Thiago Hideki Gonçalves

Avaliação do estresse oxidativo e expressão de genes envolvidos com a síntese e oxidação de ácidos graxos em modelo animal de síndrome dos ovários policísticos tratado com metformina e submetido ao exercício físico

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

Área de concentração: Medicina (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

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Thiago Hideki

Avaliação do estresse oxidativo e expressão de genes envolvidos com a síntese e oxidação de ácidos graxos em modelo animal de síndrome dos ovários policísticos tratado com metformina e submetido ao exercício físico / Thiago Hideki Gonçalves. -- São Paulo, 2017.

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.Modelos animais 3.Ácidos graxos 4.Estresse oxidativo 5.Metformina 6.Exercício físico

USP/FM/DBD-427/17

Dedicatória

Dedico esta dissertação para meus filhos Clarice e Dylan.

Agradecimentos.

Eu agradeço a Deus por tudo que ele me possibilitou para a conclusão deste trabalho e desta etapa da minha vida. Agradeço a minha família por me ajudar em todos os momentos, por sempre estar ao meu lado e por toda orientação que me deram durante minha vida, em especial a minha mãe Marcia e meu pai Paulo. Agradeço também aos meus avós: Nakata, Rosa, Sérgio e Catharina. Meus irmãos: Raphael, Tiphany e Heloísa. Agradeço aos meus filhos Clarice e Dylan e a minha amiga e companheira Fernanda, que me ajudou em boa parte da construção deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo e a Dra. Kátia que me ajudaram a concluir esta tese e ao professor Edmund Baracat por todo apoio concedido a mim. Agradeço também aos colaboradores de outros laboratórios que me ajudaram: Dr. Carlos Negrão, Dr Igor, Dr, Marcelo Mori e a Ms Beatriz Guerra

Aos meus amigos do LIM 58 que me ajudaram e sempre me estimularam para a conclusão deste trabalho, em especial ao meu amigo Rodrigo Marcondes que me ajudou em boa parte dos protocolos executados e construção desta tese. Agradeço também a minha amiga Juciara Silva no qual foi fundamental seu apoio durante este trabalho. Agradeço aos demais amigos do laboratório LIM 58: Giulia, Giovana (que me ajudaram em grande parte no manejo e cuidado com os animais e nos demais protocolos), Luísa, Leonardo, Henderson, Natália, Bruna, Marinalva, Kelly, Anamaria, Laura e Carol Costa, no qual me ajudaram na tese e nas alegrias do dia a dia.

Normalização 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.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

1. Introdução	1
1.1. Síndrome dos ovários policísticos	1
1.2. Síndrome dos ovários policísticos e obesidade	3
1.3. Terapias propostas para a síndrome dos ovários policísticos	4
1.4. Modelos experimentais de síndrome dos ovários policísticos	5
1.5. Tecido adiposo, de tecido a um órgão endócrino	6
1.6. Ácidos graxos e beta oxidação	11
1.7. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	13
1.8. Sistema de defesa antioxidante	14
1.9. Ácidos graxos e estresse oxidativo na síndrome dos ovários policísticos	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivo específico	16
3. Materiais e métodos	16
3.1. Animais	16
3.2. Grupos experimentais	17
3.3. Tratamento com metformina	17
3.4. Protocolo de exercício físico	18
3.5. Eutanásia	19
3.6. Dosagem das glutations reduzida e oxidada (GSH/GSSG)	20
3.7. Análises morfométricas do diâmetro dos adipócitos brancos	20
3.8. Análise Estatística	21
4. Resultados	21
4.1. Peso corporal e dados murinométricos	21
4.2. Medidas murinométricas	23

4. 3. Peso de depósitos de gordura, coração e rim	24
4. 4. Teste de esforço progressivo	24
4. 5. Expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real.....	25
4. 6. Estresse oxidativo no tecido adiposo	27
4. 7. Histomorfometria dos adipócitos das gorduras mesentérica e Inguinal.....	29
5. Discussão	30
6. Conclusões	34
7. Referências Bibliográficas	35

Lista de abreviaturas

DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	5 α -di-hidrotestosterona
TP	Propionato de testosterona
TG	Triglicérides
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
ATP	Trifosfato de adenosina
UCP-1	Proteína desacopladora 1
SREBP	Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
CPT	Carnitina palmitoil transferase
CACT	Carnitina acilcarnitina translocase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
VO2	Consumo de oxigênio
GSH	Glutathione reduzida

GSSG	Glutationa oxidada
cDNA	DNA complementar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fostato reduzida
LH	Hormônio Luteinizante
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
IMC	Índice de Massa Corporal

Lista de figuras

Figura 1. Origem e desenvolvimento dos adipócitos.....	7
Figura 2. Distribuição dos adipócitos constituintes dos depósitos branco e marrom, entre roedores humanos	11
Figura 3. Peso corporal e dados murinométricos.....	22
Figura 4. Índice de Massa Corpórea	23
Figura 5. Índice de Lee	23
Figura 6. Teste de esforço máximo progressivo.....	25
Figura 7. Análises de estresse oxidativo da gordura Inguinal.....	27
Figura 8. Análises de estresse oxidativo da gordura mesentérica.....	28
Figura 9. Histomorfometria dos adipócitos.....	29

Lista de tabelas

Tabela 1. Diferenças entre o tecido adiposo subcutâneo e o visceral.....	9
Tabela 2. Protocolo de exercício físico aeróbico de intensidade moderada.....	19
Tabela 3. Peso dos depósitos de gordura, rim e coração.....	24
Tabela 4. Dados do PCR em tempo real referente aos genes <i>Cpt1</i> , <i>Srebp1</i> , <i>Acaca</i> e <i>Cd36</i> , das gorduras mesentérica e marrom.....	26

Resumo

Gonçalves TH. *Avaliação do estresse oxidativo e expressão de genes envolvidos com a síntese e oxidação de ácidos graxos em modelo animal de síndrome dos ovários policísticos tratado com metformina e exercício físico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo com aspectos reprodutivos e metabólicos. Alterações do tecido adiposo participam da fisiopatologia da síndrome e anormalidades do metabolismo de ácidos graxos, bem como o estresse oxidativo, parecem ter papel importante nesse processo. Assim, tanto o exercício físico como a metformina são comumente recomendadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes envolvidos com a síntese e oxidação dos ácidos graxos e com os níveis de estresse oxidativo no tecido adiposo de ratas com modelo experimental de SOP tratadas com metformina (Met), submetidas ou não a exercício físico em esteira (Ex). **Métodos:** Foram utilizadas 46 ratas, *Wistar*, que receberam no 2º dia de vida, uma única injeção subcutânea de propionato de testosterona (1,25 mg) para a indução de estado de estro permanente e óleo de sésamo (controles). Com 80 dias de idade iniciou-se o experimento e os animais foram divididos em 5 grupos: 1) Controle; 2) SOP ; 3) SOP+Met; 4) SOP+Ex; 5) SOP+Met+Ex. Os tratamentos tiveram duração de 6 semanas. Os animais foram sacrificados aos 120 dias de vida e foram retirados os depósitos das gorduras inguinal e mesentérica. Os depósitos de gordura inguinal e mesentérica foram utilizados para análise da expressão dos genes *Acaca*, *Srebp1*, *Cpt1* e *Cd36*, por PCR quantitativo em tempo real, e dos níveis de estresse oxidativo pela dosagem das glutations reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Adicionalmente, o tamanho dos adipócitos foi analisado por histomorfometria. **Resultados:** Na análise histomorfométrica dos adipócitos da gordura mesentérica, houve diminuição significativa no grupo SOP+Met+Ex em relação ao grupo SOP. O grupo SOP apresentou hipertrofia em relação ao grupo controle. A análise na gordura inguinal não apresentou nenhuma diferença entre os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos nas análises de expressão gênica das gorduras mesentérica e marrom. Não

identificamos diferenças nas medidas de estresse oxidativo (razões GSH/GSSG, GSH, GSH total, GSSG e razão GSH/GSSG) no tecido adiposo subcutâneo, mesentérico, perigonadal e marrom entre os depósitos de gordura dos animais em nenhum dos grupos avaliados.

Descritores: Síndrome do Ovário Policístico; Modelos Animais; Ácidos Graxos; Estresse Oxidativo; Metformina; Exercício Físico.

Abstract

Gonçalves TH. Evaluation of oxidative stress and expression of genes involved with fatty acid synthesis and oxidation in animal model of polycystic ovary syndrome treated with metformin and physical exercise [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine disorder, affecting both reproductive and endocrine systems. Changes in adipose tissue are involved in the pathophysiology of the syndrome, and abnormalities of fatty acid metabolism, as well as oxidative stress, appear to play an important role in this process. Thus, both physical exercise and metformin are commonly recommended. The objective of this study was to evaluate the expression of genes involved in the synthesis and oxidation of fatty acids and oxidative stress levels in adipose tissue of in an experimental model of PCOS using Wistar rats. **Methods:** 46 rats, Wistar, treated with a single subcutaneous injection of testosterone propionate (1.25 mg) for the induction of permanent estrus status (PCOS model) or sesame oil (controls) on the 2nd day of life. Experimental phase of the study was started when animals completed 80 days of age. They were divided into 5 groups: 1) Control; 2) PCOS; 3) PCOS+ Met; 4) PCOS + Ex; 5) PCOS + Met + Ex. Intervention lasted 6 weeks. Animals were sacrificed at 120 days of age and the deposits of inguinal and mesenteric fat were removed. Inguinal and mesenteric fat deposits were used to analyze the expression of *Acaca*, *Srebp1*, *Cpt1* and *Cd36* genes by quantitative real-time PCR and oxidative stress levels by reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). In addition, adipocyte size was analyzed by histomorphometry. **Results:** In the histomorphometric analysis of mesenteric fat adipocytes, there was a significant decrease in the PCOS + Met + Ex group in relation to the PCOS group. PCOS group presented hypertrophy in relation to the control group. Inguinal fat analysis did not present any differences between the groups. There was no statistical difference between groups in analyzes of gene expression of mesenteric and brown fats. We did not identify differences in oxidative stress measurements (GSH / GSSG, GSH, total GSH, GSSG and GSH / GSSG ratio) in the subcutaneous, mesenteric, perigonadal and brown

adipose tissue among the fat deposits of the animals in any of the evaluated groups.

Descriptors: Polycystic Ovarian Syndrome; Animal Models; Fatty acids; Oxidative stress; Metformin; Physical exercise.

1. Introdução

1. 1. Síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos é uma endocrinopatia complexa que possui aspectos metabólicos e reprodutivos e que afeta boa parte das mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada por hiperandrogenismo, anovulação crônica e a presença de ovários policísticos à ultrassonografia (1) e pode apresentar grande heterogeneidade clínica e laboratorial (2).

Em 1935, Stein e Leventhal (3) descreveram o aumento bilateral dos ovários com presença de cistos, associados com amenorreia e hirsutismo em sete mulheres adultas e obesas que buscavam tratamento para a infertilidade (4). No entanto, apesar do grande número de estudos sua etiologia ainda permanece desconhecida. Contudo, atualmente a SOP é considerada uma condição genética complexa, com participação de fatores ambientais no desencadeamento e manutenção dos achados clínicos e fisiopatológicos da síndrome (5, 6).

A prevalência da SOP é estimada em 5 a 17% das mulheres em idade reprodutiva a depender dos grupos étnicos e populacionais (7). Uma das principais características da SOP é o hiperandrogenismo, no qual, destacam-se os sinais de acne, hirsutismo e alopecia. A anovulação crônica constitui outra importante característica dessa síndrome e se apresenta clinicamente como oligomenorreia, amenorreia e infertilidade (8). Por fim, alterações na foliculogênese ovariana, compõem o quadro da síndrome (9).

As primeiras definições de consenso para o diagnóstico da SOP foram criadas a partir de 1990, por iniciativa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) e estabelecia que a paciente deveria apresentar os seguintes critérios:

- Sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo;
- Oligo-ovulação ou anovulação crônica (10).

No ano de 2003, as sociedades de reprodução humana da Europa e dos EUA, *European Society for Human Reproduction and Embryology and American Society for Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM ou Rotterdam)*, apresentaram a seguinte definição para diagnóstico: a paciente deveria apresentar 2 dos 3 seguintes critérios:

- Oligo-ovulação ou anovulação crônica;
- Sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo;
- Ovários policísticos.

Em 2006, a *Androgen Excess Society (AES)*, criou a seguinte definição: Deveriam ser apresentados os dois critérios seguintes:

- Hirsutismo e/ou hiperandrogenia;
- Oligo-ovulação /ou ovários policísticos (11).

Em 1980 Burghen e colaboradores (12) mostraram associação entre SOP e a hiperinsulinemia. Esse excesso de insulina registrado em pacientes com SOP, deve-se ao quadro de resistência à insulina e está presente em cerca de 80% das mulheres com a síndrome e obesidade central. Esse índice diminui para 30 – 40% quando comparado em mulheres magras com SOP (13).

A resistência à insulina em mulheres com SOP parece ser causada por algum defeito pós-receptor que afeta o transporte da glicose (7). É sabido que a insulina estimula as células da teca a produzir androgênio e diminuem a produção de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) pelo fígado, resultando em um aumento dos níveis de testosterona livre (14).

A insulina também pode agir diretamente no hipotálamo e na hipófise, contribuindo na liberação das gonadotrofinas (15), mas o papel da resistência à insulina nas anormalidades gonadotróficas da SOP ainda permanece incerto (16).

Mulheres com SOP apresentam o mesmo nível de resistência à insulina periférica que mulheres com diabetes tipo 2, com uma característica de 35 – 40% de diminuição da absorção da glicose mediada pela insulina (17).

1. 2. Síndrome dos ovários policísticos e obesidade

Durante a última década, a obesidade e o sobrepeso, foram considerados uma das principais doenças crônicas. Pacientes obesas diagnosticadas com SOP apresentam quadro pior de hiperandrogenismo, hirsutismo, infertilidade, complicações gestacionais e resistência à insulina (18). Assim, a resistência à insulina que se apresenta pior em obesas com SOP, leva ao aumento dos riscos para pré-diabetes, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (19), além disso, quando a resistência à insulina é exacerbada pela obesidade, se torna um fator chave na patogênese da anovulação e hiperandrogenismo (20).

Mulheres com SOP parecem ser mais suscetíveis a apresentar obesidade central ou visceral, que é caracterizada pelo excesso de adiposidade na região abdominal. A obesidade central está associada à resistência à insulina, pois na fisiopatologia da SOP, a função normal da insulina relacionada às características metabólicas e reprodutivas é alterada. Parece também haver uma contribuição de hiperandrogenismo, mas essas relações ainda não são completamente entendidas (21).

Apesar da forte associação entre SOP e obesidade, a prevalência para mulheres obesas com a síndrome dos ovários policísticos é altamente variável, podendo diferir de acordo com a etnicidade e regiões geográficas, onde apresenta-se com prevalência de 40% nos Estados Unidos, 35 – 38% na população europeia e de 10 – 38% na população mediterrânea (22). Em nosso meio, a prevalência de obesidade é de 42% (dados do setor de Ginecologia Endócrina e Climatério).

1. 3. Terapias propostas para a síndrome dos ovários policísticos

A mudança do estilo de vida é considerada a primeira linha de tratamento para a manutenção da obesidade na SOP. A perda de 5 - 10% de peso melhora as características reprodutivas, tais como, normalização do ciclo menstrual, ovulação e fertilidade (18).

Nesse sentido, a prática de exercícios físicos moderados para pacientes com SOP, está relacionada à redução do risco para diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, excesso de androgênio e também a melhoria do perfil lipoproteico (23, 24). O exercício físico também se mostrou efetivo na melhora do perfil cardiometabólico e cardiopulmonar, em mulheres com SOP (25).

O estudo de Homa *et al.* (2015) (26) mostrou que o exercício voluntário em camundongas com SOP induzida por exposição pré-natal ao androgênio, apresentaram melhora no ciclo estral.

A prática de exercício voluntário em camundongas com SOP induzida por letrozol, apresentou melhora no perfil morfológico dos adipócitos da gordura mesentérica e da inguinal, além de aumentar a sensibilidade a insulina (27).

Quando a perda de peso por si não é efetiva, são utilizados tratamentos alternativos, como fármacos sensibilizadores de insulina, assim como a metformina. A metformina é derivada da planta *Galega officinalis* e pertencente à classe das biguanidas. Esta droga atua na redução da gliconeogênese hepática e na melhora da sensibilidade à insulina devido ao aumento da captação periférica da glicose pelo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (22, 28, 29).

Na SOP, a metformina reduz o quadro de resistência à insulina e diminui também a produção de androgênio ovariano (30). Como tratamento para a anovulação, a metformina pode ser usada sozinha ou como um pré-tratamento e em conjunto com o citrato de clomifeno (7).

Outros benefícios da metformina em pacientes com SOP são a melhora da ciclicidade menstrual, infertilidade, obesidade e sobrepeso (28). Por outro

lado, o uso da metformina em mulheres obesas, não obteve melhora na taxa de ovulação comparado com o placebo (31), assim como, Maciel e colaboradores (32), mostraram que pacientes magras respondem melhor ao tratamento com metformina em relação às pacientes obesas, mostrando que o mecanismo envolvendo a SOP, obesidade e metformina ainda não está totalmente esclarecido.

1. 4. Modelos experimentais de síndrome dos ovários policísticos

A Hipótese de Barker, 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 (33-35).

Baseado nesta hipótese houve um considerável número de estudos mostrando que o excesso de androgênio em fases precoces da vida, pode resultar em manifestações com fenótipo similar à SOP em animais na 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* (36).

Macacos *Rhesus* fêmeas, foram expostas no período intrauterino a níveis de testosterona equivalente a aqueles encontrados em machos expostos no período fetal, e mostraram características clínicas e bioquímicas similares à SOP. Essas fêmeas de macacos *Rhesus* exibiram hipersecreção de hormônio luteinizante (LH), hiperinsulinemia, hiperandrogenismo e anovulação crônica. 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 (37).

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 ciclo reprodutivo (estral), período gestacional e ciclicidade ovariana (38).

Em roedores, alguns tipos de androgênios estão sendo usados como indutores para um modelo experimental de SOP, dentre esses androgênios, destacam-se: a desidroepiandrosterona (DHEA), 5 α -di-hidrotestosterona (DHT) e o propionato de testosterona (39).

Utilizando propionato de testosterona, o trabalho de Barraclough (1961) (40) foi o primeiro na literatura a descrever que injeções de propionato de testosterona até o quinto dia de vida em ratas induziriam a infertilidade destes animais por anovulação na idade adulta. Trabalhos posteriores mostram que esse protocolo de injeção de propionato de testosterona em ratas induz em um quadro de anovulação, estro permanente, ovários policísticos com maior presença de folículos atrésicos (41), aumento dos níveis séricos de LH e testosterona (42), e resistência à insulina (41). Similarmente, camundongas tratadas com propionato de testosterona, exibiram anovulação e pouca receptividade sexual (38, 43).

1. 5. Tecido adiposo, de tecido a um órgão endócrino

Acredita-se que as células adiposas (adipócitos) que constituem o tecido adiposo, derivem de células-tronco embrionárias indiferenciadas (célula-tronco mesenquimal multipotente) e que se transformam em pré-adipócitos (ou lipoblastos) (44). Depois de formados, os adipócitos são encontrados isoladamente ou em conglomerados em meio ao tecido conjuntivo frouxo, ou podem constituir o tecido adiposo distribuído pelo corpo (45).

Figura 1. Origem e desenvolvimento dos adipócitos. A célula mais superior é uma célula-tronco mesenquimal indiferenciada, que além de formar outras células, dá origem aos fibroblastos (esquerda) e aos pré-adipócitos (direita). Posteriormente, os pré-adipócitos diferenciam-se em adipócitos marrom ou branco (46).

Outros tipos celulares encontrados no tecido adiposo são células do leito vascular, fibroblastos, leucócitos e macrófagos. Este tecido atua primariamente como um grande reservatório de gordura sob a forma de triglicérides (TG). O tecido adiposo também é um importante isolante térmico do organismo, assim como um amortecedor de choques mecânicos em determinadas regiões do corpo, como os coxins absorventes de choque na planta dos pés e na palma das mãos (47).

Em 1987, Siiteri (48) identificou o tecido adiposo como um local principal para o metabolismo de esteroides sexuais. Mas em 1994, com a identificação e caracterização da leptina (hormônio produzido pelo tecido adiposo), foi estabelecido o tecido adiposo como um órgão endócrino (49).

Há dois tipos de tecido adiposo, com diferenças estruturais e funcionais, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O tecido adiposo branco tem como função principal, ser um regulador central do metabolismo energético e um local para estocar triglicérides em forma de combustível orgânico. O TAB também influencia em outros processos biológicos, assim como, angiogênese, controle da pressão arterial, coagulação do sangue e imunidade (50).

Outra função importante do TAB é a capacidade de os adipócitos secretarem adipocinas, que incluem hormônios, citosinas e outras proteínas com funções biológicas específicas (51).

O tamanho do adipócito do tecido adiposo branco, pode variar de acordo com o conteúdo lipídico celular, assim, um adipócito branco pode atingir entre 30 - 130 μm de diâmetro. De acordo com sua localização anatômica o TAB é classificado em: tecido adiposo subcutâneo (TAS) e o tecido adiposo visceral (TAV) (50).

Existem diferenças a nível celular, molecular, metabólico e fisiológico, entre o tecido adiposo subcutâneo e o visceral (Tabela 1).

Tabela 1. Diferenças entre o tecido adiposo subcutâneo e o visceral

Células inflamatórias e do sistema imune	TAV apresenta um número maior de células inflamatórias e do sistema imune, comparado com o TAS
Adipócitos e alterações metabólicas	Os adipócitos do TAV, são metabolicamente mais ativos, mais sensíveis à lipólise e a resistência à insulina, comparados com os adipócitos do TAS. Enquanto os adipócitos do TAS, são mais eficazes na absorção dos ácidos graxos livres e triglicérides.
Adipocinas	Adiponectina e citocinas pró inflamatórias, tais como, TNF α e IL-6, estão mais presentes no TAV, enquanto o TAS é considerado a maior fonte de leptina.
Predição de mortalidade	TAV tem maior predição de mortalidade em homens, comparado ao TAS.
Sensibilidade para a perda de peso	O TAV é considerado mais sensível a perda de peso que o TAS
Receptores de androgênio	Há mais receptores de androgênio no TAV, em comparação ao TAS.

(52).

O tecido adiposo marrom (TAM) é encontrado em todos os mamíferos. A descoberta de uma das principais funções do TAM, que é a produção de calor, vem sendo descrita durante os últimos 40 anos e a discussão de o tecido adiposo marrom, poder atuar como um possível órgão no combate a obesidade, ocorre desde os últimos 20 anos (53).

O TAM é considerado um tecido termogênico, que permite que pequenos mamíferos consigam manter uma temperatura confortável para a sobrevivência, mesmo em ambientes frios. O adipócito do TAM contém

múltiplas gotículas lipídicas, uma das principais características que o diferencia do adipócito do TAB, que contém uma única e grande gotícula lipídica ocupando grande parte do citoplasma da célula (54).

O TAM apresenta um grande número de mitocôndrias por adipócito, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação dos ácidos graxos, para a geração de calor. Nesse processo, destaca-se a atuação da proteína desacopladora-1 (UCP-1, do inglês *uncoupling protein 1*), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, que age como um canal de prótons que descarrega a energia gerada na região intermembranosa das mitocôndrias, desencadeando o impedimento da síntese de ATP e assim, permitindo que a energia estocada nas mitocôndrias, seja liberada em forma de calor (55).

A distribuição dos depósitos e dos adipócitos brancos e marrons, se diferem entre as espécies, de acordo com as características fisiológicas e anatômicas (Figura 2).

Figura 2. Distribuição dos adipócitos constituintes dos depósitos branco e marrom, entre roedores e humanos. **a)** Apresenta os adipócitos marrons da região interescapular, adipócitos brancos nas regiões gonadal e inguinal em roedores. **b)** Apresenta os adipócitos brancos na região subcutânea e supraclavicular, os adipócitos marrons estão presentes na região supraclavicular e também na parte interna do pescoço humano. Modificado de Bartelt e Heeren (56).

1. 6. Ácidos graxos e beta oxidação

Os ácidos graxos são os maiores componentes dos triglicerídeos, fosfolípidios e outros complexos lipídicos. Os ácidos graxos podem ser obtidos na dieta alimentar e são chamados de ácidos graxos essenciais, mas também podem ser sintetizados pelo organismo e por precursores não lipídicos como a glicose. Os ácidos graxos são transportados na corrente sanguínea como

componente dos triglicerídeos e fosfolípidios, dentro de lipoproteínas, embora alguns ácidos graxos não esterificados (livres), também circulem na corrente sanguínea (57).

A síntese de ácidos graxos pode ser mediada por um processo pelos quais carbonos provenientes dos carboidratos, como a glicose, frutose e lactose, são convertidas em lipídeos, tendo assim um papel fundamental no acúmulo de gordura corporal (58).

Este processo da síntese é catalisado pela acetil-CoA carboxilase que converte a acetil-CoA em malonil-CoA. Outras moléculas envolvidas com a síntese de ácidos graxos podem ser ativadas pela família da molécula da proteína ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP, do inglês *sterol regulatory element-binding proteins*) (47).

As células de mamíferos produzem três isoformas da família SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c (genes envolvidos com a síntese de ácidos graxos) e a SREBP-2 (mais relacionado com genes envolvidos com a síntese de colesterol) (59).

Quando estão dentro da célula, os ácidos graxos são esterificados, metabolizados em mensageiros lipídicos secundários, ou β -oxidados (oxidação dos ácidos graxos) pela mitocôndria, nesse caso, quem sofre a β -oxidação são os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), esses ácidos graxos são transportados para dentro da célula pela ação da molécula Cd36 (60). Posteriormente os AGCL são transportados para dentro da matriz mitocondrial por ação do sistema carnitina palmitoil tranferase (CPT), que consiste de três proteínas: CPT1, CPT2 e carnitina acilcarnitina translocase (CACT). A CPT1 destaca-se na atuação desse complexo como uma molécula chave na β -oxidação (61).

1. 7. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Estresse oxidativo foi definido como um desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio (ERO, ERN respectivamente) e a capacidade do organismo em neutralizar sua ação por meio do sistema de proteção dos agentes antioxidantes (62).

A existência de espécies químicas na forma de radicais livres foi primeiramente descrita em 1900 por Moses Gomberg. O termo radical livre é definido como uma espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados, assim como o hidrogênio, a maioria dos íons de metais de transição e o oxigênio molecular. Já a terminologia espécies reativas de oxigênio, inclui as espécies radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (63).

A produção e eliminação de ERO, é um processo natural do organismo, contudo, existem vários fatores que desregulam esse balanço, tais como, aumento dos níveis endógenos e exógenos de compostos que contribuem para a produção de ERO, inativação das enzimas antioxidantes, diminuição das reservas de antioxidantes de baixa massa molecular e a combinação de dois ou mais desses fatores citados (64).

Das principais espécies reativas de oxigênio, destacam-se:

- Radical superóxido, formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron;
- Peróxido de hidrogênio, formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons;
- Radical hidroxil, formado a partir da redução oxigênio molecular, por 3 elétrons nas reações de Fenton e Harber-Weiss, catalisada por metais;
- Radical peroxil, formado a partir de hidroperóxidos orgânicos;

- Oxigênio molecular simpleto, primeiro estado excitado do oxigênio molecular com nível de energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto (63).

1. 8. Sistema de defesa antioxidante

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, quando presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a ação dos agentes oxidantes de maneira eficaz (65).

Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser alcançados por meio de diferentes mecanismos de ação: prevenção da formação de ERO, eliminação de ERO formada e reparo das estruturas biológicas lesadas (66).

O sistema antioxidante é usualmente dividido em enzimático e não-enzimático. As principais moléculas envolvidas no sistema de defesa antioxidante enzimático incluem, a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx) (67). Já os sistemas de defesa não-enzimáticos, incluem especialmente os compostos antioxidantes de origem dietética, como: a vitamina C, β -caroteno, zinco, cobre, selênio e o magnésio (66).

1. 9. Ácidos graxos e estresse oxidativo na síndrome dos ovários policísticos

Em fêmeas, os ácidos graxos são importantes para o eixo gonadotrófico e para a gametogênese, colaborando com a qualidade dos oócitos durante a fertilização. Eles também atuam como precursores para a síntese das prostaglandinas e esteroides. A oxidação dos ácidos graxos também é essencial para a maturação dos oócitos durante recentes estágios do desenvolvimento embrionário (68).

Em pacientes com SOP, os ácidos graxos ômega-3, mostraram ter um efeito benéfico, com aumento dos níveis de adiponectinas, na melhora do quadro de resistência à insulina e perfil lipídico (69).

O trabalho de Phelan e colaboradores (2011) (70) sugere que os ácidos graxos poliinsaturados modulam o perfil lipídico e hormonal, melhorando o quadro de hiperandrogenismo em pacientes com SOP.

O estresse oxidativo é geralmente conhecido por estar presente em pacientes com SOP independentemente do peso corporal, ou de alterações metabólicas (71).

Algumas consequências patológicas da SOP como a resistência à insulina, hiperandrogenismo e a obesidade, parecem estar aumentadas em mulheres que também apresentam quadro de estresse oxidativo (72).

O estudo de Chen e colaboradores (2014) (73) mostrou uma forte correlação entre resistência à insulina e estresse oxidativo no tecido adiposo visceral em mulheres com SOP. Ratas com hiperandrogenismo, apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo, quando comparadas com ratas normais (74), mostrando que existe uma relação da resistência à insulina e hiperandrogenismo com o quadro de estresse oxidativo, influenciando na patogênese da SOP.

Com base nos dados da literatura, observamos que alterações lipídicas, com foco na síntese e oxidação dos ácidos graxos e o estresse oxidativo, tem forte envolvimento com a síndrome dos ovários policísticos, resultando em alterações metabólicas entre as pacientes.

Dentro deste contexto, propusemo-nos a estudar os efeitos do tratamento com metformina, em ratas em estro permanente induzido no período neonatal com propionato de testosterona e submetidas a exercício físico. Avaliar também a expressão de genes envolvidos com a síntese e oxidação de ácidos graxos e níveis de estresse oxidativo em tecido adiposo.

2. Objetivos

2. 1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de estresse oxidativo e a expressão de genes envolvidos com a beta oxidação e síntese de ácidos graxos em modelo experimental de síndrome dos ovários policísticos em ratas tratadas com metformina e submetidas ao exercício físico.

2. 2. Objetivos Específicos

- Analisar a histomorfometria dos adipócitos brancos;
- Avaliar o peso corporal e as medidas murinométricas;
- Avaliar os níveis de dano oxidativo pela dosagem das glutathionas reduzida e oxidada (GSH/GSSG) no tecido adiposo branco;
- Analisar a expressão dos genes envolvidos com a síntese e oxidação dos ácidos graxos (*Acaca*, *Srebp1*, *Cpt1*, e *Cd-36*) nos tecidos adiposos branco e marrom.

3. Material e Métodos

3. 1. Animais

Foram utilizadas 46 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) com idade de até 2 dias de vida, obtidas e mantidas no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram confinados com as 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, com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*. A temperatura do local foi mantida em torno de 22° C, com iluminação artificial, sendo o foto-período intercalado de 12h/claro e 12h/escuro (considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas). Após o período de lactação, 21 dias,

as ratas foram separadas das mães e cada grupo experimental foi alocado em uma gaiola plástica própria, com as mesmas condições citadas anteriormente.

Os modelos animais de SOP foram induzidos com 2 dias de vida, por meio de uma única injeção pela via subcutânea de um dos seguintes compostos: propionato de testosterona (1,25 mg/0,1 mL de óleo de sésamo) pela via subcutânea. Os animais controles receberam com 2 dias de vida, uma única injeção de óleo de sésamo (0,1mL) pela via subcutânea.

Foram realizados exames colpo-citológicos (esfregaço vaginal) entre 66 a 81 dias (período antes dos tratamentos de exercício físico e metformina) e 105 a 120 (período realizado após os tratamentos de exercício físico e metformina), para a avaliação do ciclo estral. As lâminas contendo o esfregaço vaginal foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H. E.), para a verificação do tipo celular predominante. Foi usado um microscópio óptico convencional para avaliação das lâminas coradas.

As ratas e a ração de suas respectivas gaiolas, foram pesadas semanalmente em balança digital não paramétrica, a pesagem iniciou a partir no nascimento até o 120° dia de vida de cada animal.

3. 2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, a divisão dos grupos está representada abaixo:

- Grupo controle (Con);
- Grupo SOP (SOP);
- Grupo SOP + metformina (SOP+Met);
- Grupo SOP + exercício físico (SOP+Ex);
- Grupo SOP + metformina + exercício físico (SOP+Met+Ex).

3. 3. Tratamento com metformina

Os animais iniciaram os tratamentos com placebo, metformina e/ou exercício físico com 90 dias de idade, durante 6 semanas.

O tratamento com metformina foi realizado por meio de sonda gástrica (gavagem) na dose de 50 mg/kg da droga diluída em 1 mL de soro fisiológico. O tratamento com placebo foi realizado com gavagem apenas soro fisiológico (1 mL) (41).

3. 4. Protocolo de treinamento físico

Os animais submetidos ao exercício físico aeróbico de intensidade moderada, passaram por um período de adaptação e condicionamento à esteira por 4 dias consecutivos. A adaptação consiste em familiarização com o equipamento e aprender a se locomover na esteira rolante em diferentes intensidades. Os animais que não estiverem realizando o exercício possivelmente precisarão de mais dias. Após este período, as ratas foram conduzidas ao protocolo de teste de esforço máximo progressivo, o objetivo deste protocolo é registrar a capacidade de desempenho de cada animal. Este protocolo foi realizado 5 dias por semana em um período de 6 semanas (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolo de exercício físico aeróbico de intensidade moderada

Frequência (dias)	VO ₂ pico (%)	Tempo de exercício (min)
1ª semana		
Segunda-feira	30	15
Terça-feira	35	15
Quarta-feira	35	20
Quinta-feira	45	20
Sexta-feira	45	25
2ª semana		
Segunda-feira	35	25
Terça-feira	45	30
Quarta-feira	45	35
Quinta-feira	60	40
Sexta-feira	60	45
3ª semana		
Segunda-feira	45	45
Terça-feira	50	60
Quarta-feira	55	60
Quinta-feira	60	60
Sexta-feira	60	60
4ª semana		
Segunda-feira	Teste progressivo de esforço máximo	
Terça-feira	50	55
Quarta-feira	55	60
Quinta-feira	60	60
Sexta-feira	60	60
5ª e 6ª semanas		
Segunda-feira	55	60
Terça-feira	60	60
Quarta-feira	60	60
Quinta-feira	60	60
Sexta-feira	60	60

3. 5. Eutanásia

Com aproximadamente 120 dias de idade, os animais foram anestesiados com ketamina (30 mg/Kg) associada ao cloridrato de xilazina (15 mg/Kg), para a retirada dos tecidos adiposos subcutâneo, mesentérico, perigonadal e marrom

3. 6. Dosagem das glutathionas reduzida/oxidada (GSH/GSSG)

A avaliação da relação glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi realizada no tecido adiposo subcutâneo e mesentérico, seguindo a metodologia descrita por (75). A solução KPE (13,6 g/L de KH_2PO_4 , 17 g/L de K_2HPO_4 e 3,27 g/L de EDTA, pH 7,5) foi o tampão utilizado para preparar todas as soluções. Para homogeneização do tecido adiposo utilizamos 300 μL de KPE + 0,6% de ácido sulfosalicílico e 0,1% de Triton X-100 (todos os reagentes fornecidos pela Sigma) e depois separamos uma alíquota de 60 μL para dosar proteína pelo kit BCA (Pierce). O restante foi centrifugado a 8.000xg; 10 min; 4°C e o sobrenadante foi separado em dois tubos para a dosagem da glutathiona total e glutathiona oxidada.

Para dosar a glutathiona oxidada utilizamos o reagente 2-vinilpiridina 1/60 (v/v, Sigma), que reage covalentemente com a GSH (mas não GSSG), e depois neutralizamos o seu excesso adicionando Trietanolamina 1/20 (v/v, Sigma). Logo após, reciclamos a GSSG adicionando 13,3 mL/L da enzima glutathiona redutase (250 U) e 0,666 g/L NADPH para formar GSH e assim reagir com 0,666g/L de sulfidril 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) para formar um composto amarelo, o 5'-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB), que foi mensurado a 412 nm em leitor de microplaca (Infinite 200, Tecan). A concentração de glutathiona reduzida ou oxidada foi calculada com base em uma curva padrão e corrigida pela quantidade de proteína.

3. 7. Análises histomorfométricas do diâmetro dos adipócitos brancos

Para verificar o tamanho do diâmetro dos adipócitos brancos, as gorduras brancas (subcutânea, mesentérica) de cada rata foi fixado em formol a 10% por 48 horas, posteriormente passarão pelas seguintes etapas: desidratação em álcool etílico; diafanização em xilol; impregnação em parafina histológica em estado líquida mantida em estufa a 60°C; inclusão em parafina histológica a temperatura ambiente.

Os blocos de parafina contendo os tecidos foram seccionados em micrótomo (Microm HM315 R) com cortes de 4,5µm de espessura, depois os cortes foram depositados em lâminas e mantidos em estufa a 46°C por 24 horas, para ocorrer a secagem do material. Após a secagem, foi feita a coloração pelo método da hematoxilina e eosina (H. E.). Foram preparadas duas lâminas de cada animal, sendo avaliado o diâmetro e a área de 100 adipócitos de cada rata por um sistema computadorizado para análises morfométricas. O diâmetro foi padronizado a partir da maior distância possível entre dois pontos na membrana celular dos adipócitos. As análises morfométricas foram realizadas em microscópio óptico (Leica DM400 B), com câmera de vídeo colorida acoplada (Leica DFC420). A análise morfométrica foi feita com auxílio do software Leica Application Suite 3.0.0 a partir de fotomicrografias.

3. 8. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo terão a distribuição avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. De acordo com a distribuição dos dados, os mesmos foram analisados através da análise de variância ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido de testes *post hoc* de Bonferroni e Dunn, respectivamente. O valor de *p* foi considerado significativo para 5% ($p < 0.05$).

4. Resultados

4. 1. Peso corporal e dados murinométricos

Todos os grupos de modelos animais de SOP apresentaram maior ganho de peso em relação ao grupo controle ($P < 0,01$). Os modelos animais de SOP com tratamento de metformina e/ou exercício não apresentaram alteração de peso em comparação com os modelos animais de SOP sem tratamento.

O desenvolvimento do peso corporal dos animais ao longo do experimento está representado na Figura 3.

Figura 3. Peso corporal das ratas ao longo do experimento. Após 11 semanas de experimento, foi iniciado os tratamentos com exercício e/ou metformina e randomização do grupo SOP para subdivisão dos grupos SOP, SOP+Met, SOP+Ex e SOP+Met+Ex. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Grupos SOP x Con – $P < 0,01$

4. 2. Medidas murinométricas

Não houve diferença estatística entre os grupos do estudo com relação ao índice da massa corporal (IMC) (Figura 4) e ao índice de Lee (Figura 5).

Figura 4. Índice de Massa Corpórea (IMC) das ratas dos grupos Con, SOP, SOP+Met, SOP+Ex e SOP+Met+Ex. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Figura 5. Índice de Lee nos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4. 3. Peso de depósitos de gordura, coração e rim

Na gordura inguinal, houve aumento significativo apenas no grupo SOP+Ex em relação ao grupo SOP ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos das gorduras mesentérica e perigonadal. Também não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso do coração. No rim, houve apenas aumento significativo do grupo SOP+Ex em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Peso dos depósitos de gordura, rim e coração.

	Controle	SOP	SOP+Met	SOP+Ex	SOP+Met+Ex
<i>Localização</i>					
Inguinal	0,88 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,06 ^b	0,86 $\pm$ 0,12
Mesentérica	0,84 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,21	2,06 $\pm$ 0,52	1,16 $\pm$ 0,27
Perigonadal	1,96 $\pm$ 0,09	2,00 $\pm$ 0,31	2,06 $\pm$ 0,38	2,98 $\pm$ 0,23	1,46 $\pm$ 0,39
<i>Demais órgãos</i>					
Rim	0,99 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,15 ^a	1,24 $\pm$ 0,15
Coração	1,08 $\pm$ 0,10	1,12 $\pm$ 0,17	1,18 $\pm$ 0,06	1,40 $\pm$ 0,14	1,08 $\pm$ 0,15

Os valores acima estão em unidades de grama (g)

^a – vs Con ($P < 0,05$); ^b – vs SOP ($P < 0,05$).

4. 4. Teste de esforço progressivo

Ao final do experimento, as ratas dos grupos SOP+Ex e SOP+Met+Ex apresentaram maior capacidade aeróbica no teste de esforço progressivo em relação ao grupo SOP ($P < 0,05$). O grupo SOP+Met+Ex apresentou também maior capacidade aeróbica em relação ao grupo SOP+Met ($P < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Teste de esforço máximo progressivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. *a* – vs SOP ($P < 0,05$); *b* – vs SOP+Met ($P < 0,05$).

4. 5. Expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real

Não houve diferença estatística entre os grupos Con, SOP, SOP+Met, SOP+Ex e SOP+Met+Ex nas análises de PCR em tempo real, referente aos genes *Cpt1*, *Srebp1*, *Acaca* e *Cd36* das gorduras mesentérica e marrom (Tabela 4).

Tabela 4. Dados do PCR em tempo real referente aos genes *Cpt1*, *Srebp1*, *Acaca* e *Cd36*, das gorduras mesentérica e marrom.

	Con	SOP	SOP+Met	SOP+Ex	SOP+Met+Ex
Mesentérica					
<i>Cpt1</i>	0,012 ± 0,005	0,031 ± 0,023	0,344 ± 0,292	0,069 ± 0,036	0,088 ± 0,068
<i>Srebp1</i>	0,255 ± 0,116	0,341 ± 0,217	0,334 ± 0,168	1,546 ± 0,725	1,361 ± 1,197
<i>Cd36</i>	4,820 ± 2,548	7,216 ± 5,453	1336 ± 1329	43,28 ± 24,55	45,98 ± 39,67
Marrom					
<i>Cpt1</i>	3,644 ± 2,441	0,136 ± 0,070	4,213 ± 2,595	1,363 ± 0,733	3,424 ± 1,759
<i>Srebp1</i>	4,496 ± 4,462	2,748 ± 1,394	1,327 ± 0,916	1,188 ± 0,541	2,166 ± 1,209
<i>Cd36</i>	3,162 ± 2,829	1,779 ± 0,858	4,229 ± 3,225	0,211 ± 0,079	2,559 ± 1,302

Dados do PCR em tempo real referente aos genes *Cpt1*, *Srebp1*, *Acaca* e *Cd36*, das gorduras mesentérica e marrom. Os valores acima estão apresentados em unidade arbitrária, como média ± erro padrão. * Devido a falha na detecção, o gene *Acaca* foi excluído do trabalho.

4. 6. Estresse oxidativo no tecido adiposo

Não houve diferença estatística entre os grupos SOP, SOP+Met, SOP+Ex, SOP+Met+Ex e Con, nas análises de estresse oxidativo na gordura inguinal (Figura 7).

Gordura inguinal

Figura 7. Análises da glutathiona reduzida (GSH reduzida), glutathiona total (GSH total), glutathiona oxidada (GSSG) e razão da glutathiona reduzida/oxidada (razão GSH/GSSG). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Também não houve diferença estatística entre os grupos SOP, SOP+Met, SOP+Ex, SOP+Met+Ex e Con, nas análises de estresse oxidativo na gordura mesentérica (Figura 8).

Figura 8. Análises da glutathiona reduzida (GSH reduzida), glutathiona total (GSH total), glutathiona oxidada (GSSG) e razão da glutathiona reduzida/oxidada (razão GSH/GSSG). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4. 7. Morfometria dos adipócitos das gorduras mesentérica e inguinal

Na morfometria de adipócitos da gordura mesentérica, houve aumento do tamanho dos adipócitos do grupo SOP em relação ao grupo Con ($P < 0,01$), e houve uma diminuição da área de adipócitos do grupo SOP+Met+Ex em relação ao grupo SOP ($P < 0,05$). Não houve diferenças morfométricas nos adipócitos inguinais (Figura 7).

Figura 9. Morfometria dos adipócitos (A) gordura inguinal e (B) gordura mesentérica. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. a - vs Con ($P < 0,05$); b – vs SOP ($P < 0,05$).

5. Discussão

No presente estudo foi possível observar o que os modelos animais de SOP apresentaram maior peso corporal em relação aos controles, mas os tratamentos de metformina e/ou exercício não tiveram efeito sobre o peso corpóreo. Também foi possível observar a hipertrofia dos adipócitos mesentéricos, de modo que apenas o tratamento com associação de metformina com exercício, mas não a metformina e o exercício isolados, foi capaz de normalizar o tamanho dos adipócitos.

Mulheres com SOP apresentam maior tendência a aumento de peso e adiposidade. Esse aumento de adiposidade, ou obesidade, geralmente piora o quadro de hiperandrogenismo das pacientes com SOP. A obesidade na SOP está relacionado ao aumento da gordura visceral (obesidade central), contribuindo para um pior quadro de alterações metabólicas (76).

A obesidade pode resultar de duas adaptações das células adiposas: 1) a hiperplasia, que é o aumento na quantidade de adipócitos; 2) e a hipertrofia, que é o aumento do tamanho do adipócito (77). Os adipócitos de tamanho pequeno agem absorvendo os ácidos graxos livres e os triglicérides no período pós prandial. Enquanto que adipócitos de tamanho maior se tornam disfuncionais. Adipócitos hipertrofiados são resistentes a insulina, hiperlipolíticos e resistente ao efeito anti lipolítico da insulina. O aumento do adipócito também é responsável pela liberação de citocinas inflamatórias e adipocinas (78). Além disso, a hipertrofia de adipócitos é fortemente correlacionada com a resistência à insulina em pacientes com SOP (79).

Por outro lado, pouco se sabe sobre os efeitos de terapias como a metformina e o exercício sobre o tecido adiposo de pacientes com SOP.

A metformina é uma biguanida usada no tratamento e na prevenção de diabetes do tipo 2 que melhora a sensibilidade à insulina em nível periférico (80). A metformina também é empregada para o tratamento da SOP (32), mas seus efeitos sobre a morfologia de adipócitos ainda são pouco estudados. No presente estudo, mostramos que houve hipertrofia de adipócitos mesentéricos nos modelos animais de SOP e o tratamento de metformina associada ao exercício físico

mostrou redução significativa do tamanho de adipócitos mesentéricos em relação ao grupo SOP. Os achados do nosso grupo, corroboram com o trabalho de Pai e Majumdar (2014) (81), que usaram modelo experimental de SOP com ratas e verificaram por morfometria que os adipócitos do grupo SOP que recebeu metformina, tinha um tamanho menor em relação ao adipócito do grupo SOP sem metformina, sugerindo que a metformina atua contra a hipertrofia dos adipócitos no modelo experimental de SOP.

O trabalho de Souza Mello e colaboradores (2010) (82), mostrou a eficiência da metformina contra a hipertrofia dos adipócitos em modelo experimental de obesidade. Em nosso estudo, o tratamento com metformina isolada apresentou apenas tendência a diminuição do tamanho de adipócitos mesentéricos. A diferença de resultados entre nosso estudo e o estudo de Souza-Mello e colaboradores pode ser atribuída a diferentes protocolos de tratamento com metformina e diferentes respostas entre os modelos animais utilizados. No presente estudo, a metformina se mostrou eficaz contra a hipertrofia dos adipócitos em modelo experimental de SOP apenas quando associada ao exercício, indicando que a metformina associada a atividade física pode atuar contra a hipertrofia de adipócitos e suas possíveis complicações metabólicas.

O exercício físico, associado a outras mudanças de hábito de vida, como dieta, tem sido utilizado como primeira linha de tratamento para a SOP. Nesse estudo, o tratamento com exercício isolado para as ratas com SOP induzida por testosterona não apresentou nenhum efeito significativo sobre a morfologia de adipócitos. Em contrapartida, o trabalho de Marcondes e colaboradores (2017) (27) mostrou que modelos experimentais de SOP em camundongas, as quais apresentavam hipertrofia de adipócitos mesentéricos, treinadas com exercício físico voluntário por 4-5 semanas apresentavam redução do diâmetro de adipócitos mesentéricos em relação aos modelos animais sedentários.

O exercício voluntário e não voluntário (uso de esteira motorizada), apresentaram redução dos adipócitos da gordura visceral de ratos (83), em nosso trabalho, o exercício não voluntário, se mostrou efetivo apenas quando

associado a metformina, mostrando que apenas o exercício nas ratas do grupo SOP não foi efetivo para a redução da hipertrofia de adipócitos.

O exercício voluntário é um protocolo em que o animal faz uso da roda de corrida de maneira rotineira e sem necessidade de intervenção humana, isso faz com que a resistência do animal com relação a atividade física seja menor. O uso da esteira motorizada como protocolo de exercício aeróbico moderado necessita de um tempo de adaptação do animal e comparado ao protocolo de exercício voluntário, no protocolo de exercício em esteira motorizada o animal faz exercício por menos tempo.

Em humanos o exercício também se mostra efetivo com relação a SOP, o estudo de Mario e colaboradores (2017) (84) mostrou que mulheres do grupo exercício, apresentavam menor tamanho da circunferência abdominal e menor índice de produtos da acumulação lipídica em relação ao grupo controle.

No presente estudo, pelo teste de esforço máximo progressivo, houve diferença significativa da capacidade aeróbica dos animais submetidos ao exercício físico, isolado ou associado a metformina, quando comparado aos modelos animais de SOP sem tratamento. Este resultado corrobora com outros resultados encontrados na literatura com relação a animais condicionados ao exercício e que apresentam melhor capacidade aeróbica (85-87). O aumento da capacidade aeróbica está relacionado ao menor risco de doenças cardiovasculares (88). Por outro lado, a baixa capacidade aeróbica está relacionada a doenças cardiometabólicas em humanos (88) e em ratos (89). Em nossos modelos animais de SOP, houve a tendência a diminuição da capacidade aeróbica, o que condiz com disfunções cardiovasculares descritas previamente em modelos animais de SOP.

Com relação ao peso corporal, o presente estudo mostrou que houve diferença significativa no peso corporal das ratas com SOP induzida por testosterona, onde todos os grupos apresentaram maior peso em relação aos animais controles. Esta diferença entre as ratas controle e as demais ratas modelo de SOP, foi observada em estudos anteriores do nosso grupo usando o

mesmo modelo de exposição das ratas com SOP induzida por testosterona (42).

No presente estudo, houve aumento do peso do rim do grupo que fez exercício em relação ao grupo controle, este último resultado corrobora com o trabalho de nosso grupo (27), em que o peso do rim dos grupos que fizeram exercício, apresentou aumento em relação ao peso do rim dos animais do grupo controle.

As análises de estresse oxidativo dos grupos de SOP do presente estudo, apresentaram maiores níveis dos marcadores de estresse oxidativo GSH e GSSG em relação ao grupo Controle no tecido adiposo mesentérico e inguinal. Não houve diferença estatística entre os grupos nas análises dos níveis das glutationas GSH/GSSG e também não foram observadas variações significativas entre as várias intervenções terapêuticas.

Em resumo, a metformina em associação com o exercício físico aeróbico, se mostrou efetiva na atuação contra a hipertrofia dos adipócitos da gordura mesentérica no modelo experimental de SOP. Entender o perfil metabólico na SOP e suas alterações é algo complexo, mas que vem sendo amplamente estudado nos dias atuais. Nesse aspecto, o tecido adiposo é um alvo de grande valia para o entendimento de algumas questões relacionadas com a SOP e alterações metabólicas.

6. Conclusões

- Houve hipertrofia de adipócitos mesentéricos no grupo SOP em relação ao grupo controle. O tratamento com metformina associado ao exercício físico diminuiu o tamanho dos adipócitos em relação ao grupo SOP sem intervenção.
- Houve ganho de peso corporal em todos os grupos de modelo experimental de SOP em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos nas medidas murinométricas.
- Os grupos SOP apresentaram maiores níveis dos marcadores de estresse oxidativo GSH e GSSG em relação ao grupo controle nos tecidos adiposos mesentérico e inguinal. Não houve diferença estatística entre os grupos nas análises dos níveis das glutations reduzida/oxidada GSH/GSSG. Não foram observadas variações significativas entre as várias intervenções terapêuticas.
- Não houve diferença Significante entre os grupos com relação aos genes (*Srebp1*, *Cpt1*, e *Cd-36*) no tecido adiposo branco e marrom.

7. Referências bibliográficas

1. Franks S. Can Animal Models of PCOS Help Point the Way Towards Early and Effective Therapeutic Intervention in Women With the Syndrome? *Endocrinology*. 2015;156(7):2371-3.
2. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-7.
3. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 29(2):181-91.
4. Martins WdP, Mauad-Filho F, Araujo CHMd, Ferriani RA, Reis RMd. Síndrome dos ovários policísticos. *Femina*. 2006;34(10):659-65.
5. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2. England 2016. p. 16057.
6. Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl*. 2006;29(1):278-85; discussion 86-90.
7. Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22(2):261-74.
8. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(13):853-61.
9. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5321-7.
10. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. *Polycystic ovary syndrome*. 1992;4:377-84.

11. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4237-45.
12. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50(1):113-6.
13. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800.
14. Lungu AO, Zadeh ES, Goodling A, Cochran E, Gorden P. Insulin resistance is a sufficient basis for hyperandrogenism in lipodystrophic women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):563-7.
15. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology.* 1981;108(4):1441-9.
16. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *The Lancet.* 2007;370(9588):685-97.
17. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1992;41(10):1257-66.
18. Motta AB. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. *Curr Pharm Des.* 2012;18(17):2482-91.

19. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 2010;8:41.
20. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012;33(6):981-1030.
21. 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. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):618-37.
22. Nandi A, Chen Z, Patel R, Poretsky L. Polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43(1):123-47.
23. Whitaker KN. Polycystic ovary syndrome: an overview. *J Pharm Pract.* 2011;24(1):94-101.
24. Brown AJ, Setji TL, Sanders LL, Lowry KP, Otvos JD, Kraus WE, et al. Effects of exercise on lipoprotein particles in women with polycystic ovary syndrome. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(3):497-504.
25. Orio F, Muscogiuri G, Giallauria F, Savastano S, Bottiglieri P, Tafuri D, et al. Oral contraceptives versus physical exercise on cardiovascular and metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;85(5):764-71.
26. Homa LD, Burger LL, Cuttitta AJ, Michele DE, Moenter SM. Voluntary Exercise Improves Estrous Cyclicity in Prenatally Androgenized Female Mice Despite Programming Decreased Voluntary Exercise: Implications for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Endocrinology.* 2015;156(12):4618-28.
27. 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. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;448:66-76.

28. Katsiki N, Hatzitolios AI. Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22(6):466-76.

29. Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1105-7.

30. Naderpoor N, Shorakae S, de Courten B, Misso ML, Moran LJ, Teede HJ. Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2015;21(5):560-74.

31. Aubuchon M, Lieman H, Stein D, Cohen HW, Isaac B, Adel G, et al. Metformin does not improve the reproductive or metabolic profile in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Sci*. 2009;16(10):938-46.

32. Maciel GA, Soares Junior JM, Alves da Motta EL, Abi Haidar M, de Lima GR, Baracat EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril*. 2004;81(2):355-60.

33. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj*. 1990;301(6761):1111.

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

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

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

37. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *Journal of Endocrinology*. 2002;174(1):1-5.
38. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of reproduction*. 2012;86(5):149.
39. 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.
40. Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*. 1961;68:62-7.
41. Mahamed RR, Maganhin CC, Simoes RS, de Jesus Simoes M, Baracat EC, Soares JM, Jr. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertil Steril*. 2011;95(4):1507-9.
42. Marcondes RR, Carvalho KC, Duarte DC, Garcia N, Amaral VC, Simoes MJ, et al. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels. *Gen Comp Endocrinol*. 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. Gartner L. *Tratado de Histologia*: Elsevier Health Sciences Brazil; 2011.
45. Young B. *Wheater Histologia Funcional*: Elsevier Health Sciences Brazil; 2011.
46. LC J, J C. *Histologia Básica*. 11a ed ed. Rio de Janeiro 2008.
47. Curi RUI, Pompeia C, Myasaka CK, Procopio J. *Entendendo a Gordura - Os Acidos Graxicos*: Manole; 2001.

48. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *The American journal of clinical nutrition*. 1987;45(1):277-82.
49. 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(6505):425-32.
50. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;205(2):194-208.
51. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research*. 2008;39(8):715-28.
52. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*. 2010;11(1):11-8.
53. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
54. Betz MJ, Enerback S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*. 2015;64(7):2352-60.
55. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática:[revisão]. *J pediatr(Rio J)*. 2007;83(5, supl):S192-S203.
56. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):24-36.
57. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015;39(1 Suppl):18s-32s.

58. Polacow VO, Lancha Junior AH. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arq bras endocrinol metab.* 2007;51(3):389-400.
59. Ye J, DeBose-Boyd RA. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7).
60. Ibrahimi A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5(2):139-45.
61. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(3):269-84.
62. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
63. Ribeiro SMR, de Queiroz JH, Peluzio MdCG, Costa NMB, da Matta SLP, de Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal.* 2006;21(3).
64. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions.* 2014;224:164-75.
65. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 2002;82(1):47-95.
66. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RdCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev nutr.* 2010;23(4):629-43.
67. Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary

syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*. 2013;19(3):268-88.

68. Dupont J, Reverchon M, Bertoldo MJ, Froment P. Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):527-37.

69. Mohammadi E, Rafrat M, Farzadi L, Asghari-Jafarabadi M, Sabour S. Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012;21(4):511-8.

70. Phelan N, O'Connor A, Kyaw Tun T, Correia N, Boran G, Roche HM, et al. Hormonal and metabolic effects of polyunsaturated fatty acids in young women with polycystic ovary syndrome: results from a cross-sectional analysis and a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(3):652-62.

71. Hyderali BN, Mala K. Oxidative stress and cardiovascular complications in polycystic ovarian syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2015;191:15-22.

72. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8589318.

73. Chen L, Xu WM, Zhang D. Association of abdominal obesity, insulin resistance, and oxidative stress in adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2014;102(4):1167-74.e4.

74. Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, Zhang H, et al. Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gend Med*. 2011;8(2):103-15.

75. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65.
76. Delitala AP, Capobianco G, Delitala G, Cherchi PL, Dessole S. Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2017.
77. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* 2015;208(5):501-12.
78. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010;11(1):11-8.
79. Manneras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Oden A, Holm G, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):E304-11.
80. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017.
81. Pai SA, Majumdar AS. Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(12):1710-21.
82. Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(6):239-50.

83. Rocha-Rodrigues S, Rodriguez A, Gouveia AM, Goncalves IO, Becerril S, Ramirez B, et al. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* 2016;165:100-8.
84. Mario FM, Graff SK, Spritzer PM. Habitual physical activity is associated with improved anthropometric and androgenic profile in PCOS: a cross-sectional study. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(4):377-84.
85. Farah D, Nunes J, Sartori M, Dias DD, Sirvente R, Silva MB, et al. Exercise Training Prevents Cardiovascular Derangements Induced by Fructose Overload in Developing Rats. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167291.
86. Conti FF, Brito Jde O, Bernardes N, Dias Dda S, Malfitano C, Morris M, et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(12):R1532-9.
87. Ichige MH, Santos CR, Jordao CP, Ceroni A, Negrao CE, Michelini LC. Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. *J Physiol.* 2016;594(21):6241-54.
88. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. *Jama.* 2009;301(19):2024-35.
89. Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science.* 2005;307(5708):418-20.