

Melquíades Pereira Júnior

**Influência do Transplante de Tecido Adiposo Gonadal  
sobre o Útero e os Ovários de Camundongas Obesas  
com Policistose Ovariana**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Doutor em  
Medicina

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Abi Haidar

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Berguio Vidotti

**Coordenador:** Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Pereira Júnior, Melquíades.

Influência do Transplante de Tecido Adiposo sobre o Útero e os Ovários de Camundongas Obesas com Policistose Ovariana. Melquíades Pereira Júnior – São Paulo, 2008.

v; 47p

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

1. Hiperglicemia. 2. Ovários Polimicrocísticos. 3. Transplante de Tecido Adiposo. 4. Obesidade.

Dedico este trabalho:

---

À minha esposa Viviani, que por seu amor, perseverança, apoio e incentivo,  
me conquista mais a cada dia, provando que nada acontece por acaso.

Aos meus filhos Juliana e Gustavo, responsáveis pela minha razão de viver,  
deixando melhor cada dia da minha existência e sempre me provando que  
amanhã será melhor que hoje.

Aos meus pais Melquíades e Célia, que nunca mediram esforços para que  
todos os meus objetivos fossem conseguidos, muitas vezes sacrificando seus  
sonhos para me darem a oportunidade de realizar os meus.

Agradecimentos

---

É indispensável o agradecimento a todos aqueles que ajudaram na realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. GERALDO RODRIGUES DE LIMA, pelo exemplo de dedicação ao estudo da Ginecologia.

Ao Prof. Dr. EDMUND CHADA BARACAT, pelo seu constante estímulo na busca do conhecimento, sendo que mesmo à distância zela pelos seus entes queridos.

Ao Prof. Dr. MAURO ABI HAIDAR, que me recebeu na Escola Paulista de Medicina e me guiou no caminho da Ginecologia Endócrina e Climatério.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> DANIELA BERGUIO VIDOTTI, pessoa especial que não mediu esforços na minha orientação e conclusão deste trabalho, sempre buscando incentivar-me, tornando-me seguro de meu ideal.

Ao Prof. Dr. ISMAEL DALE COTRIM GUERREIRO DA SILVA, por seu intenso e inestimável trabalho junto à pós-graduação.

À Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo que me acolheu nos últimos 10 anos, e em especial ao Departamento de Ginecologia, Disciplina de Endocrinologia Ginecológica que me propiciou a realização desta tese.

À Universidade São Francisco, berço de minha formação Médica.

Aos amigos do Ambulatório da Infância – Adolescência, Ginecologia Endócrina, Transição Menopausal e Pós-menopausa, Dr<sup>a</sup> Emily Izumi Hinoue, Dr. Ivaldo da Silva, Dr. José Maria Soares Júnior, Dr. Roberto C. Nogueira Júnior, Dr<sup>a</sup> Michele Quaranta Panzan, Dr. Jairo Yavelbergh, Dr<sup>a</sup> Carla Gimenes Gonçalves, Dr<sup>a</sup> Márcia Gaspar Nunes, Dr. Rodrigo Varotti Pereira, Dr. Vamberto Maia Filho, Dr<sup>a</sup> Regiane Helena Barros Rabelo, Dr<sup>a</sup> Ana Maria

Massad Costa, Dr. Eduardo Lemes Alves Motta e demais colegas, pela amizade, incentivo, coleguismo e privilégio de tê-los como companheiros.

Aos Funcionários do setor: Maria de Lourdes Nietto Sena Moura, Maria Cecília dos Santos, Rosimeire de Paula, Rute Cristina Barbosa e Tereza Bezerra.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia: Zélia Maria Gomes Macedo, Karim Martin dos Santos, Maria Cecília dos Santos Silva e Valéria dos Santos Medina, pela amizade e ajuda na solução dos problemas.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta tese.

Indice

---

Lista de abreviaturas.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	IV
Introdução.....	1
Proposição.....	8
Material e Métodos.....	9
Resultados.....	13
Discussão.....	27
Conclusões.....	34
Referências Bibliográficas.....	35
Anexos.....	44

## **Listas de Abreviatura**

B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J: Camundongas Modificadas Geneticamente, Deficientes do Gene para Leptina

FSH: Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE: Técnica Histológica que Cora Tecidos em Lâmina Através da Hematoxilina-Eosina

IGF-I: Fator de Crescimento Insulinóide tipo 1

IGF-II: Fator de Crescimento Insulinóide tipo 2

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de Massa Corpóreo

KDa: Kilodáltons

LH: Hormônio Luteinizante

P450c 17 alfa: Enzima Ovariana

PPAR- $\gamma$ : Receptor Gama Ativado por Proliferadores de Peroxissomos

RNAm: RNA Mensageiro

SHBG: Globulina de Transporte dos Hormônios Sexuais

SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos

TNF $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral

Tx: Transplante

VLDL: Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

## **Resumo**

**Objetivo:** Avaliar, do ponto de vista histológico, o efeito do transplante de tecido adiposo sobre o útero e os ovários de camundongas obesas e anovuladoras.

**Métodos:** Foram utilizadas camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J com 2 e 3 meses de idade, subdivididas em grupos experimentais: 1. Controle (B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J fêmeas, com peso normal); 2. Obesidade (B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J fêmeas, obesas); 3. Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 7 dias (B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J fêmeas e obesas, que receberam aproximadamente 1g de tecido adiposo de camundongas com peso normal isogênicas); 4. Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 15 dias (B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J fêmeas e obesas, que receberam aproximadamente 1g de tecido adiposo de camundongas com peso normal isogênicas); 5. Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 45 dias (B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J fêmeas e obesas, que receberam aproximadamente 1g de tecido adiposo de camundongas com peso normal isogênicas). Após 7, 15 e 45 dias do transplante, os animais foram sacrificados. Foram verificados o peso corporal e a glicemia, além da análise histológica dos úteros e dos ovários (H/E).

**Resultados e Conclusões:** O grupo das obesas (n=6) apresentou elevação no peso corporal ( $52,0 \pm 1,3^*$ ) e na glicemia ( $418,4 \pm 33,0^*$ ) em relação ao controle ( $24,0 \pm 0,7$  e  $100,2 \pm 2,2$ , respectivamente, n=5). Os transplantes após 7 dias (n=5) e 15 dias (n=9) foram eficazes na redução da glicemia ( $390,2 \pm 34,0$  e  $270,0 \pm 38,0^*$ , pré e pós-Tx 7 dias; e  $460,0 \pm 31,4$  e  $125,0 \pm 8,4^*$ , pré e pós-Tx 15 dias, respectivamente), mas não modificaram o peso corporal. Porém, após 45

dias de transplante (n=7) houve redução da glicemia ( $467,0 \pm 28,0$  e  $209,0 \pm 18,0^*$ , pré e pós-Tx, respectivamente), assim como tendência à diminuição no peso corpóreo observado pré e pós-Tx ( $50,4 \pm 2,4$  e  $44,0 \pm 3,3$ ). Valores adotados para  $*p < 0,0001$ . A histologia revelou que, após 7 e 15 dias de Tx, os animais apresentavam ovários semelhantes aos das obesas, incluindo presença de inúmeros folículos, interstício abundante e ausência de corpos lúteos. Nos úteros notou-se intensa estimulação hormonal e glandular, mitoses, raros eosinófilos e epitélio superficial íntegro e sem renovação, sugerindo que tempos precoces de Tx são incapazes de reverter tais alterações. Entretanto, no grupo Tx 45 dias foram visualizados úteros praticamente iguais aos do controle, com grande número de leucócitos e remodelação do epitélio superficial, além de ovários com reduzida quantidade de folículos e presença de corpos lúteos, indicando ovulação. As camundongas B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J obesas apresentam formações polimicrocísticas e estroma abundante, mimetizando os achados ovarianos das pacientes anovuladoras. O Tx de tecido adiposo, a longo prazo, parece ter papel na diminuição da obesidade, mostrando-se eficiente na reversão da hiperglicemia e das alterações ovarianas e uterinas, presentes nas camundongas obesas, restabelecendo a ovulação.

Palavras-chave: Hiperinsulinemia, Ovários Polimicrocísticos, Transplante de Tecido Adiposo, Obesidade.

## **Abstract**

**Objective:** To assess from the histological point of view the effect of adipose tissue transplantation onto the uterus and ovaries of obese, anovulating mice.

**Method:** B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J mice were used and the following experimental groups evaluated: 1. Control group (B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J female, average weight); 2. Obesity (B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J female, obese); 3. Obesity plus adipose tissue transplant from mice donors which were average weight after 7 days (B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J obese females which received adipose tissue from thin, isogenic mice); 4. Obesity plus adipose tissue transplant from mice donors which were average weight after 15 days (B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J obese females which received adipose tissue from thin, isogenic mice); 5. Obesity plus adipose tissue transplant from mice donors which were average weight after 45 days (B6.V-*Lep*<sup>ob</sup>/J obese females which received adipose tissue from thin, isogenic mice). Within 7, 15 and 45 days of the transplant the animals were sacrificed. The age range was between 2 and 3 months old. In addition to the histological analyses of uteri and ovaries (H/E), these animals' corporal weight and glycemia were verified.

**Results and Conclusion:** The obese group (n=6) presented with elevation in corporal weight ( $52,0 \pm 1,3^*$ ) and glycemia ( $418,4 \pm 33,0^*$ ) in relation to the control group ( $24,0 \pm 0,7$  and  $100,2 \pm 2,2$  respectively, n=5). The transplants after 7 days (n=5) and 15 days (n=9) were effective in reducing glycemia ( $390,2 \pm 34,0$  and  $270,0 \pm 38,0^*$ , 7 days pre and post transplant; and  $460,0 \pm 31,4$  and  $125,0 \pm 8,4^*$ , 15 days pre and post transplant respectively), but not in changing corporal weight. However, within 45 days of the transplant (n=7) there was a reduction in glycemia ( $467,0 \pm 28,0$  and  $209,0 \pm 18,0^*$ , pre and post-transplant

respectively), as well as a tendency to reduce corporal weight observed pre and post transplant ( $50,4 \pm 2,4$  and  $44,0 \pm 3,3$ ). Values used for  $*p < 0,0001$ . Histology revealed that within 7 and 15 days of the transplant, the animals presented with ovaries similar to those in the obese group, containing countless follicles, abundant interstice and absence of corpora lutea. The uteri revealed intense hormonal and glandular stimulation, mitosis, scarce eosinophils and the superficial epithelium whole, without renovation, indicative of the inability of short term transplantations to reverse such alterations. In the 45-day-group, however, the uteri looked very much the same as those of the control group, with a great number of leucocytes and remodelling of the superficial epithelium, as well as ovaries with a reduced amount of follicles and presence of corpora lutea, suggesting ovulation. The obese B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J mice present with polymicrocystic formation and abundant oestrone, mimicking the ovarian findings of the anovulating patients. The long term adipose tissue transplantation, on the other hand, seems to play a part in reducing obesity, proving to be efficient in reversing hypoglycemia and the ovarian and uterine alterations present in obese mice, re-establishing ovulation.

Key words: Polymicrocystic ovaries, Anovulation, Adipose Tissue Transplant, Obesity.

## **Introdução**

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) representa o clássico exemplo da perda de ciclicidade funcional por retroalimentação anômala. Neste caso, a produção excessiva extraglandular de androgênios e sua conversão em estrogênios constitui o substrato fisiopatológico da anovulação crônica<sup>1,2,3</sup>.

Representa um dos distúrbios endócrinos reprodutivos mais comuns em mulheres, acometendo cerca de 5% a 10% da população feminina em idade fértil<sup>3</sup>. Associa-se a obesidade ao quadro de infertilidade<sup>4,5,6</sup>. A ocorrência familiar é freqüente, principalmente quando há parentesco de primeiro grau (20 a 60%)<sup>7</sup>. Além disso, pacientes com SOP têm risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de endométrio e doenças cardiovasculares, assim como alterações no metabolismo da glicose e risco precoce de “diabetes mellitus”<sup>8,9</sup>.

Dentre os fatores genéticos envolvidos na gênese desta afecção estão a insulina e o fator de crescimento insulinóide I (IGF-I), os quais agem junto com o hormônio luteinizante (LH) no aumento da produção de androgênios nos ovários<sup>10,11</sup>. Níveis elevados de IGF-I determinam elevação da atividade da enzima P450c17alfa ovariana, essencial para a produção dos androgênios ovarianos<sup>23</sup>. Além disso, a literatura descreve que, em mulheres com SOP, pode haver alteração no receptor de insulina, resultando em resistência à insulina, além de elevação da atividade da P450c17alfa, com subsequente hiperandrogenismo<sup>10,11</sup>. A primeira possibilidade para esse fenômeno é a insulina ativar os receptores do IGF-I. Este é capaz de ligar-se ao receptor de insulina, porém, com afinidade 100 a 1000 vezes inferior que a própria insulina.

Esta apresenta estruturas complementares ao receptor de IGF-I, é capaz de ligar-se a ele, porém com afinidade 500 vezes inferior à do IGF-I. Na SOP, existe um aumento dos receptores IGF-I o que facilita a ligação da insulina com esses. Somado a isso, a resistência insulínica leva à redução hepática da produção de globulinas carreadoras dos hormônios sexuais (SHBG), aumentando a fração livre de androgênios.

Clinicamente, observam-se alterações menstruais e hirsutismo, geralmente acompanhados de aumento de peso<sup>12,13</sup>.

Os exames laboratoriais complementares freqüentemente revelam valores elevados de LH e baixos índices de hormônio folículo-estimulante (FSH), porém, estes são achados não constantes. Ocorre hipersensibilidade da hipófise devido ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual causa aumento dos níveis de LH, sendo que esta hipersensibilidade anormal pode decorrer do hiperestrogenismo que acompanha a síndrome (estrone e estradiol livre aumentados)<sup>14</sup>. O aumento do LH provoca hiperplasia do estroma ovariano, com conseqüente hiperandrogenismo, o que dificulta a ovulação<sup>15</sup>. Os níveis de LH plasmáticos são diretamente proporcionais ao grau de resistência à insulina, pela atuação do IGF-I e da insulina no hipotálamo e hipófise. Dos androgênios, incluindo a androstenediona e a dehidroepiandrosterona, é freqüente o incremento dos níveis de testosterona, principalmente na forma livre, uma vez que a síntese hepática de SHBG está diminuída devido à ação dos androgênios e da insulina<sup>15</sup>.

O aspecto morfológico dos ovários está alterado; acham-se aumentados de volume, bilateralmente, de coloração branco-nacarada, com cápsula espessa, lisa e avascular. Inúmeros folículos, em número de 20 ou mais, com

diâmetro variável (1-15 mm) dispõem-se na região subcapsular <sup>16</sup>. Ocorrem graus variáveis de hiperplasia do estroma e os folículos encontram-se em estágios iniciais de maturação.

O diagnóstico de SOP é clínico e de exclusão. No geral, as pacientes apresentam história clínica de anovulação crônica, com início logo após a menarca; sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ultrasonografia indicando aumento do volume dos ovários com imagens císticas periféricas e hiperecogenicidade do estroma ovariano<sup>17</sup>.

Para o restabelecimento da fertilidade, utilizam-se drogas indutoras da ovulação, tais como citrato de clomifeno, citrato de tamoxifeno, gonadotrofinas de mulheres menopausadas ou de gestantes, além de FSH humano purificado e os análogos do GnRH<sup>17,18</sup>. Na maioria dos casos, a droga de escolha é o clomifeno, que é um modulador seletivo do receptor de estrogênio, o qual promove aumento nos níveis de FSH e LH, maturação folicular, elevação dos níveis de estradiol, postura ovular e normalização da retroalimentação acíclica.

Em pacientes com SOP resistentes ao clomifeno, podem ser utilizadas drogas que diminuam os níveis de insulina, incluindo a metformina<sup>18,19</sup>, (quando este fator está ligado à síndrome). A sua utilização isolada promove a ovulação em 78% a 96% das pacientes. Quando associada ao clomifeno, a metformina aumenta as taxas de ovulação e gravidez em pacientes previamente não resistentes ao clomifeno.

Nas pacientes obesas, a perda de peso isolada é capaz de reverter os sinais e sintomas advindos do hiperandrogenismo<sup>23</sup>.

Alternativas terapêuticas para a irregularidade menstrual são substâncias que diminuem os níveis de insulina; também neste caso, a metformina é

bastante estudada e apresenta bons resultados na melhoria da ciclicidade menstrual<sup>18,19</sup>, mas com ação menos pronunciada sobre o peso corpóreo.

A terapêutica cirúrgica fica reservada tão somente aos casos em que falharam as tentativas clínicas para a indução da ovulação<sup>17</sup>.

Entretanto, mudanças nos hábitos de vida têm papel fundamental e previnem as repercussões da síndrome a longo prazo. A perda de peso favorece a redução dos níveis androgênicos, melhora o perfil lipídico e diminui a resistência periférica à insulina, contribuindo para o retorno dos ciclos ovulatórios e para prevenção do diabetes e de doenças cardiovasculares<sup>20,21</sup>. Perda de peso de 5 a 10% pode ser suficiente para restabelecer a função ovariana e melhorar a resposta à indução da ovulação<sup>43</sup>. O fluxo aumentado de ácidos graxos livres, quando da presença do pico pós-prandial de glicose, leva ao aumento da síntese hepática de triglicerídeos, com produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e redução dos níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Apesar do uso da metformina ter demonstrado resultados positivos na regularização do ciclo menstrual<sup>22</sup>, e assim contribuir para a redução do risco de câncer de endométrio, ainda necessita de estudos mais aprofundados.

Outro achado constante em pacientes com SOP é a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória<sup>12,17,23</sup>, a qual está presente em cerca de 75% das mulheres obesas, mas que também acomete ao redor de 50% dos casos com índice de massa corpórea normal. A obesidade costuma ser do tipo central, em maçã. A circunferência abdominal, na altura do umbigo, é igual ou maior a 80 cm e está presente em 70% das pacientes. O aumento da relação cintura-quadril traduz massa de gordura central, correlacionando-se

diretamente com a resistência à insulina<sup>45</sup>. A resistência à insulina representa condição na qual a concentração de insulina “normal” não produz um efeito biológico adequado. Nessa situação, as células beta-pancreáticas são capazes de elevar a síntese de insulina para compensar a resistência à sua utilização periférica. Somando-se a isso, ocorre também decréscimo de depuração hepática, culminando com a hiperinsulinemia. A resistência insulínica está aumentada freqüentemente nas pacientes obesas, mas, alguns autores, estratificando pacientes com SOP em obesas e não obesas demonstraram que a hiperinsulinemia independe da obesidade, porém, é agravada por ela<sup>40</sup>.

Os mecanismos pelos quais a resistência periférica à insulina e a hiperinsulinemia levam à anovulação ainda são pouco esclarecidos. Sabe-se que a hiperinsulinemia aumenta a secreção androgênica pelas células da teca no estroma ovariano<sup>46</sup>, atuando sinergicamente com o LH, aumentando a produção de androgênios pelas células tecais devido à maior ligação da insulina aos receptores de IGF-I no estroma e com o hormônio de crescimento.

A literatura descreve modelo experimental de ovários polimicrocísticos em camundongas obesas diabéticas com resistência à insulina<sup>24</sup>. O fato desses animais exibirem obesidade, resistência à insulina e infertilidade demonstra sua habilidade como modelo experimental para policistose ovariana.

Atualmente, tem sido motivo de discussões o papel da leptina na infertilidade de camundongas obesas<sup>25</sup>. É um hormônio secretado pelo tecido adiposo<sup>26</sup> e pela placenta<sup>27,28</sup>, sendo que sua administração é capaz de regular o peso corporal e o metabolismo da glicose, restituindo, dessa maneira, a fertilidade de camundongas obesas e inférteis<sup>29,30</sup>. *Mounzih* e cols, em 1997 sugerem em seu trabalho, com machos, que o tratamento com leptina corrige a

infertilidade, efeito este mediado, pelo menos em parte, pela normalização do peso testicular, da espermatogênese e morfologia das células de Leydig<sup>30</sup>. Além disso, a leptina restaura o peso corporal normal em camundongos, como também a fertilidade em fêmeas adultas<sup>35</sup>. A literatura cita que pacientes com deficiência de leptina também podem ser tratadas com leptina recombinante, com sucesso<sup>31,32</sup>.

A leptina, proteína pequena com 167 resíduos de aminoácidos e 16 KDa, possui importante papel no balanço energético, apresentando duas ações: a primeira em neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico, onde estimula a expressão de neuropeptídeos ligados aos mecanismos de inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético total, via inervação simpática; a segunda, em outros neurônios do mesmo núcleo, inibindo a expressão do neuropeptídeo Y e *agouti*, envolvidos nos mecanismos de ingestão alimentar e redução do gasto energético<sup>47</sup>.

Além do tratamento convencional por meio da injeção de leptina para corrigir a obesidade, há a possibilidade de utilizar o transplante de tecido adiposo, o qual provocaria a liberação fisiológica desse hormônio. Sabe-se que o transplante de tecido adiposo de camundongas normais melhora as anormalidades metabólicas de camundongas com lipodistrofia<sup>33,34</sup>. Estudo recente utilizando protocolo longo, por até 40 semanas, demonstrou que camundongas obesas transplantadas com tecido adiposo de animais com peso normal tiveram modificações múltiplas em seu fenótipo, incluindo redução de peso corpóreo, prevenção da obesidade, normalização nos níveis de insulina e nos testes de tolerância à insulina, prevenção da elevação de corticosteróides e restauração da fertilidade<sup>35</sup>.

Portanto, a técnica de transplante de tecido adiposo como alternativa ao tratamento hormonal, se mostrou efetiva tanto na prevenção quanto na terapia de camundongas obesas, no que diz respeito à lipodistrofia e alguns tipos de obesidade. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos precoces, ou seja, a curto prazo, desse procedimento em camundongas obesas e inférteis. Daí a necessidade de se realizarem estudos intensivos no sentido de avaliar, histologicamente, os aspectos ovarianos e uterinos desses animais.

Tendo em vista as poucas informações na literatura relativas ao comportamento do transplante de tecido adiposo em camundongas obesas, e considerando ser este modelo animal eficiente, propusemo-nos a realizar o presente estudo.

## Proposição

Propõe-se, no presente estudo, a avaliar os efeitos bioquímicos e histomorfológicos do tratamento com transplante de tecido adiposo, após 7, 15 e 45 dias, sobre os ovários e o útero de camundongas obesas e anovuladoras.

### Para Tanto, avaliar-se-á:

- 1) A glicemia e o peso corporal.
- 2) Os aspectos histomorfológicos dos ovários e do útero.
- 3) A ação do transplante de tecido adiposo gonadal em camundongas obesas, a partir de camundongas isogênicas magras doadoras, após períodos precoces de 7 e 15 dias e após longo período de 45 dias, sobre:
  - A polimicrocistose ovariana;
  - A obesidade e a hiperinsulinemia.

## **Material e Métodos**

### **Grupos Experimentais**

Foram utilizadas camundongas obesas (B6. *V-Lep<sup>ob</sup>/J*, n=30) e com peso normal (B6. *V-Lep<sup>ob</sup>/J*, n=5), oriundas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP-EPM, com idade entre 2 e 3 meses. Trata-se de animais geneticamente modificados. Estas camundongas B6. *V-Lep<sup>ob</sup>/J*, denominadas *ob/ob*, são deficientes do gene para leptina e, por essa razão, desenvolvem obesidade e hiperinsulinemia. Este protocolo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP-EPM, sob a inscrição 0508/07.

Os animais foram mantidos no biotério do CEDEME durante o protocolo experimental, com temperatura controlada e ciclo claro-escuro, tendo livre acesso a água de torneira e ração padrão para camundongas (Purina®, São Paulo, Brasil).



Deste modo, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

1) Grupo Controle: Representado por 5 camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J com peso normal, com idade entre 2 e 3 meses, utilizadas como controle dos parâmetros bioquímicos e histológicos avaliados, e doadoras do tecido adiposo para os grupos que receberam o transplante. Estes animais foram sacrificados após a separação dos grupos.

2) Grupo Obesidade: composto por 6 camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J obesas, com idade entre 2 e 3 meses.

3) Grupo Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 7 dias: formado por 5 camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J obesas, com idade entre 2 e 3 meses, que receberam transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas com peso normal isogênicas. O volume médio de tecido adiposo gonadal coletado de 3 ou 4 doadoras foi de aproximadamente 1g, os quais foram transplantados na região dorsal de cada receptora devidamente anestesiada com quetamina e xilasina. Após 7 dias de transplante, os animais foram sacrificados.

4) Grupo Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 15 dias: constituído por 9 camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J obesas, com idade entre 2 e 3 meses, que receberam transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas com peso normal isogênicas. O volume médio de tecido coletado de 3 ou 4 doadoras foi de aproximadamente 1g, os quais foram transplantados na região dorsal de cada receptora

devidamente anestesiada com quetamina e xilasina. Após 15 dias de transplante, os animais foram sacrificados.

5) Grupo Obesidade + Transplante de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal após 45 dias: composto por 7 camundongas B6.V-*Lep<sup>ob</sup>*/J obesas, com idade entre 2 e 3 meses, que receberam transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas com peso normal isogênicas. O volume médio de tecido adiposo gonadal coletado de 3 ou 4 doadoras foi de aproximadamente 1g, os quais foram transplantados na região dorsal de cada receptora devidamente anestesiada com quetamina e xilasina. Após 45 dias de transplante, os animais foram sacrificados.

### Peso Corporal

O peso corporal foi aferido antes e depois de cada tratamento, e no dia do sacrifício do animal. Foi utilizada balança com capacidade de 2610g e precisão de 1g (Labortex ®). Este parâmetro foi usado para análise do ritmo de crescimento dos animais.

### Glicemia

Amostras de sangue foram obtidas a partir da artéria caudal dos animais e utilizadas para a determinação do nível de glicemia, através de tiras reativas detectadas pelo aparelho ACCU-CHEK ® Sensor (Califórnia, EUA).

## Análise Histomorfológica

Após a retirada, os ovários e o útero foram cortados em fragmentos simétricos, mantidos em formol a 10% para posterior montagem em blocos de parafina. O tecido foi cortado na espessura de 5µm e montado em lâminas silanizadas. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (H/E) e analisadas em microscópio óptico de luz Carl Zeiss, com oculares 4X, 10X e 40X.

## Método Estatístico

Os resultados foram apresentados em forma de média  $\pm$  erro padrão ( $X \pm EP$ ). As diferenças estatísticas foram identificadas pelo test-t ou pela análise de variância (ANOVA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## Resultados

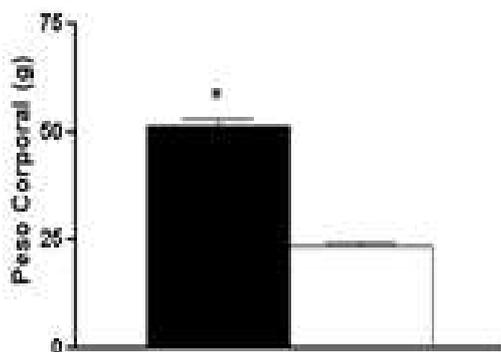
O grupo Obesidade apresentou durante a observação, elevação no peso corporal e no nível de glicemia em relação ao grupo controle (camundongas com peso normal) mostrando haver diferença significativa. (Tabela 1 e Gráficos 1A e 1B).

Tabela 1: Peso Corporal e Glicemia dos Animais dos Grupos Controle e Obesidade.

	<b>Peso Corporal (g)</b>	<b>Glicemia (mg/dl)</b>
Controle (n=5)	24,0 ± 0,7	100,2 ± 2,2
Obesidade (n=6)	52,0 ± 1,3*	418,4 ± 33,0*

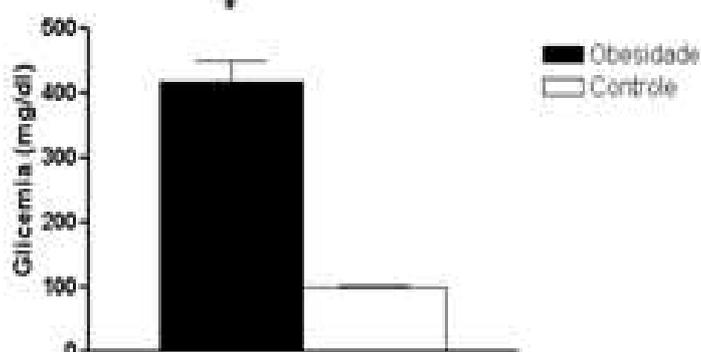
\* p<0,0001 vs. Controle

Gráfico 1 A – Peso Corporal



\*  $p < 0,0001$  vs. Controle

Gráfico 1 B - Glicemia



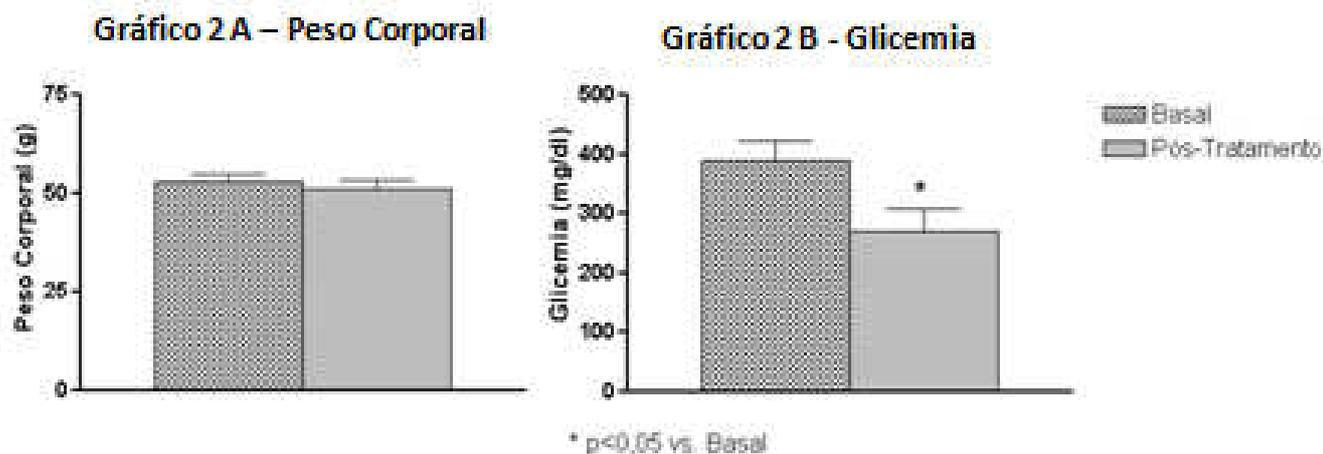
\*  $p < 0,0001$  vs. Controle

O transplante de tecido adiposo gonadal, no grupo Obesidade, mostrou, após 7 dias (Tx 7), ser eficaz na redução da glicemia, porém, não modificou o peso corporal (Tabela 2 e Gráficos 2A e 2B).

Tabela 2: Peso Corporal e Glicemia dos animais do grupo Obesidade, após 7 dias de transplante.

	Peso Corporal (g)	Glicemia (mg/dl)
Basal	53,0 ± 2,0	390,2 ± 34,0
Pós Tx 7 dias	51,0 ± 3,0	270,0 ± 38,0*

\* $p < 0,05$  vs Basal

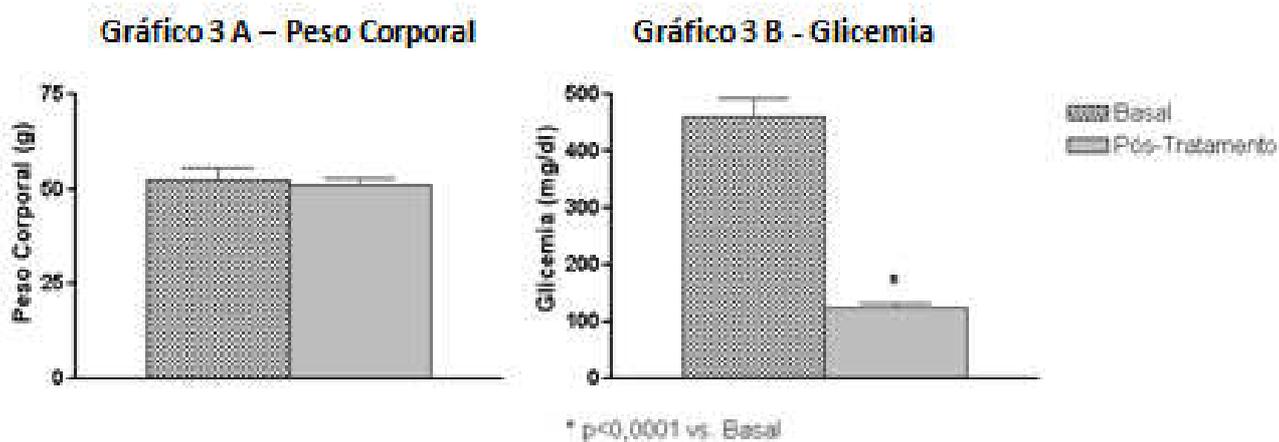


De igual modo, o transplante de tecido adiposo gonadal, no grupo Obesidade mostrou, após 15 dias (Tx 15), ser eficaz na redução da glicemia, porém, não modificou o peso corporal. (Tabela 3 e Gráficos 3A e 3B).

Tabela 3. Peso Corporal e Glicemia dos Animais do grupo Obesidade, após 15 dias de transplante.

	<b>Peso Corporal (g)</b>	<b>Glicemia (mg/dl)</b>
Basal	52,4 ± 3,0	460,0 ± 31,4
Pós Tx 15 dias	51,2 ± 2,0	125,0 ± 8,4*

\*p<0,0001 vs Basal



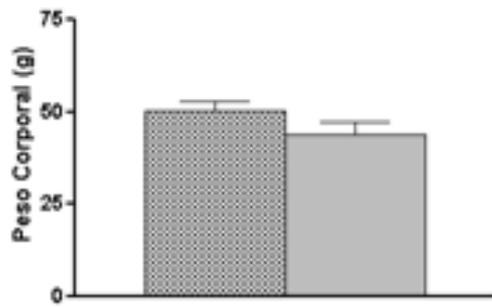
Já o transplante de tecido adiposo gonadal no grupo Obesidade mostrou, após 45 dias (Tx 45), ser eficaz na redução da glicemia, assim como houve uma tendência à diminuição do peso corpóreo. (Tabela 4 e Gráficos 4A e 4B).

Tabela 4: Peso Corporal e Glicemia dos Animais do grupo Obesidade, após 45 dias de transplante.

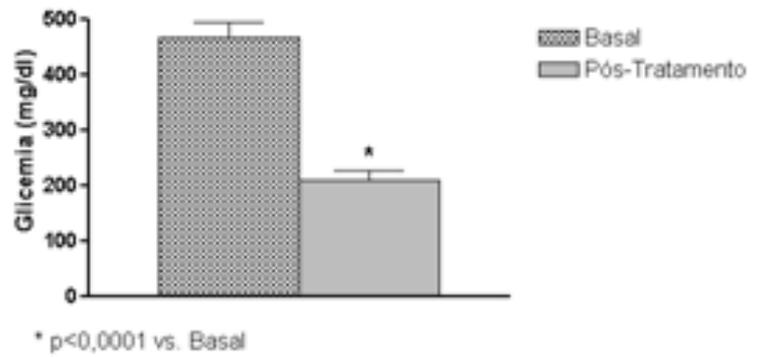
	<b>Peso Corporal (g)</b>	<b>Glicemia (mg/dl)</b>
Basal	50,4 ± 2,4	467,0 ± 28,0
Pós Tx 45 dias	44,0 ± 3,3	209,0 ± 18,0*

\* $p < 0,0001$  vs Basal

**Gráfico 4 A – Peso Corporal**



**Gráfico 4 B - Glicemia**



Histologicamente, nos ovários dos animais Controle, encontramos pequeno número de folículos periféricos, que se degeneram e se transformam em células intersticiais. ( Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

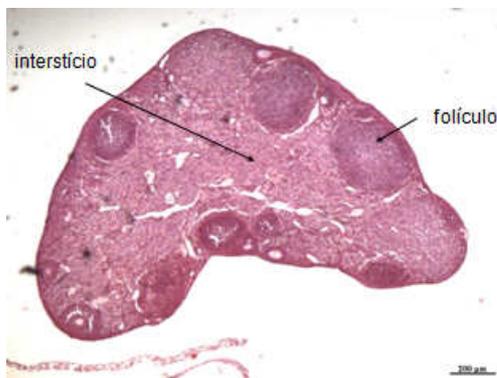


Figura 1: Ovário Controle, HE,4x.



Figura 2: Ovário Controle, HE,4x.

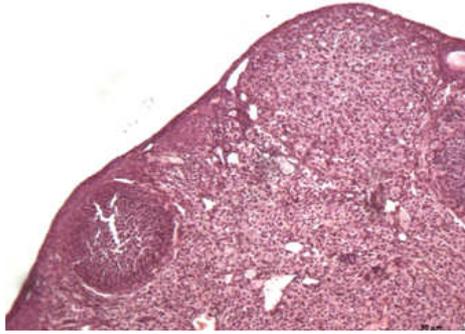


Figura 3: Ovário Controle, HE, 10x.

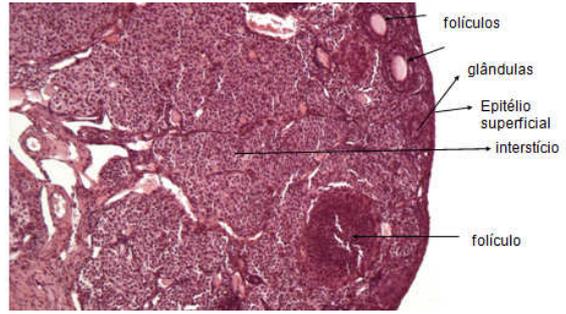


Figura 4: Ovário Controle, HE, 10x.

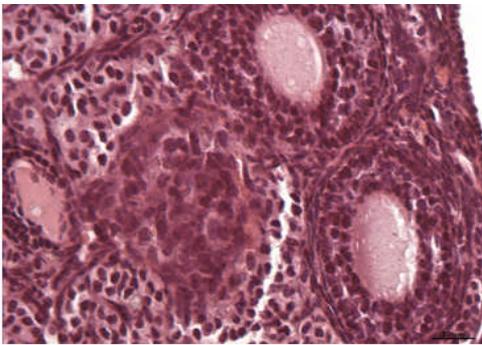


Figura 5: Ovário Controle, HE, 40x.

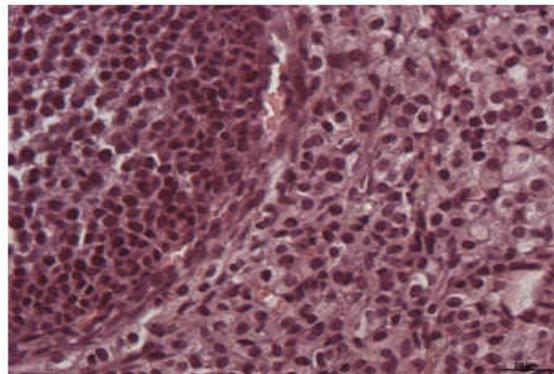


Figura 6: Ovário Controle, interstício, HE, 40x.

Nos ovários dos animais obesos, notamos grande quantidade de folículos e ausência de corpo lúteo, bem como útero de menor tamanho e com raros eosinófilos. (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11).

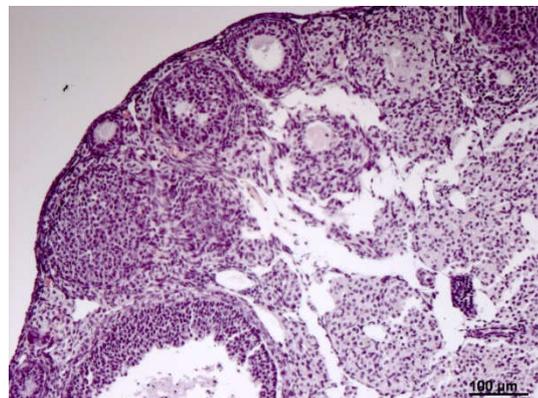
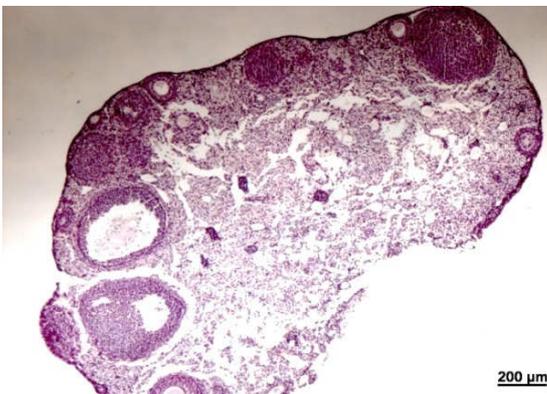


Figura 7: Ovário de Animal Obeso, HE, 4X  
10X

Figura 8: Ovário de Animal Obeso, HE,

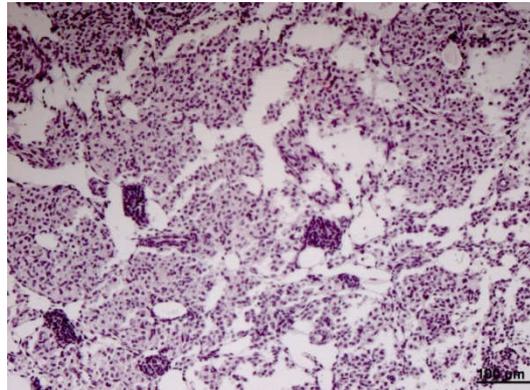


Figura 9: Ovário de Animal Obeso, HE, 40X

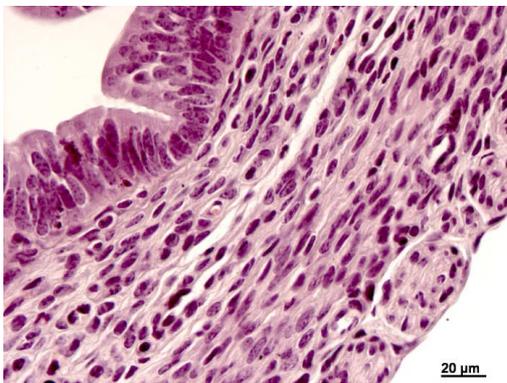


Figura 10: Útero de Animal Obeso, HE, 10X

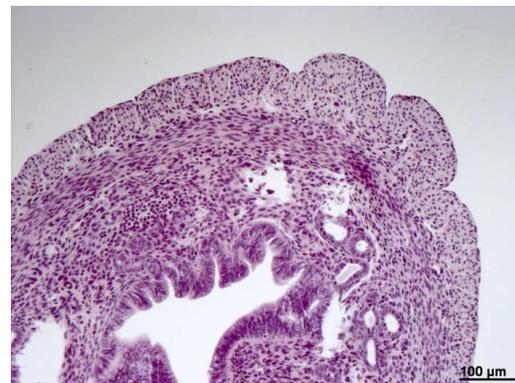


Figura 11: Útero de Animal Obeso,

HE, 4X

Após 7 dias de transplante de tecido adiposo, os ovários apresentavam padrão ainda muito parecido com os das obesas, com presença de inúmeros folículos degenerados, interstício abundante e ausência de corpo lúteo. (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).

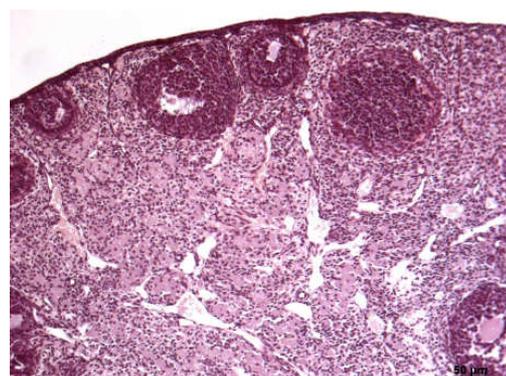


Figura 12: Ovário 7 dias pós Tx, HE, 4x  
10x

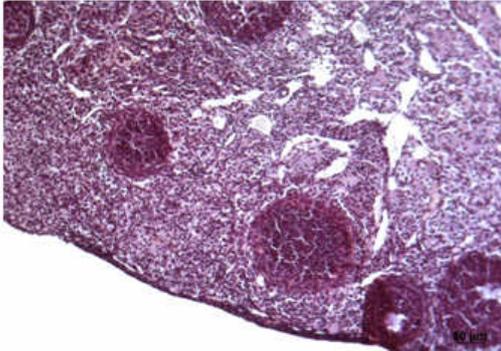


Figura 14: Ovário 7 dias pós Tx, HE, 10x  
40x

Figura 13: Ovário 7 dias pós Tx, HE,

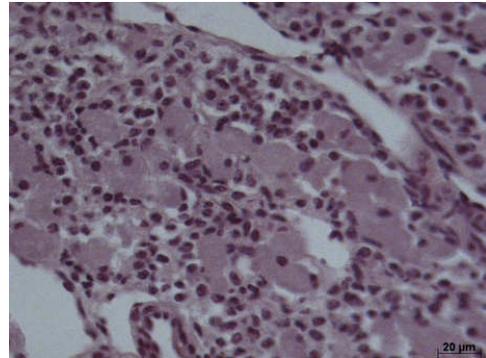


Figura 15: Ovário 7 dias pós Tx, HE,

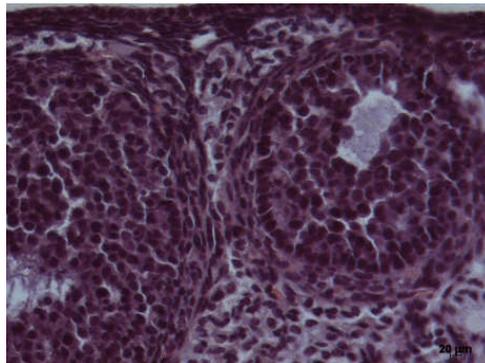


Figura 16: Ovário 7 dias pós Tx, HE, 40X

Após 7 dias de transplante de tecido adiposo, no que diz respeito à histologia do útero, o epitélio superficial mostrava-se íntegro e bem desenvolvido. Notava-se, ainda, presença de muitas figuras de mitoses e raros eosinófilos. Neste tempo pós-transplante, já há muita semelhança com o útero das obesas. (Figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22).



Figura 17: Útero 7 dias pós Tx, HE, 4x.



Figura 18: Útero 7 dias pós Tx, HE,



Figura 19: Útero 7 dias pós Tx, HE, 10x.

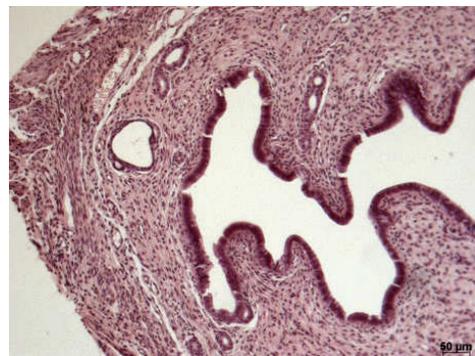


Figura 20: Útero 7 dias pós Tx, HE,

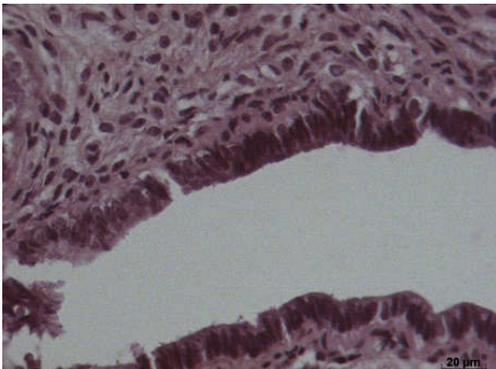


Figura 21: Útero 7 dias pós Tx, HE, 40x.

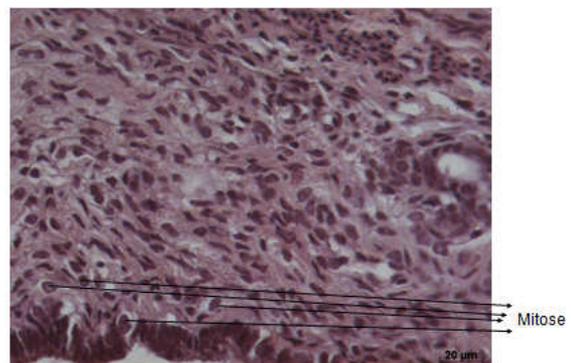


Figura 22: Útero 7 dias pós Tx, HE, 40x.

Após 15 dias de transplante de tecido adiposo, evidenciou-se não ter havido regressão das alterações do quadro ovariano. (Figuras 23 e 24).

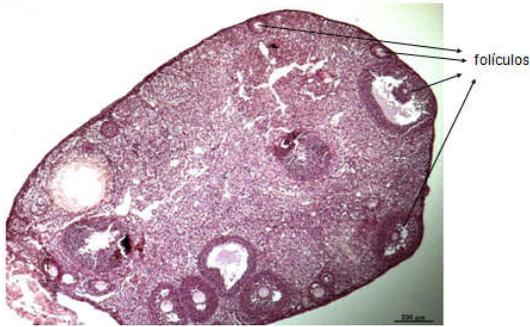


Figura 23: Ovário 15 dias pós Tx, HE, 10x.

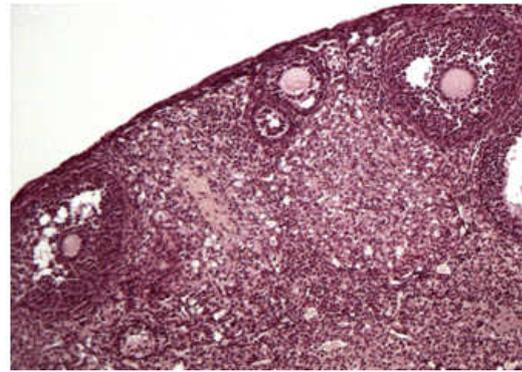


Figura 24: Ovário 15 dias pós Tx, HE, 10x.

Após 15 dias de transplante de tecido adiposo, a análise histológica do útero também não revelou mudanças significativas. No entanto, em algumas áreas, o epitélio apresentava-se super-estimulado, com maior presença de leucócitos em relação ao período de 7 dias pós transplante, evidenciando haver alto nível de estrógeno, com glândulas bem estimuladas.( Figuras 25, 26, 27, 28, 29 e 30).

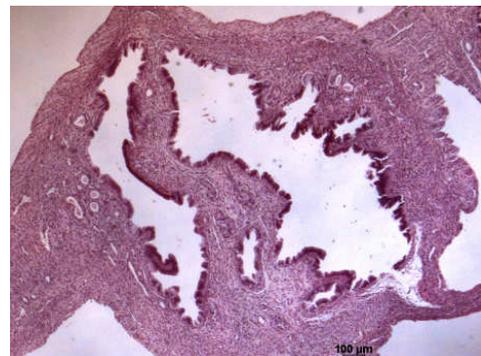
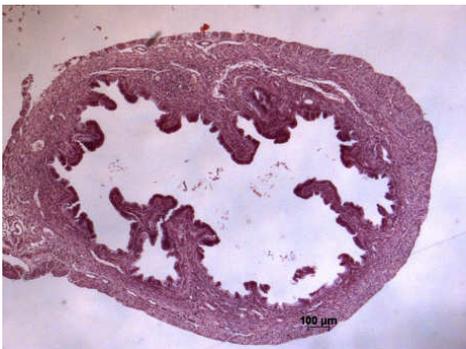


Figura 25: Útero 15 días pós Tx, HE, 4x.  
HE,4x.

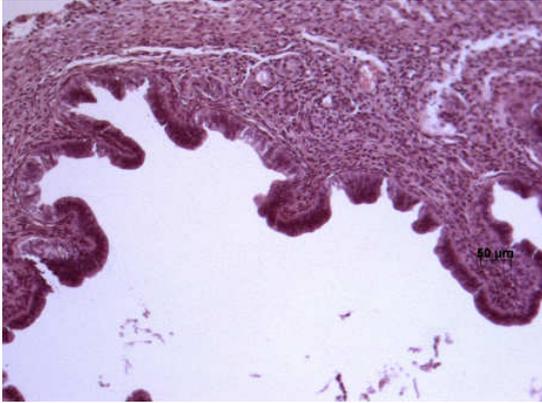


Figura 26: Útero 15 días pós Tx,

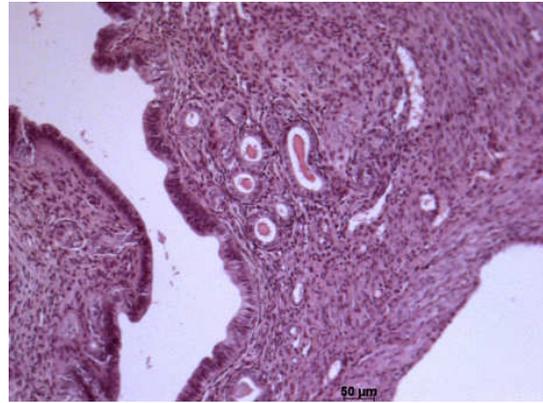


Figura 27: Útero 15 días pós Tx, HE, 10x.  
10x.

Figura 28: Útero 15 días pós Tx, HE,

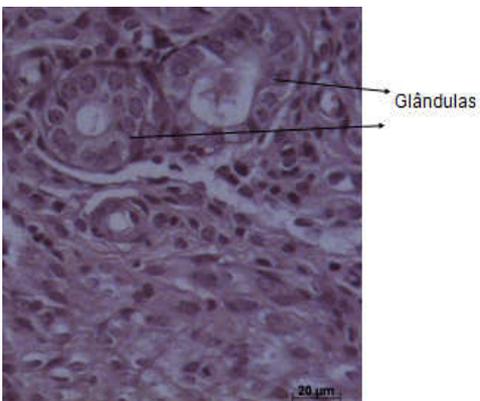
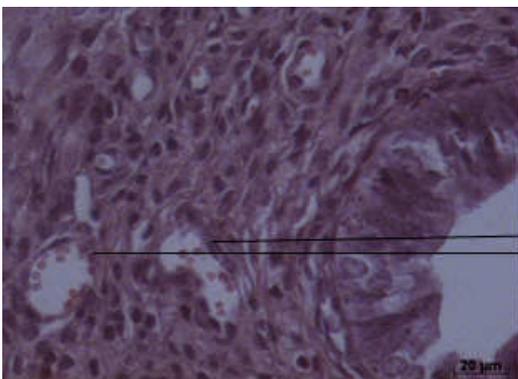


Figura 29: Útero 15 dias pós Tx, HE, 40x.  
40x.

Figura 30: Útero 15 dias pós Tx, HE,

Após 45 dias de transplante de tecido adiposo, os ovários mostravam reduzida quantidade de folículos e observou-se a presença de corpos lúteos, características estas muito semelhantes às dos animais do grupo controle, indicando ter havido o restabelecimento da ovulação. (Figuras 31, 32, 33, 34, e 35).

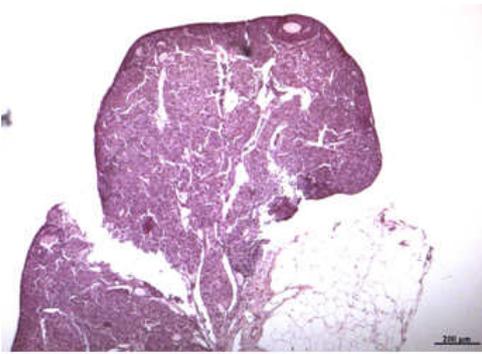


Figura 31: Ovário 45 dias pós Tx, HE, 4x.  
HE,4x.

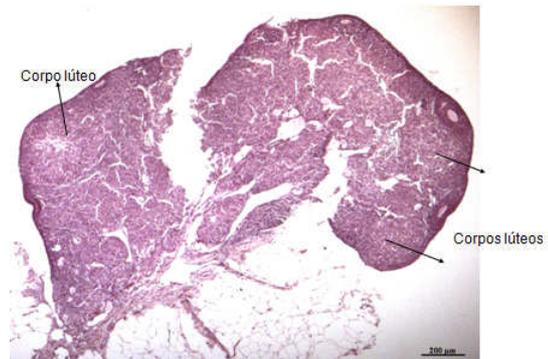


Figura 32: Ovário 45 dias pós Tx,



Figura 33: Ovário 45 dias pós Tx, HE,10x.  
HE,10x.

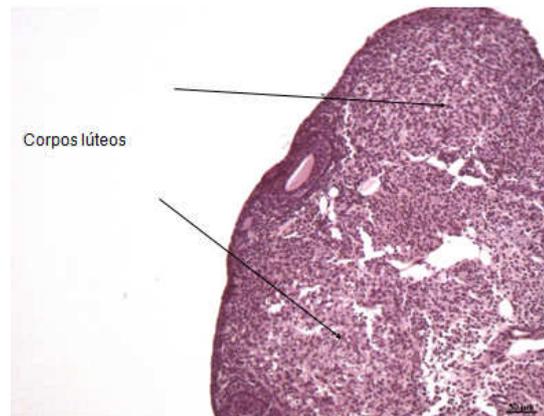


Figura 34: Ovário 45 dias pós Tx,

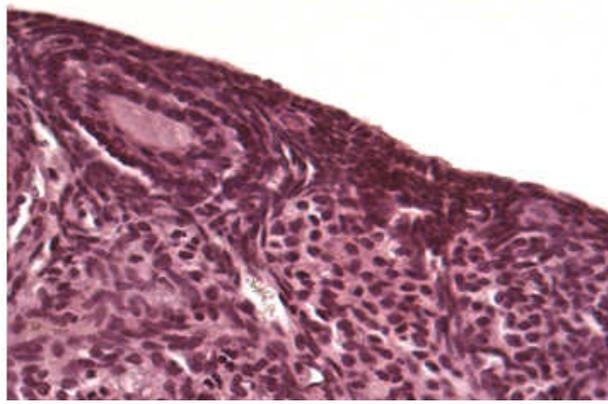


Figura 35: Ovário 45 dias pós Tx, HE, 40x.

No que diz respeito à histologia dos úteros, com o transplante de tecido adiposo, após 45 dias, notou-se a presença de inúmeros leucócitos no endométrio, sinalizando o restabelecimento do controle hormonal. Ocorreu renovação epitelial superficial, típico da fase de estro. (Figuras 36, 37, 38, 39, 40, 41, e 42).



Figura 36: Útero 45 dias pós Tx, HE, 4x.

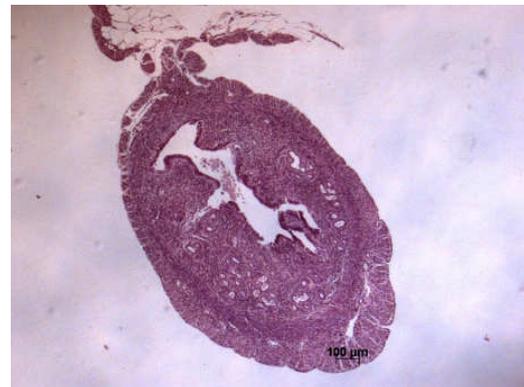


Figura 37: Útero 45 dias pós Tx, HE, 4x.

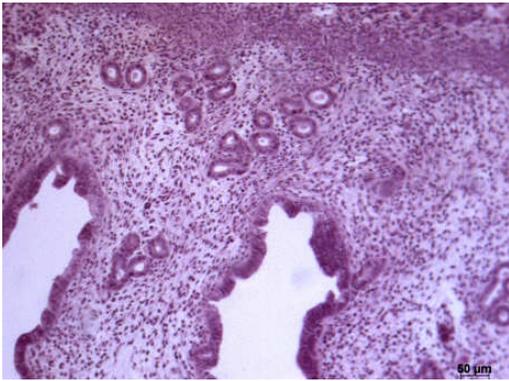


Figura 38: Útero 45 dias pós Tx, HE,10x.  
HE,10x.

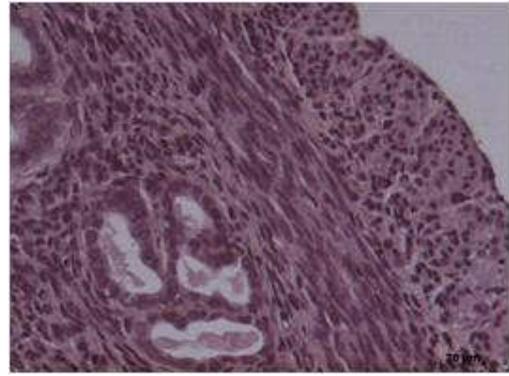


Figura 39: Útero 45 dias pós Tx,

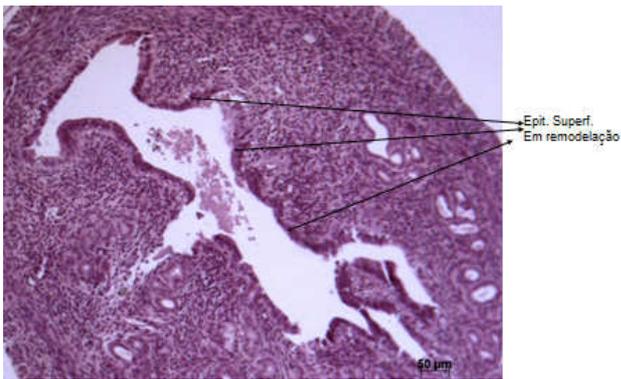


Figura 40: Útero 45 dias pós Tx, HE,10x.  
40x.

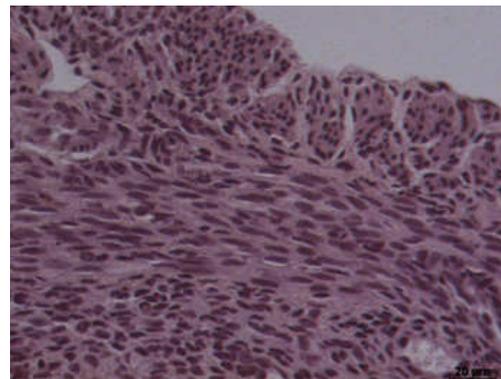


Figura 41: Útero 45 dias pós Tx, HE,

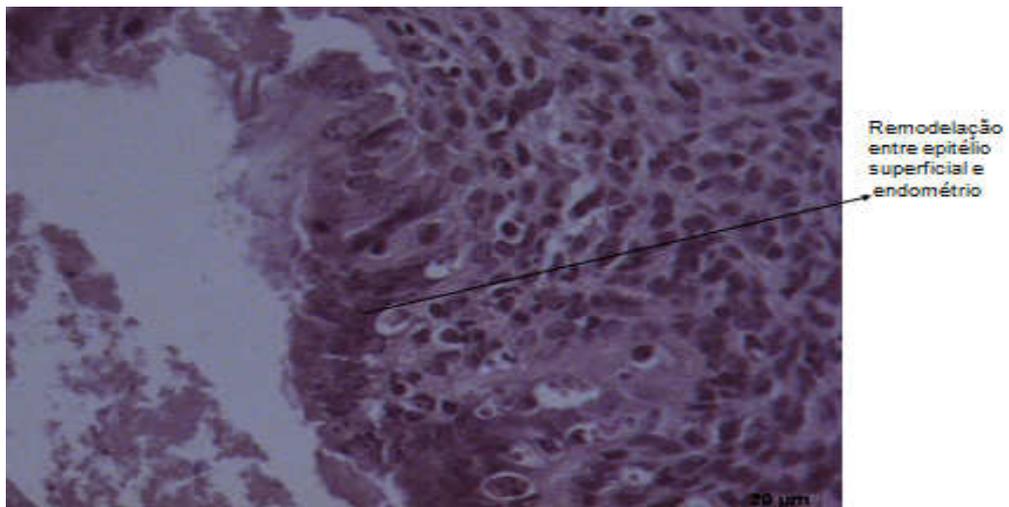
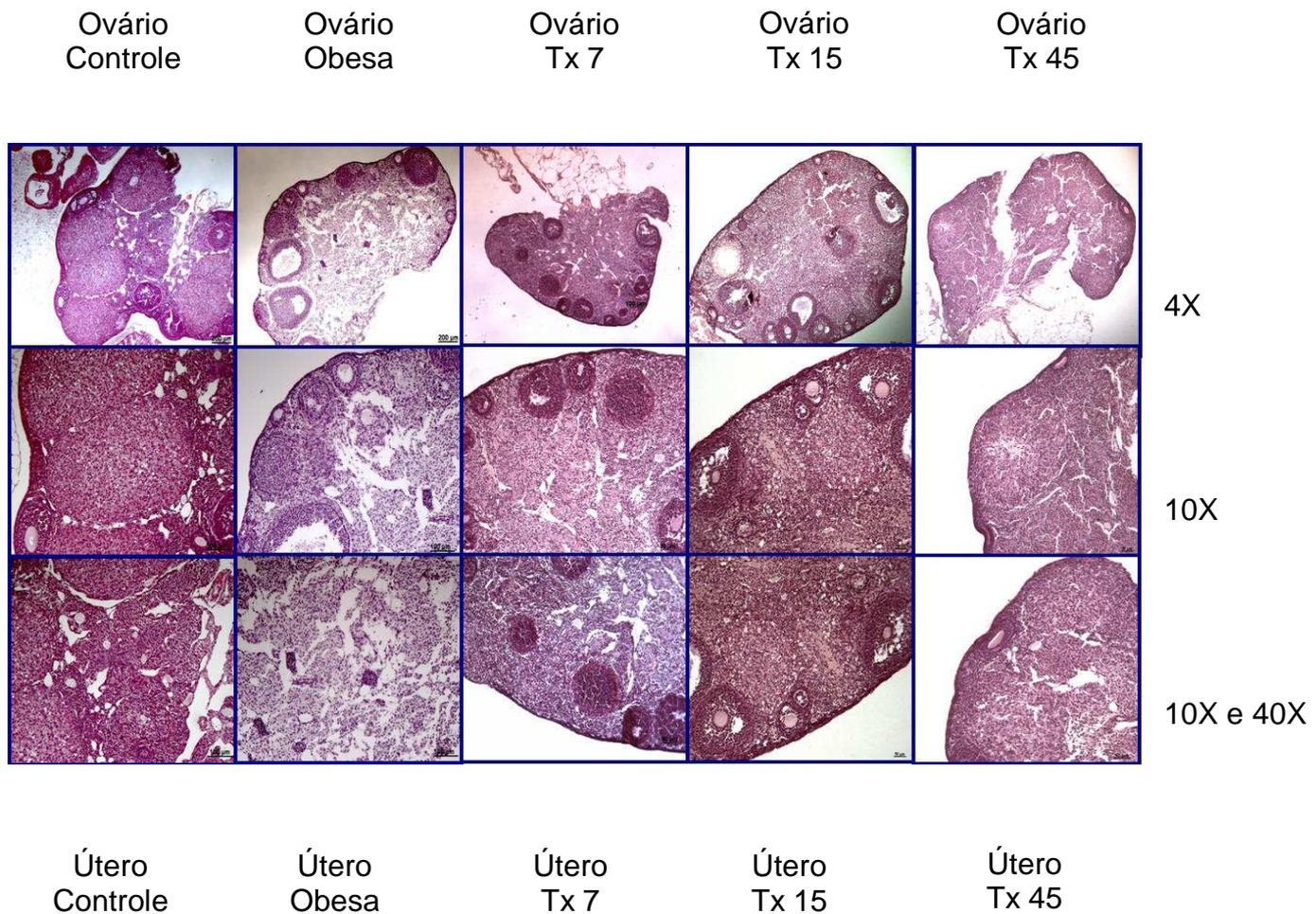


Figura 42: Útero 45 dias pós Tx, HE, 40x.

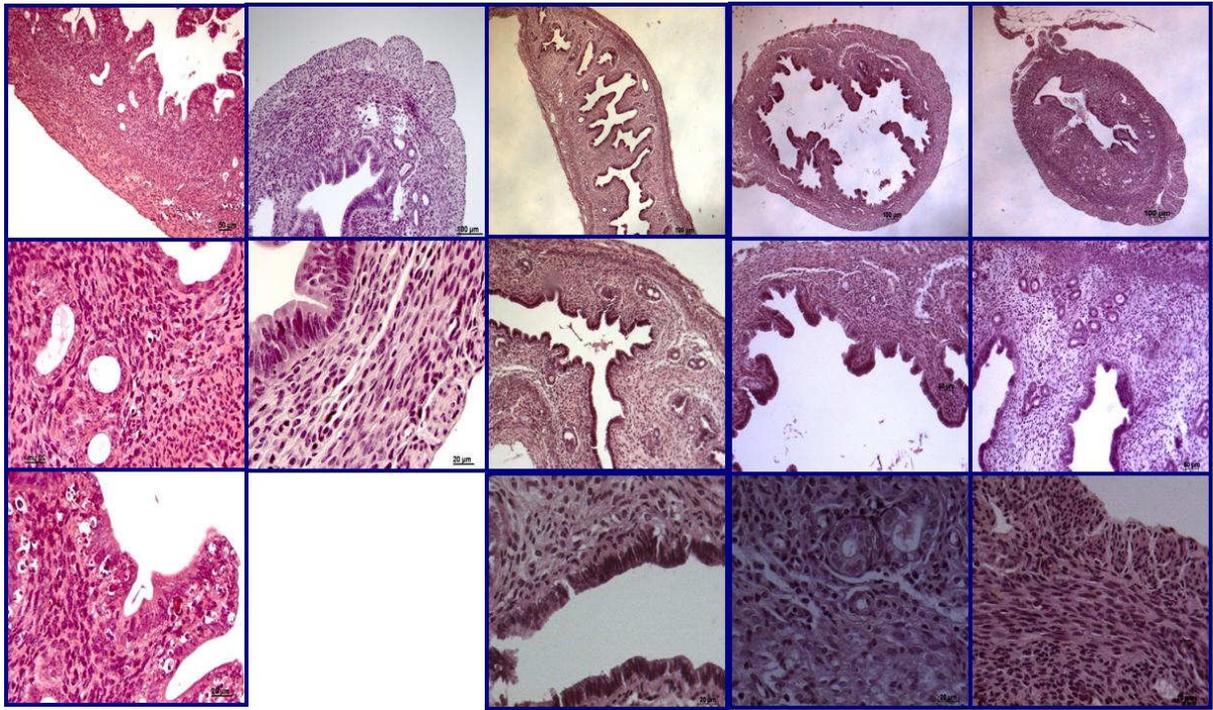
Revela-se no Quadro 1, a síntese dos aspectos histomorfológicos dos ovários e do útero das camundongas estudadas.

Quadro 1: Aspectos Histomorfológicos dos Ovários e do Útero dos animais estudados



4X

10X



## DISCUSSÃO

O modelo animal proposto no presente trabalho mostrou que as camundongas obesas utilizadas neste protocolo apresentaram características semelhantes às da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), incluindo obesidade, inúmeros polimicrocistos ovarianos, anovulação crônica e infertilidade, além de hiperglicemia constante. Estes fatores, quando associados, favorecem o desenvolvimento de câncer de endométrio e de doenças cardiovasculares, assim como alterações no metabolismo da glicose e risco precoce para o desenvolvimento e estabelecimento de “diabetes mellitus”.

A SOP é a desordem endócrina mais comum entre as mulheres em idade reprodutiva, caracterizada por ciclos anovulatórios, infertilidade e hiperandrogenismo, com perda de ciclicidade funcional, além de frequentemente haver a presença de obesidade. Em 2003, o consenso de Rotterdam, na Holanda<sup>44</sup>, propôs, como critérios diagnósticos, ciclos espaniomenorréicos ou amenorréia (anovulação crônica), sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo, além de ovários policísticos (presença ao exame ecográfico de 12 ou mais folículos entre 2 e 9mm de diâmetro médio ou volume ovariano de 10 cm<sup>3</sup> ou mais)<sup>37</sup>.

O fator obesidade em humanos, muitas vezes, inclui circunferência abdominal maior ou igual a 80 cm, o qual tem relação importante com o desenvolvimento de resistência periférica à insulina. Este fator está presente, de maneira proporcional, nas camundongas usadas neste trabalho, como pode ser observado na imagem contida na seção de Material e Métodos. Legro e cols<sup>38</sup> relataram que aproximadamente 50 a 70% das mulheres com SOP apresentavam resistência periférica à insulina, o que agravava o quadro de

hiperandrogenismo. É importante salientar que mulheres com SOP e hiperinsulinemia podem apresentar-se com peso normal, porém, 44% delas têm obesidade<sup>41</sup>.

No presente estudo, pudemos comprovar, pelo modelo experimental proposto, que a camundonga geneticamente modificada, com ausência do gene para leptina, desenvolve obesidade, ovários polimicrocísticos com padrão de anovulação e infertilidade, além da presença de hiperglicemia/hiperinsulinemia e resistência periférica à insulina. Por esta razão, realizamos o transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas doadoras com peso normal para receptoras obesas, avaliando a repercussão sobre a glicemia e o peso corporal, além da análise histomorfológica do útero e dos ovários, após 7, 15 e 45 dias do procedimento (Tx).

Com relação à glicemia, houve retorno aos níveis glicêmicos de referência, ou então redução significativa após todos os períodos de Tx avaliados, demonstrando, assim, provável melhora na resistência periférica à insulina. No que diz respeito ao peso corporal das camundongas obesas transplantadas, notamos tendência à redução somente após o período mais longo de Tx, ou seja, após 45 dias. Como os animais envolvidos no experimento tinham idade entre 2 e 3 meses (período em que se encontravam na mesma fase reprodutiva), há a possibilidade de termos utilizado animais que estavam no início do segundo mês de vida, e outros no final do terceiro mês, o que pode ter propiciado um erro padrão relativamente alto para as médias de peso corporal encontradas. Tal fato justificaria, pelo menos em parte, termos obtido resultados não significantes, isto é, tendência à redução de peso corporal, após 45 dias de Tx.

Alguns autores têm relacionado a regulação de peso corporal e do metabolismo da glicose, à ação principal da leptina<sup>49,50</sup>. O tratamento com leptina melhorou anormalidades metabólicas em camundongos mutados para o gene da leptina, incluindo hiperfagia, resistência à insulina e diabetes<sup>33</sup>, além de lipodistrofias<sup>34</sup>. Esta atuação é explicada, pelo menos em parte, através da ligação da leptina aos seus receptores hipotalâmicos, reduzindo o apetite e a ingestão alimentar<sup>67,68</sup>. Mounzih e cols.<sup>30</sup> descrevem, em seu trabalho, que seria a administração de leptina que restauraria a adiposidade, a resistência à insulina e a fertilidade, e não a restrição calórica ou a perda de peso. Há, ainda, a ação da adiponectina como agente sensibilizante à insulina, a qual reduz a produção de glicose hepática e aumenta a ação da insulina no fígado<sup>51,55</sup>.

Sabidamente, o tecido adiposo contém os adipócitos, os quais possuem propriedades metabólicas, incluindo a capacidade de produzir hormônios. Atuam em processos fisiológicos e fisiopatológicos. A literatura descreve o seu envolvimento em processos como obesidade, “diabetes mellitus” tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemias, aterosclerose e inflamações agudas e crônicas, entre outros<sup>58</sup>. Além dos adipócitos, o tecido adiposo também contém uma matriz de tecido conjuntivo, constituída de fibras colágenas e reticulares, tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes, incluindo leucócitos e macrófagos, além de fibroblastos e pré-adipócitos<sup>48</sup>. Como principal reservatório energético do organismo, o tecido adiposo atua de maneira endócrina e parácrina, produzindo substâncias pró e antiinflamatórias, as chamadas adipocinas. Dentre elas, estão a leptina, a adiponectina e a resistina<sup>60</sup>. Atualmente tem sido alvo de constante interesse por parte dos pesquisadores a ligação entre excesso de tecido adiposo/obesidade,

resistência à insulina e as suas conseqüências sobre a fertilidade feminina, sob a óptica do papel desempenhado, primordialmente, pela leptina, seguido pela adiponectina e resistina<sup>52,53</sup>.

Outros fatores já estão bem descritos na literatura como presentes no estado de obesidade associado à resistência à insulina, e implicados na sua etiologia, incluindo elevados níveis séricos de proteína C reativa, interleucina 6 (IL-6), fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) e receptores nucleares como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- $\gamma$ )<sup>61,62</sup>. Porém, os mecanismos de ação que desregulam a ação da insulina sob níveis celulares e moleculares, associados à obesidade ainda permanecem obscuros.

Algumas sugestões foram aventadas sobre o papel da resistina e da adiponectina influenciando a ação da insulina e, potencialmente, atuando para a manutenção do fenótipo obesidade/resistência à insulina/infertilidade, uma vez que estas adipocinas modulam a homeostase da glicose e da gordura<sup>53,60</sup>.

Estudos utilizando roedores obesos mostraram níveis séricos elevados de resistina, entretanto, é comum a observação de níveis de expressão de RNAm para resistina diminuídos ou inalterados neste modelo, o que pode ser explicado por alterações na tradução ou pós-tradução dessa proteína, ou ainda por mudanças no seu clearance<sup>63</sup>. Trabalhos utilizando protocolo com indivíduos obesos ou com alto índice de massa corpórea (IMC) têm mostrado elevados níveis de expressão de resistina no tecido adiposo, assim como altos níveis séricos dessa proteína<sup>50,53,63</sup>.

Em contraste, dados revelam reduzidos níveis séricos e de expressão de RNAm para adiponectina, em tecido adiposo de indivíduos obesos<sup>64</sup>, assim como em trabalhos utilizando porcos<sup>65</sup> e roedores<sup>66</sup>.

Com relação à leptina, a literatura descreve aumento na sua produção e secreção associado à redução da quantidade de tecido adiposo em animais de experimentação<sup>69</sup>. Dentre as funções atribuídas à leptina, estão a redução na ingesta alimentar e manutenção da homeostase de energia; todavia, na obesidade, há o desenvolvimento de resistência à leptina, o qual resulta em disfunção do estado energético<sup>51,54,57</sup>.

Para melhor relacionar a ação das adipocinas anteriormente descritas, e a presença do fenótipo obesidade/resistência periférica à insulina levando à infertilidade, evidências suportam esta ligação sob 4 pontos de vista: a secreção das adipocinas pelo tecido adiposo e 1) seus efeitos centrais sobre o hipotálamo e pituitária, 2) seus efeitos periféricos sobre o ovário e o trato reprodutivo, 3) seus efeitos diretos sobre o oócito e o embrião, e ainda 4) seus efeitos durante a gestação. Sabidamente, os níveis de leptina, adiponectina e resistina na circulação e nos tecidos influenciam a síntese de hormônios sexuais, a puberdade e desordens reprodutivas, incluindo a SOP<sup>35</sup>.

No que diz respeito a alterações genéticas, a partir da década de 80 iniciaram-se os estudos que estabeleceram uma relação entre os níveis elevados de insulina e o hiperandrogenismo, os quais evidenciaram a ação da insulina e dos fatores insulinóides de crescimento 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) sobre o desenvolvimento do folículo ovariano<sup>39</sup> e sobre a estimulação da síntese de androgênios nas células da teca interna *in vitro*<sup>42</sup>. Em função desses estudos, sabe-se que a resistência insulínica caracteriza-se pela diminuição da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina, gerando importantes complicações metabólicas, incluindo o desenvolvimento de obesidade, e conseqüências malélicas sobre a fertilidade. Hamilton e cols<sup>45</sup> mostraram que

uma parcela significativa de mulheres inférteis ou subférteis são obesas ou estão acima do peso, apresentando disfunção menstrual e anovulação.

Em relação às análises histológicas nos animais analisados 7 e 15 dias pós-Tx, os ovários e o útero ainda apresentavam padrão anovulatório, sugerindo que períodos muito precoces de Tx são insuficientes e ineficientes para restaurar as alterações ovarianas e uterinas encontradas neste modelo.

No entanto, após 45 dias de Tx observou-se, claramente, o retorno das características histológicas normais do útero e dos ovários, com padrão ovulatório. Este dado sugere que após 45 dias de Tx houve normalização da sensibilidade à insulina e, provavelmente, dos níveis de corticosterona<sup>35</sup>, induzindo à fertilidade.

Reforçando os resultados encontrados no presente trabalho, Klebanov e cols<sup>35</sup> demonstraram que o Tx de tecido adiposo de camundongas doadoras com peso normal para camundongas obesas receptoras reverteu os níveis de glicemia de jejum, de resistência insulínica e o peso corporal. Com isso, normalizaram-se os níveis glicêmicos e de glicocorticóides, levando à fertilidade.

Juntos, esses dados sugerem que este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ação da leptina, presente no tecido adiposo, e que o Tx pode prevenir e tratar a síndrome causada por baixos ou inexistentes níveis de leptina, incluindo obesidade, resistência à insulina e infertilidade. O excesso de tecido adiposo não tem nenhum efeito adverso sobre a resposta ao Tx de tecido adiposo para curar anormalidades endócrinas. Além disso, o Tx pode, no futuro, ser uma opção a mais na terapia hormonal, uma vez que providencia a

vantagem da liberação contínua, sem a desvantagem de injeções diárias, monitorizações repetidas e ajustes em doses de hormônios exógenos.

Desse modo, concluímos que o Tx de tecido adiposo após 45 dias é efetivo na reversão do quadro obesidade/resistência à insulina/infertilidade, e ousamos dizer que esta técnica vislumbra a possibilidade de ser uma alternativa de tratamento para esses casos. Além disso, a compreensão das propriedades funcionais do tecido adiposo contribuirá para melhorar o prognóstico desse quadro, cuja prevalência vem crescendo de modo preocupante.

## CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que em camundongas obesas:

1. O transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas com peso normal, mostrou, após 7 e 15 dias, ser eficaz na redução do nível glicêmico, porém não influenciou no peso corporal;
2. O transplante de tecido adiposo gonadal de camundongas com peso normal após 45 dias, mostrou ser eficaz tanto na redução do nível glicêmico como na diminuição do peso corporal, além de restabelecer a ovulação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Edman, CD, MacDonald PC.** Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in ovulatory and anovulatory young women. *Am J Obstet Gynecol* 130:456-61, 1978.
- 2. Plymate SR, Fariss BL, Bassett ML, Matej L.** Obesity and its role in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 52:1246-1248, 1981.
- 3. Goldzieher JW, Green JA.** The polycystic ovary I Clinical and histological features. *J Clin Endocrinol Metab* 22:325-331, 1962.
- 4. Ingalls A, Dickie M, Snell G.** Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41:317-318, 1950.
- 5. Hummel K, Dickie M, Coleman DL.** Diabetes, a new mutation in the house mouse. *Science* 153:1127-1128, 1966.
- 6. Jones N, Ainsworth-Harrisson G.** Genetically determined obesity and sterility in the mouse. *Stud Fertil* 9:51-64, 1957.
- 7. Solomon, CG.** The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28 (2): 247-63, 1999.
- 8. Baldwin CY, Witchel SF.** Polycystic ovary syndrome. *Pediatr Ann* 35:888-96, 2006.
- 9. Costello MF, Shrestha B, Eden J, Sjoblom P, Johnson N.** Insulin-sensitizing drugs versus the combined oral contraceptive pill for hirsutism, acne

and risk of diabetes, cardiovascular disease, and endometrial cancer in polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 24:CD005552, 2007.

**10. Hahn S, Bering van Halteren W, Roesler S, Schmidt M, Kimmig R, Tan S, Mann K, Janssen OE.** The combination of increased ovarian volume and follicle number is associated with more severe hyperandrogenism in German women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114: 175-181, 2006.

**11. Premoli AC, Santana LF, Ferriani RA, Moura MD, DeSa MF, Reis RM.** Growth hormone secretion and insulin-like growth factor-1 are related to hyperandrogenism in non obese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 83: 1852-1855, 2005.

**12. Legro RS.** A 27-year-old woman with a diagnosis of polycystic ovary syndrome. *JAMA* 297: 509-519, 2007.

**13. Ansarin H, Aziz-Jalali MH, Rasi A, Soltani-Arabshahi R.** Clinical presentation and etiologic factors of hirsutism in premenopausal Iranian women. *Arch Iran Med* 10: 7-13, 2007.

**14. RunnerMN.** Inherited hypo function of the female pituitary in the sterile obese syndrome in the mouse. *Genetics* 39: 990-991, 1954.

**15. Swerdloff RS, Peterson M, Vera A, Batt RA, Heber D, Bray GA.** The hypothalamic-pituitary axis in genetically obese (ob/ob) mice: Response to luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 103: 542-547, 1978.

**16. Battaglia C, Regnani G, Petraglia F, Primavera MR, Salvatori M, Volpe A.** Polycystic ovary syndrome: it is always bilateral? *Ultrasound Obstet Gynecol* 14: 183-187, 1999.

- 17. Sheehan MT.** Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. Clin Med Res 2:13-27, 2004.
- 18. Rouzi AA, Ardawi MSM, Path FRC.** A randomized controlled trial of the efficacy of rosiglitazone and clomiphene citrate versus metformin and clomiphene citrate in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 85: 428-435, 2006.
- 19. Costello MF, Shrestha B, Eden J, Johnson NP, Sjoblom P.** Metformin versus oral contraceptive pill in polycystic ovary syndrome: a Cochrane review. Hum Reprod 29. [Epub ahead of print], 2007.
- 20. Freret S, Grimard B, Ponter AA, Joly C, Ponsart C, Humblot P.** Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. Reproduction 131: 783-794, 2006.
- 21. Qublan HS, Malkawi HY.** Metformin in treatment of clomiphene citrate-resistant women with high BMI and primary infertility: clinical results and reproductive outcome. J Obstet Gynaecol 25:55-59, 2005.
- 22. Zafar S.** Role of metformin in correcting hyperinsulinemia, menstrual irregularity and anovulation in polycystic ovary syndrome. J Ayub Med Coll Abbottabad 17:54-56, 2005.
- 23. Ludwig AK, Weiss JM, Tauchert S, Dietze T, Rudolf S, Diedrich K, Petes A, Oltmanns KM.** Influence of hypo – hyperglycemia on plasma leptin concentrations in healthy women and in women with polycystic ovary syndrome. Hum reprod 29[Epub ahead of print], 2007.
- 24. Arlt W, Neogi P, Gross C, Miller WL.** Cinnamic acid based thiazolidinediones inhibit human P450c17 and 3beta-hydroxysteroid

dehydrogenase and improve insulin sensitivity independent of PPARgamma agonist activity. *J Mol Endocrinol* 32:425-436, 2004.

**25. Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF.** Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* 140: 732-738, 1999.

**26. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432, 1994.

**27. Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF.** Levels of leptin in maternal serum amniotic fluid and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 82:480–483, 1997.

**28. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K.** Non adipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029–1033, 1997.

**29. Chehab FF, Lim ME, Lu R.** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318–320, 1996.

**30. Mounzih K, Lu R, Chehab FF.** Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob male. *Endocrinology* 138:1190–1193, 1997.

**31. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O’Rahilly S.** Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and

neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 110: 1093–1103, 2002.

**32. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A.** Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *New England Journal of Medicine* 346: 570–578, 2002.

**33. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Ekhaus M, Reitman ML.** Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *Journal of Clinical Investigation* 105: 271–278, 2000.

**34. Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML.** Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes* 51: 2727–2733, 2002.

**35. Klebanov S, Astle CM, DeSimone O, Ablamunits V, Harrison DE.** Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. *Journal of Endocrinology* 186: 203-211, 2005.

**36. Yudkin JS, Juhan-Vague I, Hawe E, Humphries SE, di Minno G, Margaglione M, Tremoli E, Kooistra T, Morange PE, Lundman P, Mohamed-Ali V, Hamsten A.** Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the hifmech study. *Metabolism* 53: 852–857, 2004.

**37. Trivax, Azziz R.** Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 50(1): 168-177, 2007.

**38. Legro RS, Castracane VD, Kaufaman RP.** Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 59(2):141-154, 2004. Review

**39. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF.** Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1337-1344, 2002.

**40. Bell SH, Graffigna, MN, Oneto A. et al.** Effect of roglitazone on insulin, growth factors, and reproductive disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 652-659, 2004.

**41. Carmina E, Lobo RA.** Polycystic ovary syndrome: arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1987-1989, 1999.

**42. Azziz R.** Androgen excess is the key element in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 80: 252-254, 2003.

**43. Kiddy DS, Hamilton-fairley D, Bush A, Short F, Anayaoku V, Reed MJ, et al.** Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 36(1): 105-111, 1992.

**44. The Rotterdam ESHRE/ASRM – Sponsored PCOS Consensus Workshop Group** *Fertil Steril* 81:19-25, 2004.

**45. Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Paterson C & Franks S.** Association of moderate obesity with a poor pregnancy outcome in women with polycystic ovary syndrome treated with low dose gonadotrophin. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 99: 128-131, 1992.

- 46. Barbieri RL, Makris A, Ryan KJ et al.** Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 904-910, 1986.
- 47. Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman IM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372: 425-434, 1994.
- 48. Ahima RS, Flier JS.** Adipose Tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332, 2000.
- 49. Kershaw EE, Flier JS.** Adipose Tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556, 2004.
- 50. Seurfet j.** Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1S152-S158, 2004.
- 51. Berg AH, Combs TP, Du X & Brownlee M, Scherer PE.** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 7: 947-953, 2001.
- 52. Mattison R, Jensen M.** The adipocyte as an endocrine cell. *Curr Opin Endocrinol Diab* 10: 317-322, 2003.
- 53. Stepan CM, Balley ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright C et al.** The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001.
- 54. Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI & Foster DL.** Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 67: 370-376, 1998.

- 55. Lanfranco F, Zitmann M, Simoni M & Nieschlag E.** Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 60: 500-507, 2004.
- 56. Cerevo A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pelliceer A & Simon C.** Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproductive Biomedicine on line* 10: 217-223, 2005.
- 57. Iord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D & Palin MF.** Expression of adiponectin and its receptors in swine. *Journal of Animal Science* 83: 568-578, 2005.
- 58. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB.** O Tecido Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50, nº 2, Abril 2006.
- 59. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman, RJ.** Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130: 583-597, 2005.
- 60. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K & Nagai R.** Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 228:1111-1117, 2003.
- 61. Greenfield JR & Campbell LV.** Insulin resistance and obesity. *Clinical Dermatology* 22: 289-295, 2004.
- 62. Lee JH, Bullen JW JR, Stoyneva VL & Mantzoros CS.** Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 288: E625-E632, 2005.

- 63. Azuma K, Katsuakawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A & Saruta T.** Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obesity Research* 11: 997-1001, 2003.
- 64. Diamond FB JR, Cuthbertson D, Hanna S & Eichler D.** Correlates of Adiponectin and the leptin/adiponectin ratio in obese and non-obese children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 17: 1069-1075, 2004.
- 65. Jacobi SK, ajuwon KM, Weber TE, Kuske JL, Dyer CJ & Spurlock ME.** Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response. *Journal of Endocrinology* 182: 133-144, 2004.
- 66. Hu E, Liang P & Spiegelman BM.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 10697-10703, 1996.
- 67. Hakansson ML, Hulting AL & Meister B.** Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-relationship with NPY neurons. *Neuroreport* 7: 3087-3092, 1996.
- 68. Bjorbaek C & Kahn BB.** Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research* 59: 305-331, 2004.
- 69. Maffei M, Halaas J, Ravussim E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA & Friedman JM.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155-1161, 1995.

Valores individuais de peso e glicemia de todos os animais envolvidos nos experimentos:

Peso Corporal (g)

Grupo Controle:

1. 24,0
2. 23,5
3. 25,5
4. 21,1
5. 23,5

$X \pm EP$  23,5 $\pm$ 0,7

Grupo Obesidade:

1. 52,7
2. 49,5
3. 51,5
4. 51,3
5. 47,0
6. 56,7

$X \pm EP$  51,5 $\pm$ 1,3

Grupo Transplante 7 dias (Basal):

1. 56,7
2. 53,0
3. 56,8
4. 49,5
5. 48,1

$X \pm EP$  52,8 $\pm$ 1,8

Grupo Transplante 7 dias (Pós-Tratamento):

1. 55,4
2. 51,8
3. 56,1
4. 48,2
5. 42,6

$X \pm EP$  50,8 $\pm$ 2,5

Grupo Transplante 15 dias (Basal):

1. 60,0
2. 64,6
3. 51,8
4. 54,0
5. 63,8
6. 49,7
7. 40,8
8. 40,0
9. 47,3

$X \pm EP$  52,4 $\pm$ 3,0

Grupo Transplante 15 dias (Pós-Tratamento):

1. 50,2
2. 46,8
3. 41,0
4. 49,6
5. 58,2
6. 54,7
7. 59,0
8. 50,0
9. 51,0

$X \pm EP$  51,2 $\pm$ 2,0

Grupo Transplante 45 dias (Basal):

1. 45,3
2. 45,0
3. 46,0
4. 47,0
5. 51,4
6. 56,6
7. 61,5

$X \pm EP$  50,4 $\pm$ 2,4

Grupo Transplante 45 dias (Pós-Tratamento):

1. 33,4
2. 40,0
3. 47,3
4. 33,0
5. 48,8

6. 51,1
7. 54,7

X±EP 44,0±3,3

Glicemia (mg/dl)

Grupo Controle:

1. 108,0
2. 100,0
3. 97,0
4. 95,0
5. 101,0

X±EP 100,2±2,2

Grupo Obesidade:

1. 315,0
2. 422,0
3. 470,0
4. 501,0
5. HI (leitura muito alta dada pelo glicosímetro)
6. 384,0

X±EP 418,4±32,7

Grupo Transplante 7 dias (Basal):

1. 359,0
2. 388,0
3. 467,0
4. 454,0
5. 283,0

X±EP 390,2±34,0

Grupo Transplante 7 dias (Pós-Tratamento):

1. 406,0
2. 181,0
3. 233,0
4. 246,0
5. 282,0

X±EP 270,0±38,0

Grupo Transplante 15 dias (Basal):

1. 423,0
2. 314,0
3. 485,0
4. 509,0
5. HI
6. 534,0
7. 571,0
8. HI
9. 304,0

X±EP 460,0±31,4

Grupo Transplante 15 dias (Pós-Tratamento):

1. 122,0
2. 102,0
3. 109,0
4. 107,0
5. 165,0
6. 101,0
7. 117,0
8. 165,0
9. 135,0

X±EP 125,0±8,4

Grupo Transplante 45 dias (Basal):

1. 420,0
2. 481,0
3. 370,0
4. 385,0
5. 480,0
6. 452,0
7. 578,0

X±EP 467,0±28,0

Grupo Transplante 45 dias (Pós-Tratamento):

1. 161,0
2. 231,0
3. 263,0
4. 243,0
5. 223,0

6. 211,0

7. 130,0

X±EP 209,0±18,0

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)