

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

FLÁVIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**TECIDO ADIPOSEO MARROM EM MULHERES COM SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS: RELAÇÃO COM MEDIDAS CORPORAIS,
NÍVEIS DE IRISINA NO PLASMA E USO DE METFORMINA**

Belo Horizonte
2018

FLÁVIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**TECIDO ADIPOSEO MARROM EM MULHERES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS
POLICÍSTICOS: RELAÇÃO COM MEDIDAS CORPORAIS, NÍVEIS DE IRISINA NO
PLASMA E USO DE METFORMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Saúde da Mulher como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Saúde da Mulher.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Coorientadores: Profa. Ana Lúcia Cândido e Prof.
Marcelo Henrique Mamede Lewer

Belo Horizonte
2018

Oliveira, Flávia Ribeiro de.

OL48t Tecido adiposo marrom em mulheres com síndrome dos ovários policísticos [manuscrito]: relação com medidas corporais, níveis de Irisina no plasma e uso de Metformina. / Flávia Ribeiro de Oliveira. - - Belo Horizonte: 2018.

76f.: il.

Orientador (a): Fernando Marcos dos Reis.

Coorientador (a): Ana Lúcia Cândido.

Coorientador (a): Marcelo Henrique Mamede Lewer.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tecido Adiposo Marrom. 2. Tomografia por Emissão de Pósitrons. 3. Síndrome do Ovário Policístico. 4. Metformina. 5. Adiposidade. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Cândido, Ana Lúcia. III. Lewer, Marcelo Henrique Mamede. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QS 532.5.A3

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG


FOLHA DE APROVAÇÃO

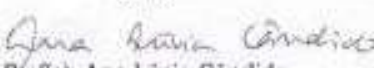
**TECIDO ADIPOSEO MARROM EM MULHERES COM SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS: RELAÇÃO COM MEDIDAS CORPORAIS, NÍVEIS
DE IRISINA NO PLASMA E USO DE METFORMINA**

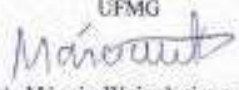
FLAVIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

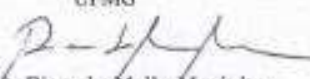
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 27 de dezembro de 2018, pela banca constituída pelos:

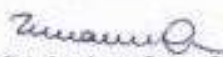

Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador
UFMG


Prof(a). Ana Lúcia Cândido
UFMG


Prof(a). Márcio Weissheimer Lauria
UFMG


Prof(a). Ricardo Mello Marinho
Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais


Prof(a). Poli Mara Spritzer
UFRGS


Prof(a). Luciana Costa Silva
IHP

Belo Horizonte, 27 de dezembro de 2018.

Dedico esta tese à memória de meus pais, em especial minha mãe, uma mulher à frente do eu tempo e que, ainda hoje, continua sendo minha fonte de inspiração profissional.

Ao meu marido, Stanys, que sempre apoia e incentiva, de forma incondicional, meus projetos de vida. E aos meus queridos filhos, Bela e Henrique, minha maior alegria e razão de viver!

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Enfim chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos. Sei que corro o risco de cometer alguma injustiça e me esquecer de mencionar alguém que mereça o meu “muito obrigada” e, desde já, desculpo-me por isso.

Foi uma longa trajetória, uma filha pequena, o parto do meu filho caçula em meio ao projeto, muitos percalços, mas também muitas colaborações e aprendizados.

Agradeço a Deus por me fortalecer e permitir que eu chegasse até aqui.

Agradeço imensamente à minha família, Stanys, Bela e Henrique, pela paciência e apoio.

Ao meu irmão, Bruno, por nossa união, mesmo a distância.

Ao professor Fernando Reis por, mais uma vez, estar ao meu lado como orientador. Obrigada por acreditar no meu projeto e me ensinar sempre o MELHOR em termos de qualidade científica e de publicação.

À professora Ana Lúcia Cândido e ao professor Mamede, meus coorientadores, que se tornaram grandes amigos durante esta jornada e sem os quais este projeto não seria possível.

Às queridas colaboradoras, professora Karina Braga, professora Cláudia Ferreira e Mariana Bizzi, minha eterna gratidão.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução Humana, professor Aroldo Fernando Camargos, Francisco, Inês, Cláudia, Júlia, Cynthia e aos demais.

À Maternidade Odete Valadares (MOV)/Rede FHEMIG, por ser instituição coparticipante neste projeto. A todos os colegas ginecologistas da MOV, em especial Vera Furtado, Fátima Brito, Mariana Meinberg, Séphora Cardoso, Lívia Leni e Gisela Gagliardi, pelo apoio, incentivo e contribuições. A toda a equipe do Núcleo de Ensino e Pesquisa e Diretoria.

À diretoria, à coordenação do curso de medicina e aos colegas da Faculdade de Saúde e Ecologia Humana (FASEH), pela oportunidade de crescer na carreira docente e por apoiar meu crescimento profissional. Obrigada professor João Lúcio, professora Hérica, professora Márcia, Guilherme, Carlos, Alexon e aos queridos alunos. Somos conceito 5!

A toda a equipe do Ambulatório de Hiperandrogenismo do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial professora Ana Lúcia, professora Ana Luiza Lunardi,

Rosana Corrêa e residentes, que estiveram tão presentes desde o desenho inicial, o recrutamento de pacientes e a execução do trabalho.

Às pacientes que concordaram em participar deste estudo, submetendo-se a um protocolo de pesquisa nada fácil.

Ao apoio financeiro proporcionado por INCT/CNPq e LRH-UFMG.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pelas críticas, sugestões e comentários que, sem dúvida, muito contribuirão para que eu continue me empenhando na carreira acadêmica.

*Challenges are what make life
interesting and overcoming them is what
makes life meaningful*

Joshua J. Marine

RESUMO

A síndrome dos ovários policísticos (PCOS) é uma disfunção crônica endócrino- reprodutiva associada à obesidade e a desordens metabólicas. O tecido adiposo marrom (TAM), que tem alta atividade metabólica, foi recentemente identificado em adultos humanos por meio da tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada (PET/CT). Irisina é uma miocina que induz o *browning* de adipócitos brancos. Este estudo foi desenhado para avaliar (i) se a atividade do TAM está alterada em mulheres com PCOS, (ii) correlacionar os níveis de irisina em mulheres com PCOS e (iii) se estes parâmetros podem ser alterados por um tratamento curto com metformina. O estudo incluiu 70 mulheres com idade entre 18 e 45 anos, divididas em um grupo de portadoras de PCOS (n=45) e um grupo controle saudável (n=25), pareados por idade e índice de massa corporal (IMC). As participantes foram recrutadas no período entre abril de 2015 e setembro de 2017, em dois centros. A atividade do TAM foi medida utilizando-se PET-CT com ^{18}F -FDG, enquanto os níveis de irisina no plasma foram analisados usando ELISA. A atividade total do TAM foi significativamente reduzida em mulheres com PCOS (valor máximo padronizado de captação [SUV_{max}]: mediana de 7,4 g/ml, intervalo interquartil 0,9 a 15,4) em comparação aos controles (mediana 13,0 g/ml, intervalo interquartil de 4,7 a 18,4, $p = 0,047$). No entanto, essa diferença não se manteve significativa após a análise do ajuste de covariância para a circunferência abdominal, um marcador de adiposidade central. No grupo com PCOS, a atividade total do TAM foi inversamentecorrelacionada com o IMC (r de Spearmann = -0,63, $p < 0,001$) e a circunferência abdominal ($r = -0,59$, $p < 0,001$) mas não com os níveis plasmáticos de irisina ($r = -0,25$, $p = 0,10$). As 45 participantes do grupo PCOS foram randomizadas para um subgrupo de metformina (1.500 mg/dia, durante 60 dias, $n = 21$) e um subgrupo placebo ($n = 24$). Nem a metformina nem o placebo resultaram em mudanças significativas em qualquer região anatômica do TAM avaliada ou nos níveis plasmáticos de irisina. Em conclusão, a atividade do TAM foi reduzida em mulheres com PCOS, possivelmente devido ao aumento da adiposidade central. Nas portadoras de PCOS, a atividade do TAM não se correlacionou com os níveis plasmáticos de irisina no plasma e não se alterou após um curto tratamento com metformina.

Palavras-chave: Tecido adiposo marrom; tomografia por emissão de pósitrons; síndrome do ovário policístico; metformina; irisina; adiposidade; ensaio clínico.

ABSTRACT

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a chronic endocrine-reproductive dysfunction associated with obesity and metabolic disorders. Brown adipose tissue (BAT), which has high metabolic activity, has been recently identified in human adults through positron emission tomography/computed tomography (PET/CT). Irisin is a myokine that induces browning of white adipocytes. This study was designed to evaluate (i) if BAT activity is altered in women with PCOS, (ii) to correlate irisin levels in women with PCOS, and (iii) if these parameters can be altered by short-term treatment with metformin. The study included 70 women aged 18 to 45 years, divided into a PCOS group (n=45) and a healthy control group (n=25), matched for age and body mass index (BMI). Participants were recruited between April 2015 and September 2017, from two centers. BAT activity was measured using PET-CT with ¹⁸F-FDG, while plasma irisin levels were analyzed using ELISA. Total BAT activity was significantly reduced in women with PCOS (standardized uptake value [SUV_{max}]: median 7.4 g/ml, interquartile range 0.9 to 15.4) compared to controls (median 13.0 g/ml, interquartile range 4.7 to 18.4, $p = 0.047$). However, this difference was not maintained significant after adjusting for covariates such as waist circumference, a marker of central adiposity. In the PCOS group, total BAT activity was inversely correlated with BMI (Spearman's $r = -0.63$, $p < 0.001$) and waist circumference ($r = -0.59$, $p < 0.001$) but not with plasma irisin levels ($r = -0.25$, $p = 0.10$). The 45 participants in the PCOS group were randomized into a metformin subgroup (1,500 mg/day, for 60 days, $n = 21$) and a placebo subgroup ($n = 24$). Neither metformin nor placebo resulted in significant changes in any anatomical region of BAT evaluated or in plasma irisin levels. In conclusion, BAT activity was reduced in women with PCOS, possibly due to increased central adiposity. In women with PCOS, BAT activity did not correlate with plasma irisin levels and did not change after short-term treatment with metformin.

Keywords: Brown adipose tissue; positron emission tomography; polycystic ovary syndrome; metformin; irisin; adiposity; clinical trial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fisiopatologia da PCOS considerando o papel central da resistência insulínica (RI)
.....
21
- Figura 2:** Mecanismos de ativação da proteína desacopladora 1
24
- Figura 3:** Esquema de transdiferenciação de adipócitos brancos induzido pela irisina/FNDC5
.....
27
- Figure 1:** Typical localization of brown fat activity with 18F-FDG PET-CT
52
- Figure 2:** Quantification of brown adipose tissue activity by 18F-FDG uptake in control and PCOS groups.
.....
53
- Figure 3:** Plasma irisin levels in control and PCOS groups and their correlation with body mass index
.....
53
- Figure 4:** Flow diagram of the randomized trial of metformin versus placebo in women with PCOS
.....
54
- Figure 5:** Variation of brown adipose tissue and plasma irisin levels in PCOS women treated with metformin or placebo
.....
55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Table 1: Baseline characteristics of the study participants
56

Table 2: Linear correlation between brown adipose tissue at
different bodyregions and some anthropometric and
metabolic variables in
PCOS women (n=45)

.....
56

Table 3: Baseline characteristics of the PCOS patients included in the
randomized controlled trial

.....
57

Table 4: Baseline characteristics of the PCOS patients analyzed at the end
of the randomized controlled trial

.....
58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios diagnósticos para a síndrome dos ovários policísticos. ... 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOVA -	Análise de
covariância CA -	Circunferência abdominal
CAAE -	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CNPq -	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONSORT -	<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
DM2 -	Diabetes mellitus tipo 2
FAPEMIG -	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
¹⁸ F-FDG -	18-Flúor-desoxi-glicose
FHEMIG -	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FSH -	Hormônio folículo estimulante
FNDC5 -	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>
GJ -	Glicemia de jejum
HAS -	Hipertensão arterial sistêmica
HC-UFMG -	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HDL -	Colesterol total sérico, lipoproteína de alta densidade
i -	Jejum insulina
IMC -	Índice de massa corporal
LAP -	<i>Lipid accumulation product</i>
LDL -	Lipoproteína de baixa densidade
LH -	Hormônio luteinizante
MOV/FHEMIG -	Maternidade Odete Valadares da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
NIH -	<i>National Institutes of Health</i>
OSEM-like -	<i>Ordered Subsets Expectation Maximization</i>
PCOS -	Síndrome dos ovários policísticos
PET -	Positron emission tomography
PET/CT -	<i>Pósitron emission tomography/computed tomography</i>
PRL -	Prolactina

REBEC -	Registro Brasileiro de Ensaio
ClínicosRI -	Resistência insulínica
SHBG -	Proteína carreadora de esteróides sexuais
T -	Testosterona
t -	Testosterona total
TAB -	Tecido adiposo branco
TAM -	Tecido adiposo marrom
TSH -	Hormônio tireoestimulante
UCP1 -	Proteína desacopladora 1
UFMG -	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS.....	18
METFORMINA.....	22
TECIDO ADIPOSO	23
IRISINA/FNDC5.....	25
OBJETIVOS.....	28
Objetivo geral.....	28
Objetivos específicos	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
Aspectos Éticos	29
Participantes	29
Medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais	31
Medida do Tecido Adiposo Marrom	31
Intervenção com metformina e placebo	32
Análise Estatística e Cálculo Amostral.....	33
RESULTADOS.....	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (PCOS, sigla em inglês) é uma importante desordem endócrina que acomete cerca de 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva. É uma condição heterogênea com expressão fenotípica variável, responsável por permanente controvérsia no diagnóstico da síndrome (1). A etiologia da PCOS ainda não está completamente elucidada. Acredita-se que exista uma desordem multigênica complexa, que inclui anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, na esteroidogênese e resistência insulínica (RI) (2). Embora a demonstração de RI não seja obrigatória para o diagnóstico de PCOS, está claro que hiperinsulinemia e RI desempenham papel predominante na fisiopatologia da síndrome (3).

A metformina, uma biguanida que sensibiliza os tecidos à insulina, tem sido bastante empregada no tratamento da PCOS, pois corrige os distúrbios endócrinos/metabólicos, aumenta a taxa de ovulação e contribui para a redução do peso corporal. Os mecanismos pelos quais essa medicação desempenha seus efeitos benéficos na PCOS relacionam-se à sensibilização dos tecidos à insulina, mas ainda existem alguns mecanismos que não estão totalmente claros (4).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo por meio do armazenamento de energia em forma de triglicerídeos. É composto por dois tipos histológicos e funcionais distintos de grupamentos celulares, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O TAM é típico de animais hibernantes e pequenos, devido à sua capacidade termogênica, o que interfere diretamente no metabolismo corporal. Sua presença favorece a sensibilidade dos tecidos à insulina e a redução do peso corporal. Até há poucos anos, era considerado presente apenas em recém-nascidos, na espécie humana. A recente identificação do TAM em adultos por meio da tomografia de emissão de pósitron (PET) com o uso do radiofármaco 18-fluorodesoxiglicose (^{18}F -FDG) trouxe à discussão sua real importância no metabolismo corporal humano (5-7).

Nos últimos anos, uma nova miocina, a irisina, que age favorecendo o “escurecimento” (*browning*) ou a transdiferenciação do TAB em TAM (gordura marrom induzida), foi observada em animais e humanos após a prática de atividade física. A irisina/FNDC5 desempenha, possivelmente, papel importante na

homeostase do tecido adiposo e pode estar envolvida tanto na etiopatogênese quanto em possibilidades terapêuticas de doenças metabólicas, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e PCOS (8-10).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

A PCOS foi descrita, inicialmente, em 1935, por Stein e Leventhal, que observaram uma associação entre amenorreia, hirsutismo e obesidade com ovários de aspecto policístico. Eles eram aumentados de volume bilateralmente, com cápsulas espessadas e esbranquiçadas, e múltiplos cistos de localização preferencialmente subcapsular, além de estroma denso e hipertrófico (11).

Do ponto de vista epidemiológico, a PCOS tem se destacado como a desordem endócrina mais comum em mulheres na faixa etária reprodutiva, com prevalência de cerca de 6% a 10% das mulheres no menacme (12). A síndrome interfere em múltiplos aspectos da saúde geral das mulheres, com efeitos em longo prazo que transcendem àqueles ligados à idade reprodutiva (13, 14). O termo "síndrome dos ovários policísticos" não reflete totalmente e com precisão a complexidade desta desordem (15), dado o seu amplo espectro de manifestações clínicas e sua associação a diversas outras morbidades (16-23). As pacientes com PCOS podem apresentar não apenas fatores de risco cardiovasculares sabidamente estudados (16, 17), como RI (18), DM2 (19), doença cardíaca coronariana (20), dislipidemia aterogênica (23) e morbidade vascular cerebral (21), mas também de saúde mental, com maior associação à ansiedade e à depressão (22). Quando grávidas, as portadoras da síndrome têm probabilidade significativamente maior de desenvolver abortamento, diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, macrosomia fetal, recém-nascidos pequenos para a idade gestacional e maior mortalidade perinatal (24, 25). As taxas de admissões hospitalares são duas vezes mais elevadas para as gestantes com PCOS do que na população em geral (26, 27).

Em relação à PCOS propriamente dita, suas características fundamentais são constituídas por disfunção menstrual, hiperandrogenismo, hiperandrogenemia e ovários policísticos. Uma definição clínica e prática para a síndrome foi elaborada pelo *National Institutes of Health* (NIH), Consenso do NIH, em 1990 (Quadro 1) (28). De acordo com esse documento, a PCOS seria consequente a um quadro de anovulação crônica hiperandrogênica e deve ser definida pela presença de disfunção menstrual e excesso androgênico, que pode ser de ordem clínica

(hiperandrogenismo) e/ou laboratorial (hiperandrogenemia). Posteriormente, dois outros consensos foram elaborados, sendo um deles em 2003, pela *European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine* (Consenso de Rotterdam) e o outro em 2006, pela *The Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS Society)*(29). O Consenso de Rotterdam considerou que a síndrome pode se manifestar por fenótipos mais amplos do que os inicialmente contemplados pelo critério do Consenso do NIH. Por esse motivo, é definido, nesse consenso, que a presença de dois dos três critérios seguintes é suficiente para o diagnóstico da síndrome: 1) oligo e/ou anovulação; 2) evidências clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo e 3) presença de ovários policísticos à ultrassonografia. Enquanto, no Consenso de Rotterdam, a morfologia ovariana policística à ultrassonografia é colocada como um dos critérios isolados para o diagnóstico da síndrome, no *Position Statement da AE-PCOS Society* o excesso androgênico deve estar obrigatoriamente presente, seja pela hiperandrogenemia, seja pelo hiperandrogenismo(1). Segundo este último posicionamento, para o diagnóstico da síndrome são necessários, obrigatoriamente, os dois seguintes critérios: 1) oligo e/ou anovulação ou ovários policísticos à ultrassonografia e 2) evidências clínicas ou laboratoriais de excesso androgênico. Na realidade, os dois últimos consensos não substituem aquele do NIH com seu fenótipo clássico, mas, sim, expandem o número de fenótipos possíveis para a síndrome (28).

Quadro 1: Critérios diagnósticos para a síndrome dos ovários policísticos.

Critérios diagnósticos para a síndrome do ovário policístico segundo os consensos do NIH, Rotterdam e *AE-PCOS Society*

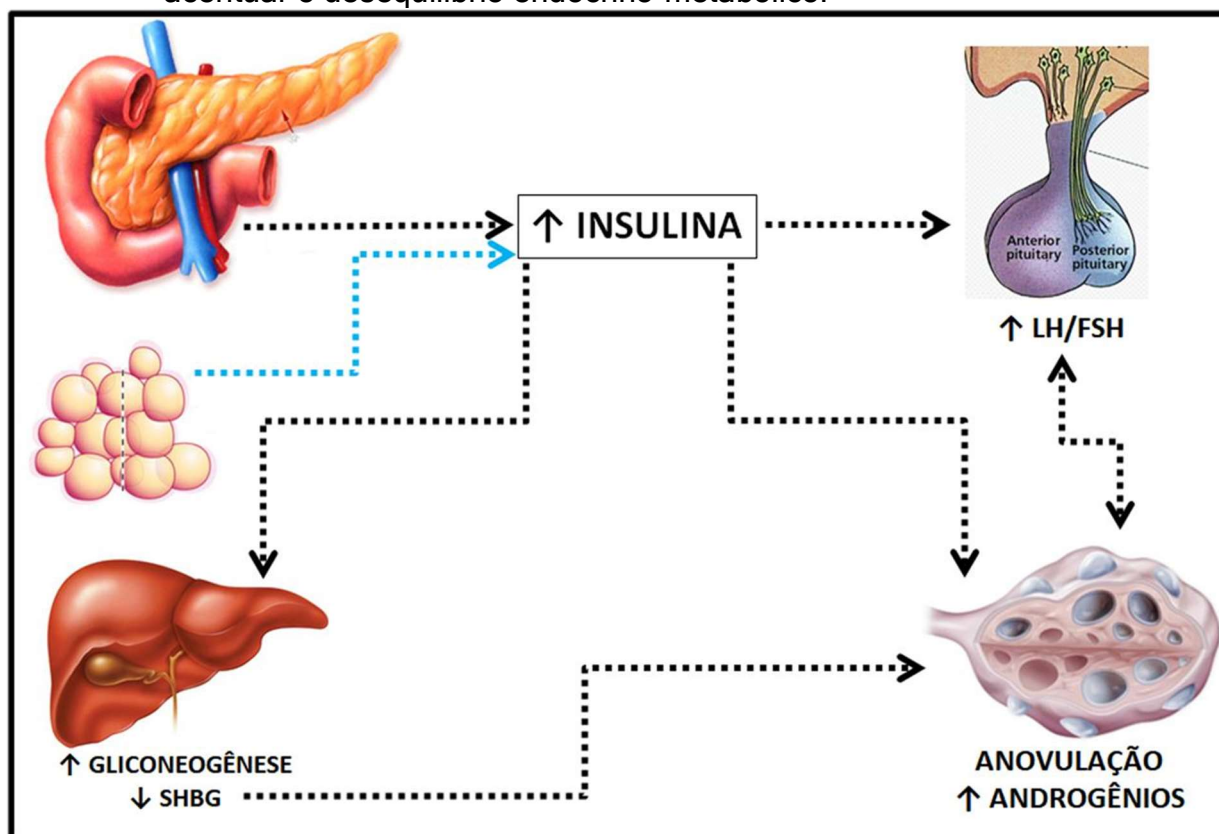
NIH	Rotterdam	<i>AE-PCOS Society</i>
Presença de dois critérios:	Presença de dois dos três critérios	Presença de dois critérios:
Disfunção menstrual	Disfunção menstrual	Disfunção menstrual e/ou ovários policísticos
Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo	Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo	Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo
	Ovários policísticos	

Para todos os consensos, a PCOS é um diagnóstico de exclusão.

Fonte: Sirmans & Pate (30).

A PCOS tem uma etiologia multifatorial que inclui fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que podem ou não estar interligados. Embora as manifestações clínicas da síndrome só apareçam após a adolescência, sugere-se que a história natural da doença tenha suas origens no ambiente intrauterino, em um processo que pode estar associado a uma série de desordens clínicas e metabólicas relacionadas a ela em diferentes etapas da vida pré e pós-natal (31). Vários hormônios e moléculas podem fazer parte da fisiopatologia da síndrome e citocinas, adipocinas, miocinas e mediadores inflamatórios parecem estar envolvidos (32). A RI é uma desordem intrínseca na PCOS, presente em, aproximadamente, 50% a 70% das pacientes, independente da obesidade, e participa da fisiopatologia da síndrome. A frequente associação entre sobrepeso/obesidade e PCOS contribui como componente extrínseco para a RI. É sabido que a RI leva à hiperinsulinemia compensatória e, secundariamente, ao hiperandrogenismo nessas mulheres. O excesso de androgênios resulta em distúrbios menstruais, desenvolvimento de cistos ovarianos, hirsutismo e outras desordens relacionadas (Figura 1). Além disso, a RI aumenta o risco de desenvolvimento de desordens metabólicas, como DM2, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doenças cardiovasculares. A redução farmacológica dos níveis de insulina pode resultar em diminuição da hiperandrogenemia e restaurar a ovulação (3, 33).

Figura 1: Fisiopatologia da PCOS considerando o papel central da resistência insulínica (RI). A RI dos tecidos adiposo e muscular leva a aumento de produção de insulina pelo pâncreas que, por sua vez, leva à hiperinsulinemia. A hiperinsulinemia causa desbalanço da relação LH/FSH e hiperandrogenismo, além de aumento da gliconeogênese hepática e redução da produção de SHBG. O ciclo se retroalimenta de forma a acentuar o desequilíbrio endócrino-metabólico.



LH – hormônio luteinizante / FSH – hormônio foliculo estimulante / SHBG – proteína carreadora de esteróides sexuais
 Fonte: John & Nestler (34).

O manejo terapêutico da PCOS tem como alvo a sintomatologia e, geralmente, requer uma abordagem multidisciplinar que pode incluir médico de família, ginecologista, clínico geral, endocrinologista, dermatologista, psiquiatra, psicólogo, nutricionista e educador físico (29). A linha inicial de tratamento para qualquer sintoma da síndrome baseia-se, essencialmente, na mudança do estilo de vida. A prática de atividade física regular e a adoção de dieta equilibrada, saudável, sem excessos são essenciais no manejo da síndrome, independentemente da coexistência de obesidade. Quando as mudanças de estilo de vida não conseguem resultar em uma resposta terapêutica adequada, é necessário associar medidas

farmacológicas focadas no objetivo principal do tratamento, como RI, infertilidade, irregularidade menstrual e/ou hiperandrogenismo clínico (35).

METFORMINA

A metformina, uma biguanida sensibilizadora dos tecidos à insulina, é um medicamento administrado por via oral no tratamento do DM2 desde longa data. Ela aumenta a utilização da glicose nos tecidos sensíveis à insulina por meio da sensibilização de seus receptores celulares, além de diminuir a gliconeogênese hepática. Como consequência, os níveis plasmáticos de insulina são reduzidos (37).

Desde 1994 a metformina foi proposta como um tratamento adequado para a PCOS, quando o uso nesta condição apresentou como benefícios menstruações mais regulares e diminuição significativa dos níveis de androgênios(36). Em 2004, o *National Institute for Health and Clinical Excellence* recomendou a prescrição de metformina para as mulheres portadoras de PCOS, índice de massa corporal (IMC) acima de 25 kg/m² e anovulação/infertilidade, quando outras terapias falhassem em produzir os efeitos terapêuticos esperados. No entanto, várias revisões posteriores não confirmaram os benefícios sugeridos e a metformina passou a não ser mais recomendada como medicação isolada de primeira linha, exceto para mulheres com intolerância à glicose (37).

Em relação à anovulação e infertilidade, a metformina aumenta a frequência de ovulação espontânea e de ciclos menstruais regulares em mulheres com PCOS, porém as taxas de nascidos vivos são inferiores àquelas obtidas com o citrato de clomifeno (38-40). Tampouco há evidência de que a associação de metformina ao citrato de clomifeno aumente a taxa de nascidos-vivos comparada ao tratamento isolado com um ou outro fármaco (40-42). Porém, em mulheres obesas e naquelas resistentes ao citrato de clomifeno, há evidência limitada de que o acréscimo de metformina possa aumentar as chances de gravidez (38).

Em relação aos aspectos endócrino-metabólicos na PCOS, os resultados da metformina são bastante positivos. A terapêutica com a metformina ajuda a melhorar a RI, o hiperinsulinismo e reduzir a circunferência abdominal (CA) e a pressão arterial (43). Em alguns estudos foi demonstrado, ainda, que, após a introdução de mudanças de estilo de vida, a metformina por tempo prolongado pode ser

considerada alternativa adicional para a redução do peso corporal em pacientes obesas e com sobrepeso na PCOS (44-46). Sabe-se que os benefícios da metformina em pacientes com PCOS, provavelmente, devem-se à sensibilização dos tecidos à insulina e à redução do peso corporal, mas nem todos os mecanismos envolvidos foram elucidados (47-49). Em 2015, Yang et al.(50) demonstraram que a metformina aumenta a expressão de *fibronectin type III domain-containing protein 5*, FNDC5, no músculo esquelético e, conseqüentemente, a liberação plasmática de irisina, sendo este um possível mecanismo de ação (51, 52).

TECIDO ADIPOSEO

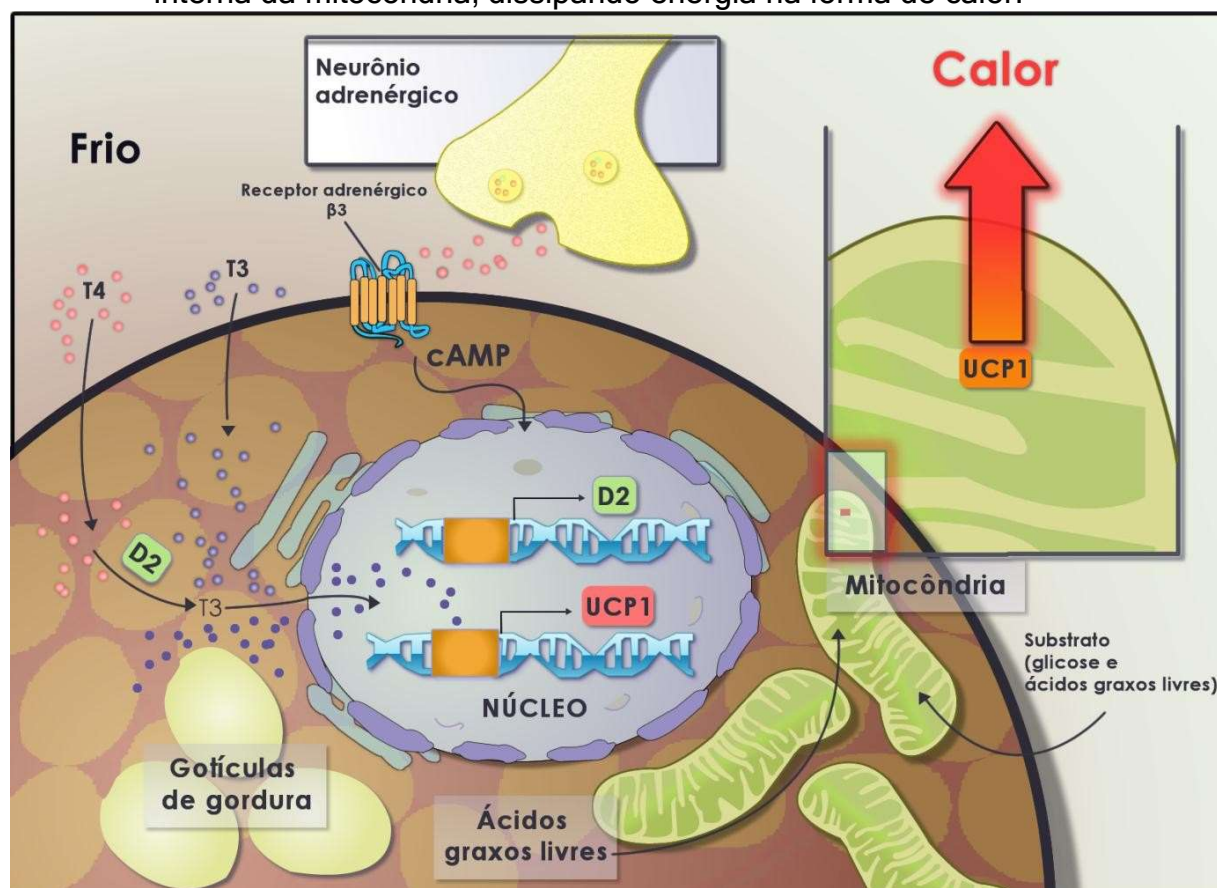
Nos últimos anos, o tecido adiposo foi reconhecido como importante órgão endócrino supostamente envolvido na regulação da insulina e na homeostase energética. O tecido adiposo é composto por dois tipos histológicos com funções totalmente diferentes. O TAB é responsável pelo acúmulo energético, libera ácidos graxos livres e adipocinas que interferem no metabolismo corporal e na RI. Tradicionalmente, o TAM é considerado um órgão termogênico para a manutenção da temperatura central durante a exposição ao frio presente em pequenos mamíferos e recém-nascidos. Nos seres humanos, acreditava-se que este último tecido desapareceria rapidamente com o avançar da idade (53).

A produção de calor como função do TAM foi demonstrada há pouco mais de 50 anos (54) e somente nos últimos 20 anos tem se estudado o envolvimento desse tecido com questões endócrino-metabólicas (55). Estudos em humanos *post mortem* demonstraram que este tipo de tecido estava presente em neonatos e crianças, mas raramente em adultos (56). Diante disso, o TAM foi considerado irrelevante ou, mesmo, ausente em adultos humanos por muitos anos, o que resultou em poucos estudos, limitados a análises histológicas, publicados até então (53).

Do ponto de vista citológico e bioquímico, as células do TAM são multiloculares, ou seja, apresentam múltiplas gotículas citoplasmáticas de gordura de diversos tamanhos, e um grande número de mitocôndrias que, por não possuírem complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia dissipada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos para gerar calor. Este processo acontece em função da ação da termogenina ou proteína desacopladora 1

(UCP1), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom que atua como um canal de próton e libera energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso das mitocôndrias, durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs. Esse mecanismo impede a síntese de ATP, permitindo que a energia estocada na mitocôndria se dissipe em calor (Figura 2). A alta concentração da enzima citocromo oxidase dessas mitocôndrias, bem como a elevada vascularização tecidual por capilares sanguíneos, contribuem para a coloração mais escura (marrom) das células e do tecido (57).

Figura 2: A estimulação dos receptores β -adrenérgicos ou a exposição ao frio leva à transcrição da UCP1, que provoca a liberação de prótons da membrana interna da mitocôndria, dissipando energia na forma de calor.



D2 - 5' deiodinase tipo 2 T3 - triiodotironina T4 - tiroxina cAMP - AMP cíclico
 Fonte: Celi (58) & Calvani (59)

Apesar de existirem algumas evidências remotas indiretas da presença do TAM em adultos, somente em 2009, por meio de estudos com tomografia por emissão de pósitrons integrada à tomografia computadorizada (*positron emission tomography/computed tomography* - PET/CT), utilizando o radiofármaco ^{18}F -FDG,

um análogo da glicose que mapeia a atividade metabólica tecidual, foi possível sua identificação inquestionável. O padrão local de captação de ^{18}F -FDG, denominado *USA-fat* (captação na região supraclavicular), foi inicialmente considerado, pelos radiologistas que estavam interessados na identificação tumores ativos, como um “artefato técnico”. Esses especialistas notaram que a identificação deste “artefato técnico” foi inversamente mais frequente quanto menor a temperatura ambiente e que, diferentemente dos tumores, a captação de ^{18}F -FDG pelo “artefato” poderia ser farmacologicamente bloqueada por β -bloqueadores (5, 6).

Em 2009, cinco grupos de pesquisadores independentes identificaram que aquele “artefato”, na realidade, trata-se do TAM, o que revolucionou os estudos sobre o metabolismo do tecido adiposo na espécie humana. Foi demonstrado, ainda, que os principais depósitos do TAM metabolicamente ativo localizam-se nas regiões cervical e supraclavicular, tendo alguns desses estudos confirmado tratar-se do TAM através da expressão de UCP1 e outras características histológicas deste tipo de tecido (53).

A importante descoberta ascendeu o interesse da comunidade científica para pesquisas com TAM em humanos e o seu possível envolvimento na obesidade, RI, DM2 e outras doenças metabólicas, além de suas supostas implicações terapêuticas (60, 61). Posteriormente Yuan et al. (50) demonstraram em ratos que a atividade do TAM foi significativamente menor na PCOS e que o transplante do TAM foi eficaz em melhorar os achados da síndrome (50).

IRISINA/FNDC5

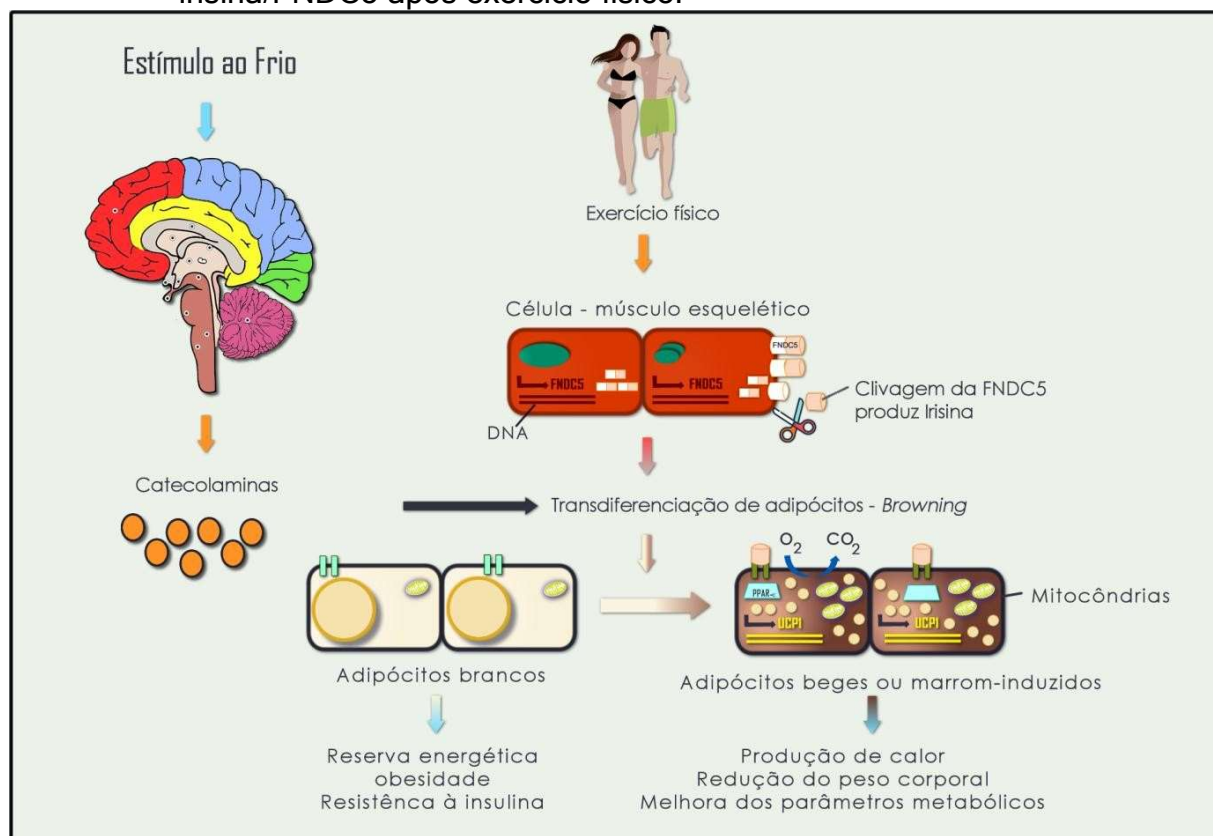
A obesidade, uma doença associada ao estilo de vida inadequado, é uma condição crônica em que o excesso de gordura acumulada leva a sérios problemas na saúde como um todo, tais como doenças cardiovasculares, RI, HAS, distúrbios osteomusculares, psicogênicos, respiratórios, DM2, doença hepática crônica, e aumento do risco de alguns cânceres. A prevalência de obesidade está aumentando continuamente e tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, nos dias atuais. A prática de atividades físicas beneficia vários órgãos e sistemas, tanto no indivíduo eutrófico quanto na obesidade, contribuindo para a redução do peso corporal e a sensibilização dos tecidos à insulina. Os mecanismos pelos quais a

atividade física age no organismo ainda não estão totalmente elucidados, mas parecem se relacionar à presença de citocinas e outros peptídeos, liberados pelo músculo esquelético. As miocinas são moléculas que podem agir de forma autócrina, parácrina e endócrina (62).

Em 2012, um grupo de pesquisadores de Harvard demonstrou a existência de irisina, um peptídeo de 112 aminoácidos e 12,6 kDa, secretado pelo músculo esquelético após atividade física e que recebeu este nome em homenagem à deusa grega mensageira Íris. A função da irisina é estimular a transdiferenciação do TAB em tecido adiposo bege ou TAM “induzido” (Figura 3). O exercício físico resulta em uma regulação para cima (*upregulation*) da FNDC5, um tipo de proteína transmembrana tipo I que é clivada em sua porção C-terminal e secretada na circulação sanguínea como irisina. Esta miocina liga-se a um receptor não identificado nos adipócitos brancos, determinando alterações em seu perfil genético, com a expressão de *peroxisome proliferator-activated receptor 1 α* . (PPAR-1 α). Isso ativaria uma cascata de reações moleculares e resultaria na expressão UCP1, ou termogenina, molécula altamente expressa no TAM e marcadora de *browning* do TAB (figura 3). Essa descoberta foi um marco transformador porque atraiu o interesse da comunidade científica pela sua potencial relação com obesidade, DM2, RI e outras doenças metabólicas (8, 9).

O domínio extracelular da FNDC5, que após clivagem se torna a irisina, é codificado pelo gene *Fndc5*. Este gene tem um códon de iniciação não canônico ATA em vez do típico códon de iniciação ATG. Alguns autores questionaram a real existência da irisina, sugerindo que o códon de iniciação ATA no gene *Fndc5* em humanos seja uma mutação nula e tenha tradução a jusante do gene *Fndc5*, sendo que não poderia fornecer o polipeptídeo(63, 64). Associado a isso, o ceticismo em relação a irisina aumentou quando foram levantados questionamentos sobre a qualidade (falta de especificidade) de kits de ELISA comercialmente disponíveis àquela época, utilizados para a identificação dessa molécula circulante na maiorias artigos publicados até aquele momento (65).

Figura 3: Esquema de “escurecimento” dos adipócitos brancos induzido pela irisina/FNDC5 após exercício físico.



Fonte: Castillo-Quan (9).

Após a confirmação da existência da irisina e a validação dos métodos para sua dosagem, observou-se uma correlação direta dos níveis de irisina com o IMC e a massa muscular (66). Em estudos recentes foi demonstrado que o metabolismo da irisina é anormal em pacientes portadores de DM2 ou diabetes gestacional, mas a verdadeira relação entre irisina e RI não está totalmente clara (66, 67). Em 2018, Zhang et al. (68) demonstraram que os níveis de irisina circulante estão associados ao hiperandrogenismo em portadoras de PCOS, mas não à oligoanovulação ou morfologia ovariana policística. Outros estudos demonstram resultados divergentes, desde níveis de irisina elevados a valores normais, em pacientes portadoras de PCOS, comparadas ao grupo controle (67).

Li et al. (52) demonstraram que, após seis meses de tratamento com a metformina, em pacientes com PCOS houve uma diminuição significativa dos níveis de irisina plasmática, seguindo uma melhora da RI (52). Estes achados não foram confirmados em outros estudos, porém são escassos e conflitantes os estudos sobre a relação PCOS, irisina e metformina (68-70).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar se a atividade do TAM através do PET está alterada em mulheres com PCOS.

Objetivos específicos

- Comparar a atividade do TAM de pacientes portadoras de PCOS com pacientes controles.
- Avaliar se a atividade do TAM correlaciona-se com medidas corporais e níveis plasmáticos de irisina em mulheres com PCOS.
- Avaliar os efeitos da metformina sobre a atividade do TAM e os níveis de irisina em mulheres com PCOS.

MATERIAIS E MÉTODOS

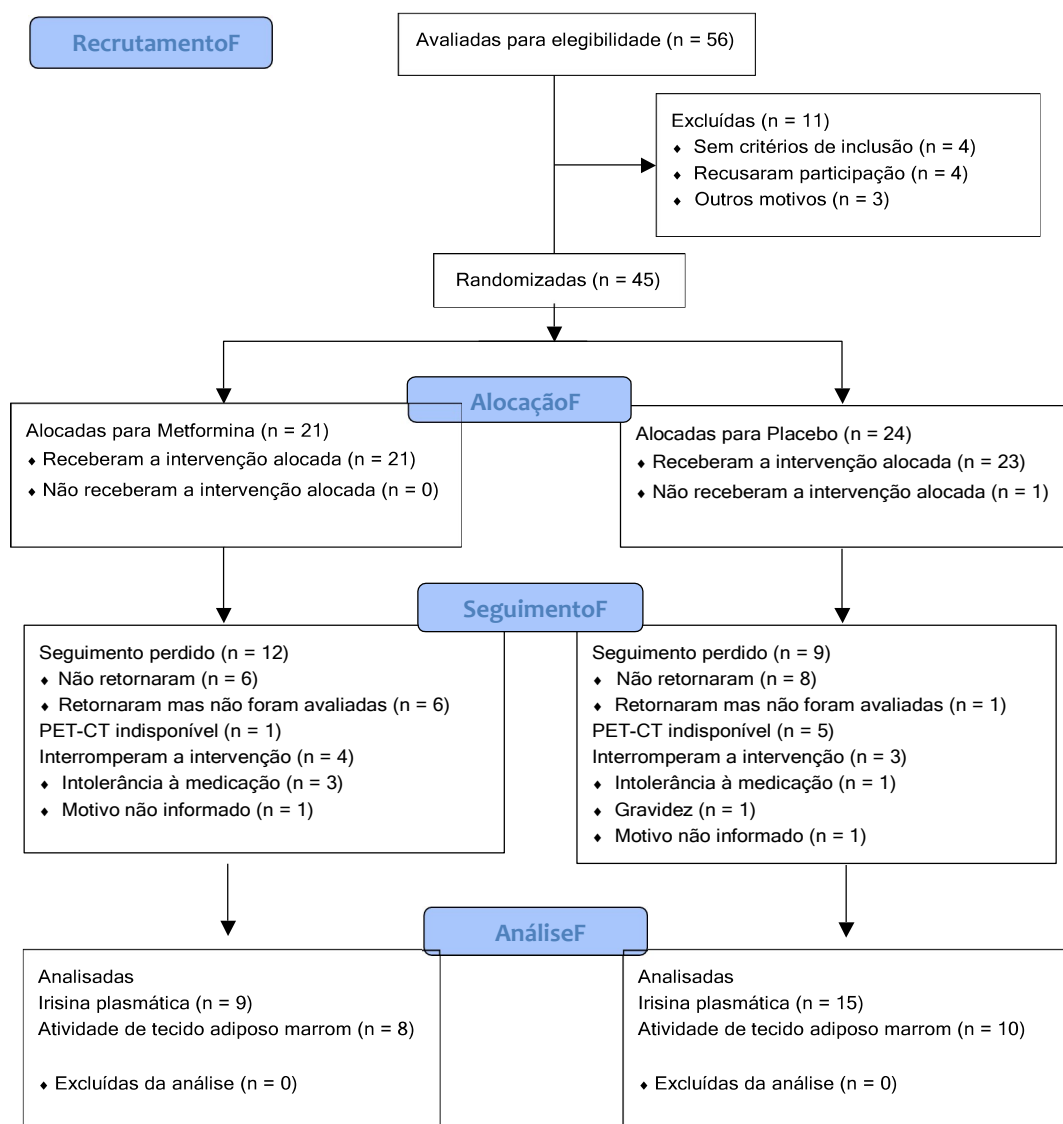
Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida à aprovação nos comitês de ética em pesquisa da UFMG e da FHEMIG, sendo aprovada sob os pareceres CAAE: 17127713.2.0000.5149 e 17127713.2.3001.5119 (ANEXOS 1 e 2). A pesquisa, por tratar-se de ensaio clínico randomizado, foi conduzida conforme o enunciado *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) 2010 (71), por meio da checagem dos 25 itens e criação do diagrama de fluxo das participantes durante cada etapa do estudo(71). O estudo foi notificado e registrado na Plataforma Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (REBEC), sob o número ID RBR-47tvky e na Plataforma Brasil, sob o registro ID 17127713.2.0000.5149 (ANEXO 3).

Participantes

Foram avaliadas, para a elegibilidade do estudo, 92 mulheres de 18 a 45 anos de idade, divididas em dois grupos iniciais, PCOS (n=56) e grupo controle (n=36), pareadas por idade, peso corporal e IMC. Foram excluídas 11 pacientes do grupo PCOS e 11 pacientes do grupo controle, em função de desistência, critérios de exclusão ou outras razões, finalizando um total de 70 pacientes (45 PCOS e 25 controles – Fluxograma 1). O recrutamento foi realizado de abril de 2015 a setembro de 2017, nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e da Maternidade Odete Valadares da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (MOV/FHEMIG).

Fluxograma 1 - Fluxograma de participantes do ensaio clínico randomizado.



Fonte: Schulz et al. (71)

O diagnóstico de PCOS foi feito de acordo com os Critérios de Rotterdam. As portadoras de síndrome foram recrutadas no Ambulatório de Hiperandrogenismo do HC/UFMG. Foram realizados consulta clínica, exame físico e medições antropométricas de todas as pacientes. Pacientes com outras causas de hiperandrogenismo, tais como tumores da tireoide, hiperplasia adrenal congênita, tumores produtores de andrógeno e hiperprolactinemia, ou que usaram drogas

antiandrogênicas nos últimos seis meses e hormônios nos últimos dois meses foram excluídas. Por motivos de segurança relacionados ao uso do ^{18}F -FDG, mulheres grávidas, puérperas, lactantes, diabéticas ou com intolerância oral de glicose também não foram recrutadas. O grupo de controle foi composto por mulheres recrutadas nos ambulatórios de ginecologia do HC/UFMG e da MOV/FHEMIG que tinham ciclos menstruais regulares, sem hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico, ovários policísticos e sem histórico de qualquer ingestão de hormônios ou metformina nos últimos três meses.

Medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais

As medidas antropométricas (IMC e CA) foram obtidas com as participantes vestindo roupas leves e sem sapatos. O IMC foi calculado de acordo com a fórmula padrão [peso em quilogramas/(estatura em metros)²]. A atividade física foi avaliada com a versão brasileira curta do *International Physical Activity Questionnaire* (Anexo 4).

Amostras de sangue foram coletadas após um jejum de nove horas durante a noite, entre os dias 3 e 5 de um episódio de sangramento espontâneo do grupo PCOS ou em dia qualquer em pacientes em amenorreia por mais de três meses consecutivos. Nestas mulheres, os níveis séricos basais de hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireestimulante (TSH), prolactina (PRL), testosterona total (t), glicemia de jejum (GJ), jejum insulina (I) e testosterona (T) foram dosados. Colesterol total sérico, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides níveis também foram medidos.

Os níveis plasmáticos de irisina foram avaliados em duplicata utilizando-se o método ELISA (CUSABIO®, número de catálogo CSB-EQ027943HU), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante, de forma cega para os grupos de pacientes. Os coeficientes de variação intraensaio e interensaio, utilizando três amostras de concentração conhecida, foram de menores que 8% e 10%, respectivamente. A sensibilidade foi de 0,78 ng/mL.

Medida do Tecido Adiposo Marrom

A atividade do TAM foi mensurada utilizando-se PET/CT com ^{18}F -FDG. As participantes foram avaliadas no período da manhã, após jejum de 6 a 12 horas. Elas

utilizavam roupas leves (roupa interior e vestido descartável) (0,18 CLO, unidade de medida para as propriedades isolantes da roupa) e permaneciam em sala com temperatura controlada, a 19 °C, por 2 horas. Após 1 hora de exposição à temperatura do protocolo de estímulo ao frio, o radiofármaco ^{18}F -FDG (média $262,9 \pm 51,5$ MBq) foi administrado por via intravenosa, tendo as pacientes permanecido nas mesmas condições de temperatura por mais uma hora. Uma hora após a administração de ^{18}F -FDG, um mapeamento de PET/CT de corpo inteiro foi realizado, a 20 °C, utilizando-se PET/CT *System Discovery PET/CT 600* (GE Healthcare, Milwaukee, EUA). Uma tomografia computadorizada sem contraste foi realizada primeiro para a correção de atenuação e fusão de imagem anatômica (90 kV, 10 – 120 mAs (smart mA) com espessura de corte de 3,75 mm). Posteriormente, seguindo a mesma extensão corporal da tomografia, imagens de PET foram obtidas. As imagens de PET foram reconstruídas em uma matriz 192x192, utilizando-se um algoritmo *Ordered Subsets Expectation Maximization* (OSEM-like), com duas iterações e 24 subconjuntos. A captação de ^{18}F -FDG pelo TAM foi semiquantificada por meio do valor padrão de captação máxima (SUV_{max}), definida como a concentração de radioatividade do tecido dividida pela dose de radiofármaco injetada por massa magra corporal, utilizando um sistema dedicado ao PET/CT (*Xeleris (GE Healthcare)*). As fórmulas utilizadas e implementadas para calcular a massa magra corporal em imagens PET podem ser encontradas em outros estudos(72, 73). Todas as imagens foram avaliadas por dois examinadores independentes (médico nuclear e radiologista experientes), cegos para os resultados clínicos e resultado laboratorial.

Intervenção com metformina e placebo

As pacientes do grupo PCOS foram randomizadas em paralelo, de forma duplo-cego, em ensaio placebo-controlado para testar a atividade do TAM e níveis plasmáticos de irisina. As mulheres randomizadas nos dois braços do estudo, metformina (Glifage® XR, Merck S/A 500 mg, três comprimidos em dose única diária ao jantar) ou placebo (formulação farmacêutica manipulada similar à metformina), receberam tratamento por 60 dias consecutivos. A randomização foi realizada por meio de uma lista randômica gerada por um programa de computador específico. As pacientes envolvidas no ensaio clínico receberam dois frascos, opacos e lacrados,

codificados e numerados sequencialmente, contendo os comprimidos de metformina ou placebo.

O período de recrutamento foi de abril de 2015 a setembro de 2017, tendo a última avaliação de seguimento ocorrido em novembro de 2017. O principal desfecho avaliado foi a atividade do TAM e o desfecho secundário, o nível plasmático de irisina. Ambos os desfechos foram avaliados antes e após a intervenção. Os resultados foram analisados pelo princípio de intenção de tratar (*intention-to-treat analysis*) modificado, que inclui todos os pacientes randomizados e seguidos com sucesso, independentemente da aderência ao tratamento (74).

Análise Estatística e Cálculo Amostral

Com base em estudos anteriores(6, 10), o cálculo do tamanho da amostra indicou que seriam necessárias 24 participantes, para cada grupo, para permitir detectar uma diferença mínima de 5 g/ml (0,8 desvio padrão) na atividade do TAM com 80% de poder estatístico e 95% de confiança.

As variáveis contínuas foram testadas para distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que a maioria das variáveis não teve distribuição normal em pelo menos um grupo, as comparações entre os dois grupos foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram ajustadas para potenciais confundidores pela análise de covariância (ANCOVA) (75). As variáveis categóricas foram submetidas ao teste do qui-quadrado com correção de continuidade (Yates) ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. As correlações lineares foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de postos de Spearmann, utilizando-se os programas Prism Graphpad versão 6 e SPSS versão

22. Todos os testes foram bicaudais e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A seguir apresenta-se o artigo principal elaborado a partir dos resultados do projeto.

Brown adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome

Flávia R. Oliveira^{1,6}, Marcelo Mamede², Mariana F. Bizzi³, Ana Luiza L. Rocha¹, Cláudia N. Ferreira⁴, Karina B. Gomes⁵, Ana L. Cândido³, Fernando M. Reis¹

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, ²Anatomy and Imaging, ³Internal Medicine, ⁴Technical College and ⁵Clinical and Toxicological Analyses, Universidade Federal de Minas Gerais, and ⁶Odete Valadares Maternity Hospital, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Short Title: Brown adipose tissue in PCOS

Trial registration number: RBR-47tvky

Funding: Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, grant # APQ-03798-16) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) through the National Institute of Hormones and Women's Health (grant # 465482/2014-7) and the National Institute of Molecular Medicine. K.B.G and F.M.R. receive individual research grants from CNPq.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

Correspondence:

Fernando M. Reis, MD, PhD

Division of Human Reproduction, Department of Ob/Gyn

Hospital das Clínicas, UFMG, Av. Alfredo Balena, 110, 9° andar

30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

Phone: 55 31 3409-9485 Fax: 55 31 3409-9299

E-mail: fmreis@ufmg.br

ABSTRACT

Context: Brown adipose tissue (BAT) has been recently identified in adult humans through positron emission tomography-computed tomography (PET-CT). Irisin is a myokine that can induce BAT formation. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a chronic dysfunction associated with obesity and metabolic disorders.

Objective: To evaluate whether BAT activity in women with PCOS differs from controls, correlates with plasma irisin levels and can be rescued by metformin.

Design: Cross-sectional study followed by randomized controlled trial.

Setting: Two medical centers in Brazil.

Patients or Other Participants: Women aged 18-45 years comprising a group with PCOS (n=45) and a healthy control group (n=25) matched by age and body mass index (BMI).

Intervention: The 45 participants of the PCOS group were randomized into a metformin subgroup (1500 mg/day during 60 days, n=21) and a placebo subgroup (n=24).

Main Outcome Measures: BAT activity was measured using ^{18}F -FDG PET-CT, while plasma irisin levels were assayed using ELISA.

Results: Total BAT activity was significantly reduced in women with PCOS. However, this difference was no longer significant after adjustment for waist circumference, a surrogate marker of central adiposity. In the PCOS group, BAT activity correlated negatively with BMI and waist circumference but not with plasma irisin levels. Neither metformin nor placebo resulted in significant changes in BAT activity or plasma irisin levels.

Conclusions: BAT activity was reduced in women with PCOS possibly due to increased central adiposity. In PCOS women, BAT activity did not correlate with plasma irisin levels and did not change after a brief treatment with metformin.

Key Words: brown adipose tissue, PET-CT, PCOS, metformin, irisin, randomized controlled trial

PRÉCIS

Brown adipose tissue activity was reduced in women with polycystic ovary syndrome and did not change after a brief treatment with metformin.

INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT) has been long known in small mammals and newborns to maintain body temperature through thermogenesis (1). In contrast to the energy storing function of white adipose tissue, BAT is a highly energetic tissue with a unique mitochondrial expression of uncoupling protein-1 (UCP-1) that converts the cell respiration electro-chemical gradient into heat, using glucose and fatty acids as fuels (2-4).

Although some indirect evidence had led a few authors to postulate the presence of BAT in adult humans (5), it could be demonstrated only with the availability of positron emission tomography (PET) with ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG), a functional imaging method that evaluates areas of high metabolic activity (4, 6). BAT cells are found in adult humans mainly in the supraclavicular, cervical and paraesternal regions (7). This discovery attracted great interest and led to the hypothesis that BAT distribution and function may be altered in metabolic diseases (4, 6-8).

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder that affects 5-10% of women of reproductive age. It is characterized by clinical and/or biochemical hyperandrogenism, ovulation failure and the presence of enlarged and/or polycystic ovaries in ultrasound images (9). Functional abnormalities of the adipose tissue have been reported in women with PCOS, primarily linked to insulin resistance, even in the absence of obesity (10). Yuan *et al.* demonstrated that BAT activity was dramatically decreased in a rat model of PCOS and that BAT transplantation reversed PCOS-like features such as estrous cycle irregularity and insulin resistance (11).

During the past decade, skeletal muscle has also been identified as an endocrine organ that releases cytokines and other peptides collectively named myokines. Irisin is an exercise-induced myokine that has been proposed to mediate the beneficial effects of physical exercise on metabolism (12-14). The active irisin molecule derives from proteolytic cleavage of fibronectin type III domain-containing 5 (FNDC5) and induces "browning" of white adipocytes through the activation of UCP-1, leading to increased cell respiration and energy expenditure (13-16). Irisin levels are positively associated with body mass index (BMI) and muscle mass (17). However, patients with type 2 diabetes have paradoxically lower irisin levels despite

the association of this condition with obesity (15), therefore the relationship between irisin and insulin resistance is complex and not fully understood (15, 18).

In women with PCOS, Zhang *et al.* found higher serum irisin levels when hyperandrogenism was part of the phenotype (19). However, a recent meta-analysis showed that, with adjustment for BMI, circulating irisin levels are similar in PCOS patients and healthy controls (20). An uncontrolled study showed that after 6 months of metformin treatment there was a small but significant decrease in plasma irisin in PCOS women, along with improvement in insulin sensitivity (16). Thus, the evidence about irisin regulation in PCOS remains largely conflicting (19-21).

The mechanisms behind insulin resistance in women with PCOS include insulin receptor signaling defects and inhibition of insulin-mediated glucose uptake in adipocytes (22). Metformin, a biguanide that has been used for PCOS treatment since 1994, is able to revert most of the metabolic abnormalities of PCOS (23, 24). By increasing insulin sensitivity, metformin treatment reduces ovarian androgen production and can restore ovulation in PCOS women (24). Another possible action mechanism of metformin could be inducing transdifferentiation of white adipocytes into BAT (25, 26).

Thus, the aims of this study were to evaluate whether BAT activity (i) is altered in women with PCOS, (ii) correlates with plasma irisin levels in PCOS women, and (iii) can be rescued by a brief treatment with metformin.

METHODS

Study approval and registration

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (Decision Number 389.782) and registered at the Brazilian Clinical Trials Registry, REBEC (Primary ID Number RBR-47tvky) and Brazilian Ministry of Health Human Research Registry (Protocol ID 17127713.2.0000.5149). All patients included in this study signed an informed consent.

Participants

The study population consisted of 70 women aged 18-45 years divided into a group with PCOS (n=45) and a healthy control group (n=25) matched to the PCOS group by age and body mass index (BMI). Participants were enrolled from April 2015 to September 2017 at the outpatient facilities of two teaching hospitals in Belo Horizonte, Brazil.

The diagnosis of PCOS was made according to the 2003 Rotterdam ESHRE/ASRM PCOS Consensus Workshop Group diagnostic criteria (27). As per the Rotterdam criteria, we excluded patients with hypo or hyperthyroidism, hyperprolactinemia, 21-hydroxylase deficiency, Cushing's syndrome and androgen producing tumors. To reduce potential confounders, we also excluded patients who had used antiandrogen drugs in the last six months or any hormones or metformin in the last two months. Finally, for safety concerns about the use of intravenous ¹⁸F- FDG, we excluded pregnant or puerperal women, women who were breastfeeding, and patients with diabetes or oral glucose intolerance. The control group consisted of women with regular menstrual cycles and without any clinical or biochemical hyperandrogenism or polycystic ovarian morphology and with no use of hormonal therapy or metformin in the past two months.

Antropometric measures, lifestyle and laboratory assessment

Body weight, height and waist circumference were measured by the same professional with the participants wearing lightweight clothing without shoes and BMI was calculated according to the standard formula (weight in kilograms divided by squared height in centimeters).

Physical activity was assessed through the International Physical Activity Questionnaire, quantified in min/week and classified into very active, active or sedentary as detailed elsewhere (28, 29). Women were classified as alcohol drinkers if they reported any quantity of alcohol consumption in the past month and as smokers if they smoked at least one cigarette per day (30, 31).

Blood samples were collected at 9:00 am after an overnight fast between the 3rd and 5th days of menstrual cycle. For serum collection, blood was withdrawn in a plain tube, allowed to clot and centrifuged for 10 min at 1500 g at room temperature. For plasma collection, blood was withdrawn in an EDTA-coated tube and centrifuged for 10 min at 2500 g at 4°C. The serum and plasma aliquots were stored at -80°C until assayed.

Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), prolactin, total testosterone, glucose, insulin, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides were measured using commercial assays (32). Lipid accumulation product (LAP) index was calculated as abdominal circumference (cm) - 58 × triglycerides (millimol/liter) (33).

Plasma Irisin assay

Plasma irisin levels were assayed using a commercial ELISA kit (CUSABIO®, catalog number CSB-EQ027943HU), following strictly the manufacturer's instructions, in duplicate and with the operator blinded to the patient group. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation, using three samples of known concentration, were < 8% and < 10%, respectively. The assay sensitivity was 0.78 ng/mL.

Brown Adipose Tissue activity measurement

BAT activity was measured using ¹⁸F-FDG PET-CT with cold activation in the morning after 6-12 h fasting. In total, the participants remained in a room at 19 °C for 2 hours wearing only underwear and a thin, sleeveless short gown with an insulation effect of 0.18 clo (34), which corresponds to 18% of the insulating value of clothing needed to maintain a person in comfort sitting at rest in a room at 21 °C with air movement of 0.1 m/s and humidity less than 50% (35). After 1h

resting at 19 °C, ^{18}F -FDG (262.9 ± 51.5 MBq) was administered intravenously and the subjects remained in the same cold conditions for another hour. Afterwards, a whole-body PET-CT scan was performed at 20 °C using a dedicated PET-CT system (Discovery PET-CT 600, GE Healthcare, Milwaukee, EUA). Low-dose CT without contrast enhancement was performed first and used for attenuation correction and anatomic image fusion (90 kV, 10-120 mAs (smart mA) with 3.75 mm section thickness). The PET images were reconstructed in a 192x192 matrix, using an Ordered Subsets Expectation Maximization (OSEM)-like algorithm, with 2 iterations and 24 subsets.

^{18}F -FDG uptake in fat areas identified by CT was quantified using a dedicated workstation (Xeleris, GE Healthcare) as described elsewhere (36). BAT activity was expressed in g/ml as the maximum standardized uptake value (SUV_{max}), defined as the tissue radioactivity concentration (KBq/ml) divided by the injection dose per lean body mass (KBq/g). In each one of four body regions (cervico-thoracic, axillary, thoracic, and abdominal) a region of interest (ROI) was delimited around the most dense uptake zone and used to calculate the SUV_{max} . The highest BAT uptake value was used as the total BAT activity. For categorical analysis, the presence of active BAT was defined as a SUV_{max} of at least 2.0 g/ml, as previously described (6). All images were evaluated by two independent readers (experienced nuclear physician and radiologist), blinded to the clinical findings and laboratorial results.

Intervention study with metformin and placebo

The participants of the PCOS group were further enrolled in a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled trial to test the effects of metformin on BAT activity and plasma irisin levels. The participants (n=45) were randomly assigned to receive 60 days of treatment with either metformin (Glifage® XR, Merck, 3 × 500 mg, single daily dose at night, n=21), or placebo tablets (n=24). Randomization was performed through a computer generated random number list. The personnel involved in participant enrollment received sequentially numbered, opaque, sealed flasks containing the metformin or placebo tablets.

The intervention period ranged from April 2015 to September 2017 and the last follow-up assessment was in September 2017. The main outcome measure was

the total BAT level, and a secondary outcome was plasma irisin level. The results were analyzed by the modified intent-to-treat principle, which includes all subjects randomized and successfully followed regardless of adherence to treatment (37).

Statistical Analysis

Sample size calculation indicated that 24 participants per group would be sufficient to detect a minimum difference of 5 g/ml (0.8 standard deviation) in BAT activity with 95% confidence and 80% statistical power.

Continuous variables were tested for normal distribution by Shapiro-Wilk test. Since most variables departed from normality in at least one group, comparisons between the two groups were performed by the non-parametric Mann-Whitney U test. Differences between groups were adjusted for potential confounders by analysis of covariance (ANCOVA) (38). Categorical variables were submitted to Chi-square test with continuity (Yates) correction or Fisher's exact test, as appropriate. Linear correlations were evaluated by Spearman's rank correlation coefficient. We used Prism Graphpad version 6 and SPSS version 22 software packages. All tests were two-tailed and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Baseline characteristics

Table 1 summarizes the baseline characteristics of the two study groups. The PCOS and control groups had similar age, BMI, blood pressure, smoking and alcohol habits, physical activity, serum cholesterol, glucose and TSH levels. The only anthropometric variable that differed between groups was waist circumference, which was larger in PCOS (mean \pm standard deviation 91.0 ± 12.3 cm) than in controls (82.4 ± 10.9 cm, $p = 0.006$).

BAT distribution and correlations

Figure 1 illustrates typical ^{18}F -FDG PET-CT images for detection of BAT in women with PCOS and healthy controls. Specific BAT activity was detected in all body regions evaluated and was present in 46/70 (65.7%) of the participants.

BAT activity was significantly reduced in women with PCOS (median SUV_{max} 7.4, interquartile range 0.9 to 15.4) compared to controls (median SUV_{max} 13.0,

interquartile range 4.7 to 18.4, $p = 0.047$, Mann-Whitney test, Figure 2). When considering each anatomic region evaluated, the BAT activity level measured at Region 3 (thorax) was significantly reduced in women with PCOS (median SUV_{max} 1.0, interquartile range 0.9 to 7.0) compared to controls (SUV_{max} 6.4, interquartile range 1.0 to 10.8, $p = 0.010$, Mann-Whitney test, Figure 2). However, these differences were no longer significant when adjusted for waist circumference ($p = 0.574$ and 0.285 for total BAT and Region 3, respectively).

Correlation analyses pooling PCOS women and controls showed that BAT activity was negatively correlated with BMI (Spearman's $r = -0.55$, $p < 0.001$) and waist circumference ($r = -0.56$, $p < 0.001$). In addition, BAT was weakly and negatively correlated with plasma irisin levels ($r = -0.27$, $p < 0.05$, Figure 2).

When considering only women with PCOS, BAT activity correlated inversely with BMI, waist circumference and LAP index in total and in most anatomical regions analyzed. Remarkably, in women with PCOS total BAT activity showed no correlation with age, serum testosterone, serum insulin or plasma irisin levels (Table 2).

Plasma Irisin levels

Figure 3 shows that plasma irisin levels were similar in women with PCOS and controls, but there was a positive correlation between irisin and BMI in the whole study sample ($r = 0.580$), as well as in each study group (PCOS, $r = 0.54$, $p < 0.01$; control, $r = 0.66$, $p < 0.01$).

Effects of Metformin

As shown in Figure 4, the 45 participants of the PCOS group were randomized into a metformin subgroup ($n=21$) and a placebo subgroup ($n=24$). The analysis plan predicted that all participants available to follow-up would be included in the analysis regardless of adherence to the treatment protocol. The trial was completed by 9 participants of the metformin arm and by 15 participants of the placebo arm, which were all analyzed (Figure 4). None of these subjects that were available to follow-up had discontinued the intervention. In other words, all participants that discontinued the intervention (4 from the metformin arm and 3 from the placebo arm) were among those who did not return to follow-up. Because our PET-CT facility had a period of shutdown, 6 participants that had completed the treatment course and returned to

follow-up could not be reevaluated for BAT activity (Figure 4). Nevertheless, the anthropometric, clinical and biochemical characteristics of the metformin and placebo subgroups were similar at baseline, both comparing all randomized participants (Table 3) and comparing only those who were available for follow-up and effectively analyzed (Table 4).

The results of the trial are summarized as the variation (post minus pre-intervention) of BAT and irisin levels (Figure 5). Neither metformin nor placebo resulted in significant changes in BAT at any evaluated anatomic region, with median variations close to zero. The median change in plasma irisin levels was also close to zero in both the metformin and the placebo arms (Figure 5).

DISCUSSION

The main finding of our study was that patients with PCOS had a lower BAT activity than control patients. This finding was due to the decreased BAT activity in the thoracic region. We also found that BAT activity is inversely correlated with BMI and waist circumference but not with plasma irisin levels in PCOS women. In the randomized controlled trial there were no changes in BAT activity or irisin levels after the use of metformin or placebo.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated BAT activity and distribution in women with PCOS. Based on studies involving other metabolic diseases, we hypothesized that BAT activity might be lower in women with PCOS. In patients with cardiovascular disease (39) or pheochromocytoma (40) the presence of BAT has been negatively associated with central obesity and metabolic dysfunction. Other studies have shown that BAT is inversely associated with BMI and waist circumference in adults (41), probably because energy expenditure is reduced in patients with central adiposity (42).

Here we have expanded this observation to women with PCOS, whose BAT activity was decreased in comparison to controls and was inversely correlated with waist circumference, a surrogate for central adiposity. Our study groups were adequately paired by age and BMI, differing only in waist circumference that was larger in the PCOS group. Thus, it is uncertain whether the lower BAT activity is directly related to PCOS or whether it is associated with visceral adiposity, since the difference between groups does not hold when the results are adjusted for waist

circumference. Furthermore, the lack of correlation between BAT activity and plasma irisin levels in the PCOS group suggests that the lower BAT activity is not explainable by low irisin levels.

The lower activity of brown fat identified in PCOS patients when compared to healthy women was due to differences in the thoracic region. Furthermore, there was an inverse correlation between BAT and LAP index, an insulin resistance and cardiovascular risk marker (33). Surprisingly there was no relationship between serum testosterone and BAT activity in any of the studied regions, suggesting that the decrease in brown fat is related to a metabolic issue independent of changes in the hypothalamic-pituitary-ovary axis, and that the reproductive changes of PCOS may not affect the regulation of the browning pathway of white adipose tissue.

Studies suggested that, compared to white fat, BAT depots are less susceptible to developing local inflammation in response to obesity. However, strong obesogenic insults ultimately induce a local pro-inflammatory environment in brown fat. In mice, this condition directly alters the thermogenic activity of BAT by impairing its energy expenditure mechanism and reducing glucose uptake for use as a fuel substrate (43). This mechanism might justify the lower BAT activity in PCOS patients as the syndrome is often associated with chronic low-grade inflammation (44).

There is growing interest in exploring circulating irisin levels in PCOS patients, as many studies demonstrated that irisin can be involved with PCOS pathophysiology (20). In the current study, PCOS women had similar plasma irisin concentrations in comparison to the control group. In the literature, the characterization of irisin in PCOS is quite controversial since normal (45), increased (16, 19, 21) and decreased (14) irisin concentrations have been described in these patients. This inconsistency may be partly due to differences in the assay methods, but it may also be due to the interference of confounding variables associated with PCOS. Recently, two meta-analyses have summarized irisin levels in women with PCOS. The first meta-analysis included eight studies involving 1918 PCOS patients and 528 controls. The pooled data indicated that the levels of irisin were higher in patients with PCOS and were unrelated to insulin resistance (24). The other meta-analysis included eight studies with 918 PCOS patients and 528 healthy controls and demonstrated that, when adjusted for BMI, circulating irisin in PCOS patients seems comparable to healthy controls (20).

As far as we know, our study is the first to evaluate the effect of metformin on BAT activity in humans. In our study, metformin treatment for 60 days showed no effect on BAT activity or plasma irisin levels in PCOS women. One possible reason for the lack of change in plasma irisin might be the relatively short treatment time, as a previous study of metformin treatment in PCOS women found a decrease in circulating irisin levels at 6 months but not at 3 months follow-up (16). In addition, we excluded women with glucose intolerance or diabetes, who are expected to benefit most from the use of metformin. Another possibility is that there was some improvement in insulin sensitivity but it was not sufficient to induce measurable changes in BAT activity. Early “browning” adipocytes (known as beige or brite) may not be evidenced by PET since the cells that undergo the transdifferentiation process are immersed and dispersed in white fat sites (46). In this context, high-resolution imaging coupled with molecular characterization of tissue specimens may be needed to localize this early type of BAT (47).

One strength of the present study is that the PCOS and control groups were matched by age and BMI and were similar except by abdominal circumference which is a characteristic related to PCOS. In addition, PET-CT examinations were performed by the same professionals unaware of the participant's group, while plasma irisin assays were performed blindly and by a widely validated technique. Our study also managed to recruit the number of participants calculated to achieve statistical power in the comparisons between PCOS and control groups. The randomized trial achieved homogeneity between the metformin and placebo groups and was double blind to avoid the risk of selection, performance and detection biases.

One limitation of this study is the smaller sample size at the end of the metformin trial as a result of the participants lost to follow-up. While attrition bias is not evident by comparing the baseline characteristics of the participants that were fully analyzed, the statistical power of the trial was reduced. Another limitation is the cross-sectional design that does not allow us to define whether the lower BAT activity was present before the onset of PCOS symptoms.

In conclusion, BAT activity was reduced in women with PCOS possibly due to increased central adiposity. In PCOS women, BAT activity did not correlate with plasma irisin levels and did not change after a brief treatment with metformin.

REFERENCES

1. **Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM** 1978 The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* 32:89-93
2. **Rothwell NJ, Stock MJ** 1983 Effects of age on diet-induced thermogenesis and brown adipose tissue metabolism in the rat. *Int J Obes* 7:583-589
3. **Gesta S, Tseng YH, Kahn CR** 2007 Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242-256
4. **van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ** 2009 Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500-1508
5. **Jung RT, Leslie P, Nicholls DG, Cunningham S, Isles TE** 1988 Energy expenditure in normal and diabetic man: the role of brown adipose tissue. *Health Bull (Edinb)* 46:55-62
6. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** 2009 Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517
7. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-452
8. **Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK** 2002 Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29:1393-1398
9. **Rosenfield RL, Ehrmann DA** 2016 The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev* 37:467-520
10. **Villa J, Pratley RE** 2011 Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Curr Diab Rep* 11:179-184
11. **Yuan X, Hu T, Zhao H, Huang Y, Ye R, Lin J, Zhang C, Zhang H, Wei G, Zhou H, Dong M, Zhao J, Wang H, Liu Q, Lee HJ, Jin W, Chen ZJ** 2016

- Brown adipose tissue transplantation ameliorates polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:2708-2713
12. **Pedersen BK, Febbraio MA** 2012 Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8:457-465
 13. **Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM** 2012 A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481:463-468
 14. **Abali R, Temel Yuksel I, Yuksel MA, Bulut B, Imamoglu M, Emirdar V, Unal F, Guzel S, Celik C** 2016 Implications of circulating irisin and Fabp4 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol* 36:897-901
 15. **Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou ZA, Makras P, Perakakis N, Kountouras J, Mantzoros CS** 2018 Irisin in metabolic diseases. *Endocrine* 59:260-274
 16. **Li M, Yang M, Zhou X, Fang X, Hu W, Zhu W, Wang C, Liu D, Li S, Liu H, Yang G, Li L** 2015 Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 100:1485-1493
 17. **Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros CS** 2012 FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 61:1725- 1738
 18. **Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, Ricart W, Fernandez-Real JM** 2013 Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E769-778
 19. **Zhang L, Fang X, Li L, Liu R, Zhang C, Liu H, Tan M, Yang G** 2018 The association between circulating irisin levels and different phenotypes of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*

20. **Cai X, Qiu S, Li L, Zugel M, Steinacker JM, Schumann U** 2018 Circulating irisin in patients with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 36:172-180
21. **Chang CL, Huang SY, Soong YK, Cheng PJ, Wang CJ, Liang IT** 2014 Circulating irisin and glucose-dependent insulinotropic peptide are associated with the development of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E2539-2548
22. **Gourgari E, Spanakis E, Dobs AS** 2016 Pathophysiology, risk factors, and screening methods for prediabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health* 8:381-387
23. **Spritzer PM** 2014 Polycystic ovary syndrome: reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 58:182- 187
24. **Wang C, Zhang XY, Sun Y, Hou XG, Chen L** 2018 Higher circulating irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome:a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol* 34:290-293
25. **Breining P, Jensen JB, Sundelin EI, Gormsen LC, Jakobsen S, Busk M, Rolighed L, Bross P, Fernandez-Guerra P, Markussen LK, Rasmussen NE, Hansen JB, Pedersen SB, Richelsen B, Jessen N** 2018 Metformin Targets Brown Adipose Tissue in vivo and Reduces Oxygen Consumption in vitro. *Diabetes Obes Metab*
26. **Kim EK, Lee SH, Lee SY, Kim JK, Jhun JY, Na HS, Kim SY, Choi JY, Yang CW, Park SH, Cho ML** 2018 Metformin ameliorates experimental-obesity-associated autoimmune arthritis by inducing FGF21 expression and brown adipocyte differentiation. *Exp Mol Med* 50:e432
27. **Rotterdam, Eshre Asrm-Sponsored Pcos Consensus Workshop Group** 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:19-25
28. **Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P** 2003 International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 35:1381-1395

29. **Macfarlane DJ, Lee CC, Ho EY, Chan KL, Chan D** 2006 Convergent validity of six methods to assess physical activity in daily life. *J Appl Physiol* (1985) 101:1328-1334
30. **Colpani V, Oppermann K, Spritzer PM** 2014 Causes of death and associated risk factors among climacteric women from Southern Brazil: a population based-study. *BMC Public Health* 14:194
31. **Bastos CA, Oppermann K, Fuchs SC, Donato GB, Spritzer PM** 2006 Determinants of ovarian volume in pre-, menopausal transition, and post-menopausal women: a population-based study. *Maturitas* 53:405-412
32. **Lauria PB, Del Puerto HL, Reis AM, Candido AL, Reis FM** 2013 Low plasma atrial natriuretic peptide: a new piece in the puzzle of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98:4882-4889
33. **Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM** 2009 Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 24:1726-1731
34. **American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers** 2009 2009 ASHRAE Handbook - Fundamentals: ASHRAE
35. **Engineering ToolBox** 2004 Clo - Clothing and Thermal Insulation. Available in https://www.engineeringtoolbox.com/clo-clothing-thermal-insulation-d_732.html
36. **Sugawara Y, Zasadny KR, Neuhoff AW, Wahl RL** 1999 Reevaluation of the standardized uptake value for FDG: variations with body weight and methods for correction. *Radiology* 213:521-525
37. **Del Re AC, Maisel NC, Blodgett JC, Finney JW** 2013 Intention-to-treat analyses and missing data approaches in pharmacotherapy trials for alcohol use disorders. *BMJ Open* 3:e003464
38. **Pourhoseingholi MA, Baghestani AR, Vahedi M** 2012 How to control confounding effects by statistical analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 5:79-83
39. **Franssens BT, Hoogduin H, Leiner T, van der Graaf Y, Visseren FLJ** 2017 Relation between brown adipose tissue and measures of obesity and metabolic dysfunction in patients with cardiovascular disease. *J Magn Reson Imaging* 46:497-504

40. **Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, Li B, Wang W** 2011 Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One* 6:e21006
41. **Izzi-Engbeaya C, Salem V, Atkar RS, Dhillon WS** 2015 Insights into Brown Adipose Tissue Physiology as Revealed by Imaging Studies. *Adipocyte* 4:1-12
42. **Carpentier AC, Blondin DP, Virtanen KA, Richard D, Haman F, Turcotte EE** 2018 Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:447
43. **Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M** 2018 Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med*
44. **Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM** 2015 Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* 149:R219-227
45. **Pukajlo K, Laczmannski L, Kolackov K, Kuliczowska-Plaksej J, Bolanowski M, Milewicz A, Daroszewski J** 2015 Irisin plasma concentration in PCOS and healthy subjects is related to body fat content and android fat distribution. *Gynecol Endocrinol* 31:907-911
46. **Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM** 2012 Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366-376
47. **Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P, Virtanen KA, Beuschlein F, Persson A, Borga M, Enerback S** 2013 Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19:631-634

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Typical localization of brown fat activity with ^{18}F -FDG PET-CT. A) Maximal Intensity Projection showing diffuse uptake of ^{18}F -FDG at different sites of brown fat. B-I) Representative axial slices throughout a patient's body showing sites of brown fat (red arrows). B) bilateral cervical regions; C) bilateral cervico-thoracic transition; D) bilateral cervico-thoracic transition, bilateral axillary regions; E) bilateral axillary regions and anterior thoracic region; F) mediastinal, bilateral axillary and bilateral intercostal regions; G) thoracic-abdominal transition (close to esophagus); H) right perirenal space; I) intraabdominal region.

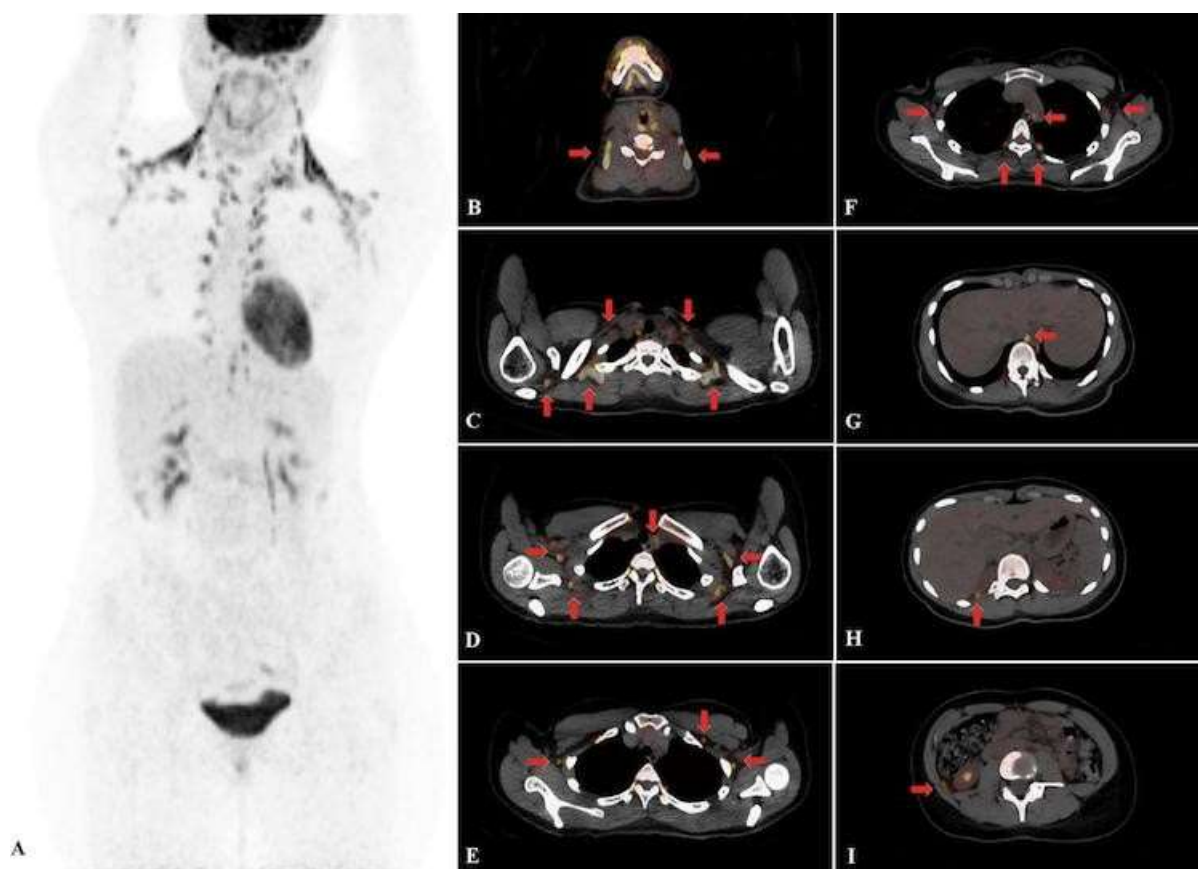


Figure 2: Quantification of brown adipose tissue activity by ^{18}F -FDG uptake in control (n=25) and PCOS (n=45) groups. The boxplots represent the medians and quartiles, with error bars indicating the 10th and 90th percentiles. The scatter plots in the upper panel show negative correlations between total BAT and BMI, waist circumference and plasma irisin. The lower plots compare BAT activity in the two groups at Region 1 (cervico-thoracic), Region 2 (axillary), Region 3 (thoracic), and Region 4 (abdominal). P values refer to Mann-Whitney test.

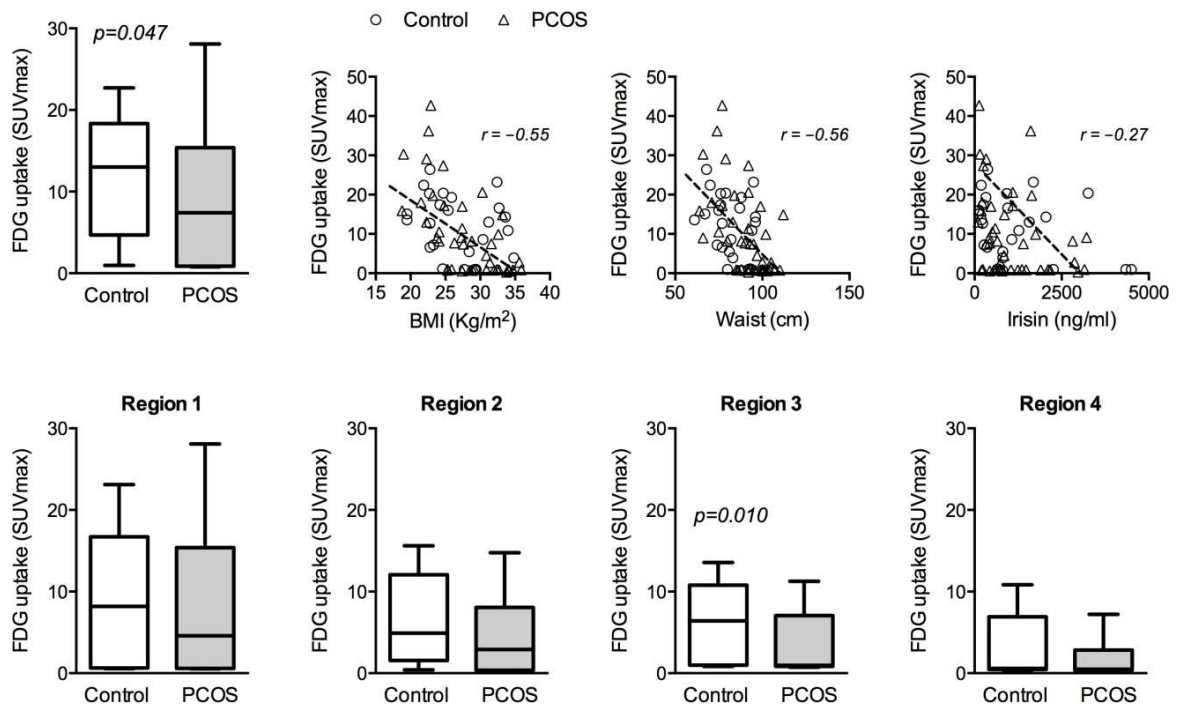


Figure 3: Plasma irisin levels in control (n=25) and PCOS (n=45) groups and their correlation with body mass index (BMI).

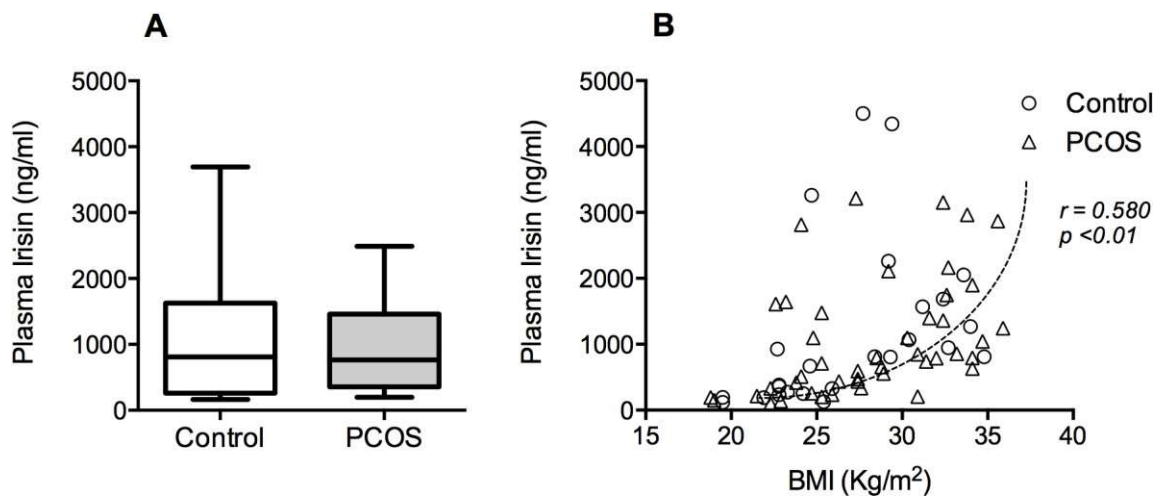


Figure 4: Flow diagram of the randomized trial of metformin versus placebo in women with PCOS.

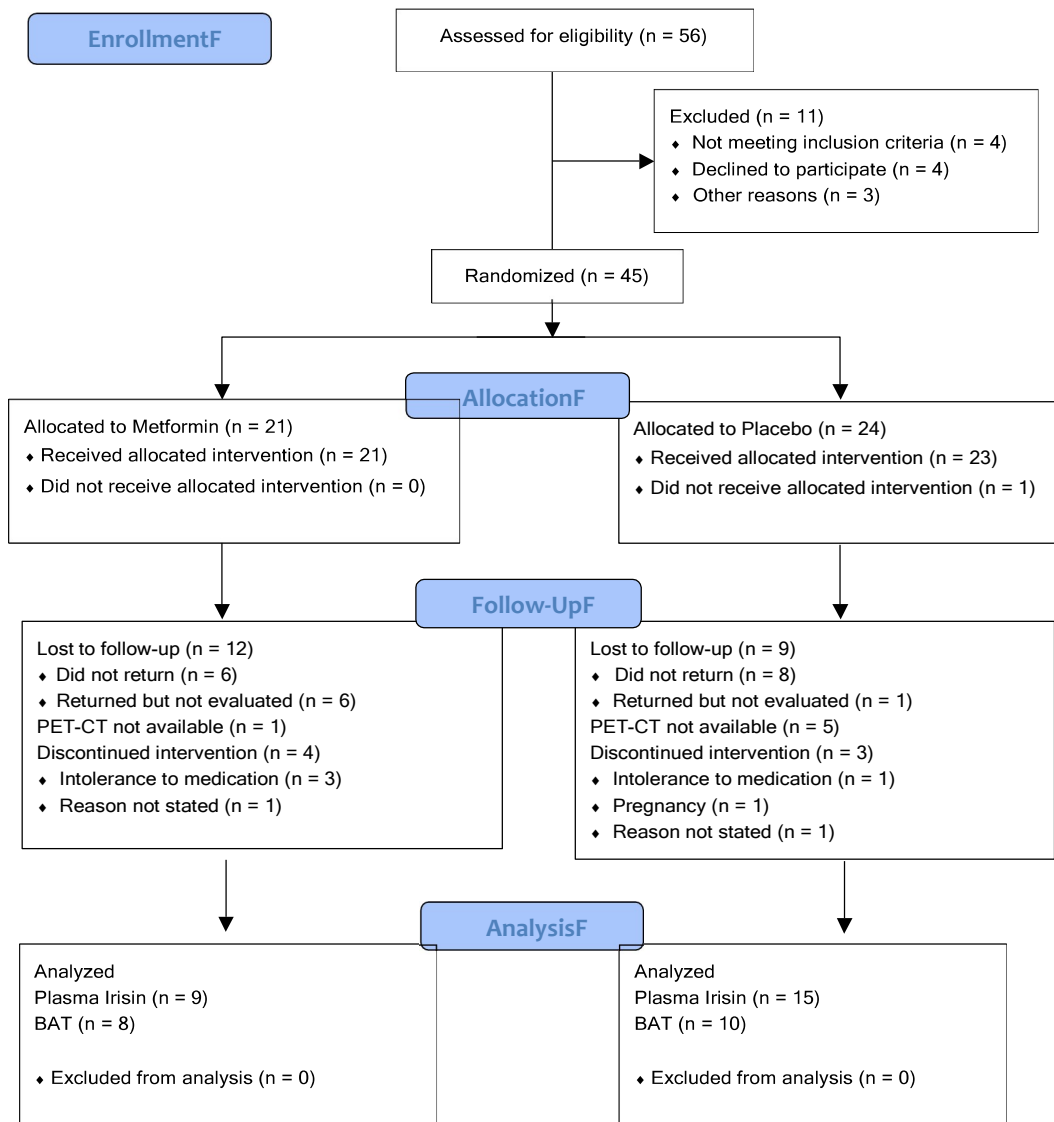


Figure 5: Variation (post minus pre-intervention, Δ) of brown adipose tissue and plasma irisin levels in PCOS women treated with metformin or placebo.

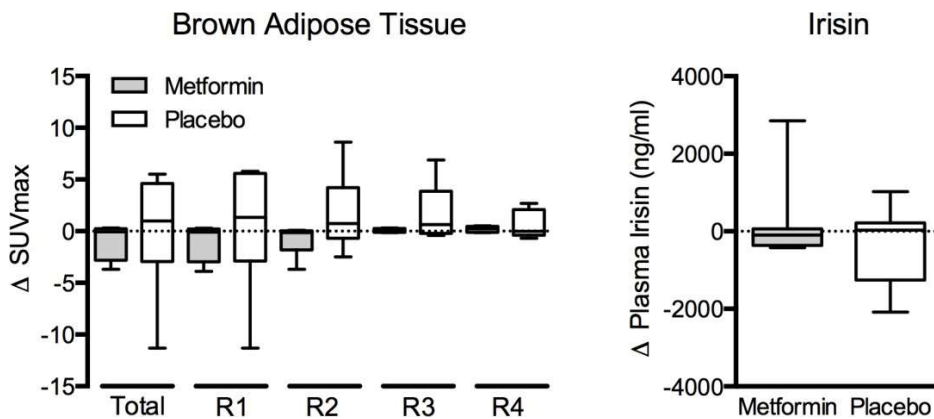


Table 1: Baseline characteristics of the study participants.

Variable	PCOS (n=45)	Control (n=25)	P-value
Age (years)	30.6 ± 5.5	33.2 ± 6.7	0.094
Weight (Kg)	73.4 ± 13.1	69.2 ± 12.1	0.204
Height (cm)	161.1 ± 6.2	160.4 ± 6.3	0.454
Body mass index (Kg/m ²)	28.2 ± 4.6	26.9 ± 4.6	0.312
Waist circumference (cm)	91.0 ± 12.3	82.4 ± 10.9	0.006
Blood Pressure (mmHg)			
Systolic	113.5 ± 12.2	112.3 ± 13.4	0.557
Diastolic	72.8 ± 9.0	74.1 ± 10.5	0.825
Smoking (n, %)	6 (13%)	0 (0%)	0.062
Alcohol drinking (n, %)	10 (22%)	3 (12%)	0.235
Physical activity duration (min/week)	510 ± 456	625 ± 527	0.398
Physical activity classification (n, %)	8 (18%)	4 (16%)	0.822
Very active	27 (60%)	15 (60%)	
Active	10 (22%)	6 (24%)	
Sedentary			
Current hypocaloric diet (n, %)	7 (17%)	4 (16%)	0.613
Serum Cholesterol (mg/dL)			
Total	188.4 ± 38.7	184.3 ± 16.2	0.684
HDL-c	47.5 ± 12.4	54.1 ± 11.4	0.173
Fasting Glucose (mg/dL)	88.3 ± 7.1	92.4 ± 7.8	0.070
Serum TSH (μIU/mL)	2.54 ± 2.45	2.95 ± 0.79	0.081

Data are expressed as means ± SD. P-values refer to Mann-Whitney test, Chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate.

Table 2: Linear correlation between brown adipose tissue at different body regions and some anthropometric and metabolic variables in PCOS women (n=45)

	Total	Region 1 Cervico- thoracic	Region 2 Axillary	Region 3 Thoracic	Region 4 Abdominal
Age	-0.241	-0.134	-0.148	-0.136	-0.007
Body mass index	-0.630*	-0.602*	-0.675*	-0.534*	-0.498*
Waist circumference	-0.592*	-0.503*	-0.628*	-0.590*	-0.437*
LAP index	-0.392*	-0.440*	-0.549*	-0.307	-0.359*
Serum Total Testosterone	0.162	0.151	0.112	0.303	0.149
Serum Insulin	-0.109	-0.083	-0.265	-0.176	-0.075
Plasma Irisin	-0.250	-0.263	-0.288	-0.257	-0.251

Data are presented as Spearman's rank correlation coefficient.

*Statistically significant correlations at p<0.05.

Table 3: Baseline characteristics of the PCOS patients included in the randomized controlled trial.

Variable	Metformin (n=21)	Placebo (n=24)	P-value
Age (years)	30.3 ± 4.5	30.9 ± 6.4	0.641
Weight (Kg)	73.2 ± 12.7	73.5 ± 13.7	0.873
Height (cm)	161.4 ± 6.5	160.9 ± 6.0	0.707
Body mass index (Kg/m ²)	28.1 ± 4.3	28.3 ± 4.9	0.900
Waist circumference (cm)	91.2 ± 10.8	90.7 ± 13.9	0.932
Blood Pressure (mmHg)			
Systolic	111.3 ± 9.7	115.4 ± 13.8	0.230
Diastolic	72.8 ± 7.6	72.8 ± 10.3	0.951
Smoking (n, %)	2 (10%)	4 (17%)	0.670
Alcohol drinking (n, %)	4 (19%)	6 (25%)	0.729
Physical activity duration (min/week)	455 ± 379	558 ± 518	0.495
Physical activity classification (n, %)	4 (19%)	4 (17%)	0.617
Very active	11 (52%)	16 (67%)	
Active	6 (29%)	4 (17%)	
Sedentary			
Current hypocaloric diet (n, %)	5 (24%)	2 (10%)	0.410
Serum Cholesterol (mg/dL)			
Total	181.5 ± 44.6	194.5 ± 32.5	0.260
HDL-c	48.4 ± 13.9	46.7 ± 11.3	0.622
Triglycerides (mg/dL)	110.4 ± 65.1	135.7 ± 77.1	0.171
LAP index	43.4 ± 29.1	57.1 ± 53.3	0.469
Fasting Glucose (mg/dL)	88.9 ± 7.9	87.7 ± 6.5	0.962
Serum Insulin (μIU/mL)	13.7 ± 7.9	14.6 ± 10.7	0.724
Serum TSH (μIU/mL)	2.02 ± 0.81	3.07 ± 3.34	0.890
PCOS phenotype (n, %)			
Hyperandrogenism + anovulation + PCO	14 (70%)	10 (45%)	0.237
Anovulation + PCO	5 (25%)	11 (50%)	
Anovulation + PCO	1 (5%)	1 (5%)	
Hyperandrogenism + PCO			
Infertility (n, %)	20 (95%)	17 (74%)	0.097
Gravidity	0.33 ± 0.73	0.50 ± 1.06	0.820
Previous metformin use (n, %)	10 (48%)	6 (26%)	0.242
Serum Total Testosterone (ng/dL)	49.5 ± 29.9	48.4 ± 29.6	0.606
Serum Prolactin (ng/ml)	13.7 ± 4.3	13.9 ± 4.2	0.820

LAP: lipid accumulation product; PCO: polycystic and/or enlarged ovaries in ultrasound imaging

Table 4: Baseline characteristics of the PCOS patients analyzed at the end of the randomized controlled trial.

Baseline Variable	Outcome: BAT			Outcome: Plasma Irisin		
	Metformin (n=8)	Placebo (n=10)	P-value	Metformin (n=9)	Placebo (n=15)	P-value
Age (years)	32.7 ± 4.0	32.4 ± 7.3	0.790	32.7 ± 3.8	32.1 ± 7.3	0.835
Weight (Kg)	76.5 ± 13.0	71.1 ± 10.7	0.326	75.0 ± 12.9	70.8 ± 13.4	0.420
Height (cm)	159.5 ± 7.5	162.0 ± 4.8	0.504	159.3 ± 7.0	160.4 ± 5.5	0.765
Body mass index (Kg/m ²)	30.0 ± 4.0	26.8 ± 3.7	0.091	29.5 ± 4.0	27.3 ± 4.5	0.270
Waist circumference (cm)	94.9 ± 5.1	86.1 ± 12.9	0.162	93.9 ± 5.6	89.1 ± 14.8	0.592
Blood Pressure (mmHg)						
Systolic	112.5 ± 10.4	112.0 ± 14.0	0.964	110.0 ± 12.2	114.0 ± 16.4	0.585
Diastolic	73.8 ± 5.2	71.0 ± 11.0	0.810	72.2 ± 6.7	72.7 ± 11.0	0.704
Smoking (n, %)	0 (0%)	1 (10%)	1.000	0 (0%)	2 (13%)	0.511
Alcohol drinking (n, %)	2 (25%)	2 (20%)	1.000	2 (22%)	4 (27%)	1.000
Physical activity duration (min/week)	406 ± 365	616 ± 509	0.328	449 ± 442	482 ± 461	1.000
Physical activity classification (n, %)						
Very active	1 (13%)	3 (30%)	0.508	2 (22%)	3 (20%)	0.719
Active	4 (50%)	5 (50%)		4 (44%)	9 (60%)	
Sedentary	2 (25%)	2 (20%)		3 (33%)	3 (20%)	
Current hypocaloric diet (n, %)	2 (25%)	0 (0%)	0.183	3 (33%)	2 (13%)	0.326
Serum Cholesterol (mg/dL)						
Total	194.3 ± 51.5	184.8 ± 27.7	0.954	194.4 ± 47.7	187.2 ± 29.6	0.942
HDL-c	43.5 ± 9.9	46.8 ± 10.3	0.728	45.9 ± 11.5	46.3 ± 12.3	0.771
Triglycerides (mg/dL)	105.6 ± 31.4	102.6 ± 41.8	0.935	99.5 ± 33.7	105.9 ± 36.2	0.657
LAP index	45.0 ± 15.8	28.0 ± 22.0	0.257	41.7 ± 17.5	37.1 ± 21.8	0.773
Fasting Glucose (mg/dL)	90.6 ± 9.5	88.4 ± 5.8	0.563	90.7 ± 8.9	88.7 ± 6.0	0.743
Serum Insulin (μIU/mL)	10.4 ± 6.0	13.4 ± 12.4	0.391	11.3 ± 5.5	14.9 ± 12.6	1.000
Serum TSH (μIU/mL)	2.20 ± 0.59	2.06 ± 1.31		2.04 ± 0.68	2.93 ± 3.94	0.446
PCOS phenotype (n, %)						
Hyperandrogenism + anovulation + PCO	6 (86%)	5 (56%)	0.321	7 (87%)	6 (46%)	0.121
Anovulation + PCO	1 (14%)	3 (33%)		1 (13%)	6 (46%)	
Hyperandrogenism + PCO	0 (0%)	1 (11%)		0 (0%)	1 (8%)	
Infertility (n, %)	7 (88%)	7 (70%)	0.588	8 (89%)	12 (80%)	1.000
Gravidity	0.50 ± 1.07	0.70 ± 1.06	0.559	0.56 ± 1.01	0.80 ± 1.27	0.679
Previous metformin use (n, %)	5 (63%)	4 (40%)	0.637	6 (67%)	5 (33%)	0.206
Serum Total Testosterone (ng/dL)	30.7 ± 18.9	39.8 ± 25.6	0.660	37.2 ± 23.3	40.1 ± 22.7	0.920
Serum Prolactin (ng/ml)	11.7 ± 3.7	14.0 ± 4.6	0.317	11.7 ± 3.7	13.1 ± 4.3	0.527

Data are expressed as means ± SD. P-values refer to Mann-Whitney test, Chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate.
LAP: lipid accumulation product; PCO: polycystic and/or enlarged ovaries in ultrasound imaging

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal achado deste estudo foi o de que pacientes com PCOS apresentam menor atividade do TAM do que as pacientes controle. Este achado foi devido à diminuição da atividade do TAM na região torácica. Também observamos que a atividade do TAM correlaciona-se inversamente com o IMC e a circunferência abdominal, mas não com a irisina plasmática, nas mulheres com PCOS. No ensaio clínico randomizado controlado não houve alteração na atividade do TAM ou níveis plasmáticos de irisina após o uso de metformina ou placebo.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo em que se avaliaram a atividade e a distribuição do TAM em mulheres portadoras de PCOS. Com base em estudos prévios envolvendo outras doenças metabólicas, levantou-se a hipótese de que a atividade do TAM pode ser menor em mulheres com a síndrome. Em pacientes com doença cardiovascular (76) ou feocromocitoma (77), a presença do TAM foi negativamente associada à obesidade central e à disfunção metabólica. Em outros estudos foi demonstrado que o TAM está inversamente associada ao IMC e à circunferência abdominal em adultos (78), provavelmente porque o gasto energético é reduzido em pacientes com adiposidade central (79).

No presente estudo, observamos que pacientes com PCOS apresentam atividade do TAM reduzida em comparação com controles e inversamente relacionada com a circunferência abdominal, um marcador de adiposidade central. Os grupos de estudo foram adequadamente pareados por idade e IMC, diferindo apenas na circunferência abdominal, que foi maior no grupo PCOS. Assim, é incerto se a menor atividade do TAM está diretamente relacionada à PCOS ou se está associada à adiposidade visceral, uma vez que a diferença entre os grupos não se mantém quando os resultados são ajustados para a circunferência abdominal. Além disso, a ausência de correlação entre a atividade do TAM e os níveis plasmáticos de irisina no grupo PCOS sugere que a menor atividade do TAM não se explica pelos baixos níveis de irisina, mas por distúrbios metabólicos associados à PCOS e adiposidade central que poderiam induzir uma liberação compensatória de irisina (79).

A menor atividade do TAM identificada em pacientes com PCOS, quando comparadas às mulheres saudáveis, se deu pela diferença na região torácica. Além

disso, houve correlação inversa entre a atividade do TAM e o índice LAP, um marcador de resistência insulínica e risco cardiovascular (80). Surpreendentemente, não houve relação entre a testosterona sérica e TAM nas regiões estudadas, sugerindo que a diminuição da gordura marrom está relacionada a uma questão metabólica independente das mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, e que as alterações reprodutivas da PCOS não participam da regulação da via de transdiferenciação do tecido adiposo branco.

Em alguns estudos sugeriu-se que os depósitos do TAM, quando comparados aos de gordura branca, são menos suscetíveis a desenvolver inflamação local em resposta à obesidade. Entretanto, em um estudo recente demonstrou-se que fortes insultos obesogênicos induziram um ambiente pró-inflamatório local no TAM. Em camundongos, a inflamação local altera diretamente a atividade termogênica do TAM, prejudicando seu mecanismo de gasto energético e reduzindo a captação de glicose para uso como substrato (81). Esse mecanismo poderia justificar a menor atividade do TAM em pacientes com PCOS, já que a síndrome é frequentemente associada à inflamação crônica de baixo grau (32).

Há um interesse crescente em explorar os níveis circulantes de irisina em pacientes com PCOS, pois em muitos estudos foi demonstrado que a irisina pode estar envolvida na fisiopatologia da síndrome (69). No presente estudo, as mulheres com PCOS apresentaram concentrações plasmáticas de irisina semelhantes às do grupo controle. Na literatura, a caracterização da irisina na PCOS é bastante controversa, uma vez que concentrações normais, aumentadas (52, 68, 70) e diminuídas (82) de irisina foram descritas nessas pacientes. Esta inconsistência pode ser, parcialmente, devido a diferenças nos métodos de ensaio, mas também pode ser devido à interferência de variáveis de confusão associadas à PCOS. Recentemente, duas metanálises resumiram os níveis de irisina em mulheres com PCOS. A primeira metanálise incluiu oito estudos envolvendo 1.918 pacientes com a síndrome e 528 pacientes controle. Os dados agrupados indicaram que os níveis de irisina foram maiores em pacientes com PCOS e não estavam relacionados à resistência à insulina (83). A outra metanálise incluiu oito estudos com 918 pacientes com PCOS e 528 controles saudáveis e demonstrou que, quando ajustado para o IMC, a irisina circulante em pacientes com PCOS parece comparável à de controles saudáveis (69).

Até onde se sabe, este estudo é o primeiro realizado para avaliar o efeito da metformina na atividade do TAM em humanos. O tratamento com metformina por 60 dias não mostrou efeito na atividade do TAM ou nos níveis plasmáticos de irisina em mulheres com PCOS. Uma possível razão para não ter sido identificada nenhuma alteração na irisina plasmática pode ser o tempo de tratamento, que foi relativamente curto, já que, em um estudo anterior sobre o tratamento com metformina em mulheres com PCOS, foi encontrada uma diminuição nos níveis de irisina circulante após seis meses, mas não com três meses de acompanhamento (52). Além disso, foram excluídas do presente estudo mulheres com intolerância à glicose ou portadora de DM2, que deveriam realmente se beneficiar mais com o uso de metformina. Outra possibilidade é que houve alguma melhora na sensibilidade à insulina, mas não foi suficiente para induzir mudanças mensuráveis na atividade do TAM. Além disso, áreas do TAM transdiferenciado poderiam não ser evidenciadas pela PET, uma vez que as células que passam pelo processo de transdiferenciação estariam imersas e dispersas em sítios de gordura branca (66). Neste contexto, a imagiologia de alta resolução, associada à caracterização molecular de amostras de tecidos, pode ser necessária para localizar precocemente este tipo do TAM (84).

No presente estudo, os grupos PCOS e controle foram pareados por idade e IMC de forma bastante semelhante, exceto pela circunferência abdominal, que é uma característica relacionada a PCOS. Além disso, os exames de PET-CT foram realizados pelos mesmos profissionais, que desconheciam os grupos de participantes, enquanto os testes de irisina plasmática foram realizados de forma cega e por meio de uma técnica amplamente validada. Ressalta-se também que foi possível recrutar o número de participantes calculado para alcançar poder estatístico nas comparações entre os grupos PCOS e controle. O estudo randomizado alcançou homogeneidade entre os subgrupos de metformina e placebo, e foi duplo-cego para evitar o risco de viés de seleção, desempenho ou detecção.

Uma limitação do estudo foi o pequeno tamanho da amostra final após intervenção com metformina ou placebo, como resultado das perdas das participantes durante o seguimento. Embora o viés de perdas não seja evidente ao compararem-se as características basais das participantes que foram analisadas, o poder estatístico do estudo ficou reduzido. Outra limitação é o desenho transversal,

que não permite definir se a menor atividade do TAM nas pacientes com PCOS estava presente antes do início dos sintomas da síndrome.

Em síntese, a atividade do TAM foi reduzida em mulheres com PCOS, possivelmente devido ao aumento da adiposidade central. Nessas pacientes, a atividade do TAM não se correlacionou com os níveis de irisina plasmáticos e não se alterou após um curto tratamento com metformina.

REFERÊNCIAS

1. Dewailly D. Diagnostic criteria for PCOS: Is there a need for a rethink? Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2016.
2. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. The New England journal of medicine. 2005;352(12):1223-36.
3. Mukherjee S, Maitra A. Molecular & genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. The Indian journal of medical research. 2010;131:743-60.
4. Indran IR, Lee BH, Yong EL. Cellular and Animal Studies: Insights into Pathophysiology and Therapy of PCOS. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2016.
5. Ravussin E. The presence and role of brown fat in adult humans. Current diabetes reports. 2010;10(2):90-2.
6. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. The New England journal of medicine. 2009;360(15):1500-8.
7. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. The New England journal of medicine. 2009;360(15):1509-17.
8. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature. 2012;481(7382):463-8.
9. Castillo-Quan JI. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. Disease models & mechanisms. 2012;5(3):293-5.
10. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. Metabolism: clinical and experimental. 2012;61(12):1725-38.
11. Stein IFL, M.L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. American journal of obstetrics and gynecology. 1935;29:181-91.

12. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2745-9.
13. Puurunen J, Piltonen T, Morin-Papunen L, Perheentupa A, Jarvela I, Ruukonen A, et al. Unfavorable hormonal, metabolic, and inflammatory alterations persist after menopause in women with PCOS. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(6):1827-34.
14. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Azziz R, Stanczyk FZ, PCOSko G, Braunstein GD, et al. Postmenopausal women with a history of irregular menses and elevated androgen measurements at high risk for worsening cardiovascular event-free survival: results from the National Institutes of Health--National Heart, Lung, and Blood Institute sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(4):1276-84.
15. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine reviews*. 2012;33(6):981-1030.
16. Ferriman D, Purdie AW. The aetiology of oligomenorrhoea and/or hirsuties: a study of 467 patients. *Postgraduate medical journal*. 1983;59(687):17-20.
17. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Human reproduction*. 1995;10(8):2107-11.
18. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertility and sterility*. 2005;83(5):1454-60.
19. Norman RJ, Masters L, Milner CR, Wang JX, Davies MJ. Relative risk of conversion from normoglycaemia to impaired glucose tolerance or non-insulin dependent diabetes mellitus in polycystic ovarian syndrome. *Human reproduction*. 2001;16(9):1995-8.
20. Krentz AJ, von Muhlen D, Barrett-Connor E. Searching for polycystic ovary syndrome in postmenopausal women: evidence of a dose-effect association with prevalent cardiovascular disease. *Menopause*. 2007;14(2):284-92.

21. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clinical endocrinology*. 2000;52(5):595-600.
22. Jedel E, Waern M, Gustafson D, Landen M, Eriksson E, Holm G, et al. Anxiety and depression symptoms in women with polycystic ovary syndrome compared with controls matched for body mass index. *Human reproduction*. 2010;25(2):450-6.
23. Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *The American journal of medicine*. 2001;111(8):607-13.
24. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction update*. 2006;12(6):673-83.
25. Qin JZ, Pang LH, Li MJ, Fan XJ, Huang RD, Chen HY. Obstetric complications in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2013;11:56.
26. Kjerulff LE, Sanchez-Ramos L, Duffy D. Pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a metaanalysis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;204(6):558 e1-6.
27. Hart R, Doherty DA. The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman's long-term health using data linkage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(3):911-9.
28. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2016.
29. El Hayek S, Bitar L, Hamdar LH, Mirza FG, Daoud G. Poly Cystic Ovarian Syndrome: An Updated Overview. *Frontiers in physiology*. 2016;7:124.
30. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical epidemiology*. 2013;6:1-13.
31. de Melo AS, Dias SV, Cavalli Rde C, Cardoso VC, Bettiol H, Barbieri MA, et al. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reproduction*. 2015;150(1):R11-24.

32. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2015;149(5):R219-27.
33. Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcarea VL, Hudita D. The polycystic ovary syndrome: an update on metabolic and hormonal mechanisms. *Journal of medicine and life*. 2015;8(2):142-5.
34. Nestler JE. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *The New England journal of medicine*. 2008;358(1):47-54.
35. Bates GW, Legro RS. Longterm management of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;373(1-2):91-7.
36. Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism: clinical and experimental*. 1994;43(5):647-54.
37. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Metformin: Current knowledge. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(7):658-64.
38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address Aao, Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Role of metformin for ovulation induction in infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a guideline. *Fertility and sterility*. 2017;108(3):426-41.
39. Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Human reproduction update*. 2016;22(6):687-708.
40. Morley LC, Tang T, Yasmin E, Norman RJ, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;11:CD003053.
41. Tso LO, Costello MF, Albuquerque LE, Andriolo RB, Freitas V. Metformin treatment before and during IVF or ICSI in women with polycystic ovary syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(2):CD006105.

42. Wang R, Kim BV, van Wely M, Johnson NP, Costello MF, Zhang H, et al. Treatment strategies for women with WHO group II anovulation: systematic review and network meta-analysis. *Bmj*. 2017;356:j138.
43. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2003;327(7421):951-3.
44. Ravn P, Haugen AG, Glintborg D. Overweight in polycystic ovary syndrome. An update on evidence based advice on diet, exercise and metformin use for weight loss. *Minerva endocrinologica*. 2013;38(1):59-76.
45. Mogul H, Freeman R, Nguyen K. Metformin-Sustained Weight Loss and Reduced Android Fat Tissue at 12 Months in Empowir (Enhance the Metabolic Profile of Women with Insulin Resistance): A Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial of Normoglycemic Women with Midlife Weight Gain. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2016;22(5):575-86.
46. Harborne LR, Sattar N, Norman JE, Fleming R. Metformin and weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome: comparison of doses. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(8):4593-8.
47. Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, et al. Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. *The Journal of endocrinology*. 2004;183(2):299-307.
48. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012(5):CD003053.
49. Tang T, Balen AH. Use of metformin for women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction update*. 2013;19(1):1.
50. Yuan X, Hu T, Zhao H, Huang Y, Ye R, Lin J, et al. Brown adipose tissue transplantation ameliorates polycystic ovary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(10):2708-13.
51. Yang Z, Chen X, Chen Y, Zhao Q. PGC-1 mediates the regulation of metformin in muscle irisin expression and function. *American journal of translational research*. 2015;7(10):1850-9.

52. Li M, Yang M, Zhou X, Fang X, Hu W, Zhu W, et al. Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(4):1485-93.
53. Tam CS, Lecoultre V, Ravussin E. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation.* 2012;125(22):2782-91.
54. Smith RE. Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimatized rat. *The Physiologist.* 1961;4:113.
55. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews.* 2004;84(1):277-359.
56. Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *Journal of anatomy.* 1972;112(Pt 1):35-9.
57. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-7.
58. Celi FS. Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *The New England journal of medicine.* 2009;360(15):1553-6.
59. Calvani R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. Brown adipose tissue and the cold war against obesity. *Diabetes.* 2014;63(12):3998-4000.
60. Ozegowska KE, Pawelczyk LA. The role of insulin and selected adipocytokines in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) - a literature review. *Ginekologia polska.* 2015;86(4):300-4.
61. Villa J, Pratley RE. Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Current diabetes reports.* 2011;11(3):179-84.
62. Panati K, Suneetha Y, Narala VR. Irisin/FNDC5 - An updated review. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2016;20(4):689-97.
63. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, et al. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Scientific reports.* 2015;5:8889.
64. Atherton PJ, Phillips BE. Greek goddess or Greek myth: the effects of exercise on irisin/FNDC5 in humans. *The Journal of physiology.* 2013;591(21):5267-8.
65. Polyzos SA, Mantzoros CS. An update on the validity of irisin assays and the link between irisin and hepatic metabolism. *Metabolism: clinical and experimental.* 2015;64(9):937-42.

66. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
67. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):E769-78.
68. Zhang L, Fang X, Li L, Liu R, Zhang C, Liu H, et al. The association between circulating irisin levels and different phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Journal of endocrinological investigation*. 2018.
69. Cai X, Qiu S, Li L, Zugel M, Steinacker JM, Schumann U. Circulating irisin in patients with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2018;36(2):172-80.
70. Chang CL, Huang SY, Soong YK, Cheng PJ, Wang CJ, Liang IT. Circulating irisin and glucose-dependent insulintropic peptide are associated with the development of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2539-48.
71. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Open medicine : a peer-reviewed, independent, open-access journal*. 2010;4(1):e60-8.
72. Morgan DJ, Bray KM. Lean body mass as a predictor of drug dosage. Implications for drug therapy. *Clinical pharmacokinetics*. 1994;26(4):292-307.
73. Sugawara Y, Zasadny KR, Neuhoff AW, Wahl RL. Reevaluation of the standardized uptake value for FDG: variations with body weight and methods for correction. *Radiology*. 1999;213(2):521-5.
74. Del Re AC, Maisel NC, Blodgett JC, Finney JW. Intention-to-treat analyses and missing data approaches in pharmacotherapy trials for alcohol use disorders. *BMJ open*. 2013;3(11):e003464.
75. Pourhoseingholi MA, Baghestani AR, Vahedi M. How to control confounding effects by statistical analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2012;5(2):79-83.
76. Franssens BT, Hoogduin H, Leiner T, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Relation between brown adipose tissue and measures of obesity and metabolic dysfunction in

patients with cardiovascular disease. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2017;46(2):497-504.

77. Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, et al. Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS one*. 2011;6(6):e21006.

78. Izzi-Engbeaya C, Salem V, Atkar RS, Dhillo WS. Insights into Brown Adipose Tissue Physiology as Revealed by Imaging Studies. *Adipocyte*. 2015;4(1):1-12.

79. Carpentier AC, Blondin DP, Virtanen KA, Richard D, Haman F, Turcotte EE. Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:447.

80. Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM. Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1726-31.

81. Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of internal medicine*. 2018.

82. Abali R, Temel Yuksel I, Yuksel MA, Bulut B, Imamoglu M, Emirdar V, et al. Implications of circulating irisin and Fabp4 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol*. 2016;36(7):897-901.

83. Wang C, Zhang XY, Sun Y, Hou XG, Chen L. Higher circulating irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2018;34(4):290-3.

84. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglund M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631-4.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA METFORMINA SOBRE OS NÍVEIS DE IRISINA E A DISTRIBUIÇÃO DE GORDURA MARROM EM MULHERES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Pesquisador: Fernando Marcos dos Reis

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17127713.2.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 389.782

Data da Relatoria: 06/09/2013

Continuação do Parecer: 389.782

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 10 de Setembro de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

ANEXO 2



FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS -
FHEMIG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA METFORMINA SOBRE OS NÍVEIS DE IRISINA E A DISTRIBUIÇÃO DE GORDURA MARROM EM MULHERES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Pesquisador: Fernando Marcos dos Reis

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17127713.2.3001.5119

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.652.753

Continuação do Parecer: 1.652.753

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 28 de Julho de 2016

Assinado por:
Vanderson Assis Romualdo
(Coordenador)

ANEXO 3

Saúde
Ministério da Saúde

REGISTRO BRASILEIRO DE
Ensaios Clínicos

USUÁRIO SENHA [Esqueceu a senha?](#)
[Registrar-se](#)

[PT](#) | [ES](#) | [EN](#)

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

[BUSCA AVANÇADA](#)

[HOME](#) / [ENSAIOS REGISTRADOS](#) /

RBR-47tvky
Efeitos da metformina sobre os níveis de irisina e a distribuição de gordura marrom em mulheres com a Síndrome dos Ovários Policísticos
Data de registro: 23 de Set. de 2013 às 10:26
Last Update: 4 de Julho de 2017 às 11:43

Tipo do estudo:

ANEXO 4



QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA -

Nome: _____
Data: ____/____/____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

CENTRO COORDENADOR DO IPAQ NO BRASIL- CELAFISCS -
INFORMAÇÕES ANÁLISE, CLASSIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE RESULTADOS NO BRASIL
Tel-Fax: - 011-42298980 ou 42299643. E-mail: celafiscs@celafiscs.com.br
Home Page: www.celafiscs.com.br IPAQ Internacional: www.ipaq.ki.se

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?
_____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?
_____ horas _____ minutos

PERGUNTA SOMENTE PARA O ESTADO DE SÃO PAULO

5. Você já ouviu falar do Programa Agita São Paulo? () Sim () Não

6.. Você sabe o objetivo do Programa? () Sim () Não



CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA IPAQ

1. MUITO ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão
- b) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão.

2. ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão; **ou**
- b) MODERADA ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão; ou
- c) Qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/sem e ≥ 150 minutos/sem (caminhada + moderada + vigorosa).

3. IRREGULARMENTE ATIVO: aquele que realiza atividade física porém insuficiente para ser classificado como ativo pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração. Para realizar essa classificação soma-se a frequência e a duração dos diferentes tipos de atividades (caminhada + moderada + vigorosa). Este grupo foi dividido em dois sub-grupos de acordo com o cumprimento ou não de alguns dos critérios de recomendação:

IRREGULARMENTE ATIVO A: aquele que atinge pelo menos um dos critérios da recomendação quanto à frequência ou quanto à duração da atividade:

- a) Frequência: 5 dias /semana **ou**
- b) Duração: 150 min / semana

IRREGULARMENTE ATIVO B: aquele que não atingiu nenhum dos critérios da recomendação quanto à frequência nem quanto à duração.

4. SEDENTÁRIO: aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

Exemplos:

Indivíduos	Caminhada		Moderada		Vigorosa		Classificação
	F	D	F	D	F	D	
1	-	-	-	-	-	-	Sedentário
2	4	20	1	30	-	-	Irregularmente Ativo A
3	3	30	-	-	-	-	Irregularmente Ativo B
4	3	20	3	20	1	30	Ativo
5	5	45	-	-	-	-	Ativo
6	3	30	3	30	3	20	Muito Ativo
7	-	-	-	-	5	30	Muito Ativo

F = Frequência - D = Duração