (4). Na fisiologia, podem estar presentes hipersecreção de gonadotrofinas, como o hormônio luteinizante (LH), aumento da expressão de enzimas esteroidogênicas nas células ovarianas produtoras de androgênios, resistência insulínica periférica, alteração intrínseca dos folículos ovarianos, entre outros (1, 5, 6). Assim, é comum na SOP uma gama de alterações da dinâmica folicular ovariana, na esteroidogênese e no metabolismo de glicose e lipídeos (1).

Em 1990, o *National Institute of Health* (NIH) estabeleceu critérios diagnósticos para a SOP: hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e ciclos espaniomenorreicos ou amenorreia, desde que outras causas fossem excluídas, como a síndrome de *Cushing*, hiperprolactinemia, deficiência enzimática da supra-renal e distúrbios da tireoide (7).

O consenso de Rotterdam, em 2003, realizado pelas *European Society for Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) e pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), incluíram como fatores diagnósticos ciclos espaniomenorreicos ou amenorreia (anovulação crônica), sinais clínicos ou

bioquímicos de hiperandrogenismo e ovários policísticos identificados pelo ultrassom (8). Esse consenso foi recentemente endossado e confirmado por um grupo internacional (9).

Os tratamentos da SOP incluem anticoncepcionais hormonais, medicamentos anti-androgênicos, medidas estéticas, sensibilizadores da insulina entre outros, a depender da queixa clínica e do perfil laboratorial da paciente (9). No entanto, as medidas universais de primeira linha na abordagem terapêutica da síndrome incluem mudança de estilo de vida, exercícios físicos e dieta com alimentação balanceada, almejando a perda de peso em pacientes com sobrepeso e obesas (10). Dentro das formas para alcançar o peso ideal, encontra-se a mudança na alimentação, exercícios físicos e alteração dos comportamentos. Com isso, é possível melhorar a qualidade de vida da paciente (11).

1.2 Aspectos nutricionais e o papel da dieta na SOP

O conjunto alimentação equilibrada e atividade física é o alicerce do bem-estar físico e mental. Em uma parte dos casos, o sobrepeso e a obesidade são resultados do desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Os fatores ambientais e genéticos são grandes influências ao excesso de peso, e estes interagem também com questões psicológicas, culturais e fisiológicas (12).

Entre as terapias não farmacológicas para a população com excesso de peso com SOP, está a perda de peso por mudanças de hábito de vida (11). A partir das associações entre obesidade, resistência insulínica e SOP, a manutenção do peso é recomendada como tratamento de primeira linha (13). Esta manutenção é uma prevenção do ganho de peso em excesso ou até mesmo mantê-lo com sucesso. Para isso é ideal uma organização do estilo de vida de forma multidisciplinar: alimentação saudável, exercício físico e equilíbrio psicológico (13).

As dietas elaboradas para mulheres com síndrome dos ovários policísticos possuem como um dos objetivos melhorar a sensibilidade à insulina. Para isso, os carboidratos devem ser consumidos com cautela, aumentando a ingestão de alimentos ricos em fibras e as refeições fracionadas

adequadamente durante o dia, respeitando sempre a individualidade (12). Conhecimentos referentes à nutrição aplicados à SOP vêm, em parte, do campo da terapia nutricional aplicada à área de diabetes. No entanto, até o momento, os estudos não conseguiram estabelecer uma prescrição nutricional especificamente direcionada para SOP uma vez que, o que parece, não haveria superioridade de nenhuma dieta específica no acompanhamento desses casos(14).

As recomendações diárias estabelecidas para uma alimentação equilibrada são basicamente 30% de lipídios (LIP) do valor energético total (VET), 15% de proteína (PTN), 55% de carboidratos (CHO) e 25g de fibras. As pesquisas que avaliam a variabilidade da composição dietética e seu impacto na perda/manutenção de peso ou nas alterações metabólicas são controversas (15).

Marsh e colaboradores (16) em 2010 estudaram o efeito de duas composições de dieta em 96 mulheres com sobrepeso e SOP, separando-as em dois grupos: 50 pacientes recebendo dieta com baixo índice glicêmico e 46 com dieta padrão, com duração de 12 meses ou então até perder 7% do peso. Obtiveram resultados quanto à antropometria (grupo com dieta modificada obteve maior perda de peso corporal), regularidade menstrual (mulheres que ingeriram a dieta de baixo índice glicêmico ficaram com ciclos mais regulares), e por fim o metabolismo, mostrando que a sensibilidade insulínica aumentou com a dieta de baixo índice glicêmico. Esse estudo, no entanto, apresentava um viés importante que foi o uso de um sensibilizador de insulina (metformina) pelas participantes do grupo de estudo. Houve também uma taxa elevada de abandono do estudo (*drop out*). Dessa forma, não se pôde afirmar de forma inequívoca que a composição entre essas dietas interferiu nos aspectos estudados, em parte devido à elevada taxa de desistência e ao uso de metformina.

Em outro estudo, Stamets e colaboradores (17) (2004), avaliaram 35 mulheres, divididas em: 17 recebendo dieta hiperprotéica (40% CHO, 30% PTN e 30% LIP) e 18 em dieta padrão (55% CHO, 15% PTN e 30% LIP), durante 30 dias. Não houve diferenças significativas entre os aspectos estudados, como a

antropometria, o metabolismo e fertilidade. Assim, a pergunta “há uma dieta específica capaz de melhorar os sintomas da síndrome dos ovários policísticos?” não pôde ser respondida.

Estudo de revisão realizado por Moran e colaboradores (14) em 2013, observaram que as dietas contendo composições nutricionais específicas influenciaram mais nos parâmetros metabólicos do que as dietas-padrão, principalmente no que diz respeito à redução da resistência insulínica, do colesterol total ou até mesmo do HDL. O motivo ainda não é claro, devido às diferenças dietéticas de cada estudo. Porém, as melhoras dos fatores estudados (antropometria, metabolismo e fertilidade) são provenientes do emagrecimento, tornando claro como a perda de peso é fundamental.

É sabido que a restrição calórica causa impactos clínicos e moleculares importantes em vários processos metabólicos como a resistência à insulina, dislipidemia e obesidade, bem como resistência ao estresse oxidativo e longevidade. Os mecanismos são altamente regulados em nível molecular e também são conservados entre as espécies, uma vez que se assemelha de modo muito proeminente desde organismos mais simples até mamíferos, primatas e o próprio ser humano (18).

Durante o período de jejum ou em estado de insulina reduzida, ocorre a depleção glicogênio hepático. Com isso, os corpos cetônicos (CC, acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona) são produzidos (cetogênese) pelo fígado a partir da β -oxidação de ácidos graxos. Estes produtos atuam como fonte energética metabólica alternativa de diversos órgãos, como cérebro, córtex renal, coração e músculo esquelético (19, 20).

Figura 1. Cetogênese, produção de corpos cetônicos para fonte energética alternativa. Modificado de Gershuni, Yan e Medici, 2018.

A cetogênese é mediada pela epinefrina e glucagon e bloqueada pela insulina (20). Esta inibe a lipólise por meio da inativação da lipase hormônio sensível no tecido adiposo, e assim prejudica a liberação de ácidos graxos para a cetogênese hepática (21). O jejum prolongado estimula a produção de corpos cetônicos, os quais utilizam a gordura (tanto dos depósitos quanto provenientes da dieta) como fonte energética alternativa (20).

Com o intuito de reduzir o peso corporal de indivíduos com sobrepeso e obesidade, o jejum é uma estratégia caracterizada pela ausência ou ingestão mínima de alimentos ou líquidos em períodos alternados com dieta normo ou hipocalórica. Os protocolos existentes são variados, entre eles: jejum intermitente (jejum em dias alternados ou em dois dias por semana), jejum periódico (vários dias ou mais em jejum a cada duas semanas) (22) e alimentação restrita em tempo (segue a mesma rotina alimentar diariamente, estabelecendo horários específicos para jejuar e as horas restantes para se alimentar) (23).

O jejum intermitente se difere da restrição calórica, pois esta é constituída por uma redução na porcentagem de quilocalorias (kcal) diária e a frequência alimentar não é interrompida. Sabe-se que o jejum intermitente

resulta em várias modificações biológicas, como a cetogênese, alterações nas vias metabólicas, nos processos celulares, lipólise e autofagia. Sendo assim, supõe-se que este procedimento pode ser mais eficiente do que alguns medicamentos já aprovados, como por exemplo, em doenças reumatóides e epilepsia (24).

Modelos experimentais têm sido utilizados para se entender melhor os efeitos de dietas dessa natureza na obesidade e na saúde de vários organismos. No trabalho de Chausse e colaboradores (25) (2014), utilizaram ratos com idade de oito semanas e aplicaram JI durante três semanas. Encontraram vários resultados, entre eles: menor peso corporal em ratos JI em comparação aos *ad libitum*; após duas horas da oferta da ração, os modelos animais submetidos a jejum intermitente ingeriram 53% do seu consumo diário. Além disso, perceberam uma redução da massa do fígado de animais em JI durante os dias de jejum, o que é possivelmente uma consequência da utilização do glicogênio hepático e lipídios como fontes de energia.

É sabido que o tecido adiposo é dividido entre branco (TAB) e marrom (TAM). O TAM, também encontrado em mamíferos, é composto por adipócitos marrons, os quais possuem elevada expressão de termogenina (UCP-1, “Uncoupling Protein-1”), uma proteína mitocondrial, que é responsável por dissipar energia para gerar calor e manter a temperatura corporal (26-28). A capacidade termogênica do TAM tem sido bastante estudada, pois é inversamente correlacionada com IMC, gordura corporal, glicemia e diabetes (29), que estão fortemente ligados à Síndrome dos Ovários Policísticos. Dessa forma, há a hipótese de que aumentar a massa da gordura marrom, ou sua atividade, pode ser capaz de tratar complicações metabólicas e obesidade (26). Em roedores, o TAM está localizado na região interescapular e perirenal, e compartilha forte semelhança com a gordura marrom de recém-nascidos (27). Após a exposição ao frio (14 a 17º), por um curto tempo (1-2h), é possível visualizar a atividade aumentada do TAM por meio do PET-CT com FDG, o qual é considerado o padrão-ouro para esta finalidade (29).

Figura 2. Distribuição de adipócitos brancos e marrons, em roedores e humanos. a) Adipócitos marrons interescapulares e brancos nas regiões gonadal e inguinal, em roedores; b) Adipócitos brancos subcutâneos e supraclaviculares, e marrons na região interna do pescoço e supraclavicular. Modificado de Bartelt e Heeren (30) (2016).

1.3 Modelos experimentais de síndrome dos ovários policísticos

A utilização de modelos experimentais de doenças é útil para tanto o melhor entendimento da fisiopatologia como para a elaboração de novas estratégias terapêuticas. Vários modelos animais de SOP foram desenvolvidos baseados na Hipótese de Barker. Essa hipótese, proposta pelo epidemiologista David Barker, descreve que a ocorrência de insultos intrauterinos ou no período neonatal, podem resultar em alterações estruturais, fisiológicas e metabólicas para o organismo e assim desencadear doenças endócrinas, metabólicas e cardiovasculares na vida adulta (31-33).

Baseado nesta hipótese houve um considerável número de estudos mostrando que o excesso de androgênio em um período precoce da vida, pode resultar em manifestações com fenótipo da SOP durante a vida adulta. Nesse sentido, o uso de modelos animais para a investigação da SOP, tornou-se de grande ajuda para a busca do esclarecimento dessa síndrome. E entre os

modelos experimentais de SOP, os animais mais utilizados são: camundongos, ratos, ovelhas e macacos *Rhesus* (34).

Macacos *Rhesus* fêmeas, foram expostas no período intrauterino a níveis de testosterona equivalente a aqueles encontrados em machos expostos no período fetal, mostraram características clínicas e bioquímicas da SOP (35). Essas fêmeas de macacos *Rhesus* exibiram hipersecreção de hormônio luteinizante (LH), hiperinsulinemia, hiperandrogenismo e anovulação. Essas observações também foram verificadas em ovelhas expostas a testosterona no período gestacional, resultando em um aumento da secreção de LH e alteração do ciclo estral das ovelhas filhas (35).

A escolha de macacos *Rhesus* ou ovelhas para modelo experimental de SOP dispõe de um custo financeiro mais elevado e de maior dificuldade para manipulação em comparação ao uso de roedores, tais como, camundongos e ratos. Entre as vantagens que o modelo experimental com roedores oferece, destacam-se: fácil manipulação e manutenção, curto período reprodutivo, gestacional e ciclicidade ovariana (36).

Em roedores, alguns tipos de androgênios estão sendo usados como indutores para um modelo experimental de SOP, dentre esses androgênios, destacam-se: a deidroepiandrosterona (DHEA), 5 α -di-hidrotestosterona (DHT) e o propionato de testosterona (TP, do inglês *testosterone propionate*) (37).

O tratamento pós-natal (1 a 3 dias após o nascimento) com propionato de testosterona em roedores induz algumas características típicas da SOP em humanos, como a anovulação, ovários policísticos, hiperandrogenismo, resistência à insulina (36). Em ratas, uma única dose de TP do dia 1 - 5 de vida resultou em um quadro de anovulação, estro permanente, ovários policísticos com maior presença de folículos atrésicos, aumento dos níveis séricos de LH e testosterona, disfunções à nível hipotalâmico, resistência à insulina, esteatose hepática (28, 38-42). Similarmente, camundongos tratadas com TP, exibiram anovulação e pouca receptividade sexual (36, 43).

Embora a intervenção dietética seja uma medida de primeira linha no tratamento da SOP, os mecanismos envolvidos na melhoria dos aspectos

metabólicos e reprodutivos ainda não são bem conhecidos. Além disso, estratégias de intervenções nutricionais são importantes para garantir a eficácia do tratamento e a manutenção da perda de peso, bem como um estilo saudável de alimentação. O jejum intermitente promove a perda de peso em indivíduos com sobrepeso e obesidade, que estão frequentemente associados à síndrome dos ovários policísticos. Parece ser uma alternativa viável à restrição calórica estrita ou mesmo a dietas radicais de corte de calorias. Desta forma, frente à possibilidade de utilizar essa intervenção na clínica diária e tendo em vista os hiatos no conhecimento de seu impacto em nível fisiológico, esse projeto de pesquisa foi elaborado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do jejum intermitente em aspectos metabólicos e reprodutivos de ratas de síndrome dos ovários policísticos induzidas experimentalmente.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o peso corporal, os dados murinométricos e a ingesta alimentar;
- Avaliar a tolerância à insulina e à glicose;
- Analisar a atividade do tecido adiposo marrom por PET-CT;
- Avaliar parâmetros macroscópicos dos órgãos reprodutivos e o ciclo estral.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizadas 46 ratas *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus)* obtidas e mantidas no Centro de Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Com dois dias de vida, os animais SOP receberam uma dose única de testosterona para indução da SOP experimental, e os Controle, óleo de girassol. Os animais foram então, confinados com as respectivas mães no período de lactação (21 dias) em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), separadas de acordo com o tipo da substância administrada e com tampa gradeada. A temperatura do local foi mantida em torno de 22°C, com iluminação artificial, sendo o fotoperíodo intercalado de 12h/claro e 12h/escuro (considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas). Após o período de lactação, as ratas foram separadas das mães e cada grupo experimental foi alocado em uma gaiola plástica própria, com as mesmas condições citadas anteriormente.

3.2 Tratamento dos animais e grupos experimentais

Os modelos animais de SOP receberam injeção subcutânea contendo propionato de testosterona (1,25 mg em 0,1 mL de óleo girassol). Os animais controle, nesse mesmo período, receberam uma única injeção subcutânea de óleo de girassol (0,1 mL). Após 90 dias, instituiu-se a intervenção, conforme os seguintes grupos experimentais:

- Controle com dieta *ad libitum* (Controle ADL; n=10)
- Controle com jejum intermitente (Controle JI; n=10)
- Modelo experimental de SOP com dieta *ad libitum* (SOP ADL; n=11)
- Modelo experimental de SOP com jejum intermitente (SOP JI; n=15)

Os animais foram mantidos em número de 2-4 por gaiola.

3.3 Protocolo de jejum intermitente

Na oitava semana de vida, o grupo em jejum intermitente recebeu ração padrão (Nuvilab CR-1, irradiada: 63,4% CHO, 25,9% PTN e 10,6% LIP) em

dias alternados: 24 horas com alimentação *ad libitum* e as próximas 24 horas em jejum. A ração era retirada/introduzida às 10h. Os animais que receberam dieta padrão foram alimentados sem restrições (*ad libitum*). O processo de jejum intermitente teve duração de quatro semanas (25).

3.4 Pesagem dos animais e ingestão alimentar

Entre os 80-84 dias de vida, no período da manhã, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas (GM) – uma rata por gaiola – localizadas no LIM 16, na FMUSP. Estas gaiolas têm como função quantificar as fezes e urina e avaliar a ingestão alimentar e hídrica de cada animal.

As ratas passaram 96 horas, sendo as primeiras 24h apenas adaptação, tendo que descartar todos os dados que foram gerados. No dia seguinte à adaptação – ao completar 48h -, as amostras (fezes e urina) eram quantificadas e armazenadas no freezer -80°C, a ração era pesada e a água também quantificada pelo medidor da própria garrafa. Isso foi realizado até completarem 96 horas. Ao final, voltaram às gaiolas normais e realocadas no Biotério Central.

Do primeiro ao 90º dia de vida, os animais foram pesados uma vez por semana. Em seguida, passaram a ser duas vezes. A balança utilizada era digital não paramétrica. Para avaliação da ingestão alimentar, o alimento fornecido e o remanescente foram pesados duas vezes por semana.

Antes e ao final da intervenção, as ratas foram mantidas individualmente em gaiolas metabólicas por 96 horas, com intuito de avaliar a ingestão alimentar e hídrica, o volume urinário e a massa fecal. Fezes e urina foram coletados e armazenados a -80°C.

3.5 Teste de tolerância à glicose

As ratas ficaram em jejum por 16 horas, com acesso livre à água. Em seguida foram pesadas e então levadas ao o Laboratório de Lípidos (LIM 10, FMUSP). Antes de iniciar o procedimento, os animais foram mantidos em uma gaiola de aquecimento por pelo menos 15 minutos. Ao retirar a rata desta

caixa, era imobilizada com um pano deixando apenas a cauda livre. Em seguida, um escalpe foi introduzido na veia caudal, o sangue basal colhido e a glicemia medida com o glicosímetro e tiras da Accu-Check Performa® (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) (glicemia basal). Feito isso em todos os animais, a glicose foi introduzida por meio de gavagem (2g/Kg de peso corporal) e a glicemia medida 15, 30, 60 e 90 minutos após a gavagem. O sangue foi colhido novamente no tempo 15. Ao final do protocolo, os animais voltaram ao Biotério Central com ração e água *ad libitum*.

3.6 Teste de tolerância à insulina

Os animais ficaram em jejum durante quatro horas, com acesso livre à água. Em seguida foram pesadas e transportadas ao LIM 10 e mantidas na gaiola de aquecimento por 15 minutos. Quando imobilizadas com um pano, o escalpe foi introduzido na veia caudal e a glicemia basal medida com o glicosímetro e tiras da Accu-Check Performa®. Em seguida, a insulina foi injetada intraperitonealmente (0,5 U/kg de peso corporal) e a glicemia medida 15, 30 e 45 minutos após a mesma. Ao final do protocolo, os animais voltaram ao Biotério Central com ração e água *ad libitum*.

3.7 Avaliação da atividade do tecido adiposo marrom por Tomografia por Emissão de Positrons (PET)

A atividade do depósito de gordura marrom interescapular foi quantificada por PET com fluorodesoxiglicose ([¹⁸F]FDG). Os animais foram anestesiados com isoflurano 5% em oxigênio e mantido em isoflurano 2-3% em O₂ para injeção do radiofármaco e durante aquisição das imagens. Com o animal anestesiado, uma gota de sangue foi obtida da cauda para medida da glicemia, colocando a gota no glicosímetro Accu-check Active (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha).

O radiofármaco [¹⁸F]FDG (0,5-1 mCi em até 1 mL) foi administrado via endovenosa na veia caudal dos animais anestesiados. Após a injeção, os animais acordaram da anestesia para melhor distribuição do radiofármaco pelo organismo e foram expostos a ambiente frio (19°C). Após 45 minutos da

injeção, os animais foram novamente anestesiados e então posicionados com a região escapular no centro do campo de visão do equipamento PET para pequenos animais (Triumph Trimodality, Gamma Medica Ideias, Califórnia, EUA) e imagens foram adquiridas por 30 minutos.

Durante todo o tempo de aquisição das imagens os animais tiveram batimentos cardíacos monitorados. Após finalização das imagens PET, os animais foram reposicionados para aquisição da imagem de tomografia computadorizada (CT), no mesmo equipamento, com aquisição de 2-4 minutos utilizando 45 kVp e 400 μ A. Imagens PET foram reconstruídas utilizando algoritmo OSEM (Ordered Subsets Expectation Maximization) 3D e as imagens de CT foram reconstruídas utilizando algoritmo FBP (Filtered Back Projection). As imagens foram analisadas no software AMIDE.

3.8 Esfregaço vaginal

O esfregaço vaginal foi colhido diariamente, a partir do 75º até o 90º dia de idade para avaliação do ciclo estral. As lâminas contendo o esfregaço vaginal foram coradas pelo método de Shorr-Harris e analisadas por microscopia óptica convencional. A fase do ciclo estral foi determinada de acordo com o tipo de célula predominante nas lâminas analisadas. Foi considerado normal o ciclo estral que exibiu todas as fases (proestro, estro, metaestro e diestro) no período de 4-5 dias.

3.9 Eutanásia

Entre 121-124 dias de vida os animais foram anestesiados com 0,3mL de quetamina associada ao cloridrato de xilazina, na proporção 1:1. Com os animais anestesiados, foram medidos as distâncias naso-anal e ano-genital. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e então eutanasiados por decapitação.

Foram extraídos: sangue, hipófise, hipotálamo anterior e posterior, tecido adiposo marrom interescapular, pâncreas, ovários, útero, fígado, adrenal, músculos (sóleo e extensor longo dos dedos). Além disso, os tecidos adiposos brancos inguinal (subcutâneo), perigonadal e mesentérico (viscerais) também

foram dissecados, pois são depósitos análogos ao gluteofemoral e abdominal em seres humanos (44).

As gorduras mesentérica, perigonadal, inguinal, os ovários e o útero foram utilizados para análises morfológicas e morfométricas. Após a dissecação e coleta dos órgãos, as carcaças dos animais foram recolhidas pelo setor responsável e obedecerão às normativas de descarte de material biológico preconizados pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Figura 3. Desenho de estudo. SOP, modelo animal de síndrome dos ovários policísticos; ADL, *ad libitum*; JI, jejum intermitente; sc, subcutânea; ITT, teste de tolerância à insulina; GTT, teste de tolerância à glicose.

3.10 Análise estatística

Para análise estatística e construção de gráficos, foi utilizado o programa Graph Pad Prism (Versão 5.0). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil) (IIQ), dependendo da normalidade, a qual foi testada por Shapiro-Wilk.

Para análise entre duas variáveis contínuas, o teste T de Student foi utilizado para variáveis paramétricas, enquanto que o teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Em casos de mais de dois grupos em conjunto, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para dados contínuos normalmente distribuídos, seguida do teste de Tukey. Para dados não normais, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Ingestão alimentar

Os animais toleraram bem o tratamento hormonal e tiveram desenvolvimento adequado. Não houve perda de animais nesse experimento. No período pré-jejum, a ingestão alimentar do grupo SOP foi maior em relação aos animais Controle ($p=0,0007$). Após a intervenção, os grupos que realizaram jejum intermitente mantiveram a mesma relação ($p=0,016$) (figura 4).

Figura 4. Ingestão alimentar dos grupos experimentais, antes e depois do jejum intermitente. (A) Ingestão alimentar antes do jejum intermitente; a – Controle vs SOP, $p=0,0007$. (B) Ingestão alimentar após o jejum intermitente; b – $p=0,016$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.2 Peso corporal

O gráfico abaixo demonstra a trajetória do peso corporal por todo o experimento (figura 5).

Figura 5. Trajetória do peso corporal dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Ao final do experimento, o peso corporal do grupo SOP se manteve maior em comparação aos seus respectivos grupos controles (figura 6).

Figura 6. Peso corporal final. a – Controle ADL vs SOP JI, $p < 0,0001$; b – Controle ADL vs SOP ADL, $p < 0,0001$; c – Controle JI vs SOP ADL, $p < 0,001$; d – Controle JI vs SOP ADL, $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3 Gaiola Metabólica

4.3.1 Ingestão alimentar

Antes do início da intervenção, a ingestão alimentar do grupo SOP foi maior em relação ao grupo controle no período em que estavam alocadas em gaiolas metabólicas ($p = 0,0002$). Ao final do protocolo do jejum intermitente, os animais retornaram às GM, e assim foi visto que houve maior ingestão alimentar no grupo Controle JI em relação ao SOP JI ($p = 0,01$) (figura 7).

Figura 7. Ingestão alimentar nas gaiolas metabólicas antes e ao final do jejum intermitente. (A) Ingestão alimentar antes do protocolo do jejum intermitente. Grupo SOP consumiu mais ração; a – Controle vs SOP, $p = 0,0002$; (B) Ingestão alimentar ao final do protocolo. Grupo Controle JI consumiu mais em relação ao grupo SOP JI; b – Controle JI vs SOP JI, $p = 0,01$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.3.2 Ingestão hídrica

Os gráficos abaixo representam a ingestão de água dos animais nas gaiolas metabólicas, antes e ao final do protocolo de intervenção. Foi visto que as ratas SOP ingeriram mais água em relação aos grupos Controle, apenas no período anterior à intervenção ($p<0,0001$) (figura 8).

Figura 8. Ingestão hídrica nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente. (A) Antes da intervenção, o grupo SOP ingere mais água em relação ao Controle. (B) Ao término do protocolo, o consumo de água não apresentou diferença estatística significativa. a – Controle vs SOP, $p<0,0001$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3.3 Peso fecal

O peso fecal do grupo SOP foi maior em relação aos animais Controle antes da intervenção ($p=0,04$). Ao final, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (figura 9).

Figura 9. Peso fecal durante o tempo nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente. (A) Peso fecal dos grupos experimentais antes do início da intervenção. Grupo SOP apresentou maior peso fecal em relação ao grupo Controle. (B) Peso fecal

dos animais ao final do protocolo de jejum intermitente. a – Controle vs SOP, $p=0,04$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3.4 Urina

A excreção de urina foi quantificada antes e próximo ao término da intervenção. Encontrou-se diferença significativa no período que antecede o início do protocolo ($p=0,002$) (figura 10).

Figura 10. Excreção de urina nas gaiolas metabólicas, antes e depois do jejum intermitente. (A) Antes do protocolo, o grupo SOP excretou mais em relação ao grupo controle. (B) Não houve diferença estatística na excreção de urina após a intervenção. a – Controle vs SOP, $p=0,002$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.4 Teste de tolerância à Insulina

O gráfico abaixo demonstra a glicemia dos grupos experimentais em cada ponto coletado (0, 15, 30 e 45 minutos). Não houve diferença estatística entre eles (figura 11).

Figura 11. Trajetória da glicemia dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Porém, o grupo Controle *ad libitum* apresentou menor glicemia basal, após jejum de 4 horas, em relação ao grupo SOP ADL ($p=0,02$) (figura 12).

Figura 12. Glicemia basal após jejum de 4 horas dos grupos experimentais. Houve diferença apenas entre os grupos Controle ADL e SOP ADL. a – Controle ADL vs SOP ADL, $p=0,02$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

A área sob a curva (AUC) foi analisada e não houve diferença significativa entre os grupos (figura 13).

Figura 13. Área sob a curva do ITT dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.5 Teste de tolerância à glicose

Após a aplicação de glicose via gavagem, a glicemia foi medida nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos. Não houve diferença significativa entre eles (figura 14).

Figura 14. Trajetória da glicemia dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Porém, a glicemia de jejum no grupo Controle JI foi maior em relação ao grupo Controle *ad libitum* ($p=0,045$) (figura 15).

Figura 15. Glicemia basal após jejum de 16 horas dos grupos experimentais. a – Controle ADL vs Controle JI, $p= 0,045$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

A AUC não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais (figura 16).

Figura 16. Área sob a curva do GTT dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.6 Peso dos órgãos

4.6.1 Gordura inguinal

Após dissecação e pesagem dos depósitos de gordura inguinal, foi visto que os animais do grupo SOP ADL possuíam maior peso desse depósito de gordura quando comparados aos grupos Controle ADL e JI ($p=0,007$). Além disso, as ratas SOP submetidas à JI reduziram significativamente o peso da gordura inguinal em relação às SOP *ad libitum* ($p=0,0007$) (figura 17).

Figura 17. Peso da gordura inguinal. O depósito de gordura inguinal era maior nas ratas pertencentes ao grupo SOP ADL, tanto em relação ao grupo Controle *ad libitum* e jejum intermitente, quanto ao grupo SOP JI. a – Controle ADL vs SOP ADL, $p=0,0007$; b – Controle JI vs SOP ADL, $p=0,0007$; c – SOP ADL vs SOP JI, $p=0,0007$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.6.2 Gordura mesentérica

O peso da gordura mesentérica nas ratas SOP ADL e JI era maior em comparação as Controle ADL e JI ($p<0,0001$). Além disso, o grupo Controle que realizou jejum intermitente apresentou redução do depósito de gordura mesentérica em relação ao Controle ADL ($p<0,0001$) (figura 18).

Figura 18. Peso da gordura mesentérica. Após a realização do protocolo do jejum intermitente, o grupo Controle JI reduziu seu depósito de gordura. Além disso, é notável a diferença entre este mesmo grupo e o SOP JI e ADL. SOP ADL apresentou maior depósito de gordura mesentérica em comparação às ratas Controle *ad libitum*. a – Controle JI vs SOP JI, $p < 0,0001$; b – Controle ADL vs SOP ADL, $p < 0,0001$; c – Controle JI vs SOP ADL, $p < 0,0001$; d – Controle ADL vs Controle JI, $p < 0,0001$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.6.3 Gordura perigonadal

Ao analisar os grupos SOP JI e Controle JI, nota-se que ambos reduziram o peso do depósito quando comparados aos seus respectivos grupos ADL ($p = 0,0007$) (figura 19).

Figura 19. Peso da gordura perigonadal. As ratas pertencentes aos grupos SOP e Controle JI apresentaram grande redução do depósito de gordura em comparação aos respectivos ADL. a – Controle ADL vs SOP JI, $p = 0,0007$; b – Controle JI vs SOP JI, $p = 0,0007$; c – Controle ADL vs Controle JI, $p = 0,0007$; d – SOP ADL vs SOP JI, $p = 0,0007$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.6.4 Coração

O peso do coração das ratas SOP ADL e JI era maior quando comparadas aos grupos Controle *ad libitum* e jejum intermitente ($p < 0,0001$) (figura 20).

Figura 20. Peso do coração. O coração das ratas SOP ADL e JI era significativamente maior do que as Controle ADL e JI. a – Controle ADL vs SOP JI, $p < 0.0001$; b – Controle JI vs SOP JI, $p < 0.0001$; c – Controle ADL vs SOP ADL, $p < 0.0001$; d – Controle JI vs SOP ADL, $p < 0.0001$. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.6.5 Adrenal

O peso da adrenal se apresentou maior nos grupos SOP, *ad libitum* e jejum intermitente, quando comparados aos grupos Controles ($p < 0,0001$) (figura 21).

Figura 21. Peso da adrenal. O peso da adrenal se apresentou maior entre os dois grupos de SOP, quando comparados aos Controles. a – Controle JI vs SOP ADL,

$p < 0,0001$; b – Controle JI vs SOP JI, $p < 0,0001$; c – Controle ADL vs SOP ADL, $p < 0,0001$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.6.6 Ovários

Os animais pertencentes aos grupos Controle ADL e JI apresentaram maior peso dos ovários em relação ao grupo SOP jejum intermitente ($p < 0,0001$) (figura 22).

Figura 22. Peso dos ovários. O peso dos ovários foi significativo entre os grupos Controle ADL e JI e SOP JI. a – Controle JI vs SOP JI, $p < 0,0001$; b – Controle ADL vs SOP JI, $p < 0,0001$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.6.7 Útero

Após pesagem do útero dos grupos experimentais e análise estatística, foi visto uma tendência entre os grupos SOP ADL e SOP JI ($p = 0,069$) (figura 23).

Figura 23. Peso do útero. Houve tendência estatística entre as ratas dos grupos SOP, ADL E JI. a – SOP ADL vs SOP JI, $p = 0,05$. Os dados são apresentados como mediana $\pm$ interquartil.

4.7 Ciclo estral

Após análise das lâminas coradas com HE, o ciclo estral dos animais controle demonstrou-se regular. As ratas modelo de síndrome dos ovários policísticos apresentaram oclusão do canal vaginal, não sendo possível realizar a coleta do esfregaço.

Após o protocolo de jejum intermitente, o ciclo estral não sofreu alteração (figura 26).

Figura 26. Ciclo estral dos animais Controle *ad libitum* e jejum intermitente. Não houve diferença significativa.

4.8 Dados murinométricos

4.8.1 Distância ano-genital

A distância ano-genital não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais (figura 24).

Figura 24. Distância ano-genital dos grupos experimentais. Os animais possuíam medidas semelhantes, não apresentando diferença estatística significativa. Os dados são apresentados como média $\pm$ padrão.

4.9 Atividade do Tecido Adiposo Marrom

O gráfico demonstra a atividade do tecido adiposo marrom interescapular dos grupos experimentais. Após realização da estatística, não foram encontrados resultados significativos (figura 25).

Figura 25. Atividade do tecido adiposo marrom. A) Imagens de PET do TAM interescapular. B) Gráfico da atividade do tecido adiposo marrom interescapular. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5. Discussão

No presente estudo, foram identificadas modificações induzidas pelo jejum intermitente nos modelos animais de SOP, principalmente no aspecto metabólico. Foi observado que os animais SOP apresentaram maior ingestão alimentar quando comparados aos Controles, tanto antes quanto depois da intervenção. O mesmo pode-se afirmar quanto ao peso corporal, sendo os grupos SOP com maior peso que os Controles. Além disso, o jejum intermitente alterou a glicemia dos animais Controle e reduziu depósitos de tecidos adiposos perigonadal, mesentérica e inguinal de ambos os grupos. A avaliação utilizando-se o PET-CT, que identifica a atividade do tecido adiposo, não mostrou diferença estatística entre os grupos experimentais.

A ingestão alimentar pré e pós-protocolo de jejum intermitente apresentou-se maior no grupo SOP em comparação ao Controle ADL e JI. Comparando-se os dados de modelos animais com os humanos, podem-se perceber algumas semelhanças. Na literatura a grande maioria dos trabalhos não encontrou diferença na ingestão calórica de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos e controles (45-47). Apenas no estudo observacional de Moran e colaboradores (14) (2013) foi relatado maior consumo energético entre pacientes com SOP e não-SOP, o qual corrobora com a da atual pesquisa. Por mais que a ingestão tenha sido maior, foi visto que a qualidade da alimentação também foi melhor, com maior ingestão de fibras e micronutrientes e menor de gordura saturada (14).

Sabe-se que mulheres afetadas pela Síndrome dos Ovários Policísticos tendem a ter excesso de peso, com acúmulo de tecido adiposo branco na região abdominal (28). Este dado também foi visto nos modelos animais do presente estudo, sendo os animais do grupo SOP com maiores depósitos de gorduras inguinal e mesentérica em comparação aos grupos Controle. Após quatro semanas de jejum intermitente, as ratas do grupo SOP reduziram as quantidades de gordura inguinal e perigonadal, e as Controles diminuíram a gordura mesentérica e também perigonadal. Em estudos semelhantes encontraram redução de massa gorda após jejum intermitente (25, 48, 49). Com isso, é sabido que o jejum prolongado promove a

cetogênese a qual utiliza a gordura como fonte energética alternativa para a maioria dos órgãos (20), ocasionando na redução dos depósitos de tecido adiposo (25).

Além do excesso de peso, mulheres com SOP apresentam risco aumentado de resistência à insulina (RI) e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) quando comparadas às mulheres sem a síndrome (1, 50, 51). Após realização do teste de tolerância à insulina neste trabalho, as ratas pertencentes ao grupo SOP *ad libitum* apresentaram maior glicemia de jejum em relação às Controle ADL. A causa da RI em pacientes com SOP ainda não é clara. No entanto, há trabalhos que sugerem que a resistência à insulina atua nos aspectos endócrinos e reprodutivos da síndrome, contribuindo com o hiperandrogenismo (50).

O jejum intermitente é uma das estratégias para melhorar o quadro metabólico das pacientes afetadas com a síndrome dos ovários policísticos. Segundo a revisão de Antoni e colaboradores (52) em 2017, estudos com roedores encontraram redução de glicemia de jejum, insulina e resistência à insulina após o protocolo de JI. Fernández e colaboradores (2018) (53) estudaram ratas *Wistar* submetidas à restrição alimentar intermitente por seis semanas e viram que esses animais apresentaram hiperglicemia. O mesmo foi encontrado no estudo de Cerqueira e colaboradores (54) em 2011 e Park e colaboradores (55) (2017). Observamos em nosso estudo que o grupo Controle JI apresentou maior glicemia de jejum em comparação aos animais Controle *ad libitum*, sugerindo uma piora do metabolismo de glicose. Sabe-se que em episódios de jejum prolongado, há a depleção de glicose e então a formação de corpos cetônicos (cetogênese). Juntamente com a cetogênese, ocorre a gliconeogênese, ou seja, a formação de glicose pelo fígado, resultando a hiperglicemia (53, 56).

Além de complicações reprodutivas e metabólicas, a síndrome dos ovários policísticos está relacionada com risco aumentado de doenças cardiovasculares (DCV) e hipertensão (57, 58). A literatura possui alguns achados que relacionam DCV com SOP, como a dislipidemia, resistência à insulina, maior massa ventricular esquerda e disfunção diastólica (59-61).

No presente estudo, foi observado que o peso do coração de ratas SOP era maior em relação às Controle, o mesmo encontrado no trabalho de Marcondes e colaboradores (28) (2017), o qual trabalhou com camundongos fêmeas tratadas com DHT. A revisão de Shi e Vine (37) (2012) analisou os aspectos cardiometabólicos dos variados modelos animais de SOP. A disfunção cardiovascular em si não foi reportada pela maioria dos modelos, apenas pelo modelo tratado com a antiprogesterona RU486, o qual demonstrou maior rigidez e menor complacência da aorta. Assim, concluíram que os modelos animais de SOP apresentam apenas fatores que podem desencadear DCV, como síndrome metabólica, RI e dislipidemia, e dessa forma podem auxiliar nos estudos sobre SOP e doenças cardiovasculares. Carmina e Lobo (62) (2018) e Azziz (1) (2018), afirmam que ainda são necessários mais estudos para fortalecer a relação entre DCV e SOP, pois as complicações cardiometabólicas podem ser provenientes da obesidade e/ou da *Diabetes Mellitus* tipo 2.

No presente estudo, foi visto que o peso da adrenal era maior em ratas SOP quando comparadas às ratas Controle. Há evidências de que a zona glomerular e reticular da adrenal de ratas *Wistar* modelo de SOP são mais espessas do que de animais Controle. Porém, ainda não se sabe se este aumento está associado ao aumento da produção de precursores de androgênios (63, 64).

Após a pesagem dos ovários dos grupos experimentais e a análise estatística, foi visto que os animais SOP JI possuíam ovários menores em relação aos dois grupos Controle (ADL e JI). Sabe-se que mulheres afetadas pela Síndrome dos Ovários Policísticos, apresentam ovários com volume aumentado (maior que 10 cm³ ou 10mL) quando comparadas às mulheres não SOP (1). Porém, quando as pesquisas são feitas em modelos animais, como em ratas, o método de indução da SOP - como o propionato de testosterona aplicado nos primeiros dias de vida - pode contradizer tal aspecto, o que explica os resultados do presente estudo (36, 37, 65).

Além da redução do peso dos ovários, foi observada uma tendência estatística quanto ao peso do útero dos animais SOP ADL e JI, sendo o JI

com menor peso. As alterações de peso dos órgãos, como o útero, são aceitas como um indicador sensível de alterações induzidas quimicamente ou fisicamente. A comparação de pesos entre grupos tratados e não tratados é utilizada para avaliar o efeito da intervenção (66). Possivelmente, esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a alterações nos níveis de esteroides sexuais. Mais estudos são necessários para elucidar essa questão.

Estudos sobre jejum intermitente na Síndrome dos Ovários Policísticos ainda são escassos. Porém, é sabido que a grande maioria de mulheres com SOP necessita de assistência nutricional para melhorar a saúde. Pesquisas com JI podem ser contraditórias, uns encontram efeitos positivos – como a perda de peso, melhora do quadro metabólico - enquanto outros, negativos, como a maior tendência à *Diabetes Mellitus* tipo 2, piora do perfil lipídico e a baixa aderência à esta estratégia nutricional. Assim, são necessários mais estudos para essa intervenção ser melhor compreendida, e outras abordagens nutricionais que visam o bem estar e a qualidade de vida de pacientes com SOP.

6. Conclusões

- O jejum intermitente não reduziu o peso corporal dos grupos experimentais;
- O jejum intermitente reduziu os depósitos de gordura mesentérica e perigonadal nos animais Controle;
- O jejum intermitente reduziu o peso das gorduras inguinal e perigonadal das ratas SOP;
- O jejum intermitente não impactou a atividade da gordura marrom;
- O jejum intermitente aumentou a glicemia basal das ratas Controle;
- O peso dos ovários não sofreu alterações com o jejum intermitente;
- O jejum intermitente não influenciou no ciclo estral nos animais controles;

7.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação metabólica e reprodutiva do jejum intermitente em modelo animal da síndrome dos ovários policísticos”**, protocolo nº **046/16** sob a responsabilidade de **Gustavo Arantes Rosa Maciel** e **Luísa Pinheiro Pimenta Neves**, apresentado pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 08.06.16.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	9 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 08 de Junho de 2016

Dr. Eduardo Pompeu

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP

e-mail: ceua.fm@usp.br

8. Referências Bibliográficas

1. Azziz R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics & Gynecology*. 2018;132(2):321-36.
2. Ebrahimi FA, Foroozanfard F, Aghadavod E, Bahmani F, Asemi Z. The Effects of Magnesium and Zinc Co-Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress, and Gene Expression Related to Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: a Randomized Controlled Clinical Trial. *Biological trace element research*. 2018;184(2):300-7.
3. Jeanes YM, Reeves S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. *Nutrition research reviews*. 2017;30(1):97-105.
4. Kataoka J, Tassone EC, Misso M, Joham AE, Stener-Victorin E, Teede H, et al. Weight management interventions in women with and without PCOS: a systematic review. *Nutrients*. 2017;9(9):996.
5. Maciel GAR, Júnior JMS, da Motta ELA, Haidar MA, de Lima GR, Baracat EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertility and sterility*. 2004;81(2):355-60.
6. Shayya R, Chang RJ. Reproductive endocrinology of adolescent polycystic ovary syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2010;117(2):150-5.
7. Baracat EC, Júnior JMS. Ovários policísticos, resistência insulínica e síndrome metabólica. *CEP*. 2007;4021:051.
8. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(1):168-77.
9. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2018;33(9):1602-18.
10. Douglas CC, Gower BA, Darnell BE, Ovalle F, Oster RA, Azziz R. Role of diet in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2006;85(3):679-88.
11. 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(3):583-90.
12. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL. Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 13 ed. Rio de Janeiro 2012. 1227 p.

13. 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. *Fertility and sterility*. 2009;92(6):1966-82.
14. Moran LJ, Ko H, Misso M, Marsh K, Noakes M, Talbot M, et al. Dietary composition in the treatment of polycystic ovary syndrome: a systematic review to inform evidence-based guidelines. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2013;113(4):520-45.
15. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(2):812-9.
16. Marsh KA, 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. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(1):83-92.
17. 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. *Fertility and sterility*. 2004;81(3):630-7.
18. Lee C, Longo V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. *F1000Research*. 2016;5.
19. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell metabolism*. 2017;25(2):262-84.
20. Gershuni VM, Yan SL, Medici V. Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome. *Current nutrition reports*. 2018;7(3):97-106.
21. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine reviews*. 2018.
22. Chiofalo B, Laganà AS, Palmara V, Granese R, Corrado G, Mancini E, et al. Fasting as possible complementary approach for polycystic ovary syndrome: Hope or hype? *Medical hypotheses*. 2017;105:1-3.
23. Tinsley GM, La Bounty PM. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. *Nutrition reviews*. 2015:nuv041.
24. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell metabolism*. 2014;19(2):181-92.
25. Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva CC, Masselli dos Reis IG, Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications

resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. *Endocrinology*. 2014;155(7):2456-66.

26. Chen KY, Brychta RJ, Linderman JD, Smith S, Courville A, Dieckmann W, et al. Brown fat activation mediates cold-induced thermogenesis in adult humans in response to a mild decrease in ambient temperature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(7):E1218-E23.

27. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.

28. Marcondes RR, Maliqueo M, Fornes R, Benrick A, Hu M, Ivarsson N, et al. Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole- and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;448:66-76.

29. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2014;19(1):25-37.

30. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10(1):24.

31. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ: British Medical Journal*. 1990;301(6761):1111.

32. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ: British Medical Journal*. 1995;311(6998):171.

33. Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1344s-52s.

34. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids*. 2013;78(8):734-40.

35. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *Journal of Endocrinology*. 2002;174(1):1-5.

36. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of reproduction*. 2012;86(5):149-1.

37. Shi D, Vine DF. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and sterility*. 2012;98(1):185-93.

38. Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*. 1961;68(1):62-7.

39. Gorski RA, Barraclough CA. Adenohypophyseal LH content in normal, androgen-sterilized and progesterone-primed sterile female rats. *Acta endocrinologica*. 1962;39(1):13-21.

40. Anzai Á, Marcondes RR, Gonçalves TH, Carvalho KC, Simões MJ, Garcia N, et al. Impaired branched-chain amino acid metabolism may underlie the nonalcoholic fatty liver disease-like pathology of neonatal testosterone-treated female rats. *Scientific reports*. 2017;7(1):13167.
41. Mahamed RR, Maganhin CC, Simões RS, de Jesus Simões M, Baracat EC, Soares Jr JM. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertility and sterility*. 2011;95(4):1507-9.
42. Marcondes RR, Carvalho KC, Duarte DC, Garcia N, Amaral VC, Simões MJ, et al. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. *General and comparative endocrinology*. 2015;212:28-33.
43. Edwards DA. Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. *Physiology & behavior*. 1971;6(3):223-8.
44. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Frontiers in nutrition*. 2016;3:10.
45. Shisheghar F, Tehrani FR, Mirmiran P, Hajian S, Baghestani AR, Moslehi N. Comparison of dietary intake between polycystic ovary syndrome women and controls. *Global journal of health science*. 2016;8(9):302.
46. Larsson I, Hulthén L, Landén M, Pålsson E, Janson P, Stener-Victorin E. Dietary intake, resting energy expenditure, and eating behavior in women with and without polycystic ovary syndrome. *Clinical nutrition*. 2016;35(1):213-8.
47. Shahdadian F, Ghiasvand R, Abbasi B, Feizi A, Saneei P, Shahshahan Z. Association between Major Dietary Patterns and Polycystic Ovary Syndrome: evidence from a case-control study. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2018(ja).
48. Gotthardt JD, Verpeut JL, Yeomans BL, Yang JA, Yasrebi A, Roepke TA, et al. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss With Lean Mass Retention, Increased Hypothalamic Norepinephrine Content, and Increased Neuropeptide Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology*. 2016;157(2):679-91.
49. Lettieri-Barbato D, Giovannetti E, Aquilano K. Effects of dietary restriction on adipose mass and biomarkers of healthy aging in human. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(12):3341.
50. Cassar S, Misso ML, Hopkins WG, Shaw CS, Teede HJ, Stepto NK. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp studies. *Human Reproduction*. 2016;31(11):2619-31.

51. Anwar S, Shikalgar N. Prevention of type 2 diabetes mellitus in polycystic ovary syndrome: A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017.
52. Antoni R, Johnston KL, Collins AL, Robertson MD. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2017;76(3):361-8.
53. Fernández MAR, Vilca CMC, Batista LO, Ramos VW, Cinelli LP, de Albuquerque KT. Intermittent food restriction in female rats induces SREBP high expression in hypothalamus and immediately postfasting hyperphagia. *Nutrition*. 2018;48:122-6.
54. Cerqueira FM, da Cunha FM, da Silva CCC, Chausse B, Romano RL, Garcia CCM, et al. Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(7):1454-60.
55. Park S, Yoo KM, Hyun JS, Kang S. Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2017;40:14-22.
56. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):131.
57. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*. 2012;18(6):618-37.
58. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(12):1223-36.
59. Tiras MB, Yalcin R, Noyan V, Maral I, Yildirim M, Dortlemez O, et al. Alterations in cardiac flow parameters in patients with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction*. 1999;14(8):1949-52.
60. Yaralı H, Yıldırım A, Aybar F, Kabakçı G, Bükülmez O, Akgül E, et al. Diastolic dysfunction and increased serum homocysteine concentrations may contribute to increased cardiovascular risk in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2001;76(3):511-6.
61. Orio Jr F, Palomba S, Spinelli L, Cascella T, Tauchmanová L, Zullo F, et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(8):3696-701.

62. Carmina E, Lobo RA. Is There Really Increased Cardiovascular Morbidity in Women with Polycystic Ovary Syndrome? *Journal of Women's Health*. 2018.
63. Macedo LA, Carbonel AAF, Simões RS, Fuchs LFP, Do Amaral VC, Simoncini T, et al. Effects of metformin on the adrenal cortex of androgenized rats. *Gynecological Endocrinology*. 2015;31(8):609-12.
64. da Silva BB, Lopes-Costa PV, Rosal MA, Pires CG, dos Santos LG, Gontijo JA, et al. Morphological and morphometric analysis of the adrenal cortex of androgenized female rats. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2007;64(1):44-8.
65. Shi D, Dyck MK, Uwiera RRE, Russell JC, Proctor SD, Vine DF. A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2009;150(9):4425-36.
66. Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic pathology*. 2007;35(5):742-50.