

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

REGINALDO BATISTELA PIETRO SANCHES

**ESTUDO DAS VARIAÇÕES PLASMÁTICA DE INTERLEUCINA-6 E FATOR DE
NECROSE TUMORAL- α EM RATAS WISTAR INDUZIDAS À SÍNDROME DO
OVÁRIO POLICÍSTICO COM VALERATO DE ESTRADIOL**

Araraquara
2018

REGINALDO BATISTELA PIETRO SANCHES

**ESTUDO DAS VARIAÇÕES PLASMÁTICA DE INTERLEUCINA-6 E FATOR DE
NECROSE TUMORAL- α EM RATAS WISTAR INDUZIDAS À SÍNDROME DO
OVÁRIO POLICÍSTICO COM VALERATO DE ESTRADIOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montezor

Coorientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S192e Sanches, Reginaldo Batistela Pietro
Estudo das variações plasmática de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa em ratas wistar induzidas à síndrome do ovário policístico com valerato de estradiol/Reginaldo Batistela Pietro Sanches Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018.
43f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor
Coorientador: Wilton Rogério Lustrí

1. Ovário policístico. 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Esteroides Ovarianos. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGb-MROM

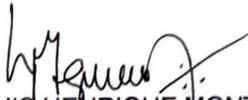


REGINALDO BATISTELA PIETRO SANCHES

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 18 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. ROBERTO CUAN RAVINAL
Universidade de Araraquara - UNIARA


Profª Drª FERNANDA KLEIN MARCONDES
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Dedicatória

Dedico em primeiro lugar, aos meus pais por me concederem a oportunidade de estudar, à minha família que me apoiou e que me incentivou incondicionalmente em todos os momentos, aos meus irmãos e amigos que colaboraram para que este estudo pudesse ser realizado.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus por estar comigo sempre, nos momentos angustiosos e de dúvidas, me encorajando a seguir o caminho dos conhecimentos, me concedendo discernimento e de me fazer crer que este trabalho poderia ser realizado.

Aos meus pais biológicos, Salustiano e Sabina, aos meus pais adotivos e de coração, Walter e Maria Augusta, que me ensinaram a caminhar e que me receberam de coração e braços abertos, que me ensinaram a ética e a moral, suportando meus momentos de tensão e vibrando com minhas conquistas e que, jamais mediram esforços para que eu galgasse mais um degrau na vida. Aos meus filhos, Pedro Henrique e Maria Victoria, à minha esposa Tayette, que compreenderam a minha ausência em muitos momentos da vida familiar e que estiveram sempre ao meu lado durante toda essa jornada, AMO vocês.

Aos meus amigos, Eduardo Donato, Guilherme Benevenuto, Aline Calseverino, Mariana Almeida, Silmara Lazarini, Renata Aquino e pesquisadores do Quimera, que estiveram comigo ao longo do estudo e que não pouparam esforços e incentivos para me auxiliarem; e não posso me esquecer do meu grande amigo Cassio Mascarenhas, sempre me incentivando aos estudos e pela acolhida em sua casa, muito grato.

Ao meu Orientador Luís Henrique Montezor e meu Coorientador Wilton Rogério Lustri, por serem pessoas de bom coração e excelentes Professores, por me ensinarem, além das orientações, a ética e a moral profissional, com calma e paciência e me ajudarem a concretizar este trabalho, transmitindo tantos conhecimentos. Muito obrigado meus PROFESSORES, serão sempre lembrados, por fazerem parte de uma fase muito importante da minha vida.

Agradeço ao Coordenador do programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da UNIARA, Professor André Capaldo Amaral, que me ajudou na continuidade do Mestrado e no momento mais crítico dos meus estudos; a nossa sempre Presente Secretária, Sandra Regina Pavanelli, por nos manter sempre atualizados das informações do Programa, por sua disposição em ajudar sem medir esforços.

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original*

Albert Einstein

ESTUDO DAS VARIAÇÕES PLASMÁTICA DE INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL- α EM RATAS WISTAR INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO COM VALERATO DE ESTRADIOL

RESUMO

A síndrome do ovário policístico (SOP) é uma endocrinopatia heterogênea com características metabólicas tais como, resistência à insulina, hiperinsulinemia, obesidade e características endócrinas como, anovulação e hiperandrogenismo e morfológica como a presença de cistos ovarianos. Os níveis plasmáticos de citocinas pro-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) encontram-se elevados na obesidade e também na SOP. O hiperandrogenismo, a oligomenorreia e a anovulação crônica, são consequências da hiperinsulinemia compensatória que exerce efeito estimulante direto nos processos inflamatórios observados na SOP. O objetivo deste estudo foi verificar as variações plasmática de IL-6 e TNF- α em ratas Wistar induzidas à SOP com valerato de estradiol (VE). Foram utilizadas 36 ratas Wistar adultas (200 a 300g), divididas em 6 grupos com 6 ratas por caixa, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}$ C) e luminosidade (ciclos 12h x 12h). Os ciclos estrais foram acompanhados regularmente. Após a indução da SOP, os animais foram separados em 3 grupos: 30, 45 e 60 dias. Para cada grupo SOP havia um grupo controle. Houve diferença significativa da massa corporal dos grupos SOP em relação aos grupos controle. O índice gonadossomático apresentou diferença significativa para o grupo SOP 30 dias em relação ao controle. Houve diferenças significativas dos níveis plasmáticos de citocinas, com aumento de IL-6 e diminuição do TNF- α dos grupos SOP em relação aos respectivos grupos controle. Observou-se aumentos significantes dos níveis plasmáticos de testosterona (T) e de estradiol (E2) dos grupos SOP em relação aos grupos controle e observou-se cistos ovarianos nos grupos SOP. Os nossos resultados mostram alterações endócrinas e inflamatórias além de morfologia ovariana característica da SOP, sugerindo que o modelo utilizado é adequado para estudos desta síndrome. Além disso, pode-se sugerir que as alterações endócrinas, principalmente o hiperandrogenismo, podem induzir processos inflamatórios com aumento nos níveis plasmáticos de IL-6, podendo agravar situações de síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo-2 e doenças cardiovasculares comumente presentes em mulheres e animais com a SOP.

Palavras-chave: *ovário policístico, inflamação, citocinas, esteroides ovarianos.*

**STUDY ON INTERLEUKIN-6 AND TUMOR NECROSIS FACTOR- α PLASMA
VARIATIONS IN WISTAR FEMALE RATS INDUCED TO POLYCYSTIC OVARY
SYNDROME BY ESTRADIOL VALERATE**

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a heterogeneous endocrinopathy with metabolic features such as insulin resistance, hyperinsulinemia, obesity and endocrine such as anovulation, hyperandrogenism and the presence of ovarian cysts. Pro-inflammatory cytokine plasma levels such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) are high in obesity and also in PCOS. Hyperandrogenism, oligomenorrhoea and chronic anovulation are consequences of compensatory hyperinsulinemia that exert a direct stimulating effect on inflammatory processes observed in PCOS. The objective of this study was to verify IL-6 and TNF- α plasma variations in Wistar female rats induce to PCOS by estradiol valerate (EV). Thirty six Wistar adult female rats (200 to 300g) were divided into 6 groups with 6 rats per box under controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}$ C) and luminosity (12-by-12-hour cycles) conditions. Estrous cycles were followed up regularly. Once PCOS was induced, the animals were separated in 3 groups: 30, 45 and 60 days. For each PCOS group, there was a control group. There was a significant body mass difference in the PCOS groups compared to the control groups. The gonadosomatic index presented a significant difference in the PCOS group 30 days over the control group. There was a significant difference in cytokine plasma levels with IL-6 increase and TNF- α reduction in the PCOS groups compared to the related control groups. Significant increases in testosterone (T) and estradiol (E2) plasma levels were observed in the PCOS groups compared to the control groups. Ovarian cysts were observed in the PCOS groups. Our results show endocrine and inflammatory alterations as well as typical PCOS ovarian morphology and suggest the model used is suitable to study this syndrome. Furthermore, it may be suggested that endocrine alterations, mainly hyperandrogenism, may induce inflammatory processes by increased IL-6 levels, which may aggravate metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases commonly present in women and animals with PCOS.

Key-words: *polycystic ovary, inflammation, cytokines, ovarian steroids.*

Lista de figuras

- Figura 1** – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (linha tracejada) e das ratas SOP (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP (barras negras) (B).....29
- Figura 2** – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (linha tracejada) e das ratas SOP (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP (barras Negras) (B).....30
- Figura 3** – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (linha tracejada) e das ratas SOP (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP (barras negras) (B).....31
- Figura 4** – Variação média (em porcentagem (%)) do índice gonadossomático (IGS) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP (barras negras), para os grupos 30 dias, 45 dias e 60 dias.....32
- Figura 5** – Variação média (em ng/mL) dos níveis plasmáticos de P4 (A), E2 (B) e T (C) das ratas controle e das ratas SOP para grupos 30 dias, 45 dias e 60 dias.....33
- Figura 6** – Variação média (em ng/mL) dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 (A) e TNF- α (B) para os grupos controle e os grupos SOP 30 dias, 45 dias e 60 dias.....34
- Figura 7** – Aspectos morfológicos dos ovários de ratas controle e induzidas à SOP com VE. Grupos 30 dias: controle (A) e SOP (B). Grupos 45 dias: controle (C) e SOP (D). Grupos 60 dias: controle (E) e SOP (F).....35

Lista de abreviaturas e siglas

AEPCOS	<i>The Androgen Excess PCOS Society</i>
AGL	Ácidos graxos livres
AVC	Acidente Vascular Cerebral
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DTH	Dihidrotestosterona
E2	Estradiol
EGF	Fator de crescimento epitelial
ET-1	Endotelina-1
ESHRE/ASRM	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine</i>
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HE	Hematoxilina - Eosina
IRS-1	Receptor insulina substrato- 1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGS	Índice Gonadossomático
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corpórea
K ₃ EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
LLP	Lipase lipoprotéica
MAPKs	Proteína ativadora mitogênio quinase
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIH	<i>National Institute of health</i>
P4	Progesterona
PT	Propionato de testosterona
PDEGF	Fator de crescimento epidérmico derivado de plaqueta

PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PCR	Proteína C reativa
PI3K	Receptor insulina quinase
RI	Resistência à insulina
RIE	Radioimunoensaio
RU486	Antiprogesterona
SHBG	Globulina transportadora de hormônios sexuais
SM	Síndrome Metabólica
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
T	Testosterona
TGFβ-1	Fator de crescimento transformador β-1
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
VE	Valerato de Estradiol
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Síndrome do Ovário Policístico	14
1.1.2 Tecido Adiposo, Obesidade e Inflamação	17
1.1.3 Fator de Necrose Tumoral-alfa	20
1.1.4 Interleucina-6	21
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 GERAL	23
3.2 Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Animais	23
4.1.2 Avaliação do ciclo estral e controle da massa corporal	23
4.1.3 Indução à SOP	24
4.5 Eutanásia	25
4.6 Obtenção do plasma para dosagens dos esteroides ovarianos, TNF- α e IL-6	25
4.7 Índice Gonadossomático – IGS	25
4.8 Obtenção dos ovários para a confecção de lâminas histológicas	26
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
6. RESULTADOS	27
6.1 EXPERIMENTO IN VIVO	27
6.1.1 Massa corporal e massa dos ovários	27
Grupo 30 dias	27
Grupo 45 dias	28
Grupo 60 dias	29
6.1.2 Índice Gonadossomático (IGS)	30
6.2 Níveis plasmáticos de P4, E2 e T	31
6.3 Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α)	32
6.4 Morfologia dos ovários	33
6.5 Ciclos estrais	34
7. DISCUSSÃO	34

8. CONCLUSÃO	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
10. ANEXO	44
Aprovação do Comitê de Ética	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do Ovário Policístico

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma endocrinopatia heterogênea, com características metabólicas tais como, resistência à insulina, hiperinsulinemia (DUMITRESCU et al., 2015; SPRITZER et al., 2015), obesidade e características endócrinas como, anovulação e hiperandrogenismo e morfologia ovariana anormal (WU et al., 2014; PANDEY et al., 2015; SPRITZER et al., 2015). Cerca de 5% a 10% das mulheres em idade reprodutiva, são afetadas pela SOP (WU et al., 2015), e entre 38% e 88% dessas mulheres estão com sobrepeso ou são obesas (SEOW et al., 2010; BARBER e FRANKS, 2012; GARG e MERHI, 2015).

De acordo com o primeiro consenso elaborado para o diagnóstico da SOP, em 1990, pelo *National Institute of Health* (NIH) – Consenso do NIH, estabeleceu-se uma definição clínica para a SOP. Documentou-se, portanto, que os critérios para o diagnóstico do distúrbio endócrino deveriam incluir, ao mesmo tempo, a presença de anovulação e evidências de hiperandrogenemia (bioquímica), hirsutismo e acne (clínica), ou ambos sem referência à morfologia do ovário (CONWAY et al., 2014). Posteriormente, outro consenso foi elaborado em 2003, para uma definição mais abrangente da síndrome, o *European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine* (ESHRE/ASRM), em Rotterdam (Consenso de Rotterdam). Esse consenso propôs que a presença de dois dos três critérios (oligo-ovulação, hiperandrogenismo e ovário policístico confirmado com a ultrassonografia), seria o suficiente para o diagnóstico da SOP (AZZIZ et al., 2009).

No entanto, as divergências permaneceram, como visto em um estudo realizado em 2005, onde verificou-se que a maioria dos ginecologistas considerou que ovário policístico, à ultrassonografia, era de suma importância para o diagnóstico da SOP, enquanto que o foco dos endocrinologistas estava mais na anovulação e no hirsutismo (CUSSONS et al., 2005). Foi em 2006 que a *The Androgen Excess PCOS Society* (AEPCOS) sugeriu a junção dos dois consensos, o do NIH e o de Rotterdam, para critério de diagnóstico, com a argumentação de que a SOP é principalmente um distúrbio hiperandrogênico, e a presença de hirsutismo e acne ou hiperandrogenemia constitui uma condição necessária para o diagnóstico da SOP (SHI e VINE, 2012; CONWAY et al., 2014).

Em 2011, o consenso de Rotterdam e *ESHRE/ASRM*, identificaram diferentes

fenótipos, desde os caracterizados por disfunções ovarianas (hiperandrogenismo e anovulação crônica) até ovário com morfologia policística. Sugeriu-se que os principais distúrbios metabólicos devem ser abordados na terapêutica clínica durante a definição do fenótipo da SOP, individualizando os pacientes (FAUSER et al., 2012).

As condições clínicas e bioquímicas da SOP podem ser afetadas pela obesidade por estar associada a vários eventos metabólicos, tais como, resistência à insulina acompanhada de hiperinsulinemia compensatória, aumentando de 5 a 8 vezes o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 em mulheres com SOP. Além disso, os riscos de desenvolver hipertensão arterial e doenças coronarianas, também são maiores em mulheres com SOP e obesas (SEOW et al., 2010; BARBER e FRANKS, 2012; SPRITZER et al., 2015). Também o estresse oxidativo, a dislipidemia, as inflamações crônicas, aumentam o risco de acidente vascular cerebral (AVC) em mulheres com a síndrome (POLOTSKY et al., 2014; FRANCISQUETI et al., 2017). Estima-se que a prevalência de cada fator de risco para as doenças cardiovasculares é de, aproximadamente, o dobro em mulheres com SOP comparado às que não têm a síndrome (PALOMBA et al., 2015).

Frequentemente a obesidade encontra-se associada à SOP, com uma estimativa de 40% a 50% em mulheres com a síndrome. O aumento de cerca de 51% em 1987-1990 para 74% em 2000-2002, de mulheres obesas com SOP, retrata um aumento relevante de prevalência da obesidade na SOP. A obesidade por si só é considerada um fator patogênico que leva a riscos cardiometabólicos, e que também está em sinergia com fatores intrínsecos da SOP, como por exemplo, a síndrome metabólica (SM) (MARQUES et al., 2015).

Estudos apontam a obesidade como fator central na determinação da heterogeneidade metabólica em pacientes com SOP. As mulheres, obesas e não obesas, com SOP têm os níveis de insulina plasmática aumentados em comparação às mulheres magras (Índice de Massa Corpórea (IMC) = 18) ou obesas (IMC > 30) sem a síndrome. Isso sugere que a resistência hepática (central) à insulina, independe da obesidade, já que o aumento dos níveis plasmáticos de insulina, juntamente com a sensibilidade hepática normal à insulina, conduziria a um estado de hipoglicemia. No entanto, os perfis metabólicos das pacientes não obesas com SOP, consistiu na supressão da lipólise, com o aumento da utilização da glicose pelos tecidos periféricos, indicando a sensibilidade à insulina pelos tecidos periféricos preservados, tais como o músculo esquelético e o tecido adiposo. Entretanto, as pacientes que possuem a síndrome e são obesas, apresentam resistência à insulina, tanto periférica como central. Neste

caso, é demonstrado a influência da obesidade na heterogeneidade metabólica da SOP (CONWAY et al., 2014).

A obesidade amplifica o hiperandrogenismo na SOP, tendo como resultado disso, o aumento da testosterona total, no aumento do nível de androgênio livre e na diminuição da globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG). A obesidade e o hiperandrogenismo em mulheres com SOP, pode resultar em infertilidade e anovulação (MESSINIS et al., 2015). A obesidade está intimamente relacionada ao desenvolvimento da síndrome metabólica, por meio dos componentes que compõe para a classificação da SM. Essas condições têm início com o aumento do tecido adiposo na região visceral, contendo um maior número de macrófagos residentes em comparação aos outros depósitos de gordura (FRANCISQUETI et al., 2017).

O acesso relativo a órgãos alvos (hipotálamo, hipófise, ovário e tecido ósseo) e manipulação genética, são algumas problemáticas encontradas entre os pesquisadores, no estudo em mulheres com SOP (ARAÚJO, 2017). A partir desta dificuldade, torna-se relevante os modelos de roedores para se compreender os distúrbios do ovário em mulheres com SOP (LOMBARDI, 2012). Esse tipo de modelo pode exibir distúrbios metabólicos e reprodutivos similares à SOP, com a vantagem do seu manuseio e pelo período de vida reprodutiva curto. Outros tipos de modelos apresentados para estudos, como ovelhas e primatas, apresentam características semelhantes às mulheres portadoras da SOP, mas o alto custo de manutenção desses animais torna-os inviáveis (WALTER et al., 2012).

Para estudar a fisiopatologia e outros fatores da SOP, vários modelos animais têm sido utilizados para o entendimento da síndrome, como por exemplo a exposição de ratas à luz contínua (LOMBARDI, 2012), influências ambientais e endócrinas como inibidores de aromatase, indução da SOP com valerato de estradiol, andrógenos e estrógenos (SHI; VINE, 2012; FRANKS, 2012). Alguns modelos utilizam injeções diárias ou implantes subcutâneos de hormônios tais como dehidroepiandrosterona (DHEA), propionato de testosterona (PT), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) e antiprogesterona (RU486). De acordo com o tipo de hormônio utilizado para a indução, as concentrações plasmáticas de esteroides ovarianos observadas nesses modelos sofrem variações. Na indução com DHEA, PT e RU486, por exemplo, as concentrações plasmáticas de T e LH estão aumentadas e as concentrações plasmáticas de P4 estão diminuídas no modelo de indução com PT. Já na indução com DHT, os níveis plasmáticos de T estão inalterados e de P4 estão diminuídos, indicando anovulação

(SHI e VINE, 2012). Segundo Beloosesky et al. (2004), vários modelos de indução à SOP foram desenvolvidos, tais como: administração prolongada de T em ratas adultas, exposição à luz constante, androgenização neonatal, administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) em ratas hipotireoideanas, exposição crônica à estrogênio e tratamento com insulina. Em um modelo de indução à SOP pela administração de testosterona (T) em ratas imaturas, os níveis plasmáticos de progesterona estão reduzidos nos animais induzidos à SOP (BELOOESKKY et al., 2004).

Segundo Shi e Vine (2012), o valerato de estradiol (VE) é um estrogênio de ação prolongada que pode causar desordem no eixo hipotalâmico-hipofisário, comprometendo a síntese do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), tendo como resultado armazenamento e liberação inadequados de hormônio luteinizante (LH), que é considerado fator patogênico relevante no desenvolvimento da SOP. Uma única dose de VE (2 mg/ 0,2 mL/rata) em ratas adultas jovens induz anovulação e ovários policísticos durante 8 semanas (BRAWER1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR et al., 2015).

Ratas com idade reprodutiva entre 3 e 12 meses apresentam ciclos estrais com duração média de 4 dias, ou seja, ciclo de curta duração. Tal característica torna esse modelo animal adequado para estudos que investigam alterações ocorridas no ciclo reprodutivo (MARCONDES, 2017). Ratas Wistar induzidas à SOP com valerato de estradiol é um modelo viável para o estudo dos efeitos patológicos da síndrome em mulheres portadoras da SOP (BROWER, 1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR, 2015).

Novas tecnologias vêm sendo aplicadas para ampliar a capacidade de entendimento com relação a fisiologia do sistema imune, correlacionando funções dos genes e alterações epigenéticas, com a proposta de encontrar um modelo ideal para o estudo do desenvolvimento da resposta inflamatória em modelos animais induzidos à SOP (OLIVEIRA, 2017).

1.1.2 Tecido Adiposo, Obesidade e Inflamação

As citocinas são glicoproteínas produzidas por uma variedade de células, sobretudo as mononucleares, e agem em nível local e sistêmico, controlando processos hormonais, imunes e inflamatórios. Elas funcionam como mensageiros intercelulares e atuam como um dos

principais mediadores da resposta inflamatória, sendo responsáveis por lesões vasculares e disfunções orgânicas (BRASIL et al., 1999).

Em pequenas quantidades, as citocinas têm efeitos benéficos, determinando o mecanismo de defesa do organismo. Em elevadas concentrações podem desencadear efeitos deletérios ao organismo, causando instabilidades metabólicas e hemodinâmicas (OLIVEIRA et al., 2011; CARDOZO et al., 2017).

O tecido adiposo é um órgão dinâmico e secreta hormônios, citocinas e adipocinas, que participam de processos que regulam o metabolismo da glicose, as respostas inflamatórias, a imunidade e a reprodução, sendo uma fonte rica em células estaminais. Na obesidade, os depósitos de gordura corporal estão hipertrofiados, estimulados pelos andrógenos que influenciam a expressão de enzimas e de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e carboidratos, o estresse oxidativo e a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (ALANIZ et al., 2007), aumentando a secreção das adipocinas, na mesma proporção do aumento do volume das células adiposas. As adipocinas estão comumente relacionadas a eventos metabólicos e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, resistência à insulina, dislipidemia e a síndrome metabólica (SPRITZER et al., 2015).

Alterações na morfologia e na função do tecido adiposo, como a diminuição da vascularização, pode induzir hipóxia tecidual, estimulando a inflamação localizada, aumentando a produção de citocinas, quimiocinas, adipocitocinas, leptina, resistina e visfatina, diminuindo a produção de adiponectina (PIRES et al., 2015).

As principais consequências da hipertrofia e da hiperplasia adiposas são as expressões de proteínas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a proteína C reativa (PCR), a resistina, o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e os fatores que estão envolvidos no sistema renina-angiotensina. Geralmente, o tecido adiposo visceral é o mais sensível à lipólise por via das catecolaminas, e mais resistente a ação da insulina, aumentando a concentração de ácidos graxos livres (AGL) no sangue (QUEIROZ et al., 2009; FRANCISQUETI et al., 2017). A obesidade, com maior concentração de tecido adiposo na região visceral, por si mesmo já acarreta uma série de riscos cardio-metabólicos. A associação da SOP com a obesidade parece aumentar a prevalência desses riscos (BARBER e FRANKS, 2012). Níveis elevados de glicose e

triglicérides no sangue, induz a ativação de células imunes e, com isso, a secreção de proteínas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α (NAZARETH, 2017).

Uma das características clínicas comuns na SOP é a resistência à insulina (RI), que está presente em 50% a 70% das mulheres com a síndrome (BARBER e FRANKS, 2012). Tem-se observado em mulheres com SOP que as células endoteliais arteriais, resistentes à insulina, estão associadas com a diminuição da síntese e da liberação de óxido nítrico (NO) e, como consequência disso, há aumento da síntese de agentes que aumentam a rigidez vascular, comprometendo a sua ação vasodilatadora. Com isso, a hiperinsulinemia tem efeitos diretos sobre a hipertrofia da parede vascular, somado a resistência à insulina, promovem o aumento da produção de endotelina-1 (ET-1) gerando a disfunção endotelial (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004; CONWAY et al., 2014). O hiperandrogenismo, a oligomenorreia e a anovulação crônica, são consequências da hiperinsulinemia compensatória que exerce efeito estimulante direto nos processos inflamatórios observados na SOP. Desta forma, os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α , IL-6 e a PCR, encontram-se elevados na obesidade e também na SOP, independente da obesidade (OLIVEIRA et al., 2007; GONZALES, 2011). Portanto, a secreção elevada de citocinas pode influenciar no desenvolvimento da SOP, por estimular a produção de hormônios esteroides, sendo o hiperandrogenismo, uma das características da SOP (BARBER e FRANKS, 2012).

A dislipidemia é a disfunção metabólica na SOP que está presente em 70% das mulheres com a síndrome, caracterizada por hipertrigliceridemia, níveis plasmáticos reduzidos de lipoproteína de alta densidade (HDL) e elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo quadro clínico típico para um estado de resistência à insulina (CONWAY et al., 2014).

Estudos correlacionam obesidade e SOP e demonstram efeitos patogênicos da obesidade na maioria das mulheres com a síndrome. O tratamento para a redução em até 5% da massa corporal melhora as vias de sinalização e a sensibilidade à insulina sobre as funções ovulatórias, o ciclo menstrual, as características hiperandrogênicas e as funções metabólicas. A orientação nutricional e o exercício físico são indicados para garantir a perda de peso e uma melhor qualidade de vida (AZEVEDO et al., 2008; BARBER e FRANKS, 2012; SPRITZER et al., 2015; PALOMBA et al., 2015).

1.1.3 Fator de Necrose Tumoral-alfa

O TNF- α é uma proteína solúvel que pertence à categoria de moléculas denominadas monocinas, secretada pelos macrófagos e pode ser ativado por vários estímulos, inclusive por produtos bacterianos. Sua expressão se dá nos adipócitos e existe correlação negativa na indução da lipólise mediada pela proteína ativadora mitogênio quinase (MAPKs). Há indicações que a TNF- α tem efeito autócrino e parácrino sobre os adipócitos regulando o tamanho desses conforme o aumento do consumo energético. Também promove a proliferação, diferenciação e morte celular (apoptose), inibição da lipogênese, inibição do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) e da acetil-CoA sintetase, demonstrando importante papel como regulador no acúmulo de gordura no tecido adiposo (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004).

Geralmente, esse tipo de citocina está mais elevada em pessoas obesas, aumentando a secreção de leptina, sendo responsável, parcialmente, pela hiperleptinemia, no aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, PCR, PAI-1, na supressão da GLUT-4 e de adiponectina no tecido adiposo. O TNF- α está envolvido na indução da aterogênese, participando da diferenciação de monócitos em macrófagos na parede endotelial, por meio da transcrição do receptor kappa- β que modula inflamações na parede vascular. Além disso, o TNF- α reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico das células endoteliais, prejudicando a vasodilatação endotélio-dependente, provoca apoptose das células endoteliais, contribuindo com disfunções neste tecido (GEHRKE e PEREIRA, 2007; OLIVEIRA, 2017).

Estudos realizados em ratos obesos, após a supressão do TNF- α , demonstram importante melhora na captação de glicose em resposta a ação da insulina, mostrando a relação entre a obesidade e a resistência à insulina na obesidade. Já em humanos obesos, existe forte correlação inversa entre o TNF- α e a mobilização da glicose. A supressão que o TNF- α exerce sobre a sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do receptor insulina substrato-1 (IRS-1) e a atividade do receptor insulina quinase (PI3K), resulta em diminuição da síntese e da translocação de GLUT-4 para a membrana celular, reduzindo a captação da glicose pelas células mediadoras da ação da insulina (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004).

1.1.4 Interleucina-6

A IL-6 é uma citocina com efeitos pró-inflamatórios e, assim como o TNF- α , inibe a expressão da lipase lipoprotéica (LLP), aumentando os níveis plasmáticos de ácido graxos livres e glicerol. Além disso, sua expressão aumentada pode estar relacionada à supressão da leptina e estimulação da produção de PCR, bem como na redução da expressão de GLUT-4 muscular e hepática (SIPPEL et al., 2014). A sua expressão está aumentada em indivíduos obesos, pela ação das catecolaminas, via adrenorreceptores β_2 e β_3 no tecido adiposo, com maior expressão nos depósitos de gordura abdominal (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004). A IL-6 também desempenha papel importante relacionado com a maturação dos ovários e nos processos de fertilização e implantação. Dessa forma, pode ser um mediador chave de inflamação crônica na SOP. Os níveis plasmáticos elevados de IL-6 podem ter ligações com a resistência à insulina e hiperandrogenismo na SOP. Somado a isso, há hipótese de que a SOP aumenta o risco de diabetes pela ativação da inflamação crônica (XU et al., 2014).

Sendo uma citocina pleiotrópica, a IL-6 desempenha funções relacionadas à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual. Aparece como mediador central da resposta inflamatória de fase aguda, tornando-se dessa forma, a principal citocina pró-coagulante, determinando a produção e a elevação das concentrações de PCR. Indivíduos com níveis plasmáticos elevados de PCR apresentam níveis elevados de IL-6, quando comparados com indivíduos com níveis plasmáticos reduzidos de PCR e de IL-6. Esta citocina pode prever morbidade em indivíduos saudáveis e mortalidade em pessoas que já apresentaram algum evento cardiovascular (VOLP et al., 2008; DE OLIVEIRA, 2017). Tanto a proteína de fase aguda como a IL-6, estão com seus níveis séricos aumentados em pacientes pós-operados. Na maioria dos casos, há um aumento rápido dos níveis séricos de PCR e IL-6 e, inversamente, uma redução em todas as outras proteínas de fase aguda após a cirurgia. Os resultados desse estudo mostraram que essas modificações diferem a partir da presença ou não de infecção pós-operatória. Mostrou também, que as proteínas de fase aguda e a IL-6 apresentam relação com complicações infecciosas e podem alertar os cirurgiões, para desenvolvimento de infecção silenciosa que não são clinicamente evidentes (NASCIMENTO et al, 2007).

Zang et al. (2013), apontam que a IL-6 também está implicada no processo de

tumorigênese. Diversos tipos de tumores são estimulados pela IL-6, tais como, melanoma, linfoma, leucemia, carcinoma ovariano e carcinoma de próstata. Esse estudo mostrou que a concentração sérica de IL-6 está elevada em pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC), podendo ser usada como um marcador tumoral.

Estudos realizados em camundongos induzidos ao estresse, mostraram ativação da cascata inflamatória e elevação de IL-6 circulante. Sendo assim, a IL-6 pode ser considerada um biomarcador inflamatório, desempenhando funções tanto nas respostas inflamatórias agudas como nas crônicas, estimuladas pelo estresse (EHTERAM et al., 2017).

Diante do exposto, as disfunções endócrinas-metabólicas na SOP estimulam o desenvolvimento de inflamações crônicas e degenerativas em mulheres com a síndrome (MURRI et al., 2013), agravando o estado de saúde dessas mulheres, tendo impacto negativo em suas vidas cotidianas. Desse modo, vimos a relevância do nosso estudo no entendimento de comportamentos fisiopatológicos na SOP.

2. JUSTIFICATIVA

Alterações endócrinas e metabólicas observadas em mulheres em idade reprodutiva e portadoras de SOP como hiperandrogenismo, obesidade e diabetes mellitus tipo 2, têm interferências diretas na qualidade de vida dessas mulheres. Sendo assim, os distúrbios endócrino-metabólicos, cardiovasculares e inflamatórios, desencadeados com a SOP, tornam-se relevantes diante do aumento da expectativa de vida da população mundial. Além disso a obesidade presente entre 38% e 88% em mulheres com SOP, mostra que efeitos relacionados com hipertrofia e hiperplasia das células adiposas, trazem complicações cardio-metabólicas, além de inflamações sistêmicas, elevando desse modo, os níveis de risco para a saúde dessas mulheres. Desta forma, a utilização de um modelo animal que mimetiza a SOP torna-se ferramenta interessante para estudos correlacionando alterações endócrinas e inflamatórias com uma endocrinopatia relevante que acomete milhares de mulheres ao redor do mundo.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo verificar as variações plasmáticas de IL-6 e TNF- α em ratas Wistar induzidas à SOP com valerato de estradiol.

3.2 Específicos

A - Induzir a Síndrome do Ovário Policístico em ratas Wistar adultas por meio da administração de Valerato de Estradiol (VE);

B – Realizar dosagens plasmáticas de progesterona (P4), testosterona (T) e estradiol (E2);

C - Analisar a influência de SOP nas variações plasmáticas de IL-6 e TNF- α

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 36 ratas Wistar adultas (200 a 300g), obtidas do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP. Os animais foram alojados em caixas padrão, divididos em 6 grupos de 6 animais por caixa, identificados individualmente nas caudas e mantidos no Biotério da Universidade de Araraquara UNIARA, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ$ C) e luminosidade (ciclos 12h x 12 h). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

4.1.2 Avaliação do ciclo estral e controle da massa corporal

A verificação dos ciclos estrais foi realizada através da coleta de lavado vaginal utilizando-se um conta gotas, inserido no início da vagina das ratas (não profundamente) onde foi injetado e aspirado volume de aproximadamente 10 μ L de solução salina 0,9%. Em seguida, o volume aspirado foi colocado em uma lâmina histológica de vidro e examinado ao microscópico de luz, usando objetivas de 10x e 40x de aumento. Três tipos celulares foram reconhecidos: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos. Na observação do lavado

vaginal, de acordo com o tipo celular predominante, pode-se determinar a fase do ciclo estral das ratas (proestro, estro, metaestro e diestro) (MARCONDES et al., 2002).

A verificação do ciclo estral teve a periodicidade de 3 vezes/semana, durante 4 semanas antes do procedimento de indução hormonal à SOP (29/05/17 a 26/06/17). Foram utilizadas no experimento ratas que apresentaram quatro ciclos normais e consecutivos (BRAUER, 1986; MONTREZOR et al., 2015). Após a indução à SOP, a verificação dos ciclos estrais continuou até a realização da eutanásia dos animais, conforme o tempo de duração dos grupos experimentais.

Todos os animais foram pesados quando chegaram ao Biotério da UNIARA, no dia da indução hormonal, semanalmente a partir do dia da indução e no final de cada etapa experimental (dias das eutanásias).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA UNIARA, sob protocolo nº 031/2016, de 09 de março de 2017 (Anexo) e foram realizados seguindo as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.1.3 Indução à SOP

A indução para ovário policístico foi realizada com dose única de valerato de estradiol (Sigma-Aldrich). O hormônio foi dissolvido em óleo mineral e administrado intramuscular na dose de 2 mg/0,2 mL/rata (BRAUER et al., 1986; PEREIRA et al., 2014; MONTREZOR et al., 2015). Os animais controle receberam injeção intramuscular de 0,2 mL de óleo mineral.

Após a injeção hormonal, os animais foram divididos em 6 grupos (n = 6): grupo 30 dias após indução; grupo 45 dias após indução e grupo 60 dias após indução. Para cada grupo de animais tratados, houve um grupo de animais controle. As datas propostas após a indução fizeram referência ao tempo necessário para que seja instalada a SOP (BRAUER et al., 1986; MONTREZOR et al., 2015).

4.5 Eutanásia

Ao final de cada período experimental (30, 45 e 60 dias) todos os animais foram sacrificados com aprofundamento da anestesia (Pentobarbital sódio 3%, 0,6 mL/100 g de peso corporal).

4.6 Obtenção do plasma para dosagens dos esteroides ovarianos, TNF- α e IL-6

Imediatamente após a eutanásia, foi coletado sangue por meio de punção cardíaca e/ou do arco aórtico com seringas de 5 mL e agulhas 30x7, e acondicionado em tubos *vacutainer* de 4 mL com heparina e mantidos em gelo. O sangue foi centrifugado (2.500 rpm x 20 minutos) para a separação do plasma que foi acondicionado em eppendorfs e congelado a -20^o C para futuras análises de: P4, T, E2, TNF- α e IL-6.

As dosagens plasmáticas de progesterona, testosterona e estradiol foram realizadas com *kits* comerciais de radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo. Os limites inferiores para as detecções de P4, T e E2 foram 0,02 ng/mL, 0,05 ng/mL 0,08 ng/mL, respectivamente. As variações dos coeficientes intra-ensaios foram de 7,5% para a progesterona, 4% para a testosterona e 12% para o estradiol. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (FORP-USP).

As dosagens plasmáticas de TNF- α e IL-6 foram realizadas com ensaios enzimáticos (Elisa), utilizando-se *kits* comerciais, seguindo as recomendações do fabricante. As leituras das reações colorimétricas foram realizadas a 450 nm em leitor de microplacas. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (FORP-USP).

4.7 Índice Gonadossomático – IGS

Imediatamente antes da eutanásia os animais foram pesados e, após a eutanásia, os ovários foram retirados cirurgicamente, cuidadosamente dissecados e pesados. As massas

ovarianas (ovários direitos e esquerdos) foram utilizadas para a determinação do índice gonadossomático: [(massa dos ovários/massa corporal) x100].

4.8 Obtenção dos ovários para a confecção de lâminas histológicas

Após a eutanásia, foi realizada uma incisão mediana na parede abdominal de todas as ratas para a retirada dos ovários. Os mesmos foram dissecados, pesados e fixados em solução de formaldeído 10% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, os ovários foram lavados em água corrente por 24 horas para remoção do excesso do fixador, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5 micras de espessura nos blocos de parafina e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, UNESP – Botucatu.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste paramétrico ou não-paramétrico, para dados independentes e mais de duas amostras (ANOVA), seguidas de teste *t*-Student para amostras independentes na comparação entre os grupos controle e SOP, utilizando o programa SPSS® v.21. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%, $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO IN VIVO

6.1.1 Massa corporal e massa dos ovários

Grupo 30 dias

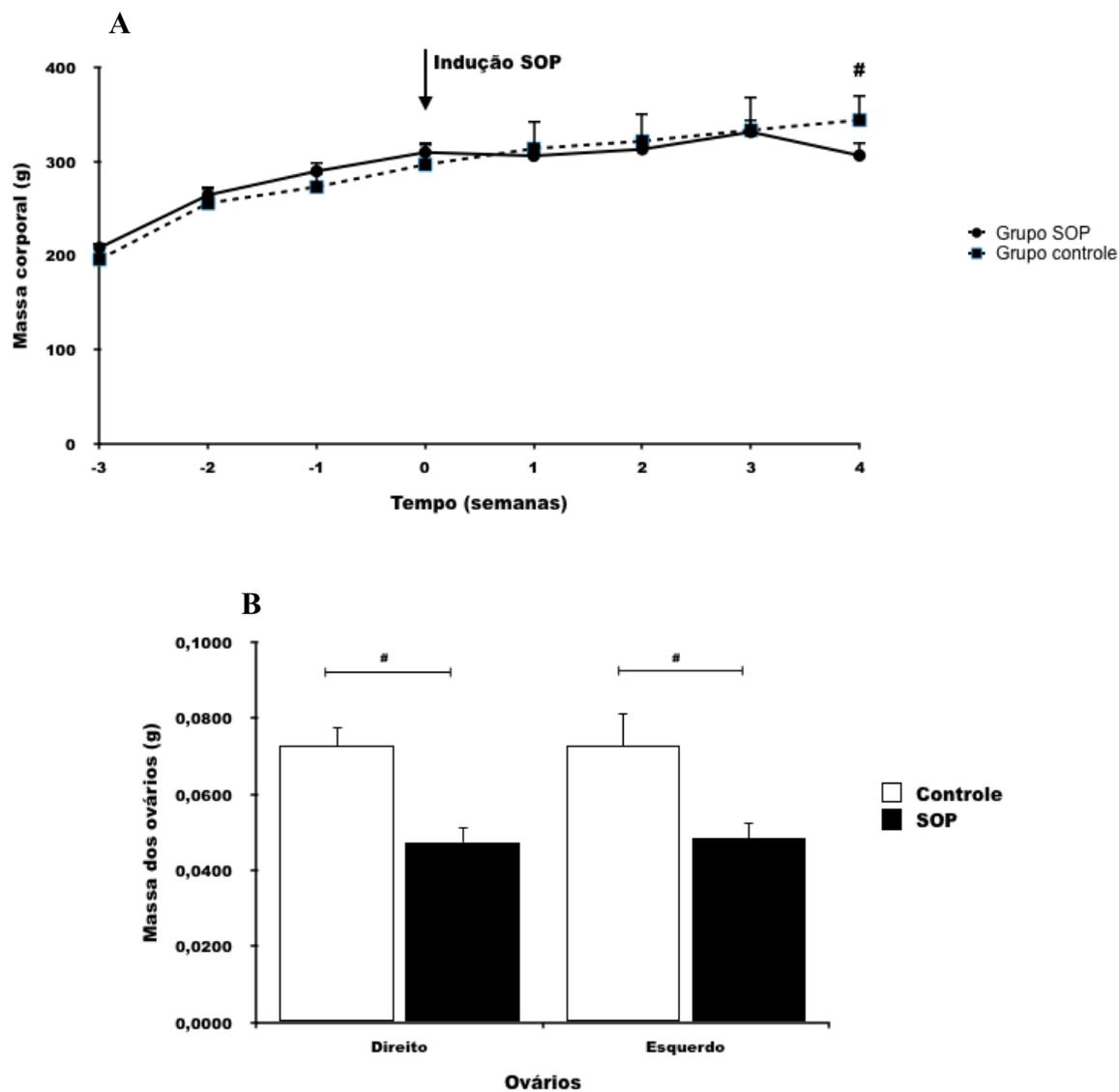


Figura 1 – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (n=6) (linha tracejada) e das ratas SOP (n=6) (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (n=6) (barras brancas) e das ratas SOP (n=6) (barras negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Na análise da figura 1A observa-se diferença significativa das variações médias da massa corporal entre os grupos controle ($344,00 \pm 13,565$ g) e SOP ($306,40 \pm 32,354$ g), na 4ª semana após a indução da SOP, com maior massa para o grupo controle. Na análise da

variação média das massas ovarianas do grupo 30 dias (figura 1B), observa-se diferença significativa para os ovários direito, entre os grupos controle ($0,072820 \pm 0,0090924$ g) e SOP ($0,047400 \pm 0,0113007$ g), e para os ovários esquerdos, entre os grupos controle ($0,072960 \pm 0,0097133$ g) e SOP ($0,48440 \pm 0,0185798$ g), com maiores massas dos grupos controle em relação aos grupos SOP. Não houve variações estatisticamente significativas das massas dos ovários entre os ovários do grupo SOP e nem entre os ovários do grupo controle.

Grupo 45 dias

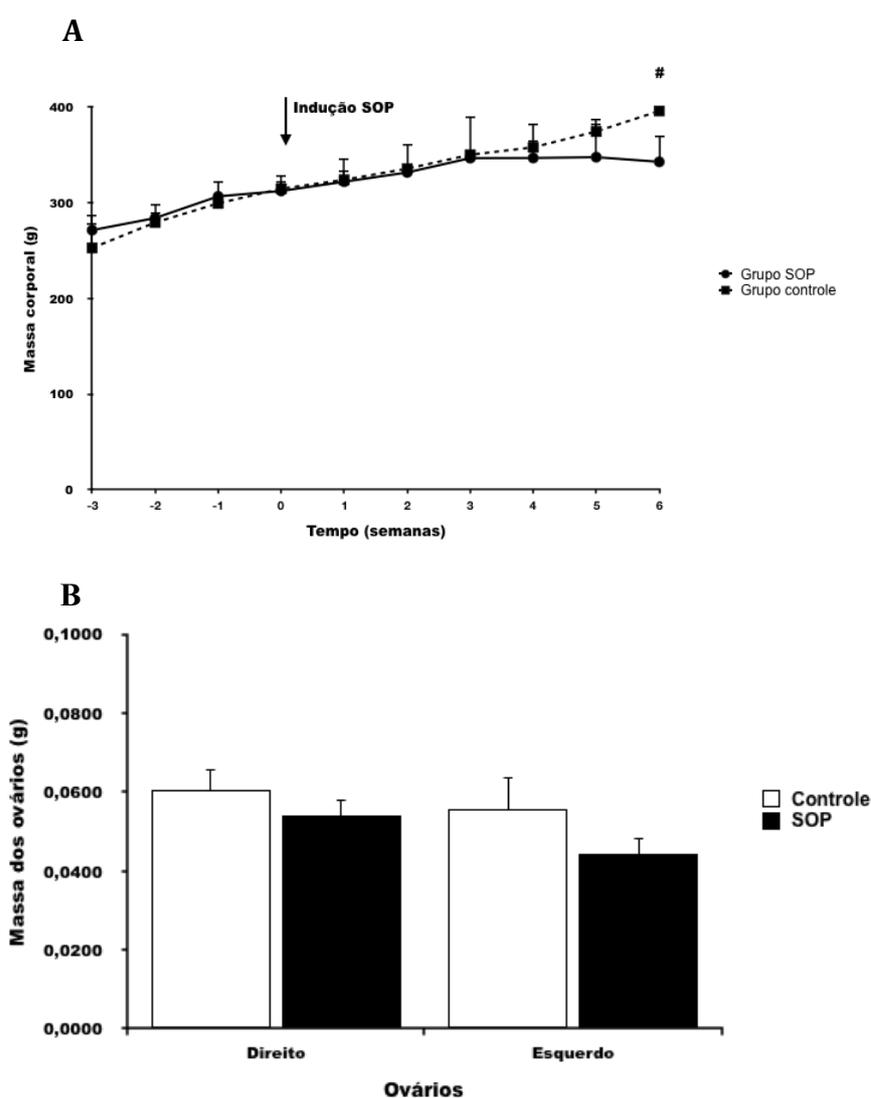


Figura 2 – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (n=6) (linha tracejada) e das ratas SOP (n=6) (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (n=6) (barras brancas) e das ratas SOP (n=6) (barras Negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Na análise da figura 2A observa-se diferença significativa das variações médias da massa corporal entre os grupos controle ($396,00 \pm 25,768$ g) e SOP ($342,80 \pm 27,806$ g), 6 semanas após a indução da SOP. Na análise das variações médias das massas dos ovários direitos e esquerdos do grupo 45 dias (figura 2B), não se observa diferença significativa entre os grupos controle e SOP.

Grupo 60 dias

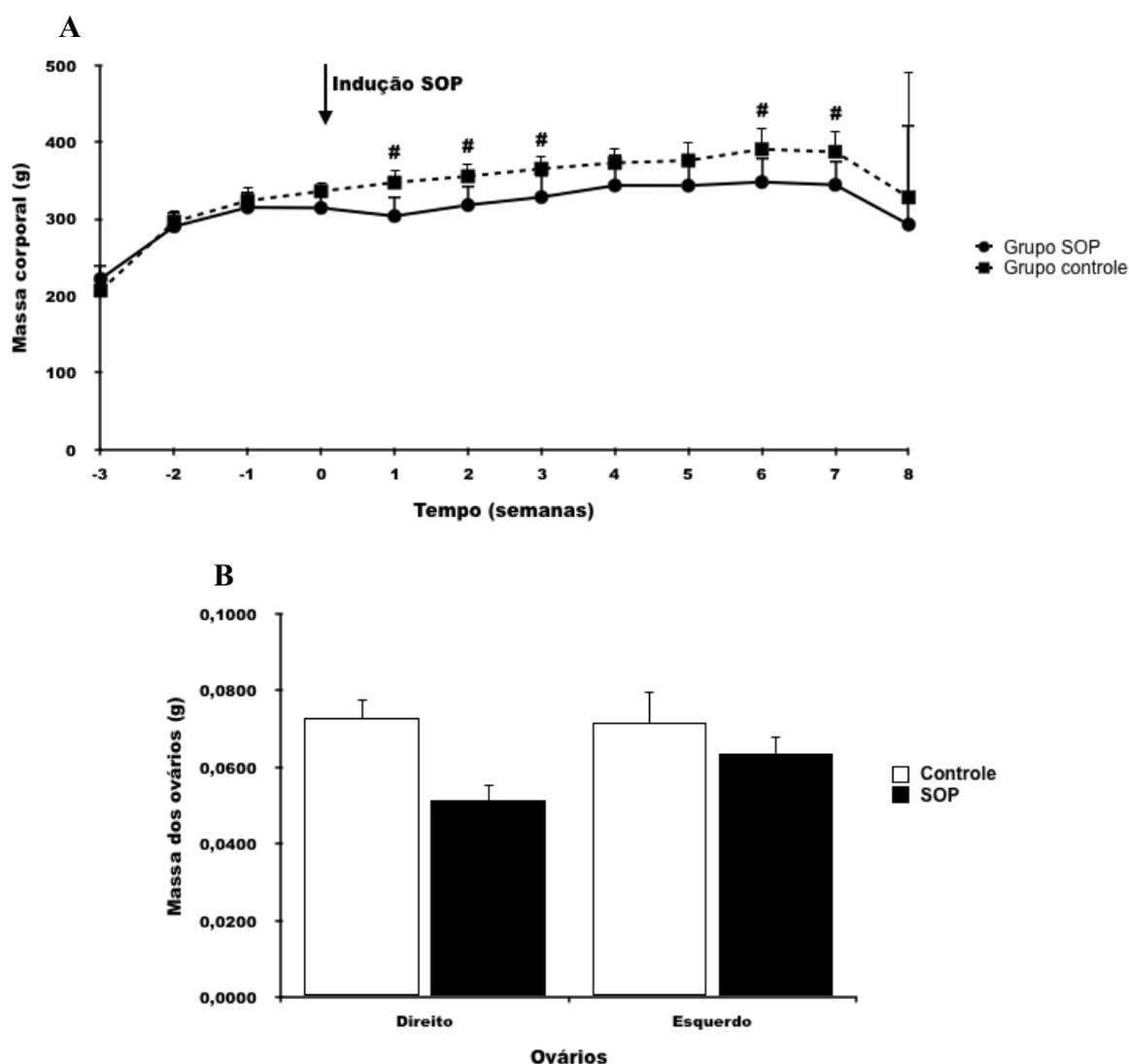


Figura 3 – Variações médias (em gramas (g)) das massas corporais das ratas controle (n=6) (linha tracejada) e das ratas SOP (n=6) (linha contínua) (A), e das massas dos ovários direitos e esquerdos das ratas controle (n=6) (barras brancas) e das ratas SOP (n=6) (barras negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Na análise da figura 3A observa-se diferença significativa das variações médias da massa corporal entre os grupos controle e SOP. Semana 1: controle ($347,33 \pm 16,232$ g), SOP ($303,67 \pm 26,334$ g); semana 2: controle ($355,5 \pm 15,617$ g) e SOP ($318,00 \pm 24,787$ g); semana 3: controle ($365,33 \pm 16,232$ g) e SOP ($328,33 \pm 29,669$ g); semana 6: controle ($390,67 \pm 28,190$ g) e SOP ($348,00 \pm 32,447$ g) e semana 7: controle ($387,33 \pm 27,267$ g) e SOP ($344,33 \pm 32,284$), após a indução da SOP. Na análise das variações médias das massas dos ovários direitos e esquerdos do grupo 60 dias (figura 3B), não se observa diferença significativa entre os grupos controle e SOP.

6.1.2 Índice Gonadossomático (IGS)

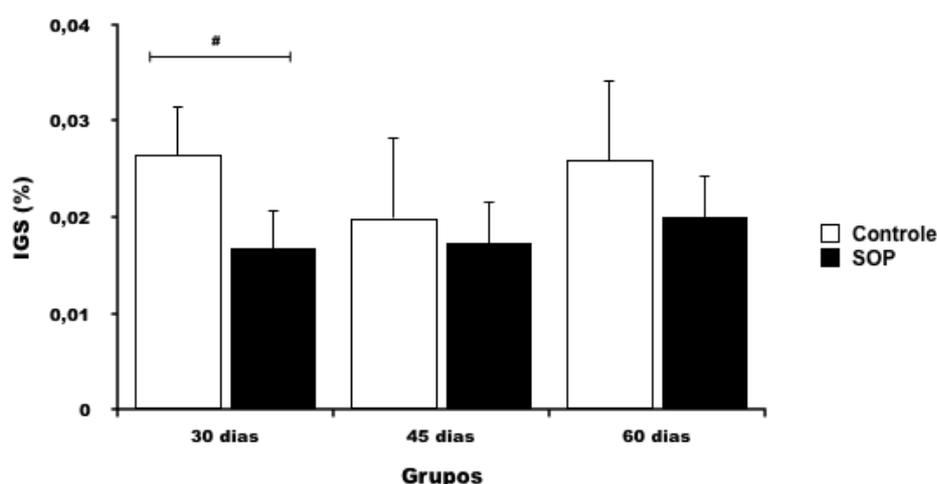


Figura 4 – Variação média (em porcentagem (%)) do índice gonadossomático (IGS) das ratas controle (n=6) (barras brancas) e das ratas SOP (barras negras), para os grupos 30 dias (n=6), 45 dias (n=6) e 60 dias (n=6). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Na análise da figura 4 observa-se diferença estatística do IGS somente entre os grupos controle e SOP 30 dias, onde o IGS do grupo controle ($0,026475 \pm 0,0059934$ %) é maior em relação ao grupo SOP ($0,016702 \pm 0,0036032$ %), não havendo diferenças estatísticas entre o grupo 45 dias e nem entre o grupo 60 dias.

6.2 Níveis plasmáticos de esteroides P4, E2 e T

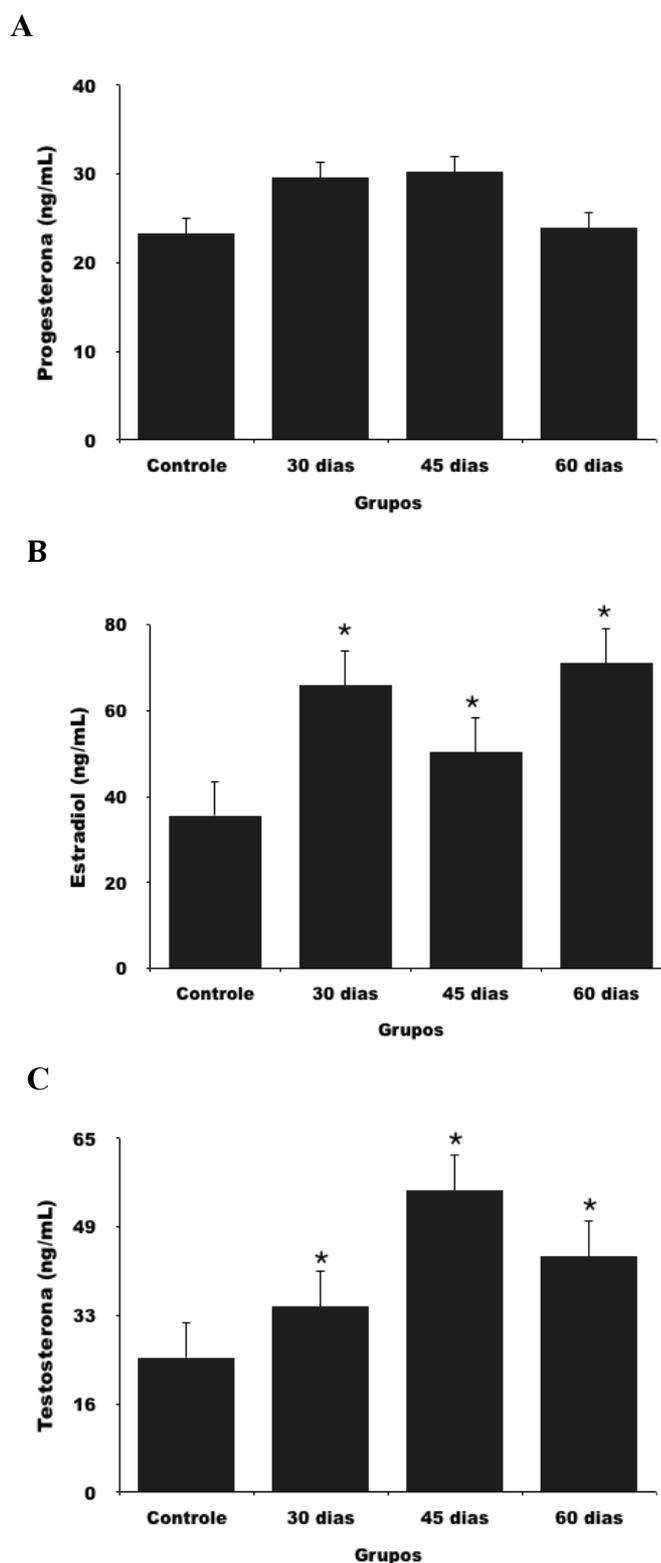


Figura 5 – Variação média (em ng/mL) dos níveis plasmáticos de P4 (A), E2 (B) e T (C) das ratas controle (n=6) e das ratas SOP para grupos 30 dias (n=6), 45 dias (n=6) e 60 dias (n=6). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. * indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Os resultados apresentados na figura 5 mostram as variações médias dos níveis plasmáticos dos esteroides ovarianos progesterona (A), estradiol (B) e testosterona (C). Na figura 5 (A), nota-se que não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de P4 entre os grupos analisados. Na figura 5 (B), observa-se diferenças significantes das médias plasmáticas de E2 dos grupos SOP (30, 45 e 60 dias: $65,9220 \pm 16,9648$ ng/mL, $50,4400 \pm 6,91090$ e $71,2280 \pm 5,07974$ ng/mL, respectivamente), em relação ao grupo controle ($35,6920 \pm 5,74160$ ng/mL). Para todos os grupos SOP observa-se maiores níveis plasmáticos de E2 em relação ao grupo controle. Na figura 5 (C), nota-se diferenças significantes dos níveis plasmáticos de T dos grupos SOP (30, 45 e 60 dias: $34,2120 \pm 2,44953$ ng/mL, $55,4300 \pm 6,52717$ ng/mL e $43,4980 \pm 5,10055$ ng/mL, respectivamente), em relação ao grupo controle ($24,7960 \pm 4,81291$ ng/mL). Os maiores níveis plasmáticos foram observados nos grupos SOP.

6.3 Níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α)

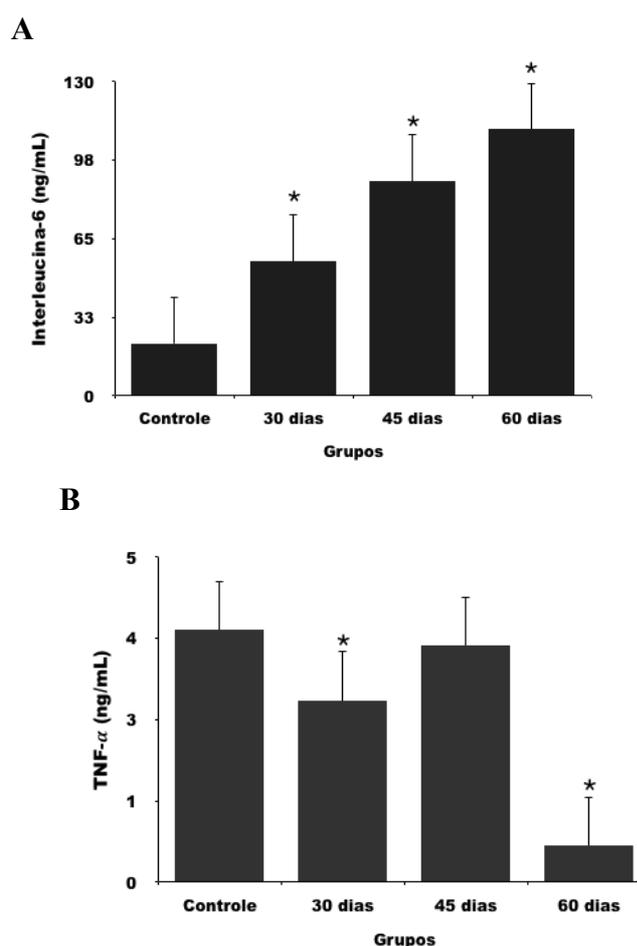


Figura 6 – Variação média (em ng/mL) dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 (A) e TNF- α (B) para os grupos controle (n=6) e os grupos SOP 30 dias (n=6), 45 dias (n=6) e 60 dias (n=6). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. *indica diferença entre as ratas controle e ratas SOP. $p < 0,05$.

Na figura 6 (A) observa-se que os níveis plasmáticos de IL-6 para os grupos SOP (30, 45 e 60 dias: $55,6760 \pm 29,39943$ ng/mL, $88,714 \pm 48,34251$ ng/mL e $110,27 \pm 29,81941$ ng/mL respectivamente), estão significativamente aumentados em relação aos níveis plasmáticos do grupo controle ($21,6240 \pm 12,92721$ ng/mL), sendo a maior média para o grupo SOP 60 dias. Na figura 6 (B) nota-se diferenças significantes dos níveis plasmáticos de TNF- α dos grupos SOP (30 e 60 dias: $2,80050 \pm 0,386849$ ng/mL e $0,56550 \pm 0,559878$ ng/mL, respectivamente), em relação ao grupo controle ($3,88675 \pm 0,492367$ ng/mL). Observa-se que houve diminuição dos níveis plasmáticos da citocina para os grupos SOP 30 e 60 dias em relação ao grupo controle, com menor média plasmática para o grupo SOP 60 dias.

6.4 Morfologia dos ovários

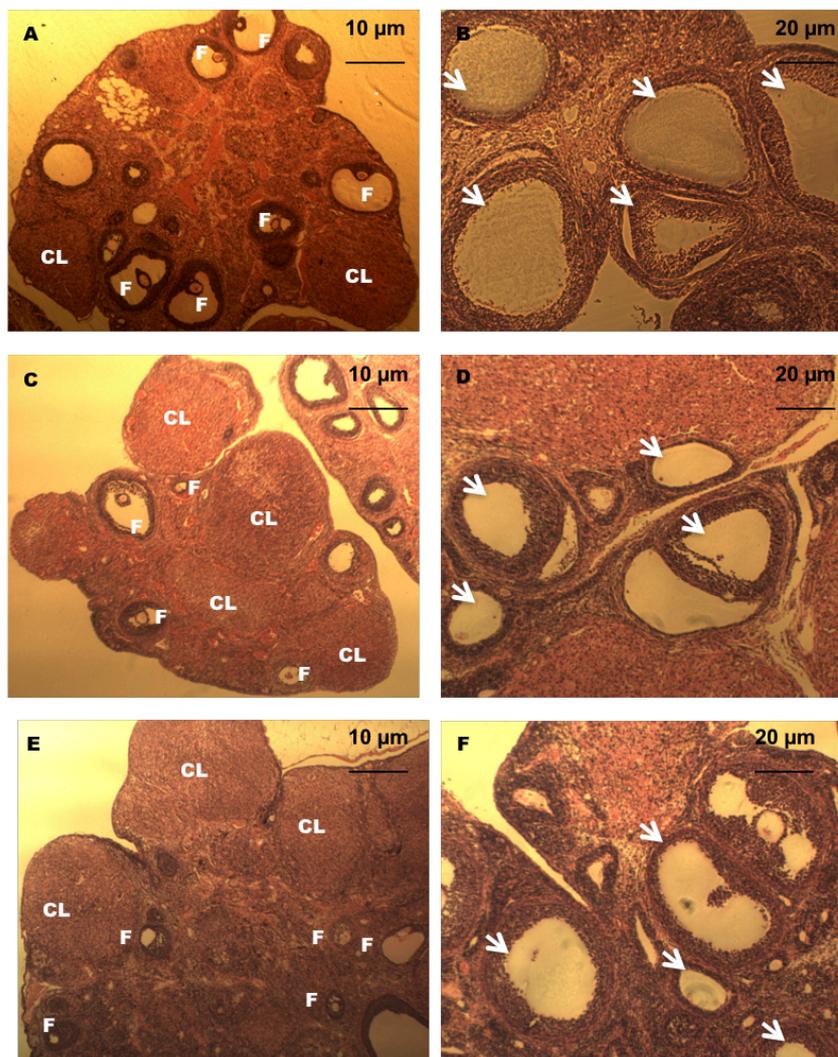


Figura 7 – Aspectos morfológicos dos ovários de ratas controle e induzidas à SOP com VE. Grupos 30 dias: controle (A) e SOP (B). Grupos 45 dias: controle (C) e SOP (D). Grupos 60 dias: controle (E) e SOP (F). As setas indicam os cistos foliculares e foliculos degenerando; CL = corpo lúteo e F = folículo. Coloração HE. Aumento inicial 100x

Observa-se na figura 7 os aspectos morfológicos dos ovários das ratas controles e induzidas à SOP com valerato de estradiol. Nota-se a presença de cistos foliculares e folículos degenerando após a indução por VE (grupos SOP 30 dias (B), 45 dias (D), 60 dias (F)), em relação aos grupos controle (30 dias (A), 45 dias (C), 60 dias (E)), onde observa-se a presença de folículos ovarianos e de corpos lúteos.

6.5 Ciclos estrais

O controle dos ciclos estrais das ratas foi realizado com a determinação das suas fases, conforme os tipos celulares encontrados por meio de microscopia óptica em esfregaço vaginal (MARCONDES et al., 2002). As células observadas permitiram concluir que houve alterações dos ciclos estrais das ratas induzidas à SOP com VE, havendo anestro, componentes de critérios para a confirmação da SOP, conforme o Consenso de Rotterdam 2004. Após quatro dias da indução à SOP, a maioria das ratas estava em metaestro, seguido de menor número de animais em diestro e, outro grupo de animais, estava em estro. No 6º dia após a indução, a maior parte dos animais apresentavam-se em proestro, seguido de um grupo em estro e outro em diestro, sugerindo mudanças irregulares nos ciclos estrais ao longo dos períodos experimentais até a eutanásia de cada grupo. Já os grupos controles, apresentaram ciclos estrais regulares (dados não apresentados). Estas irregularidades dos ciclos estrais dos grupos experimentais é um indicativo da instalação da SOP (BRAWER, 1986).

7. DISCUSSÃO

A síndrome do ovário policístico é considerada, até hoje, multicomplexa, apresentando diversas variáveis em sua etiologia, e que ainda não é bem conhecida no campo da endocrinologia ginecológica. Estudos mostram, que os distúrbios metabólicos que acontecem na SOP, estão relacionados com comorbidades como a síndrome metabólica, diabetes *mellitus* 2, obesidade, anovulação, dislipidemia e inflamações crônicas (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006). Estes distúrbios metabólicos independem da obesidade (COOK et al., 2011), podendo ou não comprometer a fertilidade (MA et al., 2017).

Nossos dados mostram que a massa corporal das ratas SOP e controle tiveram comportamentos diferentes ao longo dos tempos experimentais. Os grupos SOP apresentaram menor massa corporal em relação ao grupo controle desde à indução ao ovário policístico até

o final do período experimental, sugerindo que alterações endócrinas que ocorrem na SOP podem ter contribuído para tais diferenças. Não há consenso estabelecido em relação a aumento e/ou diminuição da massa corporal em modelos animais induzidos à SOP nem em mulheres portadoras da síndrome. Caldwell et al. (2014, 2017), mostraram que ratas induzidas à SOP com DTH (dihidrotestosterona) tiveram aumento significativo em suas massas corporais (magra e gorda) em relação ao controle. Camundongos induzidos à SOP com excesso de DTH, também apresentaram aumento significativo dos adipócitos e da massa corporal (HOUTEN et al., 2012; MARCONDES et al., 2017). O estudo de Ma et al. (2017), contrapõe esses resultados, mostrando que a massa corporal das ratas induzidas à SOP com DTH, não teve diferença significativa em relação ao controle, mostrando também, que a infertilidade não está necessariamente associada à obesidade ou ao sobrepeso.

Os resultados do nosso estudo corroboram com o que tem sido descrito na literatura sobre alterações morfológicas dos ovários de ratas induzidas à SOP por VE. Tais alterações são, principalmente, na morfologia dos ovários, com redução no tamanho dos mesmos (SHI e VINE, 2012). Nossos resultados mostram alterações nas massas dos ovários, tanto dos grupos controle quanto dos grupos SOP, ora com diminuição, ora com aumento nos grupos SOP. O índice gonadossomático (IGS) é um fator importante para mostrar a relação do peso dos ovários com a massa corporal. Os dados encontrados em nosso estudo, demonstraram que houve alterações significativas entre os grupos controle e SOP. Dessa forma, tais alterações sugerem que a SOP induz tanto alterações ovarianas como também alterações da massa corporal. Além disso, os dados de morfologia dos ovários do presente trabalho demonstraram a presença de folículos em degeneração e de cistos ovarianos nos grupos induzidos à SOP. Em contrapartida, nos ovários das ratas dos grupos controle observaram-se folículos e corpos lúteos normais. Desta forma, fica morfológicamente demonstrado a presença de cistos ovarianos nos grupos tratados com VE. Tais dados mostram que o modelo animal utilizado pode ser empregado para estudos dependentes de ovários policísticos.

Ratas induzidas à SOP por VE, demonstram menores concentrações plasmáticas de T e maiores concentrações de P4 (SHI; VINE, 2012). Em contraposição a esses resultados, Montezor et al. (2015), mostraram que os níveis plasmáticos de P4, E2 e T são maiores em ratas induzidas à SOP com VE, pela disfunção ovariana. No entanto, ratas tratadas com T tem os níveis de P4 mais baixos em comparação aos controles, devido aos fenômenos anovulatórios presentes na SOP (BELOOESKY et al., 2004). Os resultados do presente estudo, mostraram que não houve diferença significativa entre os níveis plasmáticos de P4 dos

grupos SOP em relação ao controle. Contudo, os níveis plasmáticos de T e E2 estavam significativamente elevados nos grupos SOP em relação o grupo controle. Os elevados níveis plasmáticos de T indicam hiperandrogenemia, provavelmente produto das células da teca dos cistos presentes nos ovários, características morfológica e endócrina na SOP. Camundongos estimulados com andrógenos, sem características de SOP, apresentaram aumento no número de folículos ovarianos em crescimento, sem a presença de cistos nos ovários, com níveis plasmáticos normais de T e E2 (CALDWELL et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados em macacas (ABBOTT et al., 1998) e ovelhas (WEST et al., 2001). Sendo assim, pode-se sugerir que a instalação da SOP pela injeção de VE alterou a esteroidogênese ovariana e aumentou o numero de cistos, indicando que o modelo proposto no presente trabalho é um modelo viável para estudos relacionados à SOP.

Em mulheres com SOP, os níveis plasmáticos de IL-6 estão elevados, podendo ser uma consequência do hiperandrogenismo (OLIVEIRA et al., 2007; GONZALES, 2011; XU et al., 2014;). São escassos os estudos com animais experimentais induzidos à SOP com VE, que mostram as variações plasmáticas de IL-6. Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de IL-6 estão aumentados nos grupos SOP em relação aos grupos controle, um resultado significativo na contribuição para os estudos da SOP.

A expressão de TNF- α se dá através dos adipócitos, indicando seu efeito autócrino e parácrino, envolvido na regulação do tamanho dos adipócitos. Este tipo de citocina, geralmente está com níveis plasmáticos aumentados na obesidade (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004; GEHRKE e PEREIRA, 2007; OLIVEIRA, 2017). Ratas Wistar induzidas à SOP com VE podem desenvolver obesidade, com os níveis plasmáticos de TNF- α aumentados (KAYEDPOOR et al., 2017). O TNF- α influencia a expressão gênica em tecidos metabolicamente importantes, como o tecido adiposo, suprimindo genes envolvidos na captação e armazenamento de ácido graxos não esterificados, suprime genes para fatores de transcrição envolvidos na adipogênese e lipogênese e modifica a expressão de vários fatores secretados pelos adipócitos, incluindo a adiponectina e IL-6 (KERSHAW e FLIER, 2004). Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de TNF- α estão diminuídos nos grupos SOP em relação aos grupos controles. Para o grupo SOP 45 dias, os níveis de TNF- α não tiveram diferença significativa do grupo controle. A massa corporal dos grupos SOP são menores em relação aos grupos controles. Isso sugere que, ratas induzidas à SOP com VE e baixa massa corporal, tem níveis baixos de TNF- α . Um achado importante para os estudos da SOP.

Para compreender a fisiopatologia da SOP é essencial o desenvolvimento contínuo de estudos para a identificação de biomarcadores e novos tratamentos que possam contribuir para o entendimento das desordens endócrinas-metabólicas encontradas na SOP. Embora a maioria dos estudos utilizam humanos com a síndrome, é crescente a busca por modelos animais que viabilizem de forma satisfatória, as possibilidades de estudos de órgãos e sistemas, como também dos mecanismos moleculares que não podem ser realizados em humanos. Desse modo, o nosso modelo desenvolvido no presente estudo, apresentou características inerentes à SOP, entre elas os distúrbios endócrinos e alterações morfológicas dos ovários, indicando que o modelo proposto é adequado para estudos relacionados à SOP. Contudo, mais estudos são necessários para a compreensão da fisiopatologia desta síndrome.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, podemos concluir que houve indução à SOP por VE, confirmado pelas alterações dos ciclos estrais das ratas induzidas, pelas alterações dos níveis plasmáticos dos esteroides ovarianos, principalmente a hiperandrogenemia, e pela presença de cistos foliculares nos ovários. Além disso, os distúrbios endócrinos observados no presente trabalho, sugerem que as alterações plasmáticas de T podem comprometer a síntese e a liberação de IL-6 e de TNF- α , aumentando o risco de desenvolvimento de inflamações crônicas, distúrbios metabólicos e vasculares, frequentemente observados em pacientes com SOP.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIZ, M. H. F. et al. - Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83(5 Suppl): S192-203. doi 10.2223/JPED.1709

AMADEI, S. U.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R. – A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea - *Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006

ARAUJO, G. S. – Identificação e localização das procinetivas e seus receptores no ovário de ratas com síndrome dos ovários policísticos induzidas por esteroides sexuais, 2017 – Dissertação (Mestrados) – Programa de Obstetrícia e Ginecologia – UNIFESP – São Paulo

AZEVEDO, G. D. et al. – Modificações do estilo de vida na síndrome dos ovários policísticos: papel do exercício físico e importância da abordagem multidisciplinar - *Rev Bras Ginecol Obstet.*; v. 30(5): 261-7, 2008

AZZIZ, R. Et al. - The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report - *Fertility and Sterility* v.91, p. 456–488, 2009 (doi:10.1016/j.fertnstert.06.035, 2008)

BARBER, T. M.; FRANKS, S. – Adipocyte biology in polycystic ovary syndrome - <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.010>

BELOOSESKY, R. et al. – Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *International Journal of molecular medicine* v. 14: p. 207 – 215, 2004

BETZ, V.M. et al. - Bone tissue engineering and repair by gene therapy. **Front. Biosci.** v. 13, p. 833–41, 2008.

BRASIL, L. A. et al. - Uso de corticoide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea – *Rev Bras Cir Cardiovasc*, v. 14 (3): p. 254-68, 1999

BRAWER, JR.; MUNOZ, M.; FAROOKHI R. - Development of the polycystic ovary condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Bio. Reprod.* v. 35(3); p. 647-655, 1986.

BROCCO, M. C. et al. – A study of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) serum levels in rats subjected to fecal peritonitis and treated with intraperitoneal

ropivacaine – Acta Cirúrgica Brasileira, vol. 27 (7), 2012

CALDWELL, A. S. et al. – Characterization of reproductive, metabolic and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models – Endocrinology, v. 155, n. 8, p. 3146-3159, 2014

CALDWELL, A. S. et al. – Neuroendocrine androgen action is a key extra ovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome – PNAS, v. 114, p. 16, p. E3334 – E3343, 2017

CARDOSO, J. F. et al. – Evaluation of cytokines in type 1 diabetes patients with and without retinopathy – J Bras Patol Med Lab, v. 53, n. 1, p. 31-37, 2017

CONWAY, G. et al. - The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology - European Journal of Endocrinology (2014) 171, P1–P29 - DOI: 10.1530/EJE-14-0253

COOK, H., BRENNAN, K., AZZIZ, R. – Reanalyzing the modified Ferriman - Gallweyscore – is there a simpler method for assessing the extent of hirsutism? Fertility and sterility, v. 96, n. 5, p. 1266 e 1261, 2011

CUSSONS, A. J. et al. - Polycystic ovarian syndrome: marked differences between endocrinologists and gynecologists in diagnosis and management. Clinical Endocrinology 2005 62 289–295. (doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02208.x)

DE OLIVEIRA, D. C. – Avaliação do controle da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias mediado pela IL-10. Participação da IL-10 na modulação da resposta inflamatória exercida pela glutamina e na restrição alimentar – Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - 2017

DUMITRESCU, R. et al. – The Polycystic Ovary Syndrome: An update on metabolic and hormonal mechanisms – Journal of Medicine and Life Vol. 8, Issue 2, pp.142-145, April-June 2015

FAUSER, B. C. J. M. et al. - Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Fertility and Sterility v. 97, p. 28–38. (doi:10.1016/j.fertnstert.

2011.09.024), 2012

FRANCISQUETI, F. V. et al. – Obesidade, inflamação e complicações metabólicas – *Nutrire.* v. 40(1): p. 81-89 – DOI 10.4322/2316-7874.016213, 2015 – Apr

FRANCISQUETI, F. V. et al. – The role of stress on the pathophysiology of metabolic syndrome – *Rev Assoc Med Bras*; v. 63(1): p. 85-91, 2017

GARG, D.; MERHI, Z. - Advanced Glycation End Products: Link between Diet and Ovulatory Dysfunction in PCOS? - *Nutrients*, v. 7, p. 10129–10144; doi:10.3390/nu7125524, 2015

FRANKS, S. – Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome: increasing evidence for the role of androgens in programming – *Reproductive and metabolic dysfunction - Endocrinology*; v. 153, n. 6, p. 2536-8, 2012

GEHRKE, J.; PEREIRA, R. Z. – Associação do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) com a obesidade - *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, São Paulo v. 1, n. 1, p. 1-10, Jan/Fev, ISSN 1981-9919, 2007

GHOSH, A. K.; VAUGHAN D. E. - PAI-1 in Tissue Fibrosis - *J Cell Physiol.* 227(2): 493–507. doi:10.1002/jcp.22783, 2012 February

GONZALES, F. - Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction - doi:10.1016/j.steroids. 2011.12.003

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. – Gordura visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde está o problema? – *Arq Bras Endocrinol Metab* – vol. 48 nº 6 – Dez 2004

KAYEDPORR, P. Et al. – Anti-inflammatory Effect of Silymarin on ovarian immunohistochemical localization of TNF- α associated with systemic inflammation in polycystic ovarian syndrome – *Int. J. Morphol.*, v. 35 (2), p. 723-732, 2017

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. – Adipose tissue as an Endocrine Organ – *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89 (6), p. 2548-2556, Jun 2004

LOMBARDI, L. A. Et al. – Morfologias das células intersticiais de ovários policísticos de

ratas: um estudo experimental – Rev Bras Ginecol Obstet., v.34 (7), p. 323-8, 2012

MA, Y. et al. - Androgen receptor in the ovary theca cells plays a critical role in androgen-induced reproductive dysfunction – Endocrinology, v. 158, n. 1, p. 98-108, 2017

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. Brazilian Journal Biology, v. 62, n. 4, p. 609–614, 2002.

MARCONDES, R. R. et al. – Exercise differentially affects metabolic functions and white adipose tissue in female letrozole and dihydrotestosterone-induced mouse models of polycystic ovary syndrome – Molecular Cellular Endocrinology, v. 448, p. 66-77, 2017

MARINHO, M. Et al. – TNF- α and IL-6 Immunohistochemistry in rat renal tissue experimentally infected with leptospira interrogans sevarar canicola – J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis., v. 14, 3, p. 534, 2008

MARQUES, P. Et al. – Significado cardiometabólico do excesso de peso/obesidade numa população de 263 mulheres inférteis com síndrome do ovário policístico – Rev Port Endocrinol Diabetes Metab., v. 10(1): p. 2-7, 2015

MATOS, A. F. G. et al. – Adipocinas: uma visão geral dos seus efeitos metabólicos - Revista HUPE, Rio de Janeiro, 2014; v. 13(1): p. 54-60 doi:10.12957/rhupe.2014.9806

MESSINIS, I. E. et al. – Polycystic ovaries and obesity – Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology – v. 29 p. 479 – 488), 2015

MONTREZOR, L.H. et al. - Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in rats with polycystic ovaries. Respiratory Physiology & Neurobiology, v. 217, p. 17-24, 2015

MOURA, H. H. G. et al. – Síndrome do Ovário Policístico: abordagem dermatológica - An Bras Dermatol. v. 86(1): p. 111-9, 2011

MURRI, M. et al. – Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update, v. 19, n 3, p. 268-88, May-jun, 2013

NAZARETH, A. M. – Type 2 diabetes mellitus in the pathophysiology of alzheimer’s disease – *Dement Neuropsychol*, v. 11(2) p. 105-113, 2017

OLIVEIRA, C. M. B. – Citocinas e dor – *Rev Bras Anesthesiol*, v. 61 (2), p .255-265, 2011

OLIVEIRA, M. et al. – Correlação entre os níveis de proteína C reativa ultra-sensível e as características clínicas e laboratoriais em mulheres com síndrome do ovário policístico - *Rev Bras Ginecol Obstet*. V.29(5):241-7, 2007

PALOMBA et al. - Complications and challenges associated with polycystic ovary syndrome: current perspectives - *International Journal of Women’s Health* 2015:7

PANDEY, V. et al. – Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozol-induced polycystic ovary syndrome in the rat – *Reprod Biol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.005>, 2015

PEREIRA, V. M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; MARTINS, A.S.; REIS, F. M.; REIS, A. M. - Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. *Peptides*. v. 60: p. 80-85, 2014.

PIRES, A. et al. - Obesity: Paradigm of Endothelial Dysfunction in Paediatric Age Groups *Acta Med Port*. v. 28(2): p. 233-239, 2015

POLOTSKY, A. J. et al. - Hyperandrogenic oligomenorrhea and metabolic risks across menopausal transition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 99 2120–2127. - doi:1210/jc.2013-4170

PRADO, W. L.; LOFRANO, M. C.; OYAMA, L. M., DÂMASO, A. R. – Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício – *Rev Bras Med Esporte* – v. 15, nº 5 – Set/Out, 2009

QUEIROZ, J. C. F. et al. – Controle da adipogênese por ácidos graxos - *Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 53, p. 5, 2009

SEOW, K. M. et al. – Expression levels of haem oxygenase-1 in the omental adipose tissue and peripheral blood mononuclear cells of women with polycystic ovary syndrome - *Human Reproduction*, v. 26, n.2 p. 431–437, 2011 - doi:10.1093/humrep/deq351

SHI, D.; VINE, D. F. – Animal models of polycystic ovary syndrome: A focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*, v. 98, n. 1, p. 185-193, 2012

SIPPEL, C. et al. – Processos Inflamatórios da Obesidade - *Revista de Atenção à Saúde*, v. 12, nº 42, p. 48 – 56 - DOI: 10.13037/rbcs.vol12n42.2355, out./dez. 2014

SPRITZER, P. M. et al. - Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome - *Society for Reproduction and Fertility* ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online) - DOI: 10.1530/REP-14-0435

WALTERS et al. – Rodents models for human polycystic ovary syndrome - *Biol Reprod*, v. 86, p. 149-149, 2012

WU, C. et al. – The Characterization of Obese Polycystic Ovary Syndrome Rat Model Suitable for Exercise Intervention – v. 9, Issue 6, e 99155, June 2014

WU, H. et al. - Associations between TNF- α and interleukin gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome risk: a systematic review and meta-analysis - *J Assist Reprod Genet*, 2015 - DOI 10.1007/s10815-015-0449-7

XU, X. et al. - Effect of metformin on serum interleukin-6 levels in polycystic ovary syndrome: a systematic review - *BMC Women's Health*, v. 14: p. 93, 2014 <http://www.biomedcentral.com/1472-6874/14/93>

VOLP, A. C. P. et al. – Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica – *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, v. 52, p. 3, 2008

10. ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética



Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA - UNIARA
Portaria Ministerial n.º 612 de 15.07/2016
Publicada no D.O.U. de 19.07/2016

www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº. 031/16

Título do Projeto: Influências da síndrome do ovário policístico sobre respostas inflamatórias e de reparação tecidual utilizando celulose bacteriana incorporada com soro rico em fator de crescimento.
Pesquisador responsável: Reginaldo Batistela Pietro Sanches

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "Influências da síndrome do ovário policístico sobre respostas inflamatórias e de reparação tecidual utilizando celulose bacteriana incorporada com soro rico em fator de crescimento.", sob sua orientação e com a participação do docente Luís Henrique Montrezor, foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo, verificar a resposta inflamatória e o reparo tecidual na pele de ratas Wistar induzida à Síndrome do Ovário Policístico (SOP) utilizando membranas de celulose bacteriana enriquecidas com o plasma rico em fator de crescimento. Para realização do projeto, a SOP será induzida nos animais por meio da administração de Valerato de Estradiol. Posteriormente, a pele será lesionada na região dorsal e será implantada membrana de celulose bacteriana. Após o período experimental os animais serão submetidos à eutanásia e as análises propostas serão realizadas.

A análise do referido projeto mostra que está devidamente instruído conforme as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo animais de experimentação.

Este Comitê apresenta **parecer favorável**, sendo assim, o projeto está **APROVADO** para a sua execução.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 09 de Março de 2017.

Relator/Colegiado

