ÁLVARO ANZAI

**Análise metabolômica e histomorfométrica do fígado de ratas
adultas em modelo experimental da síndrome dos ovários
policísticos induzida por exposição neonatal a esteroides
sexuais**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa
Maciel

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Anzai, Álvaro

Análise metabólica e histomorfométrica do fígado de ratas adultas em modelo experimental da síndrome dos ovários policísticos induzida por exposição neonatal a esteroides sexuais / Álvaro Anzai. -- São Paulo, 2015.

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.Metabólica
4.Fígado gorduroso 5.Hepatopatia gordurosa não alcoólica

USP/FM/DBD-199/15

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Ademar Anzai** e **Clarice Anzai**, à minha irmã, **Ariane Anzai**, a minha avó materna, **Satiko Ueda Shiraishi** e a minha avó paterna **Aia Vatanabe Anzai** (in memorian).*

O incentivo e a paciência de vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Obrigado por todo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui e por muitas vezes renunciarem aos próprios sonhos para realizar os meus. Muito Obrigado.

Agradecimentos

Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel – Palavras não seriam suficientes para agradecer este meu orientador, professor, médico, pesquisador, cientista e amigo, pelas preciosas horas de ensino, discussão e orientação despendidas a mim, sempre acompanhadas de muita motivação e muita paciência. Obrigado pela paciência e disponibilidade independente do horário e lugar. Minha eterna gratidão e admiração.

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat – Não tenho palavras para deixar registrada minha imensa admiração e eterna gratidão por este melhor exemplo de grande professor, que abriu não só as portas e oportunidades para mim, mas abriu minha mente e meu coração para o ensino, assistência e pesquisa. Obrigado pela disponibilidade mesmo em meio a tantos compromissos, pois sempre tinha um tempo reservado a mim. Sempre com palavras carinhosas e sábias. Muito Obrigado, Meu Professor.

Prof. Dr. José Maria Soares Junior – Agradeço seu apoio, suas sugestões sempre ótimas e oportunas que recebi antes, durante e após a execução deste trabalho. Admiro seu profissionalismo e sua competência.

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões – Sou imensamente grato a este grande professor, paciente, competente, atencioso. Obrigado pela paciência e motivação com que se sentou comigo para discutir as lâminas para a histomorfometria no Departamento de Morfologia da Unifesp – EPM.

Dra. Sylvia Asaka Yamashita Hayashida – Palavras são poucas para agradecer a esta grande médica e pesquisadora. Sou eternamente grato pelo entusiasmo, dedicação e paixão em nos ensinar e dar dicas para trabalhar com as pacientes no desafio das doenças ginecológicas e endócrinas.

Dra. Kátia Carvalho – Sou grato por todo o incentivo e paciência a me levar nesse universo desafiador da Biologia Molecular e de trabalho de bancada e pesquisa em laboratório. Obrigado pela paciência e pelas críticas

construtivas. Tenho enorme admiração pela sua competência e profissionalismo.

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva – Aquele que abriu meus caminhos e me motivou o interesse nesse universo das “omics”/GWAS, além de abrir também as portas de seu Laboratório na Unifesp para mim e indicar o melhor e mais competente laboratório para análise metabolômica – Biocrates, Austria.

Prof. Dr. Edson G. Lo Turco – pela motivação, dicas de pesquisas e críticas construtivas nesse projeto.

Professores da Endocrinologia, em especial, Prof. Dr. Eder Carlos Rocha Quintão, Profa. Dra. Marisa Passarelli e Prof. Dr. José Antonio Miguel Marcondes – pela paixão que me contagiou em unir pesquisa e assistência no combate à síndrome metabólica, dislipidemia, resistência insulínica, obesidade e hiperandrogenismo.

Prof. Dra. Angela Maggio da Fonseca e Prof. Dr. Vicente Bagnoli – pelo entusiasmo que se dedicaram ao meu aprendizado para trabalhar com assistência e pesquisa no HC e na FMUSP e pelo tempo que pude acompanhá-los e aprender muito com seus ensinamentos, sempre pacientes e atenciosos.

Professores e assistentes da Disciplina de Ginecologia da FMUSP, em especial, **Dra. Elsa Aida Gay Pereyra, Dra. Maricy Tacla, Dr. Homero Guidi** – minha eterna gratidão por tudo que tenho vivenciado e aprendido em Medicina com esses mestres e cuidadores.

Meus professores e amigos da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” – a quem eu devo minha formação em Medicina e também em Ginecologia e Obstetrícia, alguns que inclusive encontrei em algumas etapas deste projeto, me incentivaram neste campo da pesquisa e no trabalho na USP.

Claudia Vieira – Sua competência e organização me deixam eternamente grato por todo o trabalho de formatação, revisão e dicas, pois sem sua ajuda eu jamais poderia concluir este trabalho.

Mayte Ugeda e Elenice – Sem vocês no Laboratório do Prof. Ismael na Unifesp, sem a organização, dedicação e ajuda de vocês, eu não conseguiria nunca realizar este projeto.

Dr. Paulo D'Amora – Prontamente atendeu minhas solicitações e superou minhas expectativas em relação a sua empresa que considero a melhor que conheço para logística e exportação de material biológico. Sem sua ajuda, organização e competência eu não poderia executar este presente estudo.

Rodrigo Marcondes, Natalia Garcia e Thiago Hideki – Admiro sua competência, organização e dedicação. Além de ter ganhado amigos, tive como companheiros de bancada, de almoço e lanches em muitas etapas desde projeto. E sou eternamente grato, pois sem sua presença, seu tempo, sua amizade, seria impossível realizar este trabalho.

Amigos do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58) da FMUSP e do Ambulatório de Hiperandrogenismo e Ginecologia Endócrina do HCFMUSP – Meu apreço, gratidão e carinho a esses grandes amigos. Além dos que já citei. Luiz Fernando Portugal Fuchs, Marinalva de Almeida, Faila Catarina de Souza, Juciara da Costa Silva, Ricardo Simões, Daniella De Grande Curi, Erika Mendonça, Fúlvia Beretta, Maria Cristina Nogueira, Marina Iahn Aun. Desculpem se eu deixei de falar de alguém, mas sou grato a todos os outros pós-graduandos, funcionários, médicos colaboradores, alunos de graduação, Residentes e outros amigos que passaram pelo Ambulatório e pelo LIM-58. Pude compartilhar muitos momentos não só de discussão clínica e científica, mas também de descontração, risadas e passeios. Mais que colegas, são amigos que fiz nesta etapa da minha vida e de quem me lembrarei sempre.

Equipe de Enfermagem e secretárias do Ambulatório de Ginecologia do PAMB – Prédio dos Ambulatórios do HCFMUSP e secretárias da Disciplina de Ginecologia da FMUSP – Obrigado por todo o suporte e apoio.

Profissionais do Centro de Bioterismo da FMUSP – Agradeço a todos profissionais do Centro de Bioterismo pelo suporte no manejo dos animais utilizados nesse estudo.

Minhas pacientes do Ambulatório do HCFMUSP – Obrigado pela paciência, espera e exames para discussão clínica dos seus casos, para melhor cuidar de vocês.

Minhas pacientes e secretárias do Consultório – Obrigado pela compreensão pelas remarcações e pela minha ausência em certos períodos deste projeto para que eu pudesse concluir este trabalho. São atualizações científicas, estudo e investimento para melhor cuidar de vocês.

Familiares da Família Anzai e Shiraishi – Obrigado pela torcida, suporte, paciência e compreensão nestes anos de idas e vindas a São Paulo. Desculpem o trabalho e o incômodo, o apoio de vocês foi fundamental para a execução desta etapa da minha vida. Muito Obrigado.

Dr. Ademar Anzai, Clarice Anzai e Dra. Ariane Anzai – Meu pai, como o melhor exemplo de pai, médico, homem, amigo e ser humano que eu poderia ter. Minha mãe e minha irmã, como melhores exemplos de companheirismo e de família que eu poderia ter.

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (ABNT).

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 e Siglas	
	Lista de tabelas	
	Lista de figuras	
	Resumo	
	Abstract	
1	Introdução.....	1
	1.1 Etiologia da SOP.....	3
	1.2 Obesidade	4
	1.3 Alterações hepáticas	
	1.3.1 DHGNA e SOP.....	9
	1.3.2 DHGNA/EHNA.....	11
	1.4 Modelos animais.....	15
	1.5 <i>Omics</i> : Tecnologia de abordagem ampla na SOP e DHGNA/EHNA.....	18
2	Objetivos	
	2.1 Objetivo Geral.....	20
	2.2 Objetivos Específicos.....	20
3	Materiais e Métodos	
	3.1 Animais.....	21
	3.2 Tratamento dos Animais.....	22
	3.3 Preparo para a análise histológica das amostras de fígado por hematoxilina e eosina (H.E.).....	22
	3.3.1 Método de análise histomorfométrica	23
	3.4 Análise metabolômica das amostras do fígado	24
	3.5 Análise estatística.....	25
4	Resultados	
	4.1 Análise histomorfométrica das amostras de fígado por hematoxicilina e eosina (H.E.).....	27
	4.1.1 Resultados histomorfológicos	27

4.1.2 Resultados histomorfométricos.....	30
4.2 Resultados da análise metabólica do fígado das ratas adultas expostas a esteroides sexuais no período neonatal..	31
5 Discussão	45
6 Conclusão	56
7 Anexos.....	57
8 Referências.....	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor/igual
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus Celsius
α	Alfa
μm	Micrometro
ACSL1	Acil-CoA sintetase de cadeia longa
ANOVA	análise de variância
BCAA	<i>Branched Chain Amino Acids</i> - Aminoácidos de cadeia ramificada
C5	Valerilcarnitina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	Centímetro
CYP17	Enzima do citocromo P450 C17 alfa
CYP19	Enzima aromatase
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM 2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DP	Desvio-padrão
EHA	Esteato-Hepatite Alcoólica
EHNA	Esteato-Hepatite Não Alcoólica
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> – Análise de Injeção de Fluxo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
GCKR	Glucokinase regulatory protein (proteína reguladora da

	glucoquinase)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Hora
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE ou H.E.	Hematoxilina e eosina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Performance
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
Kg	Quilograma
LC	<i>Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida
LH	Hormônio Luteinizante
LIM-58	Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da FMUSP
m ²	Metro quadrado
mm ²	Milímetro quadrado
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de Massa
n°	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxLDL	lipoproteína de baixa densidade oxidada
PCA	análise de componentes principais
pg	Picogramas
PITC	fenilisotiocianato
ROC	Receiver operating characteristic
SLC22A4	Gene (<i>solute carrier family 22, organic cation/ergothioneine transporter, member 4</i>)
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> – Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

Val	Valina
Val/C5	Razão Valina/Valerilcarnitina
W	Watts

Lista de tabelas

Tabela 1	Prevalências da DHGNA e EHNA. Há variação substancial devido às diferenças nas populações estudadas e métodos diagnósticos utilizados.....	12
Tabela 2	Fatores de risco da DHGNA/EHNA e condições associadas.....	14
Tabela 3	Estimativa dos hepatócitos com infiltração lipídica e dos hepatócitos binucleados.....	30

Lista de figuras

Figura 1	Mecanismo proposto para explicar as interações entre resistência à insulina e os efeitos metabólicos da síndrome dos ovários policísticos.....	7
Figura 2	SOP: interação do distúrbio primário na secreção de androgênios com fatores ambientais.....	8
Figura 3	Hipótese de “múltiplos impactos” para Esteato Hepatite não alcoólica (EHNA), oxLDL (lipoproteína de baixa densidade oxidada) ; TLR (receptor Toll-like).....	15
Figura 4	Fotomicrografia de corte de fígado de rata pertencente ao grupo controle. Notar veia centro lobular e cordões de hepatócitos. H.E. 400x.....	27
Figura 5	Fotomicrografia de corte de fígado de rata exposta à testosterona. Notar inúmeras vesículas claras no citoplasma dos hepatócitos. H.E. 400x.....	28
Figura 6	Fotomicrografia de corte de fígado de rata exposta ao estradiol. Notar hepatócitos binucleados e em alguns locais aumento do volume nuclear e algumas gotículas de gordura. H.E. 400x.....	29
Figura 7	Diagrama espacial tridimensional representando a discriminação entre os 3 grupos Controle x Estradiol x Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos.....	31
Figura 8	Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os 3 grupos, listados em ordem decrescente de	

	concentração.....	33
Figura 9	Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Controle e Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos. Há uma discriminação mais evidente quando comparada ao painel geral dos 3 grupos.....	34
Figura 10	Curva ROC (receiver operating characteristic) mostrando em números a discriminação entre os grupos Controle e Testosterona.....	35
Figura 11	A razão Val/C5 reflete a atividade do gene SLC22A4 (<i>solute carrier family 22, organic cation/ergothioneine transporter, member 4</i>), no grupo testosterona quando comparado ao controle.....	36
Figura 12	O grupo testosterona apresentou marcadores de menor atividade da proteína reguladora de glicoquinase (GCKR, Glucokinase regulatory protein) enzima chave do metabolismo da glicose. Em humanos, está relacionada à susceptibilidade em desenvolver diabetes.....	37
Figura 13	Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Controle e Estradiol observando a análise global de todos os metabólitos....	38
Figura 14	Curva ROC mostrando em números a discriminação entre os grupos Controle e Estradiol.....	39

Figura 15	Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os grupos Controle e Estradiol, listados em ordem decrescente de concentração.....	40
Figura 16	Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos ...	41
Figura 17	Curva ROC mostrando em números a discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona.....	42
Figura 18	Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona, listados em ordem decrescente e concentração.....	43
Figura 19	Médias de peso dos grupos experimentais entre o nascimento e 84 dias de idade.....	54

Resumo

Anzai, A. *Análise metabólica e histomorfométrica do fígado de ratas adultas em modelo experimental da síndrome dos ovários policísticos induzida por exposição neonatal a esteroides sexuais* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo, associado a resistência insulínica, hiperinsulinemia, obesidade, acúmulo de gordura visceral e dislipidemia. Essas alterações podem levar a aumento de risco de doenças como “diabetes mellitus”, doenças cardiovasculares, esteatose hepática ou até mesmo esteato-hepatite. Em ratas, o excesso de androgênios ou estrogênios no período neonatal induz a alterações metabólicas e reprodutivas similares às observadas na SOP em humanos. O objetivo deste estudo é analisar os efeitos da exposição neonatal à testosterona e ao estrogênio no fígado de ratas adultas. Para isso foram utilizadas 30 ratas, divididas em três grupos de 10 animais cada. Foi administrada por via subcutânea, entre 1 e 3 dias de vida, uma única dose dos seguintes compostos: 0,1 mL de óleo de oliva (veículo) – grupo Controle (n=10); propionato de testosterona (1,25 mg/0,1mL de veículo) – grupo Testosterona (n=10); benzoato de estradiol (0,5 mg/0,1mL de veículo) – grupo Estradiol (n=10), de acordo com o grupo a que pertenciam. Após cerca de 90 dias, os animais foram sacrificados, sendo retirados fragmentos

do fígado que foram preparados para análise da metabolômica e da histomorfologia. Histologicamente, o fígado dos animais do grupo testosterona apresentaram maior infiltração gordurosa e infiltrado inflamatório; e do grupo estradiol apresentou hepatócitos binucleados, além do aumento do volume nuclear. Houve, no grupo testosterona modificações no perfil metabolômico ligadas a maior resistência à insulina e maior risco para diabetes. O grupo exposto ao estrogênio apresentou alterações relacionadas ao metabolismo e síntese de lipídeos. Nossos resultados sugerem que os riscos metabólicos associados à SOP podem ter origem e mecanismos diferentes.

Descritores: síndrome do ovário policístico; modelos animais; metabolômica; histomorfometria; fígado gorduroso; hepatopatia gordurosa não alcoólica

Abstract

Anzai, A. *Metabolomic and histomorphometric analysis of the liver of rat models of polycystic ovary syndrome induced by neonatal exposure to sex steroids*. [Dissertation]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (Brazil); 2015.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine disorder associated with insulin resistance, hyperinsulinemia, central obesity, accumulation of visceral fat and dyslipidemia. Those changes can lead to increased risk of diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular disease, nonalcoholic fat liver disease or even nonalcoholic steatohepatitis. In rats, the excess of androgens or estrogens in the neonatal period leads to metabolic and reproductive alterations similar to those observed in SOP in humans. The objective of this study is to analyze the effects of exposure to neonatal testosterone and estrogen in the liver of adult rats. For this we used 30 female rats, sorted into three groups of 10 animals each. It was administered subcutaneously between 1 and 3 days of age a single dose of the following compounds: 0.1 mL olive oil (vehicle) - Control Group (n = 10); testosterone propionate (1.25 mg / 0.1 mL vehicle) - Testosterone (n = 10); estradiol benzoate (0.5 mg / 0.1 mL vehicle) - Estradiol group (n = 10). After 90 days, the animals were sacrificed, and the liver removed fragments were

prepared for analysis of metabolomics and histomorphometry. Histologically, the testosterone group displayed greater fat deposition and higher degree of inflammatory infiltration. The estradiol group had binucleate hepatocytes and increased nuclear volume. Testosterone group showed changes in the metabolomic profile linked to increased insulin resistance and increased risk for diabetes mellitus. The group exposed to estrogen showed changes related to metabolism and synthesis of lipids. Our results indicate that the metabolic risks associated with PCOS may have origin and different mechanisms.

Descriptors: polycystic ovary syndrome; animal models; metabolomics; fatty liver; non alcoholic fat liver disease

1 Introdução

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino caracterizado pela associação de excesso de androgênios, ou seja, hiperandrogenismo clínico (hirsutismo, acne e alopecia) e/ou laboratorial, com anovulação crônica (amenorréia, espaniomenorréia) e/ou alteração morfológica policística dos ovários (Azziz *et al.*, 2009, Goodarzi *et al.*, 2011). É a endocrinopatia mais frequente em mulheres em idade reprodutiva e atinge de 5 a 15% das mulheres em todo o mundo (Franks, 2009). Além disso, grande parte dessas pacientes apresenta distúrbios metabólicos que constituem hoje sérios desafios para os médicos e pesquisadores. Mulheres com SOP apresentam maiores taxas de obesidade, mais resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, maior risco para diabetes tipo 2, esteatose hepática e, possivelmente, doença cardiovascular (Randeva *et al.*, 2012; Marcondes *et al.*, 2007; Alvarez-Blasco *et al.*, 2006; Escobar-Morreale e San Millán, 2007; Wild *et al.*, 2010).

Do ponto de vista reprodutivo, a SOP apresenta alterações na esteroidogênese que ocasiona uma maior produção de androgênios pelo ovário e, eventualmente, pela suprarrenal (Goodarzi *et al.*, 2011; Franks, 2009). Primeiramente, por razões ainda desconhecidas, há um aumento da amplitude e da frequência dos pulsos de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo que favorece maior produção de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. O LH encontra-se em níveis aumentados em 40-50% das mulheres com SOP (Homburg, 2008). Este aumento dos níveis de LH parece estar relacionado com quadros de hiperinsulinemia, uma vez que há evidências que a insulina interage com os

seus receptores presentes nos neurônios hipotalâmicos, estimulando a expressão e a secreção do GnRH (Gamba e Pralong, 2006). O LH atua diretamente nas células da teca interna do ovário e estimula maior produção androgênica. As células da teca aumentam sua capacidade de produção de androgênios sob o estímulo da insulina e do hormônio luteinizante (LH) (Maciel *et al.*, 2004). O aparato enzimático do ovário tem função alterada, com hiperfunção da enzima do citocromo P450 C17 alfa, (CYP17), que é etapa fundamental na produção de androgênios. O LH também aumenta a transcrição dessa enzima e favorece ainda mais a produção de excesso de androgênios. Por outro lado, também a função da enzima aromatase (CYP19) está alterada, o que ocasiona em maior acúmulo dos androgênios, precursores dos estrogênios (Jayasena e Franks, 2014). Assim, o microambiente ovariano torna-se androgenizado, o que influencia negativamente o desenvolvimento dos folículos (Jayasena e Franks, 2014). A característica primária é de hiperandrogenismo resultante de uma secreção exagerada de androgênios principalmente por parte dos ovários (Insenser *et al.*, 2013).

Além do ambiente hostil ao desenvolvimento dos folículos ovarianos e de sua postura ovulatória, parece haver também defeito intrínseco da foliculogênese desde estágios muito iniciais (Maciel *et al.*, 2004). O ovário de uma mulher com SOP apresenta de seis a oito vezes mais folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais (Homburg, 2008). A foliculogênese pré-antral encontra-se alterada uma vez que há um acúmulo de folículos primários e secundários que denota algum defeito na ação de fatores de

crescimento, pois nessa fase pré-antral, os folículos não respondem ao estímulo de gonadotrofinas.

Assim, há evidências que são numerosos os mecanismos que explicam as duas características mais fundamentais da síndrome que são a anovulação crônica e o hiperandrogenismo.

1.1 Etiologia da SOP

A etiologia desta síndrome ainda é obscura e sua origem complexa e multifatorial (Franks, 2009; Azziz *et al.*, 2009, Goodarzi *et al.*, 2011). Ao que parece, um determinado perfil genético se associaria a insultos ambientais que desencadeariam a síndrome (Escobar-Morreale and San Millan, 2007). Atualmente, têm ganhado a atenção, as teorias sobre a possibilidade da influência do meio ambiente no desencadeamento da síndrome e da programação genética intra-útero ou em momentos iniciais da vida (Franks, 2009). O desenvolvimento de endocrinopatias como a SOP na vida adulta pode estar relacionado ao excesso de androgênios no período neonatal ou pré-natal. Dessa forma, vários autores apontam sinais de que a origem da SOP pode estar na fase neonatal ou mesmo pré-natal (Bridges *et al.*, 1993; Homburg, 2009, Padmanabhan *et al.*, 2006, Dumesic *et al.*, 2005). De acordo com a hipótese de Barker, doenças da fase adulta podem ser desencadeadas por alterações ocorridas no período intraútero e neonatal. (Barker, 1990; Barker, 1993). Estresses gerados ao organismo em fases precoces da vida podem levar a alterações irreversíveis na vida adulta, já

que neste período, o organismo se encontra em diferenciação celular e amadurecimento dos órgãos e tecidos (Simmons, 2005).

1.2 Obesidade

Diversos estudos mostram associação direta entre SOP e Obesidade uma vez que mais de 50% das mulheres com SOP apresentam algum grau de obesidade (Marcondes *et al*, 2007). Além disso, a obesidade piora os aspectos hormonais, dermatológicos, metabólicos e reprodutivos da SOP (Randeva *et al.*, 2012). No entanto, apesar dessa associação, há um grande debate na literatura sobre uma relação de causalidade entre as duas condições: se é a obesidade que desenvolve predisposição das mulheres à SOP ou se a SOP que leva à obesidade nas mulheres (Lim *et al.*, 2013; Hoeger e Oberfield, 2012; Vrbikova e Hainer, 2009; Motta, 2012). A obesidade é característica frequente na SOP desde a descrição inicial feita por Stein-Leventhal em 1935. Entretanto não é um critério diagnóstico da SOP, já que se pode encontrar a SOP em pacientes com ou sem obesidade. Além disso, a resistência à insulina independe da presença da obesidade, uma vez que mesmo pacientes magras podem apresentar estados alterados do metabolismo de insulina (Chang, 1983). Existem evidências de que especialmente a obesidade abdominal piora as características clínicas e metabólicas da síndrome (Carmina, 2003).

A obesidade também está associada a maiores índices de intolerância à glicose e a maiores taxas de conversão de curvas glicêmicas (após estímulo com glicose oral) normais para intolerantes e de curvas intolerantes

para diabetes (Carmina, 2003). Em países onde as taxas de obesidade são maiores, há maior comprometimento do estado de homeostase glicêmica (Carmina, 2003). Pacientes obesas também apresentam maiores incidências da síndrome metabólica e aterosclerose (Randeva *et al.*, 2012). No que concerne à saúde reprodutiva, obesidade na SOP se associa a maior prevalência de anovulação crônica, irregularidade menstrual, episódios mais frequentes de amenorréia e menorragia, maiores níveis de androgênios circulantes e significativa redução na resposta à indução da ovulação quando comparadas a mulheres com SOP magras (Hoeger e Oberfield, 2012).

Há alguns estudos que demonstram que mulheres com SOP apresentam menor taxa de metabolismo basal do que mulheres sem síndrome, mesmo pareadas pelo índice de massa corpórea (IMC). Ou seja, mulheres com SOP gastariam menos calorias predispondo a obesidade (Robinson *et al.*, 1992; Georgopoulos *et al.*, 2009).

No entanto, ainda há muitas dúvidas referentes a questões como controle de saciedade, metabolismo energético, diferenciação de adipócitos, capacidade de perda ou de ganho de peso, resposta a restrição calórica, impacto do exercício físico na SOP e os mecanismos dos efeitos da obesidade no sistema reprodutor feminino (Hoeger e Oberfield, 2012).

É possível que genes para obesidade sejam encontrados com mais frequência em populações com SOP e então predispor as mulheres com SOP à obesidade.

Uma área relativamente nova de investigação em humanos é a influência da exposição pré-natal em doenças na fase adulta. É possível que a predisposição à obesidade comece no pré-natal. O ambiente intrauterino, particularmente com nutrição excessiva, pode predispor a doenças na fase adulta. Há evidência que a obesidade materna no pré-natal é fator de risco para síndrome metabólica da criança na infância (Dyer e Rosenfeld, 2011).

Na dependência do local do estudo e das características étnicas de cada grupo, estima-se que até 88% das mulheres com SOP são obesas ou com sobrepeso, com uma distribuição andróide da gordura visceral (Borrueal *et al.*, 2013; Escobar-Morreale e San Millán, 2007; Legro, 2000). Além disso, resistência insulínica é bastante comum em mulheres com SOP, sejam magras ou obesas (Escobar-Morreale e San Millán, 2007) com prevalência de 50 a 70% que apresentam resistência insulínica com hiperinsulinemia (Gambineri *et al.*, 2002). A SOP também é mais prevalente entre as mulheres obesas ou sobrepeso quando comparada em mulheres com IMC < 25 kg/m². Um estudo na Espanha demonstrou que 28% das mulheres com obesidade ou sobrepeso foram diagnosticadas com SOP (Alvarez-Blasco *et al.*, 2006).

Há associação do excesso de androgênios com o aumento da gordura visceral, resistência insulínica e distúrbios metabólicos nas mulheres com SOP. Para explicar essa associação, existe a proposta de um círculo vicioso que pode iniciar no período neonatal ou mesmo pré-natal nestas mulheres com SOP (Figura 1) (Escobar-Morreale e San Millan, 2007; Insenser *et al.*, 2013), em que o excesso de androgênios favorece o

aumento de gordura visceral abdominal; e o aumento de gordura visceral faz aumentar a secreção de vários mediadores que favorecem diretamente (setas pretas na figura 1) a produção de androgênios pelos ovários e adrenais ou indiretamente (setas brancas na figura 1) através da resistência insulínica com hiperinsulinemia (Nahum *et al.*, 1995; Tosi *et al.*, 2009).

Figura 1 – Mecanismo proposto para explicar as interações entre resistência à insulina e os efeitos metabólicos da síndrome dos ovários policísticos. (Escobar-Morreale e San Millan, 2007)

A SOP é tipicamente heterogênea. Desde seu conceito até seus fenótipos. Escobar-Morreale e San Millan (2007) caracterizam a SOP como um defeito primário na esteroidogênese que leva ao excesso de androgênios

de gravidade variável (Figura 2). Em algumas pacientes, o distúrbio é severo o suficiente para resultar na SOP sem a participação de nenhum outro fator. Em outras com uma leve alteração na esteroidogênese, a SOP é desencadeada pela obesidade, aumento da gordura visceral e resistência insulínica, e o fenótipo completo da SOP só se desenvolve quando um ou mais destes fatores estão presentes. Entre esses dois extremos, há uma grande variedade de fenótipos heterogêneos, de acordo com a gravidade do defeito da secreção de androgênios, da obesidade, do depósito da gordura visceral e da resistência insulínica.

Figura 2 - SOP: interação do distúrbio primário na secreção de androgênios com fatores ambientais (Escobar-Morreale e San Millan, 2007)

Do ponto de vista da evolução, a SOP parece ser o resultado da interação entre predisposição e variantes genéticas de proteção que pode ter oferecido vantagens de sobrevivência frente a situações adversas, de estresse ou fome, com fatores ambientais como estilo de vida, consumo e gasto de energia, o que determina o acúmulo ou a diminuição da gordura visceral e, portanto, da esteatose hepática (Insenser *et al.*, 2013; Simoni *et al.*, 2008).

Recentes dados de metabolômica sugerem fortemente que a obesidade é o principal determinante do metabolismo desordenado também em mulheres com SOP, pois as pacientes não obesas podem conservar a sensibilidade à insulina em determinados órgãos e tecidos (Escobar-Morreale *et al.*, 2012; Insenser *et al.*, 2013).

1.3 Alterações hepáticas

1.3.1 DHGNA e SOP

Recentemente, a literatura tem percebido o aumento da prevalência de esteatose hepática não alcoólica ou Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em mulheres com SOP, já que ambas apresentam fatores metabólicos em comum considerados responsáveis por esse aumento da associação entre elas. Entre esses fatores, destacam-se a resistência insulínica ou Diabetes instalada, a obesidade com o aumento do

acúmulo de gordura visceral, dislipidemia e o hiperandrogenismo (Kelley *et al.*, 2014; Vassilatou, 2014). Resistência Insulínica, uma característica marcante da Síndrome Metabólica, está presente em 50-80% das mulheres com SOP e pacientes com DHGNA (Baranova *et al.*, 2011; Legro RS *et al.*, 2004).

Baranova *et al.*, 2011, revisou a associação de SOP com síndrome metabólica e DHGNA numa revisão sistemática de 1985-2010. Evidenciou-se que mulheres com SOP possuem risco de desenvolver DHGNA, e a DHGNA pode ser um fator de risco para SOP. A prevalência de SOP e DHGNA aumenta proporcionalmente ao grau de resistência insulínica e o aumento na quantidade de tecido adiposo, sobretudo visceral.

Além disso, como a SOP ocorre em mulheres jovens em idade reprodutiva e a obesidade, juntamente com a resistência insulínica, tem aumentado sua prevalência, a DHGNA tem acometido cada vez mais precocemente as mulheres, e por isso essas mulheres jovens apresentam risco significativo para lesão hepática progressiva ao longo de suas vidas (Vassilatou, 2014)

Muitos autores consideram a DHGNA como a manifestação hepática da Síndrome Metabólica (Takahashi e Fukusato, 2014, Kelley *et al.*, 2014, Collantes *et al.*, 2006) enquanto a SOP é a manifestação ovariana e reprodutiva (Baranova *et al.*, 2011).

1.3.2 DHGNA/EHNA

Cada vez mais é evidente a importância da DHGNA e da (esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) na saúde mundial e no meio científico, já que nos últimos 20 anos, a prevalência dessas patologias dobrou e são agora a causa número 1, ou seja, a principal causa de doenças do fígado no mundo ocidental, enquanto as outras doenças hepáticas crônicas se mantiveram estáveis ou mesmo diminuíram sua incidência. Isso se deve principalmente às mudanças drásticas no estilo de vida e alimentação ocorridas nos dias atuais, e consequentemente, ao aumento da obesidade.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) instituiu em 2010, o dia 28 de junho como o “Dia mundial contra Hepatite” e declarou que “este apoio por parte dos estados membros convoca a OMS para desenvolver uma abordagem integral da prevenção e controle das patologias do fígado”. Uma declaração formal da OMS reconhecendo que a doença hepática é um importante problema de saúde pública no mundo, principalmente a DHGNA e EHNA, devido ao aumento importante das suas prevalências.

Estima-se que a DHGNA/EHNA vai aumentar em 26% os custos médicos mundiais diretos e indiretos em 5 anos, e está presente em cerca de 27-34% da população geral dos Estados Unidos, ao redor de 20-30% da população geral da Europa e entre 40-90% da população obesa mundial. A EHNA está presente em cerca de 2-3% da população em geral e entre 10-20% da população com DHGNA. (Tabela 1) (LaBrecque *et al.*, 2014; Angulo, 2011, 2002; Matteoni *et al.*, 1999; Clark, 2006).

Tabela 1. Prevalências da DHGNA e EHNA. Há variação substancial devido às diferenças nas populações estudadas e métodos diagnósticos utilizados.

(LaBrecque *et al.*, 2014)

Região	População estudada	Prevalência de DHGNA nestas populações (%)
EUA	População pediátrica	13–14
	População geral	27–34
	Obesidade mórbida	75–92
	Americanos - Europeus	33
	Hispano - Americanos	45
	Afro-Americanos	24
Europa	População pediátrica	2,6–10
	População geral	20–30
Países ocidentais	População geral	20–40
	Obesidade ou diabetes	75
	Obesidade mórbida	90–95
Em nível mundial	População obesa	40–90
Médio Oriente	População geral	20–30
Extremo Oriente	População geral	15
Paquistão	População geral	18
População estudada com DHGNA		Prevalência de EHNA nestas populações (%)
Doadores de fígado saudáveis selecionados		3–16%
Sem inflamação nem fibrose		5%
População geral		10–20%
Alto risco, obesidade severa		37%
Pacientes em centros de cuidados terciários		40–55%

DHGNA é definida como um espectro de condições clínico-patológicas presentes em pacientes sem história de consumo significativo de álcool (menor que 20g por dia em mulheres e menor que 30g por dia em

homens), que varia desde simples esteatose hepática (alguns autores preferem chamar de Fígado Gorduroso Não Alcoólico – FGNA), que consiste no acúmulo de gordura no fígado em forma de triglicérides, histologicamente acima de 5% dos hepatócitos, geralmente em forma de esteatose macrovesicular, podendo evoluir à Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), uma forma grave caracterizada por inflamação, dano ao hepatócito, apoptose, que pode progredir para cirrose, insuficiência hepática e Hepatocarcinoma, aumentando consideravelmente a morbidade e mortalidade por causa hepática, além de excluir outras doenças hepáticas. (LaBrecque *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015)

Como manifestação hepática da Síndrome Metabólica, a DHGNA/EHNA está associada a obesidade, resistência insulínica e Diabetes, Dislipidemia e Hipertensão, doenças relacionadas ao estilo de vida. E possui outras causas e fatores de risco, além do consumo calórico excessivo e baixo gasto de energia, como doenças endócrinas, desnutrição grave e efeitos colaterais de medicamentos (Tabela 2) (Watanabe *et al.*, 2015; LaBrecque *et al.*, 2014).

Tabela 2. Fatores de risco da DHGNA/EHNA e condições associadas.(LaBrecque *et al.*, 2014)

Fatores de risco	Progressão da doença	Condições associadas
<ul style="list-style-type: none"> Resistência à insulina/síndrome metabólica Cirurgia de by-pass jejunoileal Idade—maior risco aos 40–65 anos, mas também em crianças < 10 anos Etnia—maior risco em hispânicos e asiáticos, menor risco em afro-americanos Antecedentes familiares positivos—predisposição genética Medicamentos e toxinas—por exemplo, amiodarona, coralgil, tamoxifeno, maleato de perhexilina, corticoides, estrogênios sintéticos, metotrexato, tetraciclina IV, drogas anti-retrovirais de alta atividade (HAART) 	<ul style="list-style-type: none"> Obesidade, Aumento do IMC e da circunferência da cintura Diabetes não controlado, hiperglicemia, hipertrigliceridemia Vida sedentária, falta de exercício Resistência à insulina Síndrome metabólica Idade Fatores genéticos 	<ul style="list-style-type: none"> Hiperlipidemia Resistência à insulina/síndrome metabólica Diabetes tipo 2 Hepatite C Perda rápida de peso Nutrição parenteral total Doença de Wilson, doença de Weber–Christian, betalipoproteinemia, diverticulose, síndrome de ovário policístico, apneia obstrutiva do sono

Como a DHGNA é considerada um espectro de condições clínico-patológicas, a biópsia de fígado permanece considerada o padrão ouro para o diagnóstico definitivo, apesar da dificuldade, custo e potenciais riscos (Hashimoto *et al.*, 2015; Takahashi e Fukusato, 2014, Schattenberg e Galle, 2010).

Os componentes histológicos chaves da EHNA incluem esteatose, balonização hepatocelular e inflamação lobular; a fibrose não faz parte da definição histológica de EHNA. No entanto, o grau de fibrose observado na biópsia hepática nos fornece dados de estadiamento para prever o prognóstico, a inflamação e necrose revelados na biópsia hepática nos indica o grau da doença.

Apesar das causas da EHNA permanecerem desconhecidas, a hipótese mais aceita para a patogênese da EHNA é a “hipótese dos múltiplos impactos” (Figura 3), onde a síndrome metabólica exerce um papel central devido à resistência insulínica e ao processo inflamatório mediado por diferentes proteínas e citocinas, componentes imunológicos e vias de sinalização. A identidade dos múltiplos “impactos” é diferente em cada paciente e até hoje não está bem definida (LaBrecque *et al.*, 2014).

Figura 3. Hipótese de “múltiplos impactos” para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). oxLDL (lipoproteína de baixa densidade oxidada); TLR, (receptor Toll-like). (LaBrecque *et al.*, 2014)

1.4 Modelos Animais

Considerando aspectos éticos, econômicos e legislativos do estudo da DHGNA/EHNA, modelos animais são ferramentas essenciais para pesquisas desta doença, já que o fígado é um órgão nobre, cujo acesso a amostras de seu tecido (por exemplo, a biópsia) é extremamente dificultoso, custoso e com potenciais riscos.

Entretanto, o entendimento da fisiopatologia e tratamento da DHGNA em humanos tem sido limitado pela falta de modelos animais satisfatórios atualmente. O modelo animal ideal para o estudo da DHGNA/EHNA deveria refletir todos os aspectos da etiopatogenia da doença e os achados histológicos típicos de seus diferentes estágios. Ratas e camundongos têm sido amplamente utilizados em pesquisas relacionadas DHGNA/EHNA, já que os roedores são considerados os mais reproduzíveis, confiáveis, economicamente e tecnicamente disponíveis com menores desvantagens (Schattenberg e Galle, 2010).

Primatas já foram utilizados como modelos animais de SOP. (Abbott *et al.*, 1998, Dumesic *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2005). Entretanto, são extremamente caros (Manneras *et al.*, 2007, Walters *et al.*, 2012).

Roedores são mais frequentemente usados para o estudo da SOP, possuem vantagens como a estabilidade genética e o curto período do ciclo estral, além da relativa facilidade de manejo e manutenção (Walters *et al.*, 2012).

Barraclough (1961) foi pioneiro em descrever que administrar propionato de testosterona até o quinto dia de vida em ratas induzem a anovulação na idade adulta. Mais tarde, Singh (2005) também descreve que a testosterona aplicada durante os primeiros dias de vida, induz a anovulação em estro permanente. Alexanderson *et al.* (2007) demonstrou que propionato de testosterona no período neonatal desenvolvia na vida

adulta desses animais, distúrbios metabólicos como a resistência à insulina, e conseqüentemente, a hiperinsulinemia.

O excesso de estrogênio pode exercer efeitos similares aos de androgênios em modelos animais, sugerindo que alguns efeitos da testosterona sejam mediados pela sua conversão em estradiol (Abbott *et al.*, 2006; Padmanabhan e Veiga-Lopez, 2011).

Administrar estradiol na fase precoce da vida de ratas também induz o aparecimento de ovários policísticos na vida adulta (Brawer *et al.*, 1986) além de apresentar níveis elevados de testosterona e dislipidemia, similar à SOP em humanos (Alexanderson *et al.*, 2007).

Assim, tanto os androgênios como os estrogênios podem estar relacionados com o desenvolvimento da SOP, pois o excesso desses esteroides em fases iniciais da vida desses animais induz a características reprodutivas e metabólicas à semelhança do que ocorre em humanos.

Em ratas, portanto, o excesso de androgênios na vida neonatal induz alterações na gordura visceral, com aumento no número e no tamanho dos adipócitos na vida adulta, o que pode ser semelhante em humanos (Manneras, 2007). No entanto, os efeitos da SOP no perfil metabólico no fígado de ratas adultas são desconhecidos. Acreditamos que esse modelo animal possa trazer importantes contribuições para o entendimento dos efeitos metabólicos da SOP, principalmente no fígado.

1.5 Omics: Tecnologia de abordagem ampla na SOP e DHGNA/EHNA

Entretanto, nossa compreensão dos mecanismos genéticos, moleculares e celulares da SOP e DHGNA/EHNA é atualmente bastante limitada. O fato de haver muita dificuldade e insucessos em pesquisas que analisam proteínas específicas e genes cujo papel nas vias metabólicas e de sinalização estão relacionados à SOP e DHGNA/EHNA, fez com que exigisse da comunidade científica. Mudança no enfoque da pesquisa para aplicação de abordagens mais amplas para o estudo dessas doenças metabólicas complexas (Insenser *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014).

O desenvolvimento e a implementação dessa tecnologia de abordagem ampla, denominada *omics*, pode identificar novas moléculas e metabólitos, cuja participação na SOP e DHGNA/EHNA ainda não foi descoberta. As chamadas *omics*: metabolômica, proteômica e lipidômica, por exemplo, estão sendo utilizadas para identificar essas moléculas que potencialmente estão envolvidas na patogênese da SOP e da DHGNA/EHNA. As biomoléculas identificadas até o momento participam de várias vias metabólicas, incluindo metabolismo de energia (em que se envolve o acúmulo de gordura visceral e DHGNA), estrutura do citoesqueleto, resposta imune, inflamação, coagulação, estresse oxidativo, entre outros. Essas moléculas fornecem informações chaves sobre as funções moleculares que estão alteradas na SOP e na DHGNA/EHNA, e levantam questões em relação ao seu papel na patogênese dessas doenças (Insenser *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014).

Analisando a metabolômica do fígado de ratas em modelo experimental da síndrome dos ovários policísticos (SOP) induzida por exposição neonatal aos esteroides sexuais, podemos identificar discriminações no painel de biomoléculas entre os grupos experimentais. Essa identificação pode não somente proporcionar mais descobertas sobre patogênese da SOP e da DHGNA/EHNA, como também pode fornecer informações para o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e novas abordagens terapêuticas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da exposição neonatal aos esteroides sexuais (testosterona e estradiol) no fígado de ratas adultas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a histomorfometria das amostras de fígado das ratas adultas e compará-las entre os diferentes grupos;
- Analisar o perfil metabólico do fígado de ratas adultas submetidas à exposição de esteroides sexuais no período neonatal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Trata-se de estudo experimental, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), sob o parecer 151/10 (Anexo 1), e seguiu todas as recomendações de boas práticas e manipulação de animais de experimentação de acordo lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008. É uma derivação do projeto intitulado “Desenvolvimento de modelo de ratas em estro permanente induzida por exposição neonatal a androgênios”, desenvolvido no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-58) (Marcondes, 2012).

Foram utilizadas 30 ratas Wistar com idade de até 3 dias de vida, divididas em 3 grupos experimentais; foram obtidas e mantidas no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram tratados e confinados com as mães no período de lactação em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), separadas de acordo com o tipo de substância administrada, com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida ao redor de 22 °C, iluminações artificiais com lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia de 40W), com fotoperíodo intercalado de 12 h/claro e 12 h/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.

Todas as ratas foram submetidas a coleta de esfregaço vaginal entre 75 a 90 dias de idade para a determinação da fase do ciclo estral. As lâminas contendo o esfregaço vaginal foram coradas pelo método de Shorr-Harris e analisadas por microscopia óptica convencional. Todas as ratas do grupo Testosterona e Estradiol estavam em estro permanente.

3.2 Tratamento dos animais

Os animais receberam, entre 1 e 3 dias de vida, uma única injeção por via subcutânea dos seguintes compostos: 0,1 mL de óleo de oliva (veículo) – grupo Controle (n=10); propionato de testosterona (1,25 mg/0,1mL de veículo) – grupo Testosterona (n=10); benzoato de estradiol (0,5 mg/0,1mL de veículo) – grupo Estradiol (n=10), de acordo com o grupo a que pertenciam. Ao redor de 90 dias de idade, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg) associada ao cloridrato de xilazina (5 mg/Kg). Após a retirada dos órgãos de interesse do estudo (inclusos os fragmentos de fígado), foram sacrificados. Após a eutanásia, o descarte foi realizado de acordo com as regras dos Laboratórios de Investigação Médica e da FMUSP.

3.3 Preparo para a análise histológica das amostras de fígado por hematoxilina e eosina (H.E.)

Após a anestesia dos animais, as amostras de fígado foram retiradas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. Posteriormente, foram submetidas às seguintes etapas: desidratação com álcool etílico; diafanização com xilol;

impregnação com parafina histológica em forma líquida em estufa mantida a temperatura de 60° C; inclusão em parafina a temperatura ambiente. Os blocos de parafina contendo o material biológico foram seccionados em micrótomo (Microm HM315 R) ajustado para realizar cortes de 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram depositados em lâminas e mantidos em estufa com a temperatura regulada a 46 °C, durante 24 horas, para a secagem do material. Em seguida, foi realizada a coloração pela hematoxilina e eosina (H. E.).

3.3.1 Método de análise histomorfométrica

O cálculo do número de células binucleadas por mm² foi determinado em lâminas coradas com H.E. em imagens obtidas de 20 campos sob aumento de 400X. Para tanto, as imagens foram capturadas em microscópio de luz AxioVision Rel 4.6 (Carl Zeiss), acoplado a câmara de captura de imagens de alta resolução (AxioCam MRC - Carl Zeiss), acoplada a computador com ambiente Windows.

Para a análise da infiltração lipídica, utilizamos os mesmos campos descritos para a análise das células binucleadas e o critério de quantidade de células infiltradas. Quando o número de células por campos era menor que 5% atribuíamos o valor 0; valor 1 entre 6-20%, valor 2 entre 21-30%; valor 3 entre 31 – 40 e valor 4 acima de 41%.

3.4 Análise metabolômica das amostras de fígado

Os fragmentos de fígado de tamanho de 0,3 x 0,3 x 0,3 cm foram retirados de todos os animais e lisados em 2,0 mL de água em microtubos usando o TissueRuptor® até a homogenização. Esses microtubos foram identificados e armazenados em freezer a -80 °C para posterior análise.

O material foi enviado para análise metabolômica ao laboratório Biocrates (Insbrug, Áustria) O envio das amostras foi realizado em gelo seco através de companhia de transporte internacional, conforme Anexo 2.

Para a medida das concentrações dos metabólitos, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para análise. O Kit da Absolute/*IDQ*® p180 (Biocrates, Insbrug, Áustria) foi utilizado para a quantificação de aminoácidos, acetilcarnitinas, esfingomielinas, fosfatidilcolinas, hexoses e aminas biogênicas. (Anexo 3)

O ensaio totalmente automatizado do kit Absolute/*IDQ*® p180 foi baseado na derivação do fenilisotiocianato (PITC), um reagente usado na fase reversa de cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), seguido por análise de injeção de fluxo / espectrometria de massa (FIA-MS/MS – *Flow Injection Analysis/Mass Spectrometry*) em que se obtém um painel de acilcarnitinas, lípides e hexoses. Com a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS - *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) se obtém um painel de moléculas (aminoácidos, aminas biogênicas), utilizando um equipamento AB SCIEX 4000 QTrap® (AB SCIEX, Darmstadt, Alemanha) de

espectrometria de massa com ionização por elétron spray. Os padrões técnicos de medida da metabolômica estão descritos por Ramsay *et al.*, 2007.

Com esse ensaio, foram quantificados metabólitos endógenos de várias classes bioquímicas nos fragmentos de fígado das ratas adultas expostas a esteroides sexuais no período neonatal. Uma abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massa foi realizada para determinar a concentração desses metabólitos, incluindo aminoácidos, aminas biogênicas, acilcarnitinas, glicofosfolipídeos, esfingolipídios, e monossacarídeos. (Anexo 3)

A precisão das medidas (determinada com a precisão de calibradores) estava na faixa normal do método (desvios $\leq 20\%$) para todos os metabólitos analisados. Alguns valores de concentração de metabólitos excederam o intervalo de calibração e não puderam ser quantificados absolutamente.

Para a análise da amostra, métodos analíticos validados foram aplicados. Amostras de controle de qualidade estavam dentro dos limites de tolerância pré-definidas do método.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Metaboanalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp>). Inicialmente, os dados foram normalizados usando-se $\log_{10}$ e a escala de Pareto. Posteriormente, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida

do teste *post hoc* de Bonferroni para comparar os três grupos. O nível de significância para aceitação da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Foi realizada também análise de componentes principais (PCA) incluindo todas as variáveis, além da análise uni e multivariada. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP.

4 Resultados

4.1 Análise histomorfométrica das amostras de fígado por hematoxilina e eosina (H.E.)

Foram analisadas 30 lâminas: 10 lâminas de fígado de ratas do grupo Testosterona, 10 do grupo Estradiol e 10 do grupo Controle.

4.1.1 Resultados histomorfológicos

Os fígados do grupo controle apresentaram histologia típica, ou seja, identificamos lóbulos hepáticos, espaços porta e cordões de hepatócitos orientados radialmente em direção à veia centrolobular. Hepatócitos com núcleo vesiculoso, rico em eucromatina e citoplasma íntegro (Figura 4).

Figura 4. Fotomicrografia de corte de fígado de rata pertencente ao grupo controle. Notar veia centro lobular e cordões de hepatócitos. H.E 400x.

Já nos fígados do grupo testosterona observou-se a mesma arquitetura do grupo controle; no entanto, em algumas áreas, notamos no citoplasma dos hepatócitos a presença de inúmeras gotículas claras típicas de infiltração adiposa. Além disso, alguns animais apresentaram infiltração leucocitária (Figura 5).

Figura 5. Fotomicrografia de corte de fígado de rata exposta à testosterona. Notar inúmeras vesículas claras no citoplasma dos hepatócitos. H.E 400x.

Nas lâminas do fígado do grupo estradiol, notamos as mesmas características morfológicas observadas no grupo controle; entretanto identificamos inúmeras células binucleadas e algumas com grande volume nuclear, quando comparadas aos grupos testosterona e controle, porém com menor infiltração gordurosa e menos infiltração leucocitária quando comparadas ao grupo testosterona (Figura 6).

Figura 6. Fotomicrografia de corte de fígado de rata exposta ao estradiol. Notar hepatócitos binucleados e em alguns locais, aumento do volume nuclear e algumas gotículas de gordura. H.E 400x.

4.1.2 Resultados histomorfométricos

Os dados da estimativa de hepatócitos contendo gotículas lipídicas no seu citoplasma, assim como de hepatócitos binucleados, estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativa dos hepatócitos com infiltração lipídica e dos hepatócitos binucleados.

	Controle	Testosterona	Estradiol
Infiltração lipídica	1,0 ± 0,5	3,5 ± 0,6*	1,5 ± 0,4
Células binucleadas/mm ²	41,2 ± 3,5	51,2 ± 5,7	68,4 ± 5,6*

(p< 0,05)

Para a análise da infiltração lipídica, utilizamos os mesmos campos descritos para a análise das células binucleadas e o critério de quantidade de células infiltradas. Quando o número de células por campos foi menor que 5% atribuímos o valor 0; valor 1: entre 6-20%, valor 2: entre 21-30%; valor 3: entre 31 – 40 e valor 4: acima de 41%.

4.2 Resultados da análise metabolômica do fígado das ratas adultas expostas a esteroides sexuais no período neonatal

Inicialmente foi realizada análise global de todos os metabólitos para se averiguar se havia elementos suficientes para discriminar os três grupos do ponto de vista metabolômico. A figura 7 mostra representação gráfica tridimensional da análise conjunta de todos os metabólitos. Cada ponto representa um animal com 180 metabólitos.

Figura 7 - Diagrama espacial tridimensional representando a discriminação entre os 3 grupos Controle x Estradiol x Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos.

Na etapa posterior, numa análise de correlação, identificaram-se os 25 metabólitos que melhor discriminavam os grupos controle, testosterona e estrogênio e sua quantificação. Assim, as barras representam coeficientes de correlação positiva (em vermelho) e negativa (em azul) na separação dos grupos (figura 8).

Metabolito	Corr	T Stat	pValue	FDR
C14:1	0.58465	3.7445	8.6645E-4	0.24607
ACSL1	0.54412	3.3698	0.002279	0.32362
Thr	0.49477	2.9584	0.0063617	0.4762
C16:2	0.49202	2.9367	0.0067071	0.4762
SM16:0/SM16:1	0.46406	2.7222	0.011219	0.60817
PC ae C44:5	0.45629	2.6645	0.012849	0.60817
Met	0.4235	2.4291	0.022067	0.7482
Ile	0.41111	2.3434	0.026727	0.7482
lysoPC a C26:0	-0.38114	-2.1422	0.041355	0.7482
Asn	0.37801	2.1216	0.043195	0.7482
Xle	0.37149	2.0791	0.047233	0.7482
PC ae C36:0	0.36863	2.0606	0.049096	0.7482
BCAA	0.36802	2.0566	0.049502	0.7482
C5-OH (C3-DC-M)	0.36589	2.0429	0.050939	0.7482

Figura 8 - Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os 3 grupos, listados em ordem decrescente de concentração.

Após a primeira análise, foram estudados separadamente os grupos controle versus testosterona. De modo semelhante à figura 7, o gráfico tridimensional mostra separação, ainda mais evidente, dos grupos controle e testosterona, quando analisados em conjunto (Figura 9).

Figura 9. Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Controle e Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos. Há uma discriminação mais evidente quando comparada ao painel geral dos 3 grupos.

No passo seguinte, a diferença e capacidade de discriminação dos grupos foram calculadas usando-se a curva ROC. A figura 10 mostra taxas de sensibilidade e especificidade da análise global.

Figura 10. Curva ROC (receiver operating characteristic) mostrando em números a discriminação entre os grupos Controle e Testosterona.

Posteriormente, foi avaliada a razão entre valina/valerilcarnitina (Val/C5) que reflete atividade do gene SLC22A4. Essa razão, foi validada em humanos e roedores (figura 11). SLC22A4 é um gene transportador de cátions orgânicos poliespecífico presente no fígado e seu papel é fundamental para o transporte de antioxidantes, eliminação de cátions orgânicos endógenos, drogas e toxinas.

Figura 11. A razão Val/C5 reflete a atividade do gene SLC22A4 (*solute carrier family 22, organic cation/ergothioneine transporter, member 4*), no grupo Testosterona quando comparado ao controle.

Na figura 12, foi analisada a atividade do gene da proteína reguladora de glicoquinase, descrita em humanos e também conservada em roedores.

Figura 12. O grupo testosterona apresentou marcadores de menor atividade da proteína reguladora de glicoquinase (GCKR, Glucokinase regulatory protein), enzima chave do metabolismo da glicose. Em humanos, está relacionada à susceptibilidade em desenvolver Diabetes.

Foi realizada também análise global de todos os metabólitos para se averiguar se havia elementos suficientes para discriminar os grupos controle e estradiol, do ponto de vista metabolômico. A figura 13 mostra representação gráfica tridimensional da análise conjunta de todos os metabólitos. Cada ponto representa um animal com 180 metabólitos.

Figura 13. Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Controle e Estradiol observando a análise global de todos os metabólitos.

Cálculos da curva ROC para discriminação entre os grupos controle e estradiol (figura 14).

Figura 14. Curva ROC mostrando em números a discriminação entre os grupos Controle e Estradiol.

Assim como na figura 8, foram listados os 25 metabólitos que melhor se correlacionam com o grupo estradiol, quando comparado com o controle (figura 15).

PC ae C44:4	0.64652	3.4942	0.0027789	0.72367
D6 Arac PC aa/D9	-0.52818	-2.5646	0.020095	0.72367
lysoPC a C18:2	-0.52128	-2.5185	0.022092	0.72367
Val/C5	0.49189	2.3294	0.032424	0.72367
Met	0.47154	2.2047	0.04154	0.72367
PC aa C42:2	0.46703	2.1777	0.043804	0.72367
SFA Arac PC ae	0.44907	2.0723	0.053762	0.72367
PC ae C36:2	-0.44504	-2.049	0.056219	0.72367

Figura 15. Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os grupos Controle e Estradiol, listados em ordem decrescente de concentração.

Por fim, foi feita análise global, entre a os grupos testosterona versus o estradiol, em sua representação gráfica (figura 16) e os cálculos através das curva ROC (figura 17).

Figura 16. Diagrama espacial tridimensional apresentando a discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona observando a análise global de todos os metabólitos.

Figura 17. Curva ROC mostrando em números a discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona.

De modo semelhante, a análise revelou a lista de metabólitos que se correlacionam com os grupos estradiol e testosterona (figura 18).

lysoPC a C26:0/ACSL1/C5/C8	-0.58042	-3.024	0.0072946	0.52619
lysoPC a C26:0/ACSL1/C5	-0.57025	-2.9452	0.0086564	0.52619
lysoPC a C26:0/ACSL1	-0.56787	-2.927	0.0090039	0.52619
ELOVL2	-0.56292	-2.8896	0.0097623	0.52619
ACSL1	0.54916	2.7879	0.012147	0.52619
C2+C3	0.54029	2.7241	0.01392	0.52619
lysoPC a C26:0/ACSL1/C3:1	-0.52546	-2.6202	0.017346	0.52619
ELOVL2*	-0.52428	-2.6121	0.017644	0.52619
C2	0.51926	2.5778	0.018962	0.52619
C3	0.51897	2.5758	0.019041	0.52619
lysoPC a C20:3	0.51417	2.5434	0.020381	0.52619
PC aa C24:0	-0.50135	-2.4583	0.024323	0.57565
lysoPC a C26:0	-0.48736	-2.368	0.029286	0.63979
PC aa C42:2	-0.47558	-2.2937	0.034058	0.69089
PC aa C42:0	-0.46755	-2.244	0.037645	0.71275
lysoPC a C28:0	-0.45526	-2.1694	0.043691	0.77551
lysoPC a C26:1	-0.44244	-2.0931	0.050772	0.84818

Figura 18. Metabólitos que apresentaram maior discriminação entre os grupos Estradiol e Testosterona, listados em ordem decrescente de concentração.

5 Discussão

Foi realizado estudo experimental para avaliar o impacto tardio da exposição neonatal à testosterona e ao estradiol no fígado de ratas adultas. O racional do trabalho é tentar entender por meio do estudo dos produtos do metabolismo, os efeitos na vida adulta, da exposição neonatal à testosterona e ao estradiol. Esse é considerado um modelo da síndrome dos ovários policísticos (SOP) devido semelhança do fenótipo encontrado nesses animais com pacientes com essa condição. Os focos do estudo foram as alterações histomorfométricas e a metabolômica do fígado desses animais. Esperamos encontrar pistas da fisiopatologia das alterações hepáticas e da esteatose hepática não alcoólica ou Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) que frequentemente ocorrem na SOP.

Foi optado por este modelo animal de SOP, pois considerando aspectos éticos, econômicos e legislativos do estudo da DHGNA, modelos animais são essenciais para pesquisas desta doença, já que o fígado é um órgão nobre, cujo acesso a amostras de seu tecido (por exemplo, a biópsia) é extremamente dificultoso, custoso e com potenciais riscos. (Schattenberg e Galle, 2010).

Entretanto, existe falta de modelos animais satisfatórios atualmente. O modelo animal ideal para o estudo da DHGNA deveria refletir todos os aspectos da etiopatogenia da doença e os achados histológicos típicos de seus diferentes estágios. Ratas e camundongos têm sido amplamente utilizados em pesquisas relacionadas a DHGNA, já que são considerados os mais reproduzíveis, confiáveis, economicamente e tecnicamente disponíveis com menores desvantagens. (Schattenberg e Galle, 2010). Ratas possuem

vantagens como a estabilidade genética e o curto período do ciclo estral, além da relativa facilidade de manejo e manutenção (Walters *et al.*, 2012).

Baseado em nossos achados, nas lâminas de fígado das ratas do grupo testosterona observou-se a mesma arquitetura do grupo controle; no entanto, em algumas áreas, notamos no citoplasma dos hepatócitos a presença de inúmeras gotículas claras típicas de infiltração adiposa, algumas deslocando o núcleo para a periferia. Além disso, alguns animais apresentaram infiltração leucocitária.

Em comparação com os achados em humanos com DHGNA, notamos semelhança com as lâminas do grupo testosterona, uma vez que a DHGNA é caracterizada pela presença de vacúolos lipídicos nos hepatócitos e que deslocam o núcleo e o citoplasma para a periferia, já que os lípidos são hidrofóbicos, ou seja, insolúveis em água e, portanto, não se misturam com o citoplasma rico em água; diferentemente do que encontramos com as lâminas das ratas do grupo estradiol, em que identificamos inúmeras células binucleadas, e algumas com grande volume nuclear, quando comparadas ao grupo testosterona e grupo controle, porém com menor infiltração gordurosa e menos infiltração leucocitária quando comparadas ao grupo testosterona. A semelhança do grupo estradiol seria do aumento do volume nuclear o que pode corresponder ao aumento da atividade de transcrição e aos núcleos glicogenados em humanos que é o acúmulo de glicogênio dentro dos núcleos, resultado de uma esteatose hepática (Takahashi e Fukusato, 2014).

Em humanos, características histopatológicas do fígado com EHNA incluem vacúolos lipídicos, inflamação lobular, o chamado balonamento hepatocelular, fibrose perisinusoidal, corpúsculo hialino de Mallory e glicogênio nuclear. (Takahashi e Fukusato, 2014; Takahashi *et al.*, 2011). Para o diagnóstico de DHGNA, esteatose hepatocelular deve estar presente em pelo menos 5% dos hepatócitos. Existem dois tipos de DHGNA: macrovesicular e microvesicular. Na esteatose macrovesicular, uma única grande gotícula lipídica ou gotículas pequenas lipídicas ocupando o citoplasma do hepatócito desloca o núcleo para a periferia, semelhantemente ao encontrado em nossos achados. Na esteatose microvesicular as minúsculas gotículas lipídicas não desviam o núcleo dos hepatócitos. A esteatose na DHGNA é geralmente a macrovesicular.

Inflamação intralobular também está presente na EHNA, geralmente é leve e se apresenta com infiltrado de células inflamatórias (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos). Polimorfonucleares às vezes circundam os hepatócitos, que tipicamente contém os corpúsculos de Mallory, lesão chamada de “satelitose”. Embora a satelitose possa ser vista em EHNA, ela é mais comum em esteatose alcoólica. Microgranulomas e lipogranulomas (gotículas lipídicas entremeadas com células inflamatórias e colágeno) são frequentemente observadas em EHNA.

Inflamação portal na DHGNA/EHNA, geralmente está ausente ou apresenta-se leve, e consiste principalmente de linfócitos. Se houver inflamação importante, devemos excluir outras doenças hepáticas.

O balonamento hepatocelular é o inchaço dos hepatócitos com citoplasma rarefeito e significa lesão do hepatócito. Gotículas lipídicas e corpúsculos de Mallory podem se apresentar em hepatócitos com balonamento. Acredita-se que seja resultado da alteração do filamento intermediário do citoesqueleto. Em hepatócitos com balonamento, as citoqueratinas 8 e 18 não estão mais presentes em todo citoplasma e ficam dispersos na periferia. Embora o reconhecimento de hepatócitos com balonamento seja difícil em lâminas com H.E., a perda das citoqueratinas 8 e 18, podem servir como marcador imunohistoquímico de hepatócitos com balonamento.

O padrão característico da fibrose em EHNA é perisinusoidal e pericelular. Ela geralmente é vista com uma reação necroinflamatória ativa. À medida que a EHNA evolui, fibrose portal e periportal podem ocorrer, além da cirrose hepática.

Núcleos glicogenados são núcleos vacuolizados presentes geralmente em hepatócitos peri-portais, bem comuns na DHGNA. A presença de núcleos glicogenados é útil para diferenciar a EHNA, da Esteato-Hepatite Alcoólica (EHA), já que ela raramente aparece na EHA.

Hepatócitos apoptóticos (ou corpúsculos acidófilos) frequentemente estão presentes na EHNA e são corpúsculos eosinofílicos arredondados, com ou sem fragmentos nucleares hipercromáticos. São mais comumente observadas nos sinusóides.

Corpúsculos de Mallory são agregados eosinofílicos irregulares encontrados no citoplasma dos hepatócitos, e geralmente presentes em hepatócitos com balonamento, e consistem principalmente de citoqueratina 8 e 18. Quando estão presentes em hepatócitos com balonamento, podem ser identificados por imunohistoquímica. No entanto, ainda não está claro se os Corpúsculos de Mallory são meros expectadores, exercem fatores protetores ou promovem lesão. A presença do Corpúsculo de Mallory não é essencial, mas é útil no diagnóstico de EHNA. E não são específicas de EHNA, também estão presentes em outras hepatopatias. Na hepatite alcoólica, estão presentes também em hepatócitos sem balonamento.

O depósito de ferro na DHGNA/EHNA geralmente é leve e pode ocorrer dentro de hepatócitos e em células de revestimento sinusoidal do sistema reticuloendotelial.

Megamitocôndrias são estruturas eosinofílicas redondas ou em forma de cristal presentes no citoplasma de hepatócitos. Presentes mais frequentemente em hepatócitos com esteatose microvesicular. Embora as Megamitocôndrias são lesões pouco compreendidas em EHNA, podem ser o resultado de lesões causadas pela peroxidação lipídica ou representam uma mudança adaptativa.

O aumento de ácidos graxos livres e do TNF- α , acompanhado da diminuição da adiponectina, cenário muito comum em pacientes com SOP e obesas ou com sobrepeso (Escobar-Morreale e San Millán, 2007), estão associados com DHGNA e progressão para EHNA. A adiponectina reduz o

acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos por inibir a captação de ácidos graxos e diminuir a resistência insulínica. O TNF- α antagoniza as ações da adiponectina, promovendo esteatose do hepatócito, resistência insulínica e vias de sinalização pró-inflamatórias, levando a inflamação e fibrose perisinusoidal, evoluindo para EHNA. Dessa forma, situações em que há produção aumentada de TNF- α em relação à adiponectina promovem esteatose hepática, resistência insulínica, inflamação e fibrose. O TNF- α aumenta também a geração mitocondrial de radicais livres de oxigênio que promovem apoptose dos hepatócitos e o recrutamento de células inflamatórias. O simples acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos induz a uma sinalização para ativação de citocinas que por sua vez ativam o fator de transcrição nuclear NF κ B, que induz a síntese de TNF- α e interleucina-6 pelos hepatócitos (Diehl, 2009). De acordo com Krammer (2011), ASCL1 aumenta a captação de ácidos graxos pelo hepatócito, sua expressão está aumentada em fígado de pacientes com DHGNA/EHNA.

A análise dos dados referentes à metabolômica no fígado dos animais do estudo incluiu a identificação e quantificação de metabólitos específicos e razões com significância biológica. Adicionalmente, analisamos também razões que expressam atividades de genes específicos ou variações genéticas com significado clínico. Muitas dessas razões são conservadas e representam o mesmo fenômeno em humanos ou em roedores (Illig *et al.*, 2009).

Atualmente há uma série de trabalhos que interpretam os achados de metabolômica, à luz de resultados integrados entre a genômica e os

metabólitos. Assim, pode-se inferir, com base na identificação e dosagem do metabólito, a atividade de genes e suas variações e, acima de tudo, o risco que essa variação traz em termos de doença (Illig *et al.*, 2009).

Inicialmente, realizamos a análise global de todos os metabólitos e descobrimos que diferentes tratamentos na vida neonatal levam a diferentes perfis metabólicos durante a vida adulta desses animais (Figura 7), embora haja muita sobreposição desses perfis. No entanto, a figura 8 mostra vinte e cinco analitos que melhor discriminam os três grupos e consegue separá-los com razoável grau de acurácia. Embora a interpretação desses achados seja bastante complexa, é interessante ressaltar essa heterogeneidade de manifestações tardias da exposição aos esteroides. Esse fato, no nosso entendimento, poderia contribuir para uma melhor compreensão da heterogeneidade de endocrinopatias como a síndrome dos ovários policísticos.

Entre os 25 compostos que melhor discriminam os três grupos, chamam a atenção os aminoácidos essenciais leucina, isoleucina e valina que formam um grupo chamado aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, *branched chain amino acids*) (Figura 8). Uma série de estudos demonstra que níveis circulantes dos BCAA estão relacionados a uma piora do quadro metabólico global e maior resistência à insulina (Lynch e Adams, 2014). Nosso estudo mostra que há maior quantidade dos BCAA no fígado de ratas tratadas com testosterona do que nas ratas do grupo controle ou no grupo estradiol. Esse achado é um início experimental que a exposição à testosterona pode induzir resistência à insulina e afetar diretamente fígado.

É sabido também que a resistência à insulina participa de modo decisivo na fisiopatologia da DHGNA. (Takahashi e Fukusato, 2014, Hashimoto *et al.*, 2015).

O próximo passo foi comparar os grupos controle e testosterona. Também nesse caso, a análise global dos metabólitos foi capaz de discriminar mais claramente os dois grupos (Figuras 9 e 10).

Na figura 11, razão Val/C5 reflete a atividade do gene SLC22A4 (*solute carrier family 22, organic cation/ergothioneine transporter, member 4*), no grupo testosterona quando comparado ao controle. O SLC22A4 é um transportador de cátions envolvido na resposta hepática à exposição de xenobióticos (Pellis e Wright, 2014). Membros dessa família parecem estar relacionados com a resposta à metformina em pacientes com SOP e em pacientes diabéticas (Gambineri *et al.*, 2010). Essa associação não foi tão evidente quando se comparou o grupo controle ao grupo estrogênio. Isso parece indicar que a testosterona no período neonatal pode ter um papel essencial na caracterização do fenótipo que se manifestará tardiamente na vida, com relação ao metabolismo de glicose. Há também estudos que sugerem que outros membros dessa família também (OCT2) são regulados pela testosterona (Asaka *et al.*, 2006) e podem alterar a função do gene no fígado e no rim. Nosso estudo, desse modo, apresenta alguns indícios de que pacientes com SOP que respondem à metformina, podem pertencer a um subgrupo de pacientes que sofreram ação de agentes externos e que tiveram seu metabolismo alterado de maneira permanente.

O grupo testosterona também apresentou marcadores de menor atividade da proteína reguladora de glicoquinase (GCKR, Glucokinase regulatory protein) (Figura 12). A razão PC ae C34:2 / PC aa C32:2 (Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:2 / Phosphatidylcholine diacyl C32:2), está associada com a atividade dessa proteína, que regula a a glicoquinase hepática e é uma enzima chave no metabolismo de glicose e na resistência à insulina (Polin et al., 2011). Uma série de estudos genéticos mostrou que polimorfismos no gene que a codifica diminuem a sua atividade e associam-se com maior risco para *diabetes mellitus* (Dimas et al., 2014). Assim há vários indícios experimentais de que a exposição à testosterona leva, além dos fenótipos de anovulação crônica, a um maior acometimento metabólico, aumento de peso (Figura 13 – Marcondes, 2012), e a um quadro metabólico mais comprometido com vários marcadores de resistência à insulina.

Marcondes (2012) demonstrou em seu modelo experimental como o nosso, que após cerca de 84 dias, os animais do grupo Estradiol apresentaram a maior média de peso: $306,2 \pm 18,1$ g. Os animais do grupo Testosterona apresentaram média de peso de $285,5 \pm 26$ g. O grupo Controle, média de $263,5 \pm 11,3$ g. Demonstrando diferença de peso estatisticamente significativa entre os grupos Estradiol x Controle e Testosterona x Controle ($p < 0,05$). Entre o peso dos animais do grupo Estradiol x Testosterona, não houve diferença significativa (Figura 19)

Figura 19. Médias de peso dos grupos experimentais entre o nascimento e 84 dias de idade (Marcondes, 2012)

Quando o grupo tratado com estrogênio é comparado ao controle, também nota-se que os efeitos tardios podem ocorrer no perfil metabólico do fígado desses animais. O gráfico (Figura 13 e 14) mostra que a análise global dos metabólitos é capaz de discernir os dois grupos. Dentre os 25 componentes que melhor discriminam os grupos, as acilcarnitinas de cadeia longa se destacam (Figura 15). Isso parece indicar que o a ação do estrogênio, diferentemente daquela da testosterona, parecer afetar o metabolismo de lípides. Há sinais em nossos resultados que a ação do estrogênio em período neonatal levou a uma desregulação dos genes que controlam a síntese lipídica, seu armazenamento e oxidação.

Na literatura, há trabalhos que mostram que compostos com ação estrogênica, como o Bisfenol A, são capazes de alterar o metabolismo de

lípidos em modelos de células de hepatomas em ratos (Grasselli *et al.*, 2013). Confirmando esse fenômeno, alterações no metabolismo lipídico (aumento das colinas, fosfatidilcolinas e da relação valina/colina 5) contribuem para a patogênese e progressão de sinais de maior colestase no fígado (Moustafa *et al.*, 2012). A interpretação desses achados é bastante complexa mas, no nosso entendimento, fica patente que o perfil metabólico dos animais submetidos a diferentes tratamentos, diferem de modo muito claro.

As figuras 16 e 17, confirmam os efeitos diferentes da exposição à testosterona e ao estradiol no fígado dos animais tratados. Os 25 metabólitos que melhor discriminam os dois grupos tratados (figura 18), mostram que diferentes insultos ambientais podem gerar, de modo permanente, diferentes fenômenos biológicos. No entanto, chama a atenção que o efeito mais proeminente no grupo tratado com a testosterona foi na resistência à insulina e no risco para diabetes. Por outro lado, no grupo medicado com estrogênio, as alterações mais proeminentes foram relacionadas ao metabolismo de lipídeos, o que de certa forma, poderá estar relacionado com o risco cardiovascular. Contudo, essas são ilações que merecem investigações mais profundas no futuro.

Nossos dados ainda serão frutos de extensivas análises que possam trazer elementos não só no entendimento dos efeitos da síndrome dos ovários policísticos no fígado de mulheres portadoras dessa condição, mas também no metabolismo de lípidos, na síndrome metabólica e no risco cardiovascular.

6 Conclusão

Os resultados do nosso estudo permitem concluir que há alterações histomorfométricas e metabolômicas no fígado de ratas adultas submetidas à testosterona ou ao estradiol no período neonatal.

Histologicamente, o grupo testosterona apresentou maior acúmulo de gordura no tecido hepático e maior infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo controle. O grupo estradiol revelou hepatócitos binucleados, além do aumento do volume nuclear.

A análise dos metabólitos presentes no fígado mostrou sinais relacionados a maior resistência à insulina no grupo testosterona e alterações no metabolismo lipídico no grupo estrogênio.

7 Anexos

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.

Ao

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **21.03.2012** tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **151/10**, intitulado: **“Desenvolvimento de modelos de ratas em estro permanente induzidas por exposição neonatal a androgênios”** contempla o sub-projeto intitulado: **“Análise do perfil lipidômico da gordura visceral e do fígado de modelo experimental de ratas com síndrome dos ovários policísticos (SOP) induzido por exposição neonatal a androgênios”** que será projeto do aluno **Alvaro Anzai**, tendo como orientador. **Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel**.

CEP-FMUSP, 21 de março de 2012.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador Interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Amostras de fragmentos de fígado de ratas adultas expostas a esteroides sexuais no período neonatal analisadas para histomorfometria e metabólica.

Amostra	Código	Material	tipo	Grupo
1 GM	FIG C1	tecido	hepático	controle
2 GM	FIG C2	tecido	hepático	controle
3 GM	FIG C3	tecido	hepático	controle
4 GM	FIG C5	tecido	hepático	controle
5 GM	FIG T1	tecido	hepático	Testosterona
6 GM	FIG T2	tecido	hepático	Testosterona
7 GM	FIG T3	tecido	hepático	Testosterona
8 GM	FIG T4	tecido	hepático	Testosterona
9 GM	FIG T5	tecido	hepático	Testosterona
10 GM	FIG T2-2	tecido	hepático	Testosterona
11 GM	FIG T3-2	tecido	hepático	Testosterona
12 GM	FIG T4-2	tecido	hepático	Testosterona
13 GM	FIG T5-2	tecido	hepático	Testosterona
14 GM	FIG E1	tecido	hepático	Estrogenio
15 GM	FIG E2	tecido	hepático	Estrogenio
16 GM	FIG E3	tecido	hepático	Estrogenio
17 GM	FIG E4	tecido	hepático	Estrogenio
18 GM	FIG E5	tecido	hepático	Estrogenio
19 GM	FIG C1-2	tecido	hepático	controle
20 GM	FIG C2-2	tecido	hepático	controle
21 GM	FIG C3-2	tecido	hepático	controle
22 GM	FIG C4-2	tecido	hepático	controle

Continuação Anexo 2

23 GM	FIG C5-2	tecido	hepático	controle
24 GM	FIG T1-2	tecido	hepático	Testosterona
25 GM	FIG E1-2	tecido	hepático	Estrogenio
26 GM	FIG E2-2	tecido	hepático	Estrogenio
27 GM	FIG E3-2	tecido	hepático	Estrogenio
28 GM	FIG E4-2	tecido	hepático	Estrogenio
29 GM	FIG E5-2	tecido	hepático	Estrogenio

Anexo 3 - Lista de metabolitos pesquisados

Absolute/DQ® p180 Kit* – 10 µL required			
Acylcarnitines (40)			
C0	Carnitine	C10:1	Decenoylcarnitine
C2	Acetylcarnitine	C10:2	Decadienylcarnitine
C3	Propionylcarnitine	C12	Dodecanoylcarnitine
C3:1	Propenoylcarnitine	C12:1	Dodecenoylcarnitine
C3-OH	Hydroxypropionylcarnitine	C12-DC	Dodecanedioylcarnitine
C4	Butyrylcarnitine	C14	Tetradecanoylcarnitine
C4:1	Butenylcarnitine	C14:1	Tetradecenoylcarnitine
C4-OH (C3-DC)	Hydroxybutyrylcarnitine	C14:1-OH	Hydroxytetradecenoylcarnitine
C5	Valerylcarnitine	C14:2	Tetradecadienylcarnitine
C5:1	Tiglylcarnitine	C14:2-OH	Hydroxytetradecadienylcarnitine
C5:1-DC	Glutaconylcarnitine	C16	Hexadecanoylcarnitine
C5-DC (C6-OH)	Glutaryl carnitine* (Hydroxyhexanoylcarnitine)	C16:1	Hexadecenoylcarnitine
C5-M-DC	Methylglutaryl carnitine	C16:1-OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitine
C5-OH (C3-DC-M)	Hydroxyvaleryl carnitine (Methylmalonylcarnitine)	C16:2	Hexadecadienylcarnitine
C6 (C4:1-DC)	Hexanoylcarnitine (Fumaryl carnitine)	C16:2-OH	Hydroxyhexadecadienylcarnitine
C6:1	Hexenoylcarnitine	C16-OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitine
C7-DC	Pimelylcarnitine	C18	Octadecanoylcarnitine
C8	Octanoylcarnitine	C18:1	Octadecenoylcarnitine
C9	Nonacylcarnitine	C18:1-OH	Hydroxyoctadecenoylcarnitine
C10	Decanoylcarnitine	C18:2	Octadecadienylcarnitine
Amino Acids and Biogenic Amines (41-42)			
Ala	Alanine	Ac-Orn	Acetylorntine
Arg	Arginine	ADMA	Asymmetric dimethylarginine
Asn	Asparagine	SDMA	Symmetric dimethylarginine
Asp	Aspartate	alpha-AAA	alpha-Aminoadipic acid
Cit	Citrulline	Carnosine	Carnosine
Gln	Glutamine	Creatinine	Creatinine
Glu	Glutamate	Histamine	Histamine
Gly	Glycine	Kynurenine	Kynurenine
His	Histidine	Met-SO	Methioninesulfoxide
Ile	Isoleucine	Nitro-Tyr ¹⁾	Nitrotyrosine
Leu	Leucine	cis-OH-Pro	cis-4-Hydroxyproline
Lys	Lysine	trans-OH-Pro	trans-4-Hydroxyproline
Met	Methionine	PEA	Phenylethylamine
Orn	Ornithine	Putrescine	Putrescine
Phe	Phenylalanine	Sarcosine	Sarcosine

Continuação Anexo 3

Pro	Proline	Serotonin	Serotonin
Ser	Serine	Spermidine	Spermidine
Thr	Threonine	Spermine	Spermine
Trp	Tryptophan	Taurine	Taurine
Tyr	Tyrosine	Dopamine	Dopamine
Val	Valine	DOPA	DOPA

Monosaccharides (1)

Sum of Hexoses (including Glucose)

Sphingolipids (14-15)

SM (OH) C14:1	SM C18:0	SM (OH) C22:1	SM (OH) C24:1
SM C16:0	SM C18:1	SM (OH) C22:2	SM C26:0
SM C16:1	SM C20:2	SM C24:0	SM C26:1
SM (OH) C16:1	SM C22:3 ^{1) 2)}	SM C24:1	

Glycerophospholipids (88-90)

lysoPC a C14:0	PC aa C34:1	PC aa C42:0	PC ae C38:2
lysoPC a C16:0	PC aa C34:2	PC aa C42:1	PC ae C38:3
lysoPC a C16:1	PC aa C34:3	PC aa C42:2	PC ae C38:4
lysoPC a C17:0	PC aa C34:4	PC aa C42:4	PC ae C38:5
lysoPC a C18:0	PC aa C36:0	PC aa C42:5	PC ae C38:6
lysoPC a C18:1	PC aa C36:1	PC aa C42:6	PC ae C40:1
lysoPC a C18:2	PC aa C36:2	PC ae C30:0	PC ae C40:2
lysoPC a C20:3	PC aa C36:3	PC ae C30:1	PC ae C40:3
lysoPC a C20:4	PC aa C36:4	PC ae C30:2	PC aa C40:4
lysoPC a C24:0	PC aa C36:5	PC ae C32:1	PC ae C40:5
lysoPC a C26:0	PC aa C36:6	PC ae C32:2	PC ae C40:6
lysoPC a C26:1	PC aa C38:0	PC ae C34:0	PC ae C42:0
lysoPC a C28:0	PC aa C38:1 ^{1) 2)}	PC ae C34:1	PC ae C42:1
lysoPC a C28:1	PC aa C38:3	PC ae C34:2	PC ae C42:2
PC aa C24:0	PC aa C38:4	PC ae C34:3	PC ae C42:3
PC aa C26:0	PC aa C38:5	PC ae C36:0	PC ae C42:4
PC aa C28:1	PC aa C38:6	PC ae C36:1	PC ae C42:5
PC aa C30:0	PC aa C40:1	PC ae C36:2	PC ae C44:3
PC aa C30:2 ^{1) 2)}	PC aa C40:2	PC ae C36:3	PC ae C44:4
PC aa C32:0	PC aa C40:3	PC ae C36:4	PC ae C44:5
PC aa C32:1	PC aa C40:4	PC ae C36:5	PC ae C44:6
PC aa C32:2	PC aa C40:5	PC ae C38:0	
PC aa C32:3	PC aa C40:6	PC ae C38:1	

*) validated analytical method (FDA guidance for industry)

¹⁾ Not analyzed with Thermo TSQ Vantage

²⁾ Not analyzed with Waters mass spectrometers

8 Referências

Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into Development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) from Studies of Prenatally Androgenized Female Rhesus Monkeys. *TEM*. 1998;9(2):62-7.

Abbott DH, Padmanabhan V, Dumesic DA. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:17.

Alexanderson C, Eriksson E, Stener-Victorin E, Lystig T, Gabrielsson B, Lönn M, Holmäng A. Postnatal Testosterone Exposure Results in Insuline Resistance, Enlarged Mesenteric Adipocytes, and an Atherogenic Lipid Profile in Adult Female Rats: Comparisons with Estradiol and Dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 2007;148(11): 5369-76.

Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI, San Millán JL, Escobar-Morreale HF. Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Arch Intern Med*. 2006 Oct 23;166(19):2081-6.

Angulo P. Diagnosing steatohepatitis and predicting liverrelated mortality in patients with NAFLD: two distinct concepts. *Hepatology*. 2011;53:1792–1794.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2002; 346: 1221-1231 [PMID: 11961152]

Asaka J, Terada T, Okuda M, Katsura T, Inui K. Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm Res*. 2006 Apr;23(4):697-704. Epub 2006 Mar 25.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456-88.

Baranova A, Tran TP, Binerdinc A, Younossi ZM. Systematic review: association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Apr;33(7):801-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04579.x. Epub 2011 Jan 20. Review.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Heart J*. 1993;69(3):195-6.

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

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

Borrueal S, Fernández-Durán E, Alpañés M, Martí D, Alvarez-Blasco F, Luque-Ramírez M, Escobar-Morreale HF. Global adiposity and thickness of intraperitoneal and mesenteric adipose tissue depots are increased in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Mar;98(3):1254-63. doi: 10.1210/jc.2012-3698. Epub 2013 Feb 5.

Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*. 1986;35(3):647-55

Bridges NA, Cooke A, Healy MJ, Hindmarsh PC, Brook CG. Standards for ovarian volume in childhood and puberty. *Fertil Steril*. 1993;60(3):456-60.

Carmina E. Genetic and environmental aspect of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2003;26:1151–9.

Carmina E, Legro RS, Stamets K, Lowell J, Lobo RA. Difference in body weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Hum Reprod*. 2003 Nov;18(11):2289-93.

Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL, Kaplan SA. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983 Aug;57(2):356-9.

Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S5-10.

Collantes RS, Ong JP, Younossi ZM. The metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Panminerva Med* 2006; 48: 41–8.

Diehl AM. Esteato-hepatite alcoólica e não-alcoólica. In: Goldman L, Ausiello D. [tradução Adriana Pittella Sudré... et al] Cecil Medicina. 23. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 156. p.1307-1311.

Dimas AS, Lagou V, Barker A, Knowles JW, Mägi R, Hivert MF, Benazzo A, Rybin D, Jackson AU, Stringham HM, Song C, Fischer-Rosinsky A, Boesgaard TW, Grarup N, Abbasi FA, Assimes TL, Hao K, Yang X, Lecoeur C, Barroso I, Bonnycastle LL, Böttcher Y, Bumpstead S, Chines PS, Erdos MR, Graessler J, Kovacs P, Morken MA, Narisu N, Payne F, Stancakova A, Swift AJ, Tönjes A, Bornstein SR, Cauchi S, Froguel P, Meyre D, Schwarz PE, Häring HU, Smith U, Boehnke M, Bergman RN, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Quertemous T, Lind L, Hansen T, Pedersen O, Walker M, Pfeiffer AF, Spranger J, Stumvoll M, Meigs JB, Wareham NJ, Kuusisto J, Laakso M, Langenberg C, Dupuis J, Watanabe RM, Florez JC, Ingelsson E, McCarthy MI, Prokopenko I; MAGIC Investigators. Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes*. 2014 Jun;63(6):2158-71. doi: 10.2337/db13-0949. Epub 2013 Dec 2.

Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Develop*. 2005;17:349-60.

Dyer JS, Rosenfeld CR. Metabolic imprinting by prenatal, perinatal, and postnatal overnutrition: a review. *Semin Reprod Med* 2011;29:266–76.

Escobar-Morreale HF, Samino S, Insenser M, et al. Metabolic heterogeneity in polycystic ovary syndrome is determined by plasma metabolomic approach using GC-MS. *Clin Chem*. 2012;58: 999–1009.

Escobar-Morreale HF and San Millán JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Sep;18(7):266-72. Epub 2007 Aug 10. Review.

Franks S. Polycystic ovary syndrome. *Medicine*. 2009;37(9):441-44.

Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul 25;254-255:133-9. Epub 2006 Jun 6. Review.

Gambineri A, Tomassoni F, Gasparini DI, Di Rocco A, Mantovani V, Pagotto U, Altieri P, Sanna S, Fulghesu AM, Pasquali R. Organic cation transporter 1 polymorphisms predict the metabolic response to metformin in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Oct;95(10):E204-8. doi: 10.1210/jc.2010-0145. Epub 2010 Jul 21.

Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Jul;26(7):883-96. Review.

Georgopoulos NA, Saltamavros AD, Vervita V, Karkoulas K, Adonakis G, Decavalas G, et al. Basal metabolic rate is decreased in women with polycystic ovary syndrome and biochemical hyperandrogenemia and is associated with insulin resistance. *Fertil Steril* 2009;92:250–5.

Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Apr;7(4):219-31. doi: 10.1038/nrendo.2010.217. Epub 2011 Jan 25. Review.

Grasselli E, Cortese K, Voci A, Vergani L, Fabbri R, Barmo C, Gallo G, Canesi L. Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells. *Chemosphere*. 2013 May;91(8):1123-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.016. Epub 2013 Feb 9.

Hashimoto E, Tokushige K, Ludwig J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges. *Hepatol Res*. 2015 Jan;45(1):20-8. doi: 10.1111/hepr.12333. Epub 2014 May 20.

Hoeger, KM, Oberfield SE. Do women with PCOS have a unique predisposition to obesity? *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):13-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.026.

Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22(2):261-74.

Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1548-55.

Illig T, Gieger C, Zhai G, Römisch-Margl W, Wang-Sattler R, Prehn C, Altmaier E, Kastenmüller G, Kato BS, Mewes HW, Meitinger T, de Angelis MH, Kronenberg F, Soranzo N, Wichmann HE, Spector TD, Adamski J, Suhre K. A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):137-41. doi: 10.1038/ng.507. Epub 2009 Dec 27.

Insenser M, Montes-Nieto R, Murri M, Escobar-Morreale HF. *Mol Cell Endocrinol*. Proteomic and metabolomic approaches to the study of polycystic ovary syndrome. 2013 May 6;370(1-2):65-77. doi: 10.1016/j.mce.2013.02.009. Epub 2013 Feb 17.

Jayasena CN, Franks S. The management of patients with polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 624–636 (2014) doi:10.1038/nrendo.2014.102

Kelley CE, Brown AJ, Diehl AM, Setji TL. Review of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 21;20(39):14172-84. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14172.

Krammer J, Digel M, Ehehalt F, Stremmel W, Füllekrug J, Ehehalt R. Overexpression of CD36 and Acyl-CoA Synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 Increases Fatty Acid Uptake in Human Hepatoma Cells. *Int. J. Med. Sci.* v. 8, p. 599-614. 2011.

LaBrecque DR, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh KL, Hamid SS, Isakov V, Lizarzabal M, Peñaranda MM, Ramos JF, Sarin S, Stimac D, Thomson AB, Umar M, Krabshuis J, LeMair A; World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Jul;48(6):467-73. doi: 10.1097/MCG.0000000000000116.

Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59: 141–54.

Legro RS. The genetics of obesity. Lessons for polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:193–202.

Lim JW, Dillon J, Miller M. Proteomic and genomic studies of non-alcoholic fatty liver disease-clues in the pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8325-40.

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 Nov-Dec; 18(6):618-37. Epub 2012 Jul 4. Review.

Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis *Obes Rev*. 2013 Feb;14(2):95-109. Epub 2012 Oct 31. Review.

Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Dec;10(12):723-36. doi: 10.1038/nrendo.2014.171. Epub 2014 Oct 7.

Maciel GAR, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF. Stockpiling of Transitional and Classic Primary Follicles in Ovaries of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5321-7.

Manneras L, Cajander S, Holmång A, Seleskovic Z, Lystig T, Lö Stener-Victorin E. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Male Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 2007;148(8):3781-91.

Marcondes JA, Hayashida SA, Barcellos CR, Rocha MP, Maciel GA, Baracat EC. Metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome: prevalence, characteristics and predictors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Aug;51(6):972-9.

Marcondes RR. Efeitos da exposição neonatal a esteróides sexuais no hipotálamo e ovário de ratas adultas: modelos animais da síndrome dos ovários policísticos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Martel C, Esposti DD, Bouchet A, Brenner C, Lemoine A. Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:726–735.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999; 116: 1413-1419 [PMID: 10348825]

Motta AB. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. *Curr Pharm Des*. 2012;18(17):2482-91. Review.

Moustafa T, Fickert P, Magnes C, Guelly C, Thueringer A, Frank S, Kratky D, Sattler W, Reicher H, Sinner F, Gumhold J, Silbert D, Fauler G, Höfler

G, Lass A, Zechner R, Trauner M. Alterations in lipid metabolism mediate inflammation, fibrosis, and proliferation in a mouse model of chronic cholestatic liver injury. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):140-151.e12. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.051. Epub 2011 Oct 14.

Nahum, R., Thong, K.J., Hillier, S.G., 1995. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum. Reprod* 10, 75–81.

Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;246:165-74.

Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. *Semin Reprod Med*. 2011;29(3):173-86.

Pelis RM, Wright SH. SLC22, SLC44, and SLC47 transporters—organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. *Curr Top Membr*. 2014;73:233-61. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00006-2.

Pollin TI, Jablonski KA, McAteer JB, Saxena R, Kathiresan S, Kahn SE, Goldberg RB, Altshuler D, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. Triglyceride response to an intensive lifestyle intervention is enhanced in carriers of the GCKR Pro446Leu polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):E1142-7. doi: 10.1210/jc.2010-2324. Epub 2011 Apr 27.

Ramsay S. L., Stoegg W. M., Weinberger K. M., Graber A., Guggenbichler W. "Apparatus and method for analyzing a metabolite profile," EP 1875401 A211-Jan-2007.

Randeva HS, Tan BK, Weickert MO, Lois K, Nestler JE, Sattar N, Lehnert H. Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2012 Oct;33(5):812-41. doi: 10.1210/er.2012-1003. Epub 2012 Jul 24.

Robinson S, Chan SP, Spacey S, Anyaoku V, Johnston DG, Franks S. Postprandial thermogenesis is reduced in polycystic ovary syndrome and is associated with increased insulin resistance. *Clin Endocrinol* 1992;36:537–43.

Schattenberg JM, Galle PR. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis of mice and man. *Dig Dis* 2010; **28**: 247-254.

Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(8):390-4.

Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC, 2008. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum. Reproduct. Update* 14, 459–484.

Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril*. 2005;84(Suppl 2):1228-34.

Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 14;20(42):15539-48. doi: 10.3748/wjg.v20.i42.15539.

Takahashi Y, Inui A, Fujisawa T, Takikawa H, Fukusato T. Histopathological characteristics of non-alcoholic fatty liver disease in children: Comparison with adult cases. *Hepatol. Res.* v. 41, p. 1066–1074. 2011.

Tosi F, Dorizzi R, Castello R, Maffei C, Spiazzi G, Zoppini G, Muggeo M, Moghetti P, 2009. Body fat and insulin resistance independently predict increased serum C-reactive protein in hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 161, 737–745.

Vassilatou E. Nonalcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8351-63. doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8351. Review.

Vrbikova J, Hainer V. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Obes Facts*. 2009;2(1):26-35. doi: 10.1159/000194971. Epub 2009 Feb 10. Review.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Reprod*. 2012

Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, Uto H, Ono M, Sumida Y, Seike M, Takei Y, Takehara T, Tokushige K, Nakajima A, Yoneda M, Saibara T, Shiota G, Sakaida I, Nakamuta M, Mizuta T, Tsubouchi H, Sugano K, Shimosegawa T. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2015 Apr;45(4):363-77.

Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AEPCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2038–2049.)

Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Abbott DH. Adrenal Hyperandrogenism Is Induced by Fetal Androgen Excess in a Rhesus Monkey Model of Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6630-7.