UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina

Laura Ferreira Santana

Ribeirão Preto
2007

Laura Ferreira Santana

Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Medicina, Área de Concentração: Tocoginecologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis**

Ribeirão Preto
2007

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Santana, Laura Ferreira
Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina.
Ribeirão Preto, 2007
102 p. : il. ; 29,7cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.
Orientadora: Reis, Rosana Maria

Palavras-chave
1. Receptor de IGF-1. 2. SOP. 3. Expressão gênica. 4.Metformina. 5. Células da granulosa.

Folha de aprovação

Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Medicina, Área de Concentração: Tocoginecologia.

Data da Defesa:____/_____/_____

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____
Instituição: _____Assinatura: _____

Profa. Dra. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura: _____

Profa. Dra. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.”

(Coríntios, cap XIII,. v.1)

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor , nada serei.”

(Coríntios, cap XIII,. v.2)

“O amor é de essência divina, e , desde o primeiro até o último, possuis no fundo do coração a chama desse fogo sagrado.”

(Allan Kardec)

A DEUS

SER de infinita bondade, que me iluminou e me guiou durante todo tempo em que vivi a realização deste trabalho**.**

À Benedita, minha admirável **MÃE,** verbo que se conjuga **AMOR,** pelo carinho e amor a mim dedicados, estando sempre presente.

A Arquileo, meu querido **PAI,** que me ensinou desde cedo a ser perseverante e lutar por meus ideais, me orientando quanto à importância do aprendizado e dos reais valores da vida, quanta **SAUDADE**.

A Dario, meu companheiro, que sempre acreditou nos meus sonhos, minha alegria.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Às mulheres que participaram deste estudo pela confiança, inestimável colaboração e parceria.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, pela orientação, por ter acreditado em meu trabalho, pelos ensinamentos valiosos na pós-graduação, por me estimular sempre na busca de novos limites no conhecimento científico, minha gratidão.

Ao Dr. Manuel Fernández-Sánchez por me aceitar no IVI-Sevilha, pelo acolhimento, reconhecimento a minha dedicação e principalmente por ter tornado sua prioridade o meu projeto.

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva e Sá, por sua indicação e incentivo na realização do doutorado sanduíche, sempre na vanguarda, nos ensinando a ver além dos horizontes, a sonhar, meu eterno respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Antonio Pellicer e ao Prof. José Remohi, por me receberem no IVI de abraços abertos, pelas oportunidades oferecidas pelo reconhecimento e carinho, transmitindo sempre segurança para a realização de um sonho.

Ao Prof. Dr. José Maria Fernandez Santos (Universidade de Sevilha), pela paciência e pelos valiosos ensinamentos em biologia molecular.

À Profa. Dra. Maria Victoria San Martin Diez, por me receber na Universidade de Sevilha e proporcionar meu acesso aos importantes caminhos da biologia molecular.

Ao Prof. Edmund Chada Baracat pela disponibilidade, pela elegância de um mestre que ensina e estimula com palavras doces de sabedoria.

À Profa. Dra A Poli Mara Spritzer pela disponibilidade e preciosas sugestões que tanto enriqueceram este trabalho

À Profa. Dra Carolina Sales Vieira Macedo pelo companheirismo, dedicação e estimulo não somente na realização deste trabalho, mas no dia a dia, da rotina hospitalar.

Ao Prof Dr. Francisco José Cândido dos Reis, pelo estimulo e pela valiosa ajuda na aquisão de meus conhecimentos em estatística.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, em especial aos professores que estiveram à frente desta comissão no período de na realização do doutorado Prof Dr. Jurandyr Moreira de Andrade e Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira pelo apoio, e exemplos de ética e profissionalismo, sempre presentes e as secretárias: Sra. Ilza Alves Rezende Mazzocato e Srta. Taísa Abade, pelo apoio, dedicação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani pelo brilhantismo, na chefia Departamento de Ginecologia e Obstetrícia um líder que estimula, pontuando as qualidades e limites necessários para o crescimento de uma equipe.

A todos os que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo contínuo aprendizado, indispensável a minha formação profissional.

A todos que compõem a Universidade de Sevilha pela disponibilidade, apoio, incentivo e por terem acreditado no meu sonho.

A todos que compõem o IVI Sevilha: corpo clínico, anestesistas, enfermeiras, auxiliares de enfermagem, biólogos, técnicos, recepcionistas, atenção ao cliente, administração, secretárias, setor de informática, supervisão clínica e minhas queridas *azulitas*, por tornarem o IVI Sevilha, um agradável ambiente de trabalho e fazerem com que eu me sentisse em casa, totalmente acolhida, com gestos, palavras e por vezes uma simples *mirada* de apoio e confiança, era como se eu ouvisse o tempo

todo "*confiamos em você e te apoiamos incondicionalmente*", meu carinho, agradecimento e amizade.

A todos médicos que compõem o corpo clínico do IVI-Sevilha, em especial aos doutores: Francisco Carranza, Antonia Tocino, Inmaculada Rodriguez, Julia Ramos, Cinzia Caligara pelo incondicional apoio, estímulo, amizade e carinho.

À Dra Maria Mar Tirado, pelo carinho, apoio e amizade nos momentos difíceis.

Ao Setor de Reprodução Humana, agradeço a todos pelos inúmeros ensinamentos e pelas oportunidades proporcionadas ao meu crescimento científico.

A todos os Docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente aos Professores Geraldo Duarte, Jurandyr Moreira de Andrade, Hélio Humberto Angotti Carrara, Marta Edna Diogenez Yazlle, Maria Célia Mendes e Maristela C. Patta pela colaboração e apoio durante o período de Pós-graduação.

Aos médicos assistentes Drs.: Alessandra Cristina Marcolin, Ana Carolina J. de Sá Rosa e Silva, Paula Andréa de A.S Navarro, Daniela Michelazzo, Júlio César Rosa e Silva, Luiz Alberto Manetta, Rodrigo Alves Ferreira, Stael Porto Leite, Silvio Franceschini, Vânia Buarim, Rogério Lino, pela amizade e convivência agradável.

Aos diretores, biológios e técnicos dos diversos laboratórios envolvidos, neste trabalho, pelo profissionalismo e amizade, de modo especial a Nicolas Prado, Maria José Hernandez, Pablo Vime, Alma Cepeda, Miriam Ruiz, Mari Carmen Roldan (Laboratório de FIV- IVI Sevilha) e a Cristina González Ravina, pela imprescindível colaboração na realização das dosagens laboratoriais (Laboratório Geral IVI - Sevilha).

A todos os funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Setor de Reprodução Humana, em especial as Sras Maria Albina V. Bortolieiro, Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Maria

Cristina Picinato Medeiros de Araújo, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Sandra Aparecida Cavichiollo Viana, pela paciência, compreensão, apoio e alegre convivência durante as diversas fases do doutorado.

Aos colegas da Pós-graduação, pela amizade e pelo companheirismo, em especial a Lauriane Giselle Abreu, Luciana de Barros Matos, Mariana Kéfalas, Wellington Martins, Daniel Tiezzi, Areana D. Nascimento, por compartilharem a luta da busca de um ideal, e a todos pelo alegre e feliz convívio.

A todos os funcionários e médicos-residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ao pessoal técnico-administrativo, Iara Maria Correa, Reinaldo Vicente Tavares, Ricardo Perussi e Silva, Rosane Aparecida Cunha Casula, meu mais sincero agradecimento.

Aos vários profissionais que me ajudaram diretamente na confecção do presente trabalho: Sra. Elettra Greene, pela solicitude e eficiência nas traduções, ao Sra. Maria do Socorro D. N. de Senne, pela revisão gramatical.

À Profa. Dra. Maria Inês Machado Fernandes e ao Prof. Dr. Jose Antunes Rodrigues, que despertaram em mim o gosto pela pesquisa científica, sou grata pela sua orientação.

À Profa Dra Maria Matheus de Sala, pelo apoio e incentivo na realização de um ideal.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA), pelo auxílio financeiro concedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

SANTANA, L.F. Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina. Ribeirão Preto, 2007. 102 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

OBJETIVO: avaliação da expressão gênica do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina de (*Insulin-Like Growth Factor* – IGF) 1 em células da granulosa luteinizadas do *cumulus* de mulheres não obesas, com sensibilidade à insulina normal, com síndrome dos ovários policísticos (SOP) tratadas e não tratadas com metformina.

MODELO DO ESTUDO: prospectivo, longitudinal, randomizado.

PACIENTES E MÉTODOS: avaliamos 12 mulheres com ciclos ovulatórios, 9 mulheres com SOP e 8 mulheres com SOP e tratadas com metformina, ao menos 8 semanas na dose de 1.700 mg/dia. Todos os grupos foram similares com relação ao peso, ao índice de massa corporal (IMC), à circunferência da cintura e com sensibilidade à insulina normal. Todas as mulheres foram submetidas à estimulação ovariana controlada com uso de agonista de GnRH em protocolo longo e gonadotrofinas para ciclos de FIV/ICSI. As células da granulosa do *cumulus* foram obtidas por microdissecção dos cinco maiores folículos pré-ovulatórios. A expressão gênica do receptor de IGF-1 foi determinada com técnica da Reação da Polimerase em Cadeia a partir da Transcrição Reversa (*Reverse transcriptase - Polymerase*

Chain Reaction RT-PCR) semiquantitativa. Foram avaliadas as concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, testosterona, hormônio folículo estimulante (*Follicle-Stimulating Hormone* - FSH), hormônio luteinizante (*Luteinizing Hormone* – LH), *Sex Hormone-Binding Globulin* (SHBG), glicose, insulina e IGF-1. Para análise estatística, foram utilizados os testes: *ANOVA*, *Newman-Keuls*, coeficiente de *Pearson* e regressão linear múltipla, sendo considerado nível de significância de 5%.

RESULTADOS: não foram observadas diferenças com relação à expressão gênica do receptor de IGF-1 nos três grupos analisados (P>0,05). O número de oócitos (20,4 *vs*. 13,1 *vs*. 11,5, P= 0,009), os níveis séricos de estradiol (1.896,00 pcg/mL *vs*. 985,20 pcg/mL *vs*. 908,10 pcg/mL, P = 0,03) e testosterona (1,43 ng/mL *vs*. 0,89 ng/mL *vs*. 0,82 ng/mL pcg/mL, P = 0,02) foram maiores no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina em comparação com as mulheres com ciclos ovulatórios e tratadas com metformina, respectivamente. As mulheres com ciclos ovulatórios (50.710±42.520 ng/mL) apresentaram maiores concentrações foliculares de progesterona quando comparados com as mulheres com SOP tratadas (13.660±5.212 ng/mL) e não tratadas com metformina (17.680±6.644 ng/mL) (P=0,01). Na avaliação da regressão múltipla, a testosterona sérica não sofreu influência da expressão gênica do receptor de IGF-1 ou do IMC.

CONCLUSÕES: as altas concentrações séricas de estradiol e testosterona, maior número de oócitos no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina nos levam a concluir que mulheres com SOP provavelmente têm uma maior sensibilidade à estimulação da esteroidogênese ovariana quando comparadas com mulheres sem essa doença, embora não tenha sido encontrada diferença na expressão do receptor de IGF-1 nos três grupos analisados. A similaridade dos resultados deste

estudo entre mulheres com SOP tratadas com metformina e com ciclos ovulatórios nos levam a “hipotetizar” que um dos possíveis mecanismos de ação da metformina no sistema IGF-1 nas células da granulosa do *cumulus* poderia ser por mecanismos pós-receptores.

Palavras-chave: 1. Receptor de IGF-1. 2. SOP. 3. Expressão gênica. 4.Metformina. 5. Células da granulosa 6.Reprodução assistida.

SUMMARY

SANTANA, L.F. Gene expression of the IGF-1 receptor in luteinized granulosa cells from non-obese women with polycystic ovarian syndrome (PCOS) and with normal insulin sensitivity, treated or not with metformin. Ribeirão Preto, 2007. 102p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

OBJECTIVE: evaluation of the gene expression of the IGF-I receptor in luteinized cumulus granulosa cells from non-obese women with normal insulin sensitivity and with polycystic ovarian syndrome (PCOS) treated or nor with metformin.

STUDY MODEL: prospective, longitudinal, randomized.

PATIENTS AND METHODS: we evaluated 12 women with ovulatory cycles and 9 women with PCOS who had been treated for at least 8 weeks with a metformin dose of 1700 mg/day. All groups were similar in terms of weight, body mass index (BMI), and waist circumference and all had normal insulin sensitivity. All women were submitted to controlled ovarian stimulation with a GnRH agonist in a long protocol and with gonadotropins for IVF/ICSI cycles. Cumulus granulosa cells were obtained by microdissection of the five largest pre-ovulatory follicles. Gene expression of the IGF-1 receptor was determined by semiquantitative RT-PCR. Serum and follicular concentrations of estradiol, progesterone, testosterone, FSH, LH, insulin, SHBG, and IGF-1 were determined. Data were analyzed statistically by ANOVA and by the Newman-Keuls test and the Pearson coefficient and linear multiple regression were calculated, with the level of significance set at 5%.

RESULTS: no difference in gene expression of the IGF-I receptor were observed between the three groups studied (P>0.05). The number of oocytes (20.4 *vs*. 13.1 *vs*. 11.5, P= 0.009) and the serum levels of estradiol (1,896.00 pcg/mL *vs*. 985.20 pcg/mL *vs*. 908.10 pcg/mL, P = 0.03) and testosterone (1.43 ng/mL *vs*. 0.89 ng/mL *vs*. 0.82 ng/mL pcg/mL, P = 0.02) were higher in the group of women with PCOS not treated with metformin than in women with ovulatory cycles and in women treated with metformin, respectively. The women with ovulatory cycles (50.710±42.520 ng/mL) presented higher follicular concentrations of progesterone compared with women with PCOS treated (13.660±5.212 ng/mL) or not with metformin (17.680±6.644 ng/mL) (P=0.01). Multiple regression revealed that serum testosterone was not affected by the gene expression of the IGF-1 receptor or by BMI.

CONCLUSIONS: the high serum concentrations of estradiol and testosterone and the larger number of oocytes in the group of women with PCOS not treated with metformin lead us to conclude that women with PCOS probably have greater sensitivity to stimulation of ovarian steroidogenesis than women without the disease, although no difference was detected in the expression of the IGF-I receptor between the three groups studied. The similarity of the present results for the women with PCOS treated with metformin and for the women with ovulatory cycles leads us to hypothesize that one of the possible mechanisms of action of metformin on the IGF-1 system in cumulus granulosa cells may be of the post-receptor type.

Key-words: 1. IGF-1 receptor. 2. PCOS 3. Gene expression 4. metformin 5. granulosa cells. 6. assisted reproduction .

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1 OBJETIVOS 1

2 REVISÃO BIBILOGRÁFICA 3

2.1 Metformina no tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos 4

2.2 Metformina comparada com uso de placebo na ovulação 9

2.3 Citrato de clomifeno versus metformina com citrato de clomifeno 10

2.4 Uso de metformina associado ao FSH na indução da ovulação 12

2.5 Metformina e fertilização *in vitro* (FIV) 13

2.6 O uso da metformina durante a gravidez 16

2.7 Conclusões do uso da metformina no tratamento da infertilidade em mulheres com SOP 19

2.8 Referências Bibilográficas 20

3 ARTIGO CIENTÍFICO 30

3.1 Resumo 31

3.2 Abstract 33

3.3 Introdução 35

3.4 Pacientes e Métodos 38

3.4.1 Pacientes 38

3.4.2 Uso de metformina e avaliação da resistência à insulina 41

3.4.3 Estimulação ovariana controlada e captação oocitária 41

3.4.4 Preparação das células da granulosa do cumulus e do fluido folicular 42

3.4.5 Padronização de extração de RNA total de células da granulosa 43
3.4.6 RT-PCR qualitativa e RT-PCR semiquantitativa 44
3.4.7 Dosagens das concentrações hormonais no soro e fluido folicular de glicose, insulina, SHBG, IGF-1, testosterona, estradiol, LH, FSH e progesterona 47
3.4.8 Análise estatística 48
3.5 Resultados 49
3.5.1 Avaliação da expressão gênica do receptor de IGF-1 nas células da granulosa do *cumulus* 49
3.5.2 Avaliação das concentrações hormonais séricas e foliculares 49
3.5.3 Avaliação da resposta à indução da ovulação controlada 51
3.6 Discussão e conclusões 60
3.7 Referências Bibliográficas 72

ANEXOS 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação qualitativa da RT-PCR da expressão gênica dos receptores de IGF-1, FSH, LH-N, LH-O e do gene de referência da β-Actina humana em células da granulosa do *cumulus* de mulheres ovulatórias realizada com eletroforese em gel de agarose a 3% e bomuro de etídio 56

Figura 2 – RT-PCR qualitativa da expressão gênica do receptor de IGF-1 e do gene de referência da β-actina, com 100 ng, 10 ng e 1 ng de RNA em células da granulosa do *cumulus* de mulheres ovulatórias, com SOP tratadas e não tratadas com metformina. Eletroforese em gel de agarose a 3% e bomuro de etídio 57

Figura 3 – Semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa do cumulus de mulheres não obesas ovulatórias, com SOP tratadas e não tratadas com metformina. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média (P = 0,18) 58

Figura 4 – Correlação entre as concentrações séricas e foliculares de testosterona, no grupo de mulheres com síndrome dos ovários policísticos não tratadas com metformina (A) (P = 0,04) e nas mulheres incluidas neste estudo (B) (P = 0,02) 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados relativos às médias das concentrações séricas e foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia, IGF-1, FSH e LH de mulheres ovulatórias e com SOP tratadas e não tratadas com metformina, no dia da punção oocitária 52

Tabela 2 – Resultados referentes à avaliação dos coeficientes de correlação entre as concentrações séricas e foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia, IGF-1, FSH e LH das mulheres incluídas neste estudo e dos grupos de mulheres ovulatórias, com síndrome dos ovários policísticos (SOP) tratadas e não tratadas com metformina, no dia da punção oocitária 53

Tabela 3 – Resultados referentes ao modelo de regressão múltipla, considerando concentração sérica de testosterona como variável dependente e a expressão gênica do receptor de IGF-1, IMC, número de oócitos, concentrações foliculares de testosterona e as concentrações séricas de insulina como variáveis independentes, nas mulheres incluídas neste estudo 54

Tabela 4 – Resultados referentes à comparação da resposta à estimulação ovariana controlada entre mulheres com ciclos ovulatórios e mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina 55

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP-15 – *Bone morphogenetic factor* 15

C/Q – Relação cintura-quadril

C/Q – Relação cintura-quadril

E2 – Estradiol

FDA – Food and Drug Administration

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – *Follicle-Stimulating Hormone*

GDF-9 – *Growth differentiation factor-9*

GLUTs – *Glucose transporter proteins*

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

HCG – Gonadotrofina coriônica humana

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMG – Gonadotrofina de mulher menopausada

ICSI – Injeção Intra-citoplasmática de espermatozoíde

IGF-1 – Fator de crescimento similar à insulina 1

IGFBP-1 – Globulina carreadora de fator de crescimento semelhante à insulina 1

IMC – Índice de massa corporal

IRS-1 – *Insulin receptor substrate*

LH – *Luteinizing Hormone*

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

P4 – Progesterona

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio

QUICKI – Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index

RT-PCR – *Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

S-DHEA – Sulfato dehidroepiandrosterona

SHBG – *Sex Hormone-Binding Globulin*

SHO – Síndrome de hiperestimulação ovariana

SM – Síndrome metabólica

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

T – Testosterona

1- Objetivos do estudo

Objetivo Primário

Padronizar a técnica de extração de RNA total das células da granulosa do *cumulus* de oócitos obtidos de folículos aspirados de mulheres submetidas à estimulação ovariana controlada para avaliar a expressão gênica do receptor de IGF-1.

Objetivos Secundários

1) Determinar o efeito da metformina sobre a expressão gênica do receptor de IGF-1 nas células da granulosa do *cumulus* oocitário de mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, comparadas com mulheres com ciclos ovulatórios.

2) Avaliar as concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, testosterona, FSH, LH, SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 em mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, comparadas com o grupo-controle.

2- Revisão bibliográfica

2.1 Metformina no tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos

A síndrome dos ovários policísticos representa a principal endocrinopatia ginecológica na idade reprodutiva, com incidência de 6-10% das mulheres no menacme (Asuncion, Calvo *et al.*, 2000). É considerada a causa mais comum de infertilidade por anovulação, podendo em alguns países, como nos EUA, representar a principal causa de infertilidade feminina (Homburg, 1996). Atualmente, acredita-se que sua etiopatogenia seja devido a fatores de origem genética desencadeados por fatores ambientais. O tipo de herança genética provavelmente é poligênica, sendo que os genes, mais freqüentemente associados com a SOP, são os relacionados com a biossíntese, ação e regulação de androgênios, genes envolvidos na resistência insulínica e no processo inflamatório crônico e aterosclerose (Escobar-Morreale, Luque-Ramirez *et al.*, 2005). As diversas manifestações clínicas desta doença fazem com que essas mulheres sejam atualmente consideradas parte integrante de diferentes fenótipos (Xita e Tsatsoulis, 2006) (Figura 1).

Dos fatores ambientais, podemos citar o estilo de vida, sendo a obesidade tanto um desencadeador como um complicador da SOP. Cerca de 50% das mulheres com SOP são portadoras de obesidade (Reis, Foss *et al.*, 1995). O Consenso de *Rotterdam* sugere realização de rastreamento para síndrome metabólica (SM) em todas as mulheres com SOP e portadoras de obesidade. Nesse consenso a SM foi definida com a presença de pelo menos três dos seguintes critérios: obesidade abdominal (circunferênica da cintura > 88 cm), níveis séricos de triglicérides maiores que 150 mg/dL, HDL colesterol menor que 50 mg/dL, níveis pressóricos

>130/>85 mmHg e glicemia de jejum entre 100 e 126 mg/dL e/ou glicemia de segunda hora no teste de tolerância oral à glicose entre 140 e 199 mg/dL (Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome, 2004).

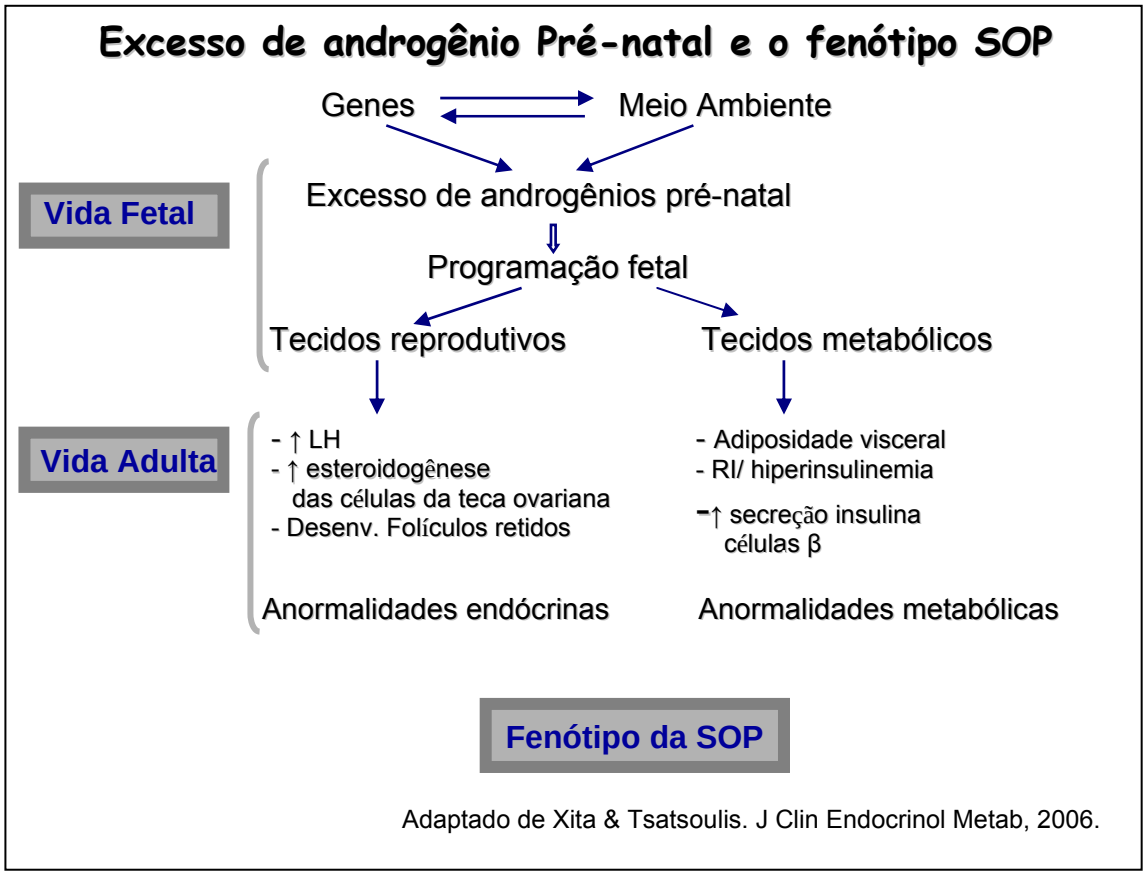


Figura 1: O fenótipo da Síndrome dos Ovários Policísticos depende da interação entre fatores genéticos e ambientais, tanto na vida fetal como na vida adulta.

A resistência insulínica e a hiperinsulinemia compensatória permanecem como os elementos mais importantes na etiopatogenia da SOP (Diamanti-Kandarakis e Papavassiliou, 2006), e estes fatores fazem com que a SOP seja vista como uma doença com caráter metabólico com importantes repercussões a longo prazo, com a maior probabilidade de desenvolvimento de *diabetes mellitus*,

síndrome metabólica e doença cardiovascular, associados a um maior risco de desenvolvimento de doença coronariana nestas mulheres (Talbott, Zborowski *et al.*, 2004; Carmina, Chu *et al.*, 2005; Teede, Hutchison *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo se cria um paradoxo, pois enquanto na maioria dos órgãos de ação da insulina se observa um estado de resistência, no ovário ocorre um aumento de sensibilidade (Wu, Zhou *et al.*, 2003; Baillargeon e Nestler, 2006; Poretsky, 2006), com um maior estímulo na esteroidogênese com potencialização na produção androgênica e maior risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO), quando essas mulheres são submetidas à estimulação ovariana controlada (Delvigne e Rozenberg, 2002; Reis e Santana L.F., 2004).

Nas mulheres com SOP, a resposta à indução da ovulação nem sempre é adequada, variando de baixa resposta à hiperestimulação ovariana. Por se tratar de uma causa freqüente de infertilidade em nossa população, torna-se necessária a avaliação de opções terapêuticas que possibilitem modular essa resposta ovariana, o que continua sendo um desafio aos médicos e pesquisadores.

A modificação no estilo de vida, com dieta e exercícios, deve ser a primeira orientação nas mulheres com obesidade, com intuito não apenas de restabelecer a ovulação e favorecer a gravidez, como também para prevenir as complicações a longo prazo associadas à SOP como *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (Pasquali e Gambineri, 2004).

A resistência insulínica associada à obesidade está relacionada com piores resultados no tratamento com indutores da ovulação em mulheres com SOP (Mulders, Eijkemans *et al.*, 2003). Sendo freqüentemente observadas baixas taxas de

gravidez, elevadas taxas de aborto, uso de maiores doses de gonadotrofinas, maior tendência à resposta multifolicular e maiores taxas de cancelamento. A perda de peso pode restaurar as alterações hormonais associadas à SOP, com aumento das concentrações plasmáticas de SHBG, diminuição dos níveis séricos de insulina e androgênios (Kiddy, Hamilton-Fairley *et al.*, 1992) (Guzick, Wing *et al.*, 1994). Perdas de peso de 5-10% podem ser suficientes para restabelecer a função ovariana e melhorar a resposta à indução da ovulação (Kiddy, Hamilton-Fairley *et al.*, 1992). Assim a perda de peso deve ser considerada a primeira opção de tratamento para mulheres portadoras de SOP e obesidade (Norman, Noakes *et al.*, 2004) (Pasquali e Gambineri, 2004).

Conseguir este objetivo não será fácil dando uma simples dieta à paciente. É importante proporcionar informações corretas dos riscos tanto a curto como a longo prazo a que estas mulheres estão expostas. Sendo também fundamental explicar a importância que a perda de peso tem não só para conseguir a gestação, mas também para se obter uma melhor evolução da gravidez, com menores riscos de complicações obstétricas e neonatais. O objetivo principal não deve ser conseguir um máximo de perda de peso em curto tempo, mas uma perda paulatina e duradora. Estas recomendações deverão ser individualizadas e adaptadas às condições pessoais de cada mulher (Moran e Norman, 2004; Norman, Noakes *et al.*, 2004).

Nos casos em que não se consegue êxito com uso dessas recomendações, uma das opções terapêuticas é uso da metformina que, nos últimos anos, tem sua atuação no tratamento da infertilidade amplamente discutida (Acbay e Gundogdu, 1996; Costello, Chapman *et al.*, 2006).

A metformina pertence ao grupo das biguanidas, foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1995, para o tratamento de mulheres com *diabetes mellitus* não insulinodependente, essa droga tem como contra-indicação o uso em pacientes com risco de acidose láctica (Sulkin, Bosman *et al.*, 1997). Os prováveis mecanismos de ação da metformina são diminuição da gluconeogênese hepática, interferindo com o processo respiratório oxidativo mitocondrial. Suprimindo a gluconeogênese de vários substratos, incluindo lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos. Além disso, a metformina aumenta o nível de cálcio intramitocondrial que é um modulador da respiração celular (Dominguez, Davidoff *et al.*, 1996; Kirpichnikov, Mcfarlane *et al.*, 2002). Na melhora da sensibilidade tecidual à insulina, a metformina facilita o transporte de glicose com aumento da atividade tirosina cinase nos receptores de insulina (Dominguez, Davidoff *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a metformina não tem efeito direto na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Defronzo e Goodman, 1995).

Vários trabalhos têm demonstrado que a metformina é capaz de promover melhora na sensibilidade insulínica (Kolodziejczyk, Duleba *et al.*, 2000; Santana, De Sa *et al.*, 2004), no perfil lipídico (Glueck, Fontaine *et al.*, 2001; Nardo e Rai, 2001; Santana, De Sa *et al.*, 2004) bem como na diminuição dos níveis séricos de insulina/glicemia de jejum e dos níveis séricos de testosterona (Santana, De Sa *et al.*, 2004) (Moghetti, Castello *et al.*, 2000). Tudo isso, repercutindo clinicamente em provável diminuição do risco cardiovascular para mulheres com SOP. Além de apresentar boa tolerabilidade, os principais efeitos colaterais são náuseas e diarréia que, em geral, diminuem após a segunda semana de tratamento (Kirpichnikov, Mcfarlane *et al.*, 2002).

Na literatura, várias metanálises e revisões sistemáticas vêm tentando esclarecer a efetividade da metformina, como opção terapêutica para mulheres com SOP e infertilidade. Esta revisão tem como objetivo avaliar o uso da metformina em mulheres com SOP nos diferentes contextos da infertilidade feminina e gestação.

2.2 Metformina comparada com uso de placebo na ovulação

Lord *et al*. (2003) realizaram uma metanálise e compararam a efetividade da metformina com relação ao uso de placebo para promover a ovulação. Esses autores concluíram que a metformina é mais efetiva que a administração de placebo para a ocorrência de ovulação com *odds ratio* de 3,88 (2,25 a 6,69, $p < 0,0001$). Foram avaliados apenas sete estudos, a dose da metformina utilizada variou de 1.500 mg a 1.700 mg e o tempo de uso da medicação foi de 35 dias a quatro meses. Em somente dois desses estudos não foram demonstradas diferenças significativas, em ambos o índice de massa corporal era menor que os demais estudos . Kashyap *et al*. (2004) realizaram uma revisão sistemática sobre a utilização da metformina em mulheres com SOP e observaram que a metformina foi 50% melhor que o placebo para induzir a ovulação (risco relativo de 1,50). Nessa metanálise foram incluídos seis, estudos a dose da metformina utilizada variou de 1.500 mg a 1.700 mg, e o tempo de uso da medicação de 35 dias a seis meses .

Em nenhuma das revisões foram observadas diferenças com relação às taxas de gestação clínica com o uso da metformina ou placebo, no entanto, os estudos analisados nessas revisões não tinham como objetivo principal avaliar a taxa de gestação.

2.3 Citrato de clomifeno *versus* metformina com citrato de clomifeno

O citrato de clomifeno foi a primeira droga estudada com objetivo de promover a indução da ovulação em mulheres com oligomenorréia e representou durante muitos anos a primeira opção terapêutica para mulheres com infertilidade por anovulação. Trata-se de uma medicação efetiva e caracterizada por baixo custo, poucos efeitos colaterais e simplicidade de administração. A metformina tem sido uma das drogas mais amplamente utilizadas no tratamento de mulheres com SOP com resultados favoráveis na melhora das taxas de ovulações nessas mulheres. Vários estudos tiveram por objetivo avaliar a eficácia da metformina, do citrato de clomifeno e da combinação destas drogas como primeira linha de tratamento da infertilidade de mulheres com SOP. Porém, até o presente momento não há uma definição de qual seria a melhor escolha, devido principalmente às limitações dos estudos realizados.

A metanálise de Lord *et al*. (2003) mostrou que a taxa de ovulação foi superior nas mulheres nas quais se administrou metformina associada ao citrato de clomifeno com uma *odds ratio* de 4,41 (2,37 a 8,22 P < 0,0001). Foi também observada uma maior taxa de gravidez (*odds ratio* de 4,40, intervalo de confiança de 1,96 a 9,85 $P = 0,0003$).

Kashyap *et al.* (2004) em sua revisão concluíram que a taxa de ovulação foi três a quatro vezes maior nos grupos onde foi administrada metformina associada ao citrato de clomifeno (risco relativo de 3,04), o mesmo foi observado com relação às taxas de gravidez (risco relativo de 3,65).

Neveu *et al.* (2007) avaliaram o uso do citrato de clomifeno, metformina e o uso concomitante destas duas medicações na indução da ovulação de 154 mulheres com SOP e observaram que o uso da metformina isolado ou em associação com o citrato de clomifeno foi mais efetivo no aumento das taxas de ovulação quando comparados com o grupo que usou citrato de clomifeno isoladamente, com taxas de ovulação respectivamente de 75,4%, 63,4% e 50, 0%. Não foram observadas diferenças com relação às taxas de gravidez, nos três grupos analisados.

Legro *et al*. (2007) publicaram um estudo com 626 mulheres com SOP e compararam o uso da metformina e do citrato de clomifeno no tratamento de infertilidade. Esse estudo demonstrou que o citrato de clomifeno seria mais efetivo que a metformina na indução da ovulação em mulheres com SOP, sem qualquer benefício da adição da metformina ao citrato de clomifeno. A taxa de nascidos vivos foi considerada o principal parâmetro avaliado no estudo de Legro *et al*., foram considerados parâmetros secundários as taxas de ovulação, gestação, aborto e gestação múltipla. Várias críticas foram realizadas a este estudo, sendo motivo de um editorial na própria *New England Journal of Medicine* (Guzick, 2007). Nesse estudo foram incluídas mulheres com obstrução tubárea unilateral, a análise do espermograma foi incompleta avaliando-se apenas o número de espermatozóides, podendo estes fatores repercutirem nas taxas de gravidez e nascidos vivos dos grupos estudados. O IMC médio das mulheres nos três grupos foi aproximadamente 35 Kg/m^2. Maciel *et al.* (2004) demonstram que as mulheres não obesas são as que mais se beneficiariam clinicamente do uso da metformina. (Maciel, Soares Junior *et al.*, 2004).

Palomba *et al*. (2007) publicaram o mais recente estudo multicêntrico não randomizado, com o objetivo de avaliar a efetividade do citrato de clomifeno e da metformina na indução da ovulação de mulheres com SOP. Não foram detectadas diferenças nas taxas de ovulação tanto com o uso da metformina ou do citrato de clomifeno. Foi um estudo bem controlado com grupos similares e a seleção de pacientes foi cuidadosa, excluindo-se o uso de tratamentos prévios, bem como outras causas de infertilidade como fatores masculino e tubáreo. A principal limitação desse trabalho foi o fato de não ser um estudo randomizado.

2.4 Uso de metformina associado ao FSH na indução da ovulação

Na literatura, poucos estudos analisaram o uso da metformina com ciclos de estimulação ovariana com FSH. De Leo *et al* .(1999), em um estudo prospectivo randomizado, avaliaram 20 mulheres resistentes ao citrato de clomifeno randomizadas em dois grupos estimulados, durante dois ciclos. O grupo A foi estimulado com FSH, e ao grupo B associou-se metformina da dose de 1.500 mg ao dia, por pelo menos um mês, antes de iniciar a estimulação ovariana com FSH. Nesse estudo foi observado que o número de folículos dominantes (2,4 *vs* 4,5) e os níveis de estradiol (E2: 1620 pcg/mL *vs* 2643 pcg/mL) foram maiores nos ciclos sem metformina. O número de ciclos cancelados por hiper-resposta (0 *vs* 32%) foi significativamente maior no grupo sem metformina. Esses autores concluíram que o uso da metformina, nos ciclos de estimulação ovariana com FSH, poderia levar a um crescimento folicular mais adequado com menor risco de síndrome de hiperestimulação ovariana. Van Santbrink *et al.* (2005), em estudo prospectivo

randomizado placebo controlado, avaliaram 20 mulheres resistentes à insulina e observaram que a taxa de ciclos monofoliculares era maior quando se associava metformina com FSH. Também observaram menores valores das concentrações séricas de estradiol no grupo que usou metformina.

Entretanto Yarali *et al.* (2002), em um estudo realizado com 32 mulheres resistentes ao citrato de clomifeno, divididas em dois grupos: 16 usaram metformina coadjuvante na dose de 1.700 mg pelo menos seis semanas antes da estimulação com FSH e 16 mulheres usaram apenas placebo associado à indução com FSH, não observaram diferenças significativas com o uso de metformina nos principais parâmetros da estimulação ovariana controlada, duração do tratamento, dose de FSH, níveis séricos de estradiol no dia de administração da gonadotrofina coriônica humana (HCG).

2.5 Metformina e fertilização *in vitro* (FIV)

Tem sido demonstrado que a metformina leva à redução dos níveis de insulina, testosterona e LH em mulheres com SOP (Morin-Papunen, Koivunen *et al.*, 1998; Ehrmann, Barnes *et al.*, 1999). Por este motivo tem-se "hipotetizado" que a administração concomitante de metformina, antes e durante o tratamento de FIV (Stadtmauer, Toma *et al.*, 2001; Kjotrod, Von During *et al.*, 2004) (Fedorcsak, Dale *et al.*, 2003), em mulheres com SOP, poderia reduzir as doses de FSH utilizadas e melhorar a qualidade embrionária e taxas de gravidez.

Stadtmauer *et al*. (2001) realizaram um estudo retrospectivo com 46 mulheres não obesas (IMC = 26,5 kg/m^2) resistentes ao citrato de clomifeno em 60

ciclos de FIV-ICSI. Na metade dos ciclos, administram metformina na dose de 1.000 a 1.500 mg/dia. No grupo de mulheres para as quais se administrou metformina, observaram que o número total de folículos foi menor quando comparados com aquelas que usaram somente FSH, porém não houve diferenças no número total de folículos maiores que 14 mm de diâmetro médio. O tratamento com metformina não teve efeito sobre o número total de oócitos obtidos, todavia o número de oócitos maduros foi maior no grupo de mulheres que usou metformina (18,4±1,5 *vs.* 13±1,5). Neste grupo de mulheres também foram observadas melhores taxas de fertilização (64% *vs.* 43%) e implantação com maior número de embriões com quatro células ou mais (12,5 ±1,5 *vs.* 5,9±0,9) e melhores taxas de gravidez clínica (70% *vs.* 30%). Esses autores concluíram que o uso da metformina parece melhorar a qualidade oocitária em mulheres com SOP que realizaram tratamentos de FIV.

Ferdocsak *et al.* (2003) realizaram um estudo randomizado cruzado com 17 mulheres portadoras de SOP obesas e resistentes à insulina, e foram avaliados dois ciclos consecutivos de indução da ovulação para FIV, sendo um ciclo com e outro sem metformina. A metformina foi administrada na dose de 1.500 mg/dia, iniciando seu uso três semanas antes da inibição com buserelina. Esses autores concluíram que a metformina não reduziu a dose de FSH utilizada, mas levou a um aumento no número de oócitos recuperados. Dos estudos que avaliaram o efeito da metformina na estimulação ovariana para ciclos de FIV, apenas dois foram prospectivos randomizados duplos-cegos (Kjotrod, Von During *et al.*, 2004; Tang, Glanville *et al.*, 2006). Kjotrod *et al.* (2004) analisaram o efeito do tratamento com metformina em 73 mulheres com SOP que realizaram estimulação ovariana controlada para ciclos de FIV. Nesse estudo as mulheres foram divididas em dois

subgrupos: obesas (IMC > 28 kg/m^2) e não obesas. A metformina foi administrada na dose de 1.000 mg durante 16 semanas e até o dia de realização da gonadotrofina coriônica humana. Não foram observadas diferenças com relação à dose de FSH, número de oócitos obtidos, taxa de fertilização, qualidade embrionária ou taxa de gravidez clínica por transferência embrionária. Tang *et al.* (2006) avaliaram o uso da metformina na dose de 850 mg iniciado no primeiro dia do bloqueio hipofisário com agonista de GnRH em mulheres com SOP. Não observaram diferenças com relação à dose de FSH utilizada na indução da ovulação, no número de oócitos captados e na taxa de fertilização entre os grupos que utilizaram metformina e placebo. As taxas de gestação por ciclo (38,5% *vs.* 16,3%) e por embrião transferido (44,4% *vs.* 19,1%) foram maiores no grupo de mulheres que fizeram uso da metformina como coadjuvante durante a indução da ovulação. Foi também observada uma importante redução na ocorrência de síndrome de hiperestimulação ovariana no grupo de mulheres que usou metformina (3,8% *vs.* 20,4%).

Costello *et al.* (2006) realizaram a mais recente metanálise do uso da metformina em ciclos de FIV e relataram que o uso concomitante da metformina em ciclos de indução para ovulação para FIV não aumentou nem as taxas de gestação, nem de nascidos vivos, sendo, todavia, efetiva na redução do risco de síndrome de hiperestimulação ovariana *odds ratio* 0,21 (0,11 a 0,41). Todavia permanece a necessidade de novos estudos prospectivos controlados com maior número de mulheres, para que possamos analisar com maior segurança o efeito da metformina no objetivo principal dos tratamentos de reprodução assistida que é a taxa de nascidos vivos.

2.6 O uso da metformina durante a gravidez

Um dos principais questionamentos com relação ao uso da metformina é a sua manutenção durante a gravidez. Importante ressaltar que gestantes com SOP apresentam maiores incidências de complicações obstétricas (Diamant, Rimon *et al.*, 1982; Radon, Mcmahon *et al.*, 1999; Mikola, Hiilesmaa *et al.*, 2001; Boomsma, Eijkemans *et al.*, 2006). A obesidade, a resistência insulínica e a hiperinsulinemia compensatória são fatores característicos de grande parte das mulheres com esta síndrome, sendo estes fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes gestacional e *diabetes mellitus* tipo II. Alguns trabalhos têm demonstrado maior incidência de diabetes gestacional nas mulheres com SOP. Mikola *et al.* (2001) observaram uma incidência de 20% de diabetes gestacional nas mulheres com SOP *versus* 8,9% nas mulheres sem SOP e Radon *et al.* (1999) observaram 41% *versus* 3%. Anttila (1998) e Kousta (2000) encontraram que entre 44 e 52% das mulheres com diagnóstico de diabetes gestacional apresentavam SOP.

Boomsma *et al.* (2006), na mais recente metanálise avaliando gravidez em mulheres com SOP, observaram que essas mulheres apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de diabetes gestacional, hipertensão induzida pela gestação, pré-eclâmpsia e nascimentos pré-termos. Também observaram que os recém-nascidos de mulheres com SOP apresentaram maiores riscos de admissão em unidades intensivas de cuidados neonatais e maiores taxas de mortalidade perinatal. Devido ao maior risco de complicações materno-fetais e neonatais, esses autores enfatizaram a necessidade de condutas pré-concepcionais que visam a reduzir o risco de complicações para estas mulheres.

O tratamento com metformina, durante a gestação, reduz a prevalência de diabetes gestacional em mulheres com SOP. No estudo de Glueck *et al*. (2002), no grupo de gestantes tratadas durante a gravidez com metformina na dose de 2,55 gramas ao dia, somente 3% desenvolveram diabetes gestacional, cifra compatível com a população geral, contra 31% do grupo de gestantes não tratadas. Todavia serão necessários novos estudos com maior casuística para estabelecer a indicação sistemática deste tratamento. O tratamento com dieta e metformina prévios à gestação diminui o IMC, a resistência insulínica e secreção pancreática de insulina, reduzindo as demandas sobre as células betapancreáticas. Hellmuth *et al*. (2000) utilizaram metformina como tratamento de gestantes diabéticas pré-concepcionais e observaram maior prevalência de pré-eclâmpsia neste grupo de mulheres (32%), quando comparadas com as mulheres tratadas com sulfonilurea (7%) ou insulina (10%). Bem como maior prevalência na mortalidade perinatal 11% contra 1,3%, quando comparadas com as mulheres tratadas com insulina ou sulfonilurea. É importante levar em consideração que se trata de um estudo não randomizado no qual as mulheres tratadas com metformina eram significativamente mais obesas.

Jakubowicz (2002) e Glueck (2002) observaram uma maior incidência de aborto de primeiro trimestre, 42% e 39% respectivamente nas mulheres com SOP, quando comparadas com grupos-controle. As mulheres com aborto recorrente, no primeiro trimestre, apresentam níveis elevados do inibidor de ativador tissular de plasminogênio (PAI) (Gris, Neveu *et al.*, 1993), o que supõe um estado de hipofibrinólise. Há especulações se este estado hipofibrinolítico provocaria uma insuficiência placentária precoce ou limitaria o desenvolvimento adequado do tecido

trofoblástico. Glueck *et al.* (2001) avaliaram 22 mulheres com SOP que tiveram aborto e detectaram níveis de PAI aumentados em 52% destas mulheres contra 4% do grupo-controle. As mulheres com SOP apresentam maior polimorfismo 4G/4G para o gene do PAI, esta situação hipofibrinolítica é reversível com o tratamento com metformina. Ao reduzir os níveis de PAI, a metformina poderia reduzir as taxas de aborto em gestantes tratadas com metformina e com uso continuado durante a gestação. Redução nas cifras de aborto a 10% tem sido relatada por Glueck *et al.* (2001).

A metformina tem boa tolerabilidade. É uma droga da categoria B do FDA, o que significa que não existem estudos suficientes em humanos, todavia não foram demonstrados efeitos teratogênicos em animais. Coetzee & Jackson (1979) avaliaram o uso da metformina no controle de *diabetes mellitus* não insulinodependente ou diabetes gestacional em grávidas e não houve malformações congênitas maiores nos fetos dessas mulheres. Não têm sido observadas alterações no crescimento, na relação peso/estatura do recém-nascido e também não observaram alterações do desenvolvimento psicomotor no primeiro ano de vida das crianças cujas mães tomaram metformina durante a gestação (Glueck, Goldenberg *et al.*, 2004). Recente revisão do uso da metformina em mulheres com SOP recomenda que a metformina deva ser mantida nas mulheres que engravidaram durante o uso da metformina, devido à diminuição do risco de abortos de primeiro trimestre e da incidência de diabetes gestacional neste grupo de mulheres (Checa, Requena *et al.*, 2005).

2.7 Conclusões do uso da metformina no tratamento da infertilidade em mulheres com SOP

Após a realização dessa revisão, podemos chegar a algumas conclusões com relação ao uso da metformina no tratamento da infertilidade em mulheres com SOP:

1. O uso da metformina leva a melhores resultados nas taxas de ovulação quando comparados ao placebo em mulheres com SOP.
2. Não há um consenso se a meftormina deve ser considerada como primeira linha de tratamento para indução da ovulação em mulheres com SOP no lugar do citrato de clomifeno.
3. Com relação ao uso da metformina coadjuvante na estimulação ovariana controlada para ciclos de FIV, a literatura está em concordância nos efeitos de diminuição dos riscos de ocorrência de síndrome de hiperestimulação ovariana.
4. A manutenção da terapêutica com metformina na gravidez na maioria dos estudos tem se mostrado benéfica na prevenção de aborto no primeiro trimestre, no entanto os dados da literatura não permitem uma conclusão definitiva.

2.8 Referências biblográficas

Acbay, O. e S. Gundogdu. Can metformin reduce insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Fertil Steril, v.65, n.5, May, p.946-9. 1996.

Anttila, L., K. Karjala, *et al.* Polycystic ovaries in women with gestational diabetes. Obstet Gynecol, v.92, n.1, Jul, p.13-6. 1998.

Asuncion, M., R. M. Calvo, *et al.* A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab, v.85, n.7, Jul, p.2434-8. 2000.

Baillargeon, J. P. e J. E. Nestler. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? J Clin Endocrinol Metab, v.91, n.1, Jan, p.22-4. 2006.

Boomsma, C. M., M. J. Eijkemans, *et al.* A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update, v.12, n.6, Nov-Dec, p.673-83. 2006.

Carmina, E., M. C. Chu, *et al.* Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. J Clin Endocrinol Metab, v.90, n.5, May, p.2545-9. 2005.

Coetzee, E. J. e W. P. Jackson. Metformin in management of pregnant insulin-independent diabetics. Diabetologia, v.16, n.4, Apr, p.241-5. 1979.

Costello, M. F., M. Chapman, *et al.* A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod, v.21, n.6, Jun, p.1387-99. 2006.

Checa, M. A., A. Requena, *et al.* Insulin-sensitizing agents: use in pregnancy and as therapy in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update, v.11, n.4, Jul-Aug, p.375-90. 2005.

De Leo, V., A. La Marca, *et al.* Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.72, n.2, Aug, p.282-5. 1999.

Defronzo, R. A. e A. M. Goodman. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. N Engl J Med, v.333, n.9, Aug 31, p.541-9. 1995.

Delvigne, A. e S. Rozenberg. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. Hum Reprod Update, v.8, n.6, Nov-Dec, p.559-77. 2002.

Diamant, Y. Z., E. Rimon, *et al.* High incidence of preeclamptic toxemia in patients with polycystic ovarian disease. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.14, n.3, Dec, p.199-204. 1982.

Diamanti-Kandarakis, E. e A. G. Papavassiliou. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Trends Mol Med, v.12, n.7, Jul, p.324-32. 2006.

Dominguez, L. J., A. J. Davidoff, *et al.* Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. Endocrinology, v.137, n.1, Jan, p.113-21. 1996.

Ehrmann, D. A., R. B. Barnes, *et al.* Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. Diabetes Care, v.22, n.1, Jan, p.141-6. 1999.

Escobar-Morreale, H. F., M. Luque-Ramirez, *et al.* The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. Endocr Rev, v.26, n.2, Apr, p.251-82. 2005.

Fedorcsak, P., P. O. Dale, *et al.* The effect of metformin on ovarian stimulation and in vitro fertilization in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: an open-label randomized cross-over trial. Gynecol Endocrinol, v.17, n.3, Jun, p.207-14. 2003.

Glueck, C. J., R. N. Fontaine, *et al.* Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. Metabolism, v.50, n.7, Jul, p.856-61. 2001.

Glueck, C. J., N. Goldenberg, *et al.* Height, weight, and motor-social development during the first 18 months of life in 126 infants born to 109 mothers with polycystic ovary syndrome who conceived on and continued metformin through pregnancy. Hum Reprod, v.19, n.6, Jun, p.1323-30. 2004.

Glueck, C. J., H. Phillips, *et al.* Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. Fertil Steril, v.75, n.1, Jan, p.46-52. 2001.

Glueck, C. J., P. Wang, *et al.* Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.77, n.3, Mar, p.520-5. 2002.

Gris, J. C., S. Neveu, *et al.* Plasma fibrinolytic activators and their inhibitors in women suffering from early recurrent abortion of unknown etiology. J Lab Clin Med, v.122, n.5, Nov, p.606-15. 1993.

Guzick, D. S. Treating the polycystic ovary syndrome the old-fashioned way. N Engl J Med, v.356, n.6, Feb 8, p.622-4. 2007.

Guzick, D. S., R. Wing, *et al.* Endocrine consequences of weight loss in obese, hyperandrogenic, anovulatory women. Fertil Steril, v.61, n.4, Apr, p.598-604. 1994.

Hellmuth, E., P. Damm, *et al.* Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies. Diabet Med, v.17, n.7, Jul, p.507-11. 2000.

Homburg, R. Polycystic ovary syndrome - from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. Hum Reprod, v.11, n.1, Jan, p.29-39. 1996.

Jakubowicz, D. J., M. J. Iuorno, *et al.* Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.2, Feb, p.524-9. 2002.

Kashyap, S., G. A. Wells, *et al.* Insulin-sensitizing agents as primary therapy for patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod, v.19, n.11, Nov, p.2474-83. 2004.

Kiddy, D. S., D. Hamilton-Fairley, *et al.* Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf), v.36, n.1, Jan, p.105-11. 1992.

Kirpichnikov, D., S. I. Mcfarlane, *et al.* Metformin: an update. Ann Intern Med, v.137, n.1, Jul 2, p.25-33. 2002.

Kjotrod, S. B., V. Von During, *et al.* Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome; a prospective, randomized, double blind study. Hum Reprod, v.19, n.6, Jun, p.1315-22. 2004.

Kolodziejczyk, B., A. J. Duleba, *et al.* Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.73, n.6, Jun, p.1149-54. 2000.

Kousta, E., E. Cela, *et al.* The prevalence of polycystic ovaries in women with a history of gestational diabetes. Clin Endocrinol (Oxf), v.53, n.4, Oct, p.501-7. 2000.

Legro, R. S., R. J. Zaino, *et al.* The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. Am J Obstet Gynecol, v.196, n.4, Apr, p.402 e1-10; discussion 402 e10-1. 2007.

Lord, J. M., I. H. Flight, *et al.* Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. Bmj, v.327, n.7421, Oct 25, p.951-3. 2003.

Maciel, G. A., J. M. Soares Junior, *et al.* Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. Fertil Steril, v.81, n.2, Feb, p.355-60. 2004.

Mikola, M., V. Hiilesmaa, *et al.* Obstetric outcome in women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod, v.16, n.2, Feb, p.226-9. 2001.

Moghetti, P., R. Castello, *et al.* Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. J Clin Endocrinol Metab, v.85, n.1, Jan, p.139-46. 2000.

Moran, L. e R. J. Norman. Understanding and managing disturbances in insulin metabolism and body weight in women with polycystic ovary syndrome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v.18, n.5, Oct, p.719-36. 2004.

Morin-Papunen, L. C., R. M. Koivunen, *et al.* Metformin therapy improves the menstrual pattern with minimal endocrine and metabolic effects in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.69, n.4, Apr, p.691-6. 1998.

Mulders, A. G., M. J. Eijkemans, *et al.* Prediction of chances for success or complications in gonadotrophin ovulation induction in normogonadotrophic anovulatory infertility. Reprod Biomed Online, v.7, n.2, Sep, p.170-8. 2003.

Nardo, L. G. e R. Rai. Metformin therapy in the management of polycystic ovary syndrome: endocrine, metabolic and reproductive effects. Gynecol Endocrinol, v.15, n.5, Oct, p.373-80. 2001.

Neveu, N., L. Granger, *et al.* Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.87, n.1, Jan, p.113-20. 2007.

Norman, R. J., M. Noakes, *et al.* Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. Hum Reprod Update, v.10, n.3, May-Jun, p.267-80. 2004.

Palomba, S., F. Orio, Jr., *et al.* Clomiphene citrate versus metformin as first-line approach for the treatment of anovulation in infertile patients with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, Jun 26. 2007.

Pasquali, R. e A. Gambineri. Role of changes in dietary habits in polycystic ovary syndrome. Reprod Biomed Online, v.8, n.4, Apr, p.431-9. 2004.

Poretsky, L. Commentary: Polycystic ovary syndrome--increased or preserved ovarian sensitivity to insulin? J Clin Endocrinol Metab, v.91, n.8, Aug, p.2859-60. 2006.

Radon, P. A., M. J. Mcmahon, *et al.* Impaired glucose tolerance in pregnant women with polycystic ovary syndrome. Obstet Gynecol, v.94, n.2, Aug, p.194-7. 1999.

Reis, R. M., De Ângelo A.G, Romão G.S. e D. M. M. D. Santana L.F., Ferriani R.A. Can Polycystic Ovary Syndrome Interfere with the Outcome of In Vitro Fertilization? Rev. Bras. Ginecol. Obstet, v.26, n.9, Oct. 2004, p.727-733. 2004.

Reis, R. M., M. C. Foss, *et al.* Insulin secretion in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome and its relationship with hyperandrogenism. Gynecol Endocrinol, v.9, n.1, Mar, p.45-50. 1995.

Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.81, n.1, Jan, p.19-25. 2004.

Santana, L. F., M. F. De Sa, *et al.* Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol, v.19, n.2, Aug, p.88-96. 2004.

Stadtmauer, L. A., S. K. Toma, *et al.* Metformin treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insulin-like growth factors. Fertil Steril, v.75, n.3, Mar, p.505-9. 2001.

Sulkin, T. V., D. Bosman, *et al.* Contraindications to metformin therapy in patients with NIDDM. Diabetes Care, v.20, n.6, Jun, p.925-8. 1997.

Talbott, E. O., J. V. Zborowski, *et al.* Evidence for an association between metabolic cardiovascular syndrome and coronary and aortic calcification among women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.11, Nov, p.5454-61. 2004.

Tang, T., J. Glanville, *et al.* The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. Hum Reprod, v.21, n.6, Jun, p.1416-25. 2006.

Teede, H. J., S. Hutchison, *et al.* Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS. Endocrine, v.30, n.1, Aug, p.45-53. 2006.

Van Santbrink, E. J., F. P. Hohmann, *et al.* Does metformin modify ovarian responsiveness during exogenous FSH ovulation induction in normogonadotrophic anovulation? A placebo-controlled double-blind assessment. Eur J Endocrinol, v.152, n.4, Apr, p.611-7. 2005.

Wu, X. K., S. Y. Zhou, *et al.* Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, v.80, n.4, Oct, p.954-65. 2003.

Xita, N. e A. Tsatsoulis. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. J Clin Endocrinol Metab, v.91, n.5, May, p.1660-6. 2006.

Yarali, H., B. O. Yildiz, *et al.* Co-administration of metformin during rFSH treatment in patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial. Hum Reprod, v.17, n.2, Feb, p.289-94. 2002.

3- Artigo científico

3.1 Resumo

Expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), não obesas, com sensibilidade à insulina normal, tratadas e não tratadas com metformina.

OBJETIVO: avaliação da expressão gênica do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina de IGF-1 em células da granulosa luteinizadas do *cumulus* de mulheres não obesas, com sensibilidade à insulina normal, com síndrome dos ovários policísticos (SOP) tratadas e não tratadas com metformina.

MODELO DO ESTUDO: prospectivo, longitudinal, randomizado.

PACIENTES E MÉTODOS: avaliamos 12 mulheres com ciclos ovulatórios, 9 mulheres com SOP e 8 mulheres com SOP e tratadas com metformina, ao menos 8 semanas na dose de 1.700 mg/dia. Todos os grupos foram similares com relação ao peso, ao índice de massa corporal (IMC), à circunferência da cintura e com sensibilidade à insulina normal. Todas as mulheres foram submetidas à estimulação ovariana controlada com uso de agonista de GnRH em protocolo longo e gonadotrofinas para ciclos de FIV/ICSI. As células da granulosa do *cumulus* foram obtidas por microdissecção dos cinco maiores folículos pré-ovulatórios. A expressão gênica do receptor de IGF-1 foi determinada RT-PCR semiquantitativa. Foram avaliadas as concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, testosterona, FSH, LH, SHBG, glicose, insulina e IGF-1. Para análise estatística, foram utilizados os testes: *ANOVA*, *Newman-Keuls*, coeficiente de *Pearson* e regressão linear múltipla, sendo considerado nível de significância de 5%.

RESULTADOS: não foram observadas diferenças com relação à expressão gênica do receptor de IGF-1 nos três grupos analisados (*P*>0,05). O número de oócitos (20,4 *vs*. 13,1 *vs*. 11,5, *P*= 0,009), os níveis séricos de estradiol (1.896,00 pcg/mL *vs*. 985,20 pcg/mL *vs*. 908,10 pcg/mL, *P* = 0,03) e testosterona (1,43 ng/mL *vs*. 0,89 ng/mL *vs*. 0,82 ng/mL pcg/mL, *P* = 0,02) foram maiores no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina em comparação com as mulheres com ciclos ovulatórios e tratadas com metformina, respectivamente. As mulheres com ciclos ovulatórios (50.710±42.520 ng/mL) apresentaram maiores concentrações foliculares de progesterona quando comparados com as mulheres com SOP tratadas (13.660±5.212 ng/mL) e não tratadas com metformina (17.680±6.644 ng/mL) (*P*=0,01). Na avaliação da regressão múltipla, a testosterona sérica não sofreu influência da expressão gênica do receptor de IGF-1 ou do IMC.

CONCLUSÕES: as altas concentrações séricas de estradiol e testosterona, maior número de oócitos no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina nos levam a concluir que mulheres com SOP provavelmente têm uma maior sensibilidade à estimulação da esteroidogênese ovariana quando comparadas com mulheres sem essa doença, embora não tenha sido encontrada diferença na expressão do receptor de IGF-1 nos três grupos analisados. A similaridade dos resultados deste estudo entre mulheres com SOP tratadas com metformina e com ciclos ovulatórios nos levam a "hipotetizar" que um dos possíveis mecanismos de ação da metformina no sistema IGF-1 nas células da granulosa do *cumulus* poderia ser por mecanismos pós-receptores.

Palavras-chave: 1. Receptor de IGF-1. 2. SOP. 3. Expressão gênica. 4.Metformina. 5. Células da granulosa 6.Reprodução assistida.

3.2 Abstract

Gene expression of the IGF-1 receptor in luteinized granulosa cells from non-obese women with polycystic ovarian syndrome (PCOS) and with normal insulin sensitivity, treated or not with metformin.

OBJECTIVE: evaluation of the gene expression of the IGF-I receptor in luteinized cumulus granulosa cells from non-obese women with normal insulin sensitivity and with polycystic ovarian syndrome (PCOS) treated or nor with metformin.

STUDY MODEL: prospective, longitudinal, randomized.

PATIENTS AND METHODS: we evaluated 12 women with ovulatory cycles and 9 women with PCOS who had been treated for at least 8 weeks with a metformin dose of 1700 mg/day. All groups were similar in terms of weight, body mass index (BMI), and waist circumference and all had normal insulin sensitivity. All women were submitted to controlled ovarian stimulation with a GnRH agonist in a long protocol and with gonadotropins for IVF/ICSI cycles. *Cumulus* granulosa cells were obtained by microdissection of the five largest pre-ovulatory follicles. Gene expression of the IGF-1 receptor was determined by semiquantitative RT-PCR. Serum and follicular concentrations of estradiol, progesterone, testosterone, glucose, FSH, LH, insulin, SHBG, and IGF-1 were determined. Data were analyzed statistically by ANOVA and by the Newman-Keuls test and the Pearson coefficient and linear multiple regression were calculated, with the level of significance set at 5%.

RESULTS: no difference in gene expression of the IGF-I receptor were observed between the three groups studied (P>0.05). The number of oocytes (20.4 *vs*. 13.1 *vs.*

11.5, *P*= 0.009) and the serum levels of estradiol (1,896.00 pcg/mL *vs*. 985.20 pcg/mL *vs*. 908.10 pcg/mL, *P* = 0.03) and testosterone (1.43 ng/mL *vs*. 0.89 ng/mL *vs*. 0.82 ng/mL pcg/mL, *P* = 0.02) were higher in the group of women with PCOS not treated with metformin than in women with ovulatory cycles and in women treated with metformin, respectively. The women with ovulatory cycles (50.710±42.520 ng/mL) presented higher follicular concentrations of progesterone compared with women with PCOS treated (13.660±5.212 ng/mL) or not with metformin (17.680±6.644 ng/mL) (*P*=0.01). Multiple regression revealed that serum testosterone was not affected by the gene expression of the IGF-1 receptor or by BMI.

CONCLUSIONS: the high serum concentrations of estradiol and testosterone and the larger number of oocytes in the group of women with PCOS not treated with metformin lead us to conclude that women with PCOS probably have greater sensitivity to stimulation of ovarian steroidogenesis than women without the disease, although no difference was detected in the expression of the IGF-I receptor between the three groups studied. The similarity of the present results for the women with PCOS treated with metformin and for the women with ovulatory cycles leads us to hypothesize that one of the possible mechanisms of action of metformin on the IGF-1 system in *cumulus* granulosa cells may be of the post-receptor type.

Key-words: 1. IGF-1 receptor. 2. PCOS 3. Gene expression 4. metformin5. granulosa cells. 6. assisted reproduction .

3.3 Introdução

A síndrome dos ovários policísticos representa a principal endocrinopatia ginecológica na idade reprodutiva, com incidência de 6-10% das mulheres no menacme (1). É considerada a causa mais comum de infertilidade por anovulação, podendo em alguns países, como nos EUA, representar a principal causa de infertilidade feminina (2). Atualmente, acredita-se que sua etiopatogenia seja ocasionada pelos fatores de origem genética desencadeados por fatores ambientais. O tipo de herença genética provavelmente é poligênica, sendo que os genes mais freqüentemente associados com a SOP são os relacionados com a biossíntese, ação e regulação de androgênios, genes envolvidos na resistência insulínica e no processo inflamatório crônico e aterosclerose (3).

Dos fatores ambientais podemos citar, o estilo de vida sendo a obesidade tanto um desencadeador como um complicador da SOP, cerca de 50% das mulheres com SOP são portadoras de obesidade (4). O Consenso de Rotterdam sugere realização de rastreamento para síndrome metabólica em todas as mulheres com SOP e portadoras de obesidade. (5).

A resistência insulínica e a hiperinsulinemia compensatória permanecem como os elementos mais importantes na etiopatogenia da SOP (6), e estes fatores fazem com que a SOP seja vista como uma doença de caráter metabólico com importantes repercussões a longo prazo, como o maior risco de desenvolvimento de *diabetes mellitus*, síndrome metabólica e doença cardiovascular, associados a maior risco de doença coronariana nestas mulheres (7).

Ao mesmo tempo se cria um paradoxo, pois, enquanto na maioria dos órgãos de ação da insulina é observado um estado de resistência, no ovário ocorre um aumento de sensibilidade (8, 9), com um maior estímulo na esteroidogênese com potencialização na produção androgênica e maior risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO), quando essas mulheres são submetidas à estimulação ovariana controlada (10).

Os efeitos da insulina na função reprodutiva repercutem em todos os passos da função ovariana, atuando tanto na foliculogênese, esteroidogênese, como na qualidade oocitária e embrionária (6).

Para tentar entender esse paradoxo, torna-se necessário compreender os mecanismos moleculares envolvidos na SOP, com atenção especial aos fatores parácrinos e autócrinos envolvidos na auto-regulação da função ovariana.

Alguns mecanismos moleculares envolvidos na SOP estão descritos como o estudo de Dunaif que, ao estudar cultura de fibroblastos de mulheres com SOP, detectou alterações na fosforilação da serina em 50% dos casos (11). Um ponto importante na etiopatogênese da SOP é a evidência de que a fosforilação da serina poderia modular a atividade da enzima p450c17α, uma das enzimas responsável pela regulação da biossíntese de androgênios (12). Nas células da teca, a insulina estimula diretamente a p450c17α com conseqüente aumento de atividade das enzimas 17 α hydroxilase e 17,20 liase, com aumento na produção de androstenediona e conseqüente aumento na produção de testosterona (13).

Outro ponto que merece destaque na compreensão da ação da insulina no tecido ovariano é sua interação com sistema IGF. Em nosso grupo, avaliamos previamente a participação do sistema IGF -1 na fisiologia da SOP e observamos

maior resposta ao teste da L-Dopa em mulheres com SOP não obesas (14). Tanto a insulina como o IGF-1 atuam como fatores potencializadores da ação das gonadotrofinas em mulheres com SOP. Atenção especial deve ser dada ao receptor IGF-1, devido não só a sua grande similaridade com o receptor de insulina (15), mas também por ser um importante fator regulador da função ovariana. Tanto o receptor de insulina como o receptor de IGF-1 são compostos por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, são ativados por ação tirosina cinase, podendo inclusive se formar com dímeros e constituir receptores híbridos (16) e, desta maneira, ser alvo de ação tanto do IGF-1, IGF-2 como da insulina (17).

A participação da resistência insulínica e da hiperinsulinemia compensatória na SOP tem levado ao uso de agentes insulinossensibilizantes como parte da terapêutica, sendo a metformina uma das drogas mais utilizadas e estudadas neste tratamento. Os efeitos benéficos da metformina, no tratamento das mulheres com SOP, foram observados em estudo prévio, em nosso grupo, como regularização de ciclos menstruais, redistribuição de gordura corporal com diminuição da circunferência da cintura, diminuição dos níveis séricos de testosterona e melhora no perfil lipídico com o uso da metformina, corroborando com outros autores (18, 19).

As mais recentes publicações têm levado a metformina a ser considerada como primeira ou segunda opção no tratamento de mulheres com SOP e desejo de gestação (20). Embora, o estudo de Legro *et al*. traga evidências de que os efeitos metabólicos da metformina não são traduzidos para as taxas de nascidos vivos, com piores resultados quando comparados com o uso do citrato de clomifeno (21).

No uso coadjuvante em ciclos de FIV, há um consenso com relação ao uso da metformina apenas na prevenção da SHO, uma das principais complicações

das técnicas de reprodução assistida para mulheres com SOP (22). A metformina também tem se mostrado benéfica durante a gestação, ao diminuir as taxas de aborto (23) e a ocorrência de diabetes gestacional em mulheres com SOP (24).

Com uso cada vez mais atuante na prática clínica diária, mesmo em mulheres com sensibilidade normal à insulina (25, 26), pouco se tem descrito com relação aos mecanismos moleculares da metformina na função ovariana e aos mecanismos envolvidos na regulação do sistema IGF. Em um dos mais recentes estudos publicados, *Seibel et al*. (27)avaliaram os níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-1, em mulheres obesas com SOP, tratadas e não tratadas com metformina e não encontraram diferenças entre os dois grupos, dados condizentes com estudos prévios do nosso grupo (18).

No intuito de entender a participação do sistema IGF-1 na função ovariana, neste estudo avaliamos a expressão do receptor de IGF-1, utilizando células da granulosa do *cumulus* oócitos de mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, comparadas com mulheres com ciclos ovulatórios, bem como analisamos os níveis foliculares e séricos dos principais hormônios e fatores envolvidos na função ovariana.

3.4 Pacientes e Métodos

3.4.1 Pacientes

Os dados deste estudo foram coletados no Instituto Valenciano de Infertilidade (IVI-Sevilha - Espanha), e a avaliação de RT-PCR foi realizada em

parceria com a Universidade de Sevilha-Espanha. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição e todas as mulheres assinaram o termo de consentimento informado, antes do seu início.

Os critérios gerais de inclusão para todas as participantes do estudo foram: idade entre 20 e 37 anos, IMC menor que 30 kg/m^2, ausência de utilização de qualquer medicação hormonal no período de 60 dias, anteriormente à inclusão no estudo, níveis normais de prolactina, função tireoidiana normal, ausência de cirurgias prévias ovarianas, endometriomas ou cistos ovarianos maiores que 10 mm.

Todas as mulheres com SOP cumpriram os critérios diagnósticos de SOP definidos no Consenso de Rotterdan de 2003 das Sociedades Européia e Americana de Reprodução Humana (28). Apresentavam dois de três dos seguintes critérios: intervalos intermenstruais maiores que 35 dias, hirsutismo (Índice de Ferriman-Gallwey $\geq$ 8) e/ou níveis séricos de testosterona total > 1,2 ng/mL e critérios ultra-sonográficos característicos de SOP, definidos com a presença de 12 ou mais folículos entre 2-9 mm e/ou volume ovariano superior a 10 cm^3, sendo alteração em apenas um ovário suficiente para o diagnóstico. Em nenhuma mulher com SOP foram detectadas alterações da função hepática ou renal, hiperplasia adrenal clássica ou não clássica e tumores virilizantes.

Todas as mulheres com ciclos ovulatórios tinham ciclos menstruais regulares a cada 21-35 dias, ausência de hirsutismo (Índice de Ferriman-Gallwey < 8) e morfologia ovariana à ultra-sonografia normal, cariótipos normais e estavam incluídas no programa de doação de óvulos.

Foram incluídas nesta pesquisa nove mulheres com SOP (idade 32,50±2,62 anos) que foram submetidas à estimulação ovariana controlada com o

uso de gonadotrofinas; oito mulheres com SOP e tratadas com meformina Dianben® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), na dose de 1.700 mg, por pelo menos 8 semanas prévias e durante a estimulação ovariana controlada até a presença de batimentos cardiofetais observados no exame ultra-sonográfico no caso de gravidez (idade 25,56±5,29 anos) e 12 mulheres, com ciclos ovulatórios (idade 25,33±4,01 anos). No momento de inclusão no estudo, todas as mulheres foram submetidas à avaliação clínica e punção venosa para completa análise hormonal.

A avaliação clínica inicial foi constituída de medidas antropométricas (peso, IMC, medidas da circunferência da cintura e do quadril) e índice de *Ferriman-Gallwey* (29). O IMC foi calculado com a fórmula peso dividido pela estatura ao quadrado. A medida da cintura foi considerada a menor medida entre o último rebordo costal e a crista ilíaca. A medida do quadril foi considerada a medida entre os trocânteres. Essas medidas foram realizadas com a paciente em posição supina, com o abdômen relaxado, braços ao longo do corpo. Na mesma consulta foi realizado ultra-sonografia transvaginal.

As mulheres com ciclos ovulatórios, com SOP e com SOP tratadas com metformina foram homogêneas, respectivamente com relação ao peso (58,82±8,50 kg *vs* 59,43±8,56 kg *vs* 64,7±12,8 kg P=0,40), IMC (22,54±2,88 kg/m^2 *vs* 23,39±2,99 kg/m^2 *vs* 23,22±4,25 kg/m^2 P=0,82), circunferência da cintura (74,00±6,88 cm *vs* 75,22±5,26 cm *vs* 76,6±10,2 cm P=0,86), relação cintura-quadril (0,74±0,03 *vs* 0,78±0,05 *vs* 0,77±0,04 P= 0,08) e avaliação da resistência insulínica pelo *Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index* (QUICKI) (0,44±0.03 *vs* 0,41 ± 0,04 *vs* 0,43±0,03 P= 0,19).

3.4.2 Uso de metformina e avaliação da resistência à insulina

O uso da metformina para as mulheres com SOP foi definido mediante randomização através da página *WEB* http://www.randomization. Para uma melhor adaptação à mettormina, o seu uso foi realizado com doses progressivas, sendo orientado o uso de 425 mg na primeira semana, 850 mg na segunda semana e 1.700 mg nas demais semanas. A utilização da metformina ocorreu independente da presença ou não de resistência insulínica avaliada através do QUICKI = 1/[log(insulina jejum) + log(glicemia jejum)], com as seguintes unidades: insulina em µUI/mL; glicemia em mg/dL, sendo considerado valor normal > 0,34 (30).

3.4.3 Estimulação ovariana controlada e captação oocitária

Para a programação do início da estimulação ovariana controlada, foi utilizado anticoncepcional oral composto por 0,03 mg de etinil estradiol e 0,15 mg de levonorgetrel (Microgynona ®, Schering Berlim, Germany) iniciado entre o primeiro e terceiros dias do ciclo anterior, por um período mínimo de 15 dias e máximo de 30 dias, sendo suspenso cinco dias prévios à data de início da estimualação ovariana controlada. Para o bloqueio hipofisário, foi utilizado acetato de leuprorelina (Procrin ® , Abbott Laboratories AS, Madrid, Spain) frasco com 2,8 mL subcutâneo na dose de 0,1 mL iniciado dez dias antes do início da estimulação ovariana controlada. Uma vez confirmado o bloqueio hipofisário com ausência de folículos ovarianos maiores que 10 mm, a dose de acetato de leuprorelina foi reduzida a 0,05 mL a partir do início da estimulação e mantida até o dia de administração do HCG.

Na estimulação ovariana controlada, utilizaram-se hormônio folículo estimulante recombinante (FSH ® Gonal-F, Serono Laboratories, Madrid, Spain) e gonadotrofina humana de mulher menopausada (HMG Lepori®, Fama Lepori, Barcelona, Spain) nas doses de 150 UI e 75 UI, respectivamente, ajustando a partir do terceiro dia de estimulação, de acordo com os níveis de estradiol e com o crescimento folicular avaliado por ultra-sonografia bidimensional. Na presença de dois ou mais folículos maiores ou iguais a 18 mm, foi indicado gonadotrofina coriônica humana (HCG-Lepori ® Fama Lepori, Barcelona, Spain) via subcutâneo, na dose de 10.000 UI.

A punção oocitária foi realizada 36 horas após o uso do HCG-Lepori ®, sendo guiada por ultra-sonografia transvaginal, realizada com agulha Swemed tipo "IVI" de 16 G, com bisel de 60º fixada ao transdutor por meio de uma guia de punção. Para aspiração, utilizou-se o aspirador modelo Labotec Aspirator 4014 que proporciona uma pressão negativa de 140 mm Hg. Utilizou-se o "bloque térmico" modelo *COOK IVF* à temperatura constante de 37 ºC, para manter os tubos aquecidos durante a aspiração oocitária. Foram puncionados isoladamente os cinco maiores folículos dos dois ovários até a obtenção de cinco oócitos. Os folículos foram selecionados de acordo com o tamanho (maiores ou iguais a 17 mm de diâmetro médio) e acessibilidade.

3.4.4 Preparação das células da granulosa do *cumulus* e do fluido folicular

Os oócitos foram colocados em placas de petri (Nunc 150288) previamente aquecidas em uma superfície a 37 ºC, para evitar mudanças de

temperatura. O meio de lavado utilizado foi *Wash* (*HTF-HEPES*). As células da granulosa foram obtidas com a realização de cortes dos *cumulus* de cada oócito, a partir de técnicas de microdissecção, utilizando agulhas de 25 G acopladas a seringas de insulina de 1 mL. Foram realizados vários cortes longitudinais, paralelos à superfície de trabalho, em movimentos suaves, evitando tocar a placa para com isso não liberar partículas plásticas que poderiam ser tóxicas ao oócito. Uma seringa é utilizada para fixar o *cumulus* oocitário, e com o bisel da outra cortam-se as células da granulosa. As células da granulosa obtidas a partir dos *cumulus* dos cinco oócitos foram lavadas em separado com meio de lavado *wash* em uma placa limpa de *wash*. As células da granulosa do *pool* de cinco oócitos foram depositadas em criotubos, com a menor quantidade possível de meio de lavado, e os criotubos foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido para congelamento e armazenados a – 80 ºC até o momento da extração do RNA.

O *pool* de fluido folicular resultante dos cinco oócitos de onde foram retiradas as células da granulosa foi depositado em dois tubos de *Falcon* com um volume máximo de 6 mL. Os tubos foram imediatamente centrifugados a 600 G durante 10 minutos, sendo o sobrenadante pipetado e armazenado em três tubos *Gobelet* e armazenados a -80 ºC até o momento de avaliação hormonal.

3.4.5 Padronização de extração de RNA total de células da granulosa

Foi realizada extração de RNA total do *pool* de células da granulosa do *cumulus* dos cinco oócitos obtidos por microdisseção de cada paciente. A quantidade de células da granulosa obtidas, bem como a contaminação de sangue é muito

variável. Para minimizar os problemas derivados para a extração de RNA, foi utilizado o *kit Tripure Isolation Reagent* (Roche, Mannheim, Germany). Este *kit* nos permite obter aproximadamente 1-1,5 microgramas de RNA por mg de cada amostra pura de células, com pureza aceitável independentemente de ser ou não escassa a quantidade de células ou que possa ou não ter contaminação sangüínea. Para manter a integridade do RNA, é muito importante que as células da granulosa sejam congeladas imediatamente após sua extração. Para isso, durante a fase de padronização da técnica, não obtivemos resultados adequados e RNA degradado ou não amplificável em amostras que permaneceram mais de 30 minutos sem serem congeladas**.**

Para a quantificação do RNA total, foi utilizado o espectrofotômetro (Shimadzu UV 160-A). Com a absorção a 260 nm que nos deu a quantidade de RNA (1 unidade de D.O. corresponde 40 µg/mL de RNA), e a 280 nm que nos proporcionou a quantidade de proteína, a relação entre D.O.260/D.O.280 foi compreendida entre 1,7 e 2.

3.4.6 RT-PCR qualitativa e RT-PCR semiquantitativa

Para este passo, usamos *o kit Titan one tube RT-PCR kit* (Roche, Mannheim, Germany) na versão *ramdom primers*. Este método utiliza um só passo para as duas fases: retrotranscrição e amplificação.

Primeiro passo: 55º durante 60 minutos.

Segundo passo: *Primers* específicos para amplificar o cDNA com 40 ciclos

Para comprovar a validez das amostras de RNA, foi amplificado o gene da β-actina humana, naquelas amostras de prova, utilizadas no período de padronização da técnica de extração. As amostras, em que não foi possível a amplificação, foram descartadas do estudo. Todos os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados no Departamento de Citologia e Histologia Normal e Patológica da Universidade de Sevilha e adquiridos da *TIB MOLBIOL Berlim - Germany.* Foram utilizados os seguintes *primers*:

Primer forward: 5`-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3`

Primer reverse: 5`-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3`

O produto de amplificação previsto é de 746 pb.

Os produtos de todas RT-PCR foram separados em um gel de agarose a 3% e tintos com bromuro de etídio. Para confirmar a qualidade do RNA total, obtido das células da granulosa do *cumulus,* em um primeiro momento, avaliamos qualitativamente a expressão do gene de referência da β-actina humana e dos genes dos receptores de IGF-1, FSH e LH mediante os seguintes *primer sets*.

IGF-IR

5'-ACC CGG AGT ACT TCA GCG CT-3'

5'-CAC AGA AGC TTC GTT GAG AA-3'

O produto de amplificação previsto é de 246 pb.

FSH-R

5'GAGAGCAAGGTGACAGAGATTCC-3'

5'CCTTTGGAGAGAATGAATCTT-3'

O produto de amplificação previsto é de 342 pb

LH receptor

Outer

5'GCATCTGTAACACAGGCATC 3'

5'CATCTGGTTCAGGAGCACAT 3'

Nested

5'GCAGAAGATGCACAATGGAG 3'

5'CTCTCAGCAAGCATGGAAGA 3'

O produto de amplificação previsto é de 342 pb.

Após esse passo, optamos por avaliar de maneira semiquantitativa cada um dos genes inicialmente avalidados qualitativamente, sendo o gene do receptor de IGF-1 o primeiro a ser estudado, a avaliação de todos os demais genes será motivo de estudos subseqüentes a este.

Precedendo o estudo semiquantitativo do receptor de IGF-1, com o objetivo de avaliar a qualidade do RNA foi realizado RT-PCR de 40 ciclos (31) com análise qualitativa, utilizando-se 100 ng de RNA, de todas as amostras do *pool* de células da granulosa de cada mulher incluída no estudo. Em todos os géis analisados foi possível constatar a presença das bandas dos genes da β-actina humana e do receptor de IGF-1.

A análise semiquantitativa da RT-PCR foi realizada em duplicata, usando 100 ng de RNA total e diluições a 10 ng e 1 ng, respectivamente, de cada amostra com avaliação em paralelo entre o gene da β-actina humana e do receptor de IGF-1. A digitalização das imagens foi realizada mediante o *software TDI's lane manager 2.2* para *PC*. Para análise das imagens digitalizadas, foi utilizado o programa *Scion Image Software (ScionCorp., Frederick, MD).*

3.4.7 Dosagens das concentrações hormonais no soro e fluido folicular de glicose, insulina, SHBG, IGF-1, testosterona, estradiol, LH, FSH e progesterona

Para as dosagens das concentrações hormonais, as coletas sangüíneas foram realizadas entre as 8:00 e 9:00 horas após 12 horas de jejum e repouso, sendo coletado um total de 20 mL de sangue total, o sangue foi centrifugado a 600 G durante 10 minutos e o soro armazenado a -80 ºC até o momento das avaliações hormonais. As concentrações no soro e no fluido folicular de glicose foram determinadas pelo método ultravioleta enzimático (método hexoquinasa), *Olympus* AUS400, as concentrações de insulina, SHBG e IGF-1 foram determinadas pelo método quimiluminescência, *Immulite 2000* (*DPC, Dipesa AS, Madrid, Spain*), as concentrações de testosterona, estradiol, LH e FSH foram determinadas por quimiluminescência pelo aparelho, *ACCESS, Beckman Coulter* com *kits* próprios *CA, USA* e as concentrações de progesterona foram mensuradas pela Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), teste quantitativo automatizado no sistema VIDAS, BioMérieux AS, Marcy-I'Etoile, France. Todos os coeficientes de variação intra-ensaio neste estudo foram menores que 10. Para as dosagens das concentrações foliculares de estradiol e progesterona foi necessária a realização de diluições com diluente dos próprios *kits* até a obtenção dos valores observados.

3.4.8 Análise estatística

Para verificar a normalidade ou não da distruibuição dos valores amostrais, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov*, não sendo rejeitada a hipótese de normalidade de nenhuma das variáveis. A comparação entre idade, peso, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril e relação circunferência da cintura/circunferência do quadril, duração do tratamento em dias, dose de FSH em UI, dose de hMG em UI, número de oócitos, concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, FSH, LH, testosterona, SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 e expressão gênica do receptor de IGF-1 foi realizada com o teste *ANOVA* e pós-teste de *Newman-keuls*. Para a comparação entre o número de casos de SHO, foi utilizado o teste do Qui-quadrado. A correlação entre as concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, FSH, LH, testosterona, SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 foi realizada com o coeficiente de correlação *Pearson*. Foi calculado o modelo de regressão múltipla para avaliar a relação da concentração sérica de testosterona como variável dependente e a expressão gênica do receptor de IGF-1, IMC, número de oócitos, concentrações foliculares de testosterona e concentrações séricas de insulina como variáveis independentes. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%, com o resultado das variáveis expresso em média e desvio-padrão. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando os seguintes programas estatísticos: *software GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA,* www.graphpad.com e *Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA)*

3.5 Resultados

3.5.1 Avaliação da expressão gênica do receptor de IGF-1 nas células da granulosa do *cumulus*

A preparação de células da granulosa do *cumulus* realizada por microdissecção manual permitiu a obtenção de RNA e DNA em quantidade e qualidade suficientes para realização de RT-PCR qualitativa dos genes do receptor de IGF-1, LH, FSH e β-actina de mulheres com ciclos ovulatórios (Figura 1). Essa técnica apresentou boa reprodutividade, sendo possível a obtenção de RNA com quantidade e qualidade suficientes para a realização de RT-PCR qualitativa do gene do receptor de IGF -1 em todas as mulheres dos três grupos de estudo. (Figuras 2, 3).

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas com relação à expressão gênica do receptor de IGF-1 nas células do *cumulus* entre os três grupos analisados (P = 0,18) (Figura 3).

3.5.2 Avaliação das concentrações hormonais séricas e foliculares

As mulheres com SOP não tratadas com metformina apresentaram maiores concentrações séricas de estradiol no dia da punção oocitária, quando comparadas com os grupos de mulheres com ciclos ovulatórios e mulheres com SOP tratadas com metformina, com valores respectivamente de 1.896,00±1.300 pcg/mL, 985,20±396,70 pcg/mL e 908,10±497,40 pcg/mL (P = 0,03). Ao analisarmos concentrações foliculares de estradiol, não houve diferença estatística nos três grupos

avaliados (*P* = 0,63) (Tabela 1). As concentrações séricas de progesterona foram menores no grupo de mulheres com SOP tratadas com metformina, quando comparadas com as mulheres com ciclos ovulatórios e com SOP não tratadas com metformina, com valores respectivamente de 4,74±1,92 ng/mL, 9,01±5,45 ng/mL e 11,55±6,92 ng/mL (*P* = 0,04) (Tabela 1). O grupo de mulheres com ciclos ovulatórios apresentou maiores concentrações foliculares de progesterona, que as mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, com valores respectivamente de 50.710±42.520 ng/mL, 13.660±5.212 ng/mL e 17.680±6.644 ng/mL (*P* = 0,01). As concentrações séricas de testosterona foram maiores no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina, quando comparadas com as mulheres com ciclos ovulatórios e com SOP tratadas com metformina, com valores respectivamente de 1,43±0,75 ng/mL, 0,90±0,22 ng/mL e 0,83±0,19 ng/mL (*P* = 0,04) (*P* = 0,02) (Tabela 1). Na comparação das concentrações séricas e foliculares de insulina, glicemia, IGF-1 e SHBG entre os três grupos avaliados não foram encontradas diferenças estatísticas (*P*>0,05) (Tabela 1).

A tabela 2 mostra a avaliação das correlações entre as concentrações séricas e foliculares de estradiol, progesterona, testosterona, SHBG, insulina, glicemia, IGF-1, FSH e LH nas mulheres incluídas neste estudo e em cada grupo. Nos três grupos, foram observadas correlações positivas entre os níveis séricos e foliculares de FSH (*P*<0,05) (Tabela 2). Foram positivas as correlações entre as concentrações séricas e foliculares de SHBG, nos grupos de mulheres com ciclos ovulatórios (*r* = 0,80; *P* = 0,002) e com SOP tratadas com metformina (*r* = 0,98; *P*<0,0001). As concentrações séricas e foliculares de IGF-1 se correlacionaram

positivamente nas mulheres com SOP, independentemente se tratadas (r = 0,90; P = 0,005) ou não com metformina (r = 0,71; P = 0,04) (Tabela 2).

Foram observadas correlações positivas no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina entre as concentrações séricas e foliculares de testosterona (r =0,67; P = 0,04) (Tabela 2, Figura 4) e entre as concentrações séricas e foliculares de insulina (r = 0,70; P = 0,04) (Tabela 2).

Ao considerarmos a hipótese de que os níveis séricos de testosterona podem ser influenciados pelas concentrações séricas de insulina e outros fatores como IMC, no modelo de regressão múltipla observamos, neste estudo, que as concentrações séricas de testosterona podem ser influenciadas positivamente pelo número de oócitos, concentrações foliculares de testosterona, níveis séricos de insulina e independem da expressão gênica do receptor de IGF-1 e do IMC (Tabela 3).

3.5.3 Avaliação da resposta à indução da ovulação controlada

A resposta à indução da ovulação nos três grupos foi similar com relação à duração do tratamento, à dose de hMG, às concentrações séricas de estradiol e progesterona no dia do HCG e ao número de casos de SHO ($P>0,05$). O grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina foi o que obteve o maior número de oócitos na captação oocitária, quando comparadas com as mulheres com ciclos ovulatórios e tratadas com metformina (P=0,009). O grupo de mulheres com ciclos ovulatórios foi o que utilizou a maior dose de FSH recombinante quando comparado com os demais grupos (P=0,02) (Tabela 4).

Tabela 1 – Resultados relativos às médias das concentrações séricas e foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia, IGF-1, FSH e LH de mulheres ovulatórias e com SOP tratadas e não tratadas com metformina, no dia da punção oocitária

	Ovulatórias (N = 12)		SOP (N = 9)		SOP - Metformina (N = 8)		***P***	
	Sérico	Folicular	Sérico	Folicular	Sérico	Folicular	Sérico	Folicular
E2 pcg/mL	985,20±396,70	650000±376200	1896±1300[a]	813700±448600	908,10±497,40	730700±196200	0,026	0,60
P4 ng/mL	9,01±5,45	50710±42520[b]	11,55±6,92	17680±6644	4,74±1,92[c]	13660±5212	0,04	0,01
T ng/mL	0,90±0,22	6,81±3,22	1,43±0,75[d]	6,80±3,24	0,83±0,19	5,02±1,07	0,016	0,33
SHBG nmol/L	171,60±94,15	115,10±55,69	181,60±93,62	125,70±73,62	120,80±48,65	92,89±36,71	0,30	0,50
Insulina mcU/mL	2,60±0,97	3,12±1,70	3,64±1,92	3,42±1,35	2,77±1,53	2,65±0,87	0,26	0,54
Glicemia ng/dL	82,67±8,82	69,75±11,77	79,75±7,63	74,67±13,21	84,00±2,98	80,75±10,31	0,50	0,15
IGF-1 ng/mL	156,30±28,84	127,70±36,16	181,30±47,45	129,30±23,60	161,90±24,41	118,00±16,20	0,29	0,67
FSH mUI/mL	6,23±1,82	4,72±2,05	4,52±1,80	2,89±1,36	4,68±1,72	3,60±1,27	0,07	0,06
LH mUI/mL	0,17±0,14	0,09±0,14	0,12±0,08	0,03±0,07	0,21±0,09	0,03±0,04	0,23	0,29

[a] Comparação entre as concentrações séricas de estradiol SOP *vs*. Ovulatórias e SOP-Metformina.
[b] Comparação entre as concentrações foliculares de progesterona Ovulatórias *vs*. SOP e SOP-Metformina
[c] Comparação entre as concentrações séricas de progesterona Ovulatórias *vs.* SOP e SOP-Metformina
[d] Comparação entre as concentrações séricas de testosterona SOP *vs* Ovulatórias e SOP-Metformina
Todas as comparações foram realizadas com *ANOVA* e pós-teste: *Newman-Keuls.*

Tabela 2 – Resultados referentes à avaliação dos coeficientes de correlação entre as concentrações séricas e foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia, IGF-1, FSH e LH das mulheres incluídas neste estudo e dos grupos de mulheres ovulatórias, com síndrome dos ovários policísticos (SOP) tratadas e não tratadas com metformina, no dia da punção oocitária

Variável	N Total (N = 29)	*P*	Ovulatórias (N = 12)	*P*	SOP (N = 9)	*P*	SOP-Met (N = 8)	*P*
E2 pcg/mL	*r* = 0,29	0,15	*r* = -0,12	0,72	*r* = 0,40	0,29	*r* = 0,11	0,81
P4 ng/mL	*r* = 0,23	0,25	*r* = 0,32	0,33	*r* = 0,09	0,82	*r* = 0,30	0,51
T ng/mL	*r* =0,43	0,02*	*r* = 0,15	0,65	*r* = 0,67	0,04*	*r* = 0,19	0,64
SHBG nmol/L	*r* = 0,69	<0,0001*	*r* =0,81	0,002*	*r* = 0,46	0,20	*r* = 0,98	<0,0001*
Insulina mcU/mL	*r* = 0,33	0,08	*r* = -0,16	0,63	*r* = 0,70	0,04*	*r* = 0,54	0,17
Glicemia ng/dL	*r* = 0,37	0,04*	*r* = 0,39	0,22	*r* = 0,45	0,26	*r* = 0,74	0,04*
IGF-1 ng/mL	*r* = 0,55	0,003*	*r* = 0,47	0,13	*r* = 0,71	0,04*	*r* = 0,90	0,005*
FSH mUI/mL	*r* =0,84	<0,0001*	*r* =0,84	0,0007*	*r* =0,69	0,04*	*r* = 0,93	0,0009*
LH mUI/mL	*r* = 0,66	0,0001*	*r* =0,74 *	0,006*	*r* =0,92	0,0005*	*r* = 0,59	0,13

Nota: todas as correlações foram realizadas com o coeficente de correlação de *Pearson*; * *P* <0,05

Tabela 3 – Resultados referentes ao modelo de regressão múltipla, considerando concentração sérica de testosterona como variável dependente e a expressão gênica do receptor de IGF-1, IMC, número de oócitos, concentrações foliculares de testosterona e as concentrações séricas de insulina como variáveis independentes, nas mulheres incluídas neste estudo

	Variável dependente: testosterona sérica	
Variáveis independentes	Coeficientes: beta	*P*
Expressão gênica receptor		
IGF-1	0,238	0,108
IMC	-0,277	0,065
Número de oócitos	0,350	0,021
T folicular	0,474	0,003
Insulina sérica	0,335	0,027

Tabela 4 – Resultados referentes à comparação da resposta à estimulação ovariana controlada entre mulheres com ciclos ovulatórios e mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina

Parâmetro	Ovulatórias (N = 12)	SOP (N = 9)	SOP-Metformina (N = 8)	***P***
Duração (dias) [a]	11,17±1,59	10,00±1,32	11,50±2,51	0,21
FSH recombinante (UI) [a]	1363,00±335,20 [c]	937,50±396,40	939,50±344,00	0,02
hMG (UI) [a]	850,00±273,90	625,00±163,50	665,6±181,20	0,06
E2 no dia hCG (pg/mL) [a]	1646,00±640,20	2328,0±911,60	1619,00±863,60	0,12
P4 no dia hCG (ng/mL) [a]	1,51±0,85	1,37±0,59	0,86±0,19	0,11
Nº oócitos [a]	13,08±4,17	20,44±9,36[d]	11,50±2,33	0,009
Nº casos de SHO leve ou moderada [b]	1	1	2	0,55

[a] Comparações realizadas com *ANOVA* e pós-teste: *Newman-Keuls*
[b] Comparação realizada com o teste Qui-quadrado
[c] Comparação entre as doses de FSH recombinante Ovulatórias *vs.* SOP e SOP-Metformina
[d] Comparação entre o número de oócitos SOP *vs.* Ovulatórias e SOP-Metformina.

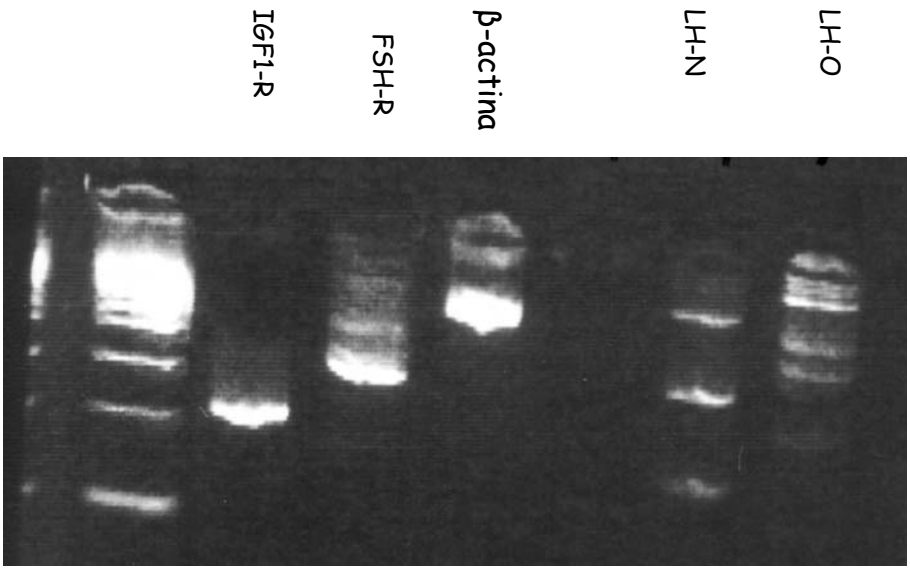


Figura 1 - Avaliação qualitativa da RT-PCR da expressão gênica dos receptores de IGF-1, FSH, LH-N, LH-O e do gene de referência da β-actina humana em células da granulosa do *cumulus* de mulheres ovulatórias realizada com eletroforese em gel de agarose a 3% e bomuro de etídio

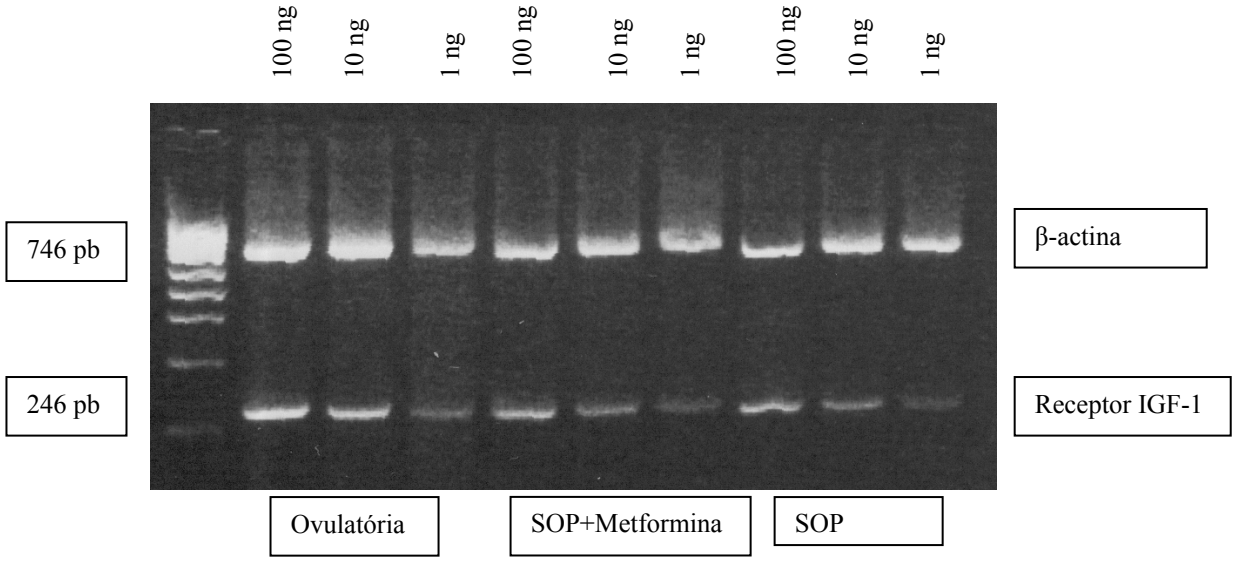


Figura 2 - RT-PCR qualitativa da expressão gênica do receptor de IGF-1 e do gene de referência da β-actina, com 100 ng, 10 ng e 1 ng de RNA em células da granulosa do *cumulus* de mulheres ovulatórias, com SOP tratadas e não tratadas com metformina. Eletroforese em gel de agarose a 3% e bomuro de etídio

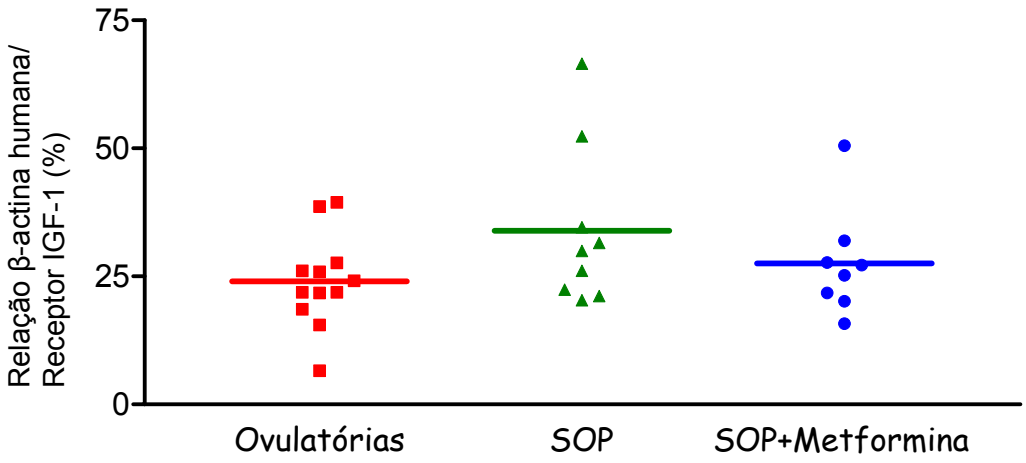
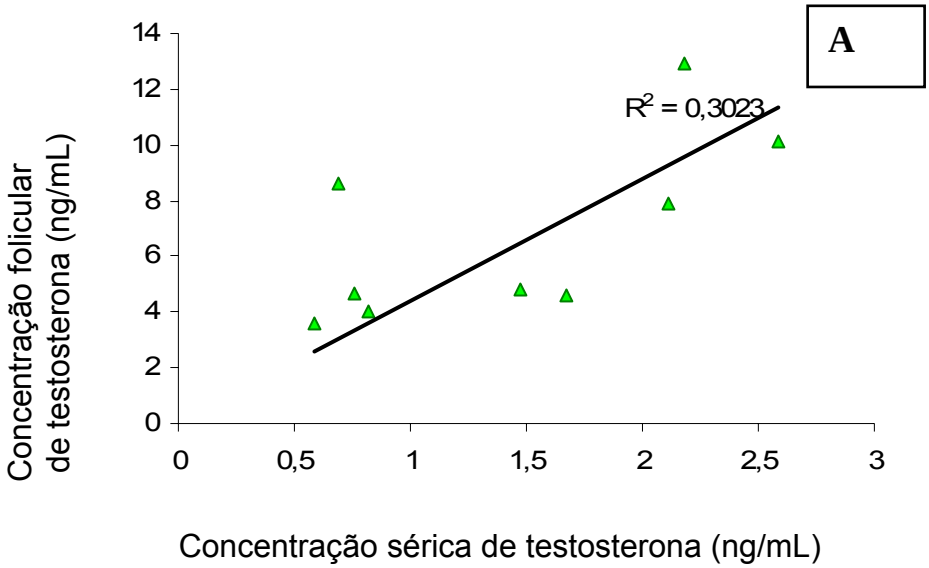


Figura 3 - Semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 em células da granulosa do *cumulus* de mulheres não obesas ovulatórias, com SOP tratadas e não tratadas com metformina. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média (P = 0,18)



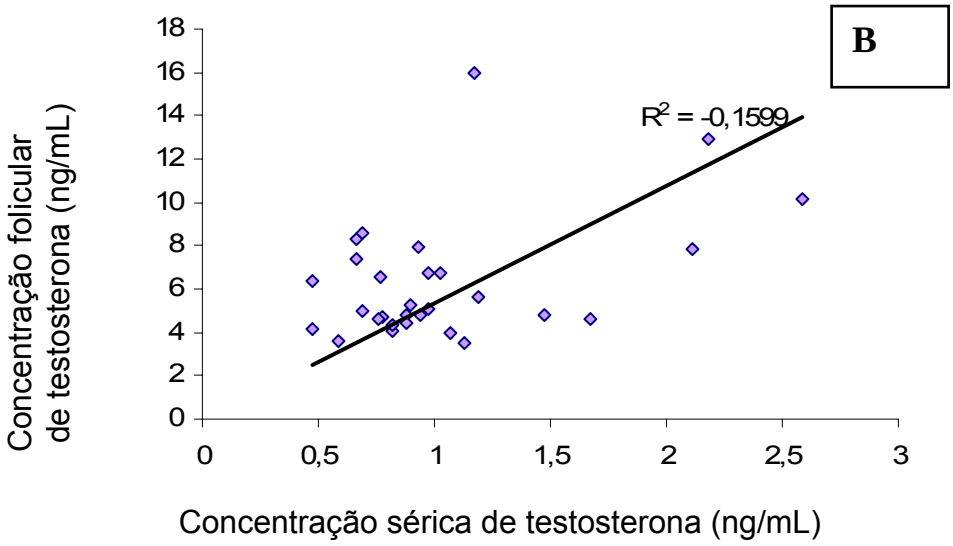


Figura 4 – Correlação entre as concentrações séricas e foliculares de testosterona, no grupo de mulheres com síndrome dos ovários policísticos não tratadas com metformina **(A)** (***P*** = 0,04) e nas mulheres incluídas neste estudo **(B)** (***P*** = 0,02)

3.6 Discussão e conclusões

A participação da resistência insulínica/hiperinsulinemia compensatória na etiopatogenia da SOP (6) tem levado ao uso freqüente da metformina na prática clínica diária (18). A maioria dos trabalhos denota que o tratamento com metformina repercute na diminuição das concentrações séricas de testosterona e regularização de ciclos menstruais (18).

Em estudos prévios, nós demonstramos que o sistema IGF atua como importante fator na fisiopatologia do hiperandrogenismo em mulheres com SOP, sem obesidade (14), e não encontramos diferenças, quando avaliamos as concentrações séricas de IGF-1 com o tratamento com metformina (18), corroborando com outros autores (27). Não há um consenso na literatura com relação aos efeitos da meformina nas concentrações séricas de IGF-1. Kolodziejczyk et al. (2000) utilizaram 1,5 grama de metformina ao dia por 12 semanas e observaram aumento nos níveis séricos de IGF-1, apenas nas mulheres que apresentavam níveis elevados de S-DHEA (32). No mesmo ano, De Leo *et al*. avaliaram o uso de metformina na mesma dose por 32 dias e não encontraram aumento significativo nos níveis séricos de IGF-1, porém observaram aumento nos níveis de IGFBP-1 e conseqüente diminuição da relação IGF-1/IGFBP-1 e menor biodisponibilidade de IGF-1 associada à terapêutica com a metformina (33).

Na busca de uma maior compreensão da participação do sistema IGF na SOP El-Roeiy *et al*. (34), utilizaram técnicas de hibridização *in situ* para avaliar o RNA mensageiro e imunoistoquímica para análise de proteínas. Estudaram a expressão e localização dos genes e proteínas: IGFs, receptores de IGF e de insulina,

IGFBPs 1-6, nas diferentes células ovarianas de mulheres com ovários normais e com SOP. A presença de receptor de IGF-1 foi detectada apenas nas células da granulosa, tanto em folículos antrais como em folículos dominantes em ovários normais e com SOP, já o receptor de insulina foi expresso em todos os compartimentos celulares estudados. Não foram detectadas expressão gênica e a protéica de IGF-1 e IGF 2 nas células da granulosa. Apenas nas células da teca foram detectadas a presença de RNA mensageiro e a proteína de IGF-2 e somente expressão gênica de IGF-1. A ação do IGF-1 ocorre via receptor de IGF-1, até o presente momento não há descrição da avaliação da expressão do receptor de IGF-1 nas células de granulosa de mulheres com SOP tratadas com metformina. Assim para a realização deste trabalho nós "hipotetizamos" que a metformina poderia ter papel na modulação do sistema IGF, para tanto avaliamos a expressão gênica do receptor de IGF-1 em mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, comparadas com mulheres ovulatórias, bem como avaliamos as concentrações séricas e foliculares dos principais hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular e oocitário, sendo este o primeiro trabalho na literatura a avaliar a expressão do receptor de IGF-1 em células da granulosa de mulheres tratadas com metformina.

Neste estudo, optamos por avaliar a expressão das células da granulosa do *cumulus* oocitário, pois, na formação do antrofolicular, as células da granulosa são divididas em duas populações celulares com características morfológicas e moleculares distintas (35). As células da granulosa do mural estão mais relacionadas com a parede folicular enquanto as células do *cumulus* estão mais associadas com o oócito. Estas células são diferentes não apenas quanto à localização, mas também na

expressão e regulação gênica (36). Provavelmente fatores derivados da interação entre o oócito e as células da granulosa sejam responsáveis por essa diferenciação celular. O oócito que durante muito tempo foi considerado como passivo neste processo, atualmente é conhecido como um elemento ativo capaz de secretar inúmeros fatores que contribuem para o adequado desenvolvimento oocitário e folicular (37). Os principais fatores secretados pelo oócito que representam importante papel nesta comunicação bidirecional são o *growth differentiation factor-9* (GDF-9) (37) e o *bone morphogenetic factor-15* (BMP-15) (38). Provavelmente a comunicação entre o oócito e as células da granulosa seja importante em todas as etapas da foliculogênese, esteroidogênese e desenvolvimento oocitário (39). Esses fatores atuam sobre as células da granulosa e provavelmente influenciam na proliferação, função e diferenciação dessas células. Teixeira Filho *et al.* (40) avaliaram a expressão de GDF-9 e BPM-15 em oócitos de mulheres com SOP e observaram uma menor expressão de GDF-9 em todas as etapas da foliculogênese em oócitos de mulheres com SOP, provavelmente essa alteração na expressão de GDF-9 possa interferir no desenvolvimento folicular e qualidade oocitária nessas mulheres, contribuindo para anovulação e infertilidade, associadas a essa doença.

As gonadotrofinas dirigem este processo, e a insulina, IGFs, androgênios e inúmeros receptores supostamente interferem ou contribuem com a regulação deste processo tanto oocitário como folicular (39). Estudos moleculares *in vitro* e *in vivo* com células da granulosa buscam uma melhor compreensão deste complexo processo. Das principais críticas com relação aos estudos moleculares com células da granulosa, podemos citar a realização de culturas celulares. A obtenção de resultados provenientes de culturas celulares nem sempre representa o estado

fisiológico das células e, provavelmente com importantes diferenças na expressão dos diferentes genes. A maioria dos estudos utiliza células provenientes de fluido folicular, sendo que estas muitas vezes apresentam contaminação com elementos do sangue como leucócitos, trazendo uma falsa interpretação dos resultados. A utilização de *pool* de células de todos os folículos é outro fator que pode trazer dificuldades na interpretação dos resultados, uma vez que folículos de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento expressam genes de maneira distinta (41). Dessa maneira, buscando uma melhor homogeneidade na interpretação dos resultados, neste estudo optamos por utilizar as células do *cumulus* de folículos maiores que 18 mm, obtidas por microdissecção mecânica. Com essa técnica, foi possível obter RNA em quantidade e qualidades suficientes para avaliação em RT-PCR qualitativa dos genes dos receptores de IGF-1, FSH e LH e de maneira semiquantitativa avaliar a expressão gênica do receptor de IGF-1. Assim essa técnica cria uma importante ferramenta para o estudo da expressão dos diferentes genes envolvidos no processo reprodutivo nas diversas doenças envolvidas com a infertilidade, com boa reprodutividade e facilidade de execução.

A escolha do estudo, expressão do receptor de IGF-1, foi ocasionada por dois principais fatores. Primeiro devido à importância do sistema IGF na regulação da função ovariana, a nível celular, molecular e clínico, atuando como fator regulador tanto em situações fisiológicas como em situações de doença como a SOP, obesidade, *diabetes mellitus* e síndromes associadas com resistência insulínica (13, 15). Trata-se de um sistema complexo composto por: insulina, IGF-1 e IGF-2, receptores de insulina, de IGF tipo 1 e tipo 2, receptor híbrido, IGFBPs e IGFBP proteases (15). E segundo, embora os receptores de insulina e IGF-1 sejam

codificados em cromossomos distintos, 19 (42) e 15 (17, 43, 44) respectivamente, apresentam grande similaridade, ambos são receptores com ativação do tipo tirosina cinase, compostos por duas subunidades alfa e duas subunidades beta e apresentam áreas de homogeneidade em cerca de 60% (43, 44). Estes dados conferem ao receptor de IGF-1 importante sítio de ação tanto do IGF-1, como do IGF-2 e insulina (17, 44). A real compreensão do funcionamento da regulação da função ovariana pela insulina e pelo IGF-1, nos diferentes componentes do tecido ovariano, faz parte das possíveis explicações para o paradoxo de por que o ovário permanece sensível à ação da insulina enquanto os demais órgãos de ação da insulina permanecem resistentes na SOP (8, 9, 45-47). O receptor de insulina no ovário tem a mesma estrutura heterotetrâmica $\alpha 2\beta 2$ que nos outros órgãos clássicos de ação insulínica (48). Talbot *et al.* (49) avaliaram os receptores de insulina em mulheres com SOP e não detectaram mutações ou alterações estruturais. Phy *et al.* (50) estudaram as isoformas A e B do receptor de insulina em células da granulosa do *cumulus* e da parede folicular provenientes de folículos de ciclos estimulados de mulheres com SOP e mulheres ovulatórias não hirsutas. Esses autores observaram maiores expressões de RNA mensageiro da isoforma A do receptor de insulina, isoforma responsável pela ação mitogênica, quando comparadas com a expressão da isoforma B, responsável pela ação metabólica da insulina, nas células da granulosa independente se proveniente do *cumulus* ou da parede folicular. Nas mulheres com SOP foi detectada maior expressão dos receptores de insulina A e B, porém, somente nas mulheres com intolerância à glicose foram observados maiores valores de insulina folicular, que não se correlacionaram com a expressão gênica dos receptores de insulina. Os níveis foliculares de insulina se correlacionaram

positivamente com o IMC e com os níveis séricos de insulina e não com a presença de SOP. Em nosso estudo, não foram detectadas diferenças nas concentrações de insulina sérica e folicular nos três grupos analisados. Apenas no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina, observamos correlações positivas das concentrações séricas e foliculares de insulina. No estudo de Phy (50) nas mulheres com SOP foram observdos menores valores da relação insulina folicular/insulina sérica, sugerindo uma menor ação da insulina intrafolicular.

Uma provável explicação da ação da insulina no ovário seria via receptor de IGF-1 (17, 47). Em nosso estudo, ao avaliar a expressão do receptor de IGF-1, não foram observadas diferenças na sua expressão entre as mulheres com ciclos ovulatórios e com SOP tratadas e não tratadas com metformina. Segundo a literatura, as prováveis ações da insulina, ao ativar o receptor de IGF-1, seriam *upregulation* no número de receptores de IGF-1 e de receptores híbridos insulina/IGF-1 (15, 51), ou ainda na inibição da produção de IGFBP-1 (52), aumentando assim a biodisponibilidade do IGF-1 e amplificando sua ação com aumento dos receptores. Sonntag *et al.* avaliaram o efeito metformina em culturas de células da granulosa provenientes de mulheres sem SOP com diferentes concentrações de insulina e de IGF-1 e observaram um aumento na viabilidade das células da granulosa pré-incubadas com metformina, sugerindo que a metformina levaria a uma menor suscetibilidade à apoptose das células da granulosa (53).

Outra provável razão para o paradoxo da ação da insulina no ovário, comparado com os outros órgãos, seria que as células ovarianas de mulheres com SOP produzem maior quantidade de androgênios em resposta à estimulação com insulina que células ovarianas de mulheres sem SOP (54). Em nosso estudo, os altos

valores das concentrações séricas de estradiol observadas no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina, associadas a maiores concentrações séricas de testosterona, maior número de oócitos obtidos neste grupo, poderiam sugerir uma maior sensibilidade à estimulação ovariana no grupo de mulheres com SOP, repercutindo assim em uma maior estimulação na esteroidogênese. Na análise da regressão múltipla, constatamos que as concentrações séricas de testosterona não se correlacionaram com a expressão gênica do receptor de IGF-1 ou com o IMC, mas foram associadas ao número de oócitos, às concentrações séricas de insulina e foliculares de testosterona. Como na análise da comparação entre os grupos, não observamos diferenças com relação aos níveis de testosterona folicular e insulina nos três grupos analisados, provavelmente as maiores concentrações séricas de testosterona ocorreram em decorrência do maior número de oócitos.

Na avaliação da resposta ovariana, o grupo de mulheres com SOP tratadas com metformina foi muito semelhante ao grupo de mulheres ovulatórias, no que diz respeito às concentrações séricas de estradiol e testosterona e número de oócitos obtidos, sugerindo que a metformina poderia modular a resposta ovariana em ciclos estimulados. Inúmeros estudos têm demonstrado que o uso da metformina está associado com presença de ciclos regulares e redução dos níveis de testosterona plasmática, sugerindo que a metformina poderia ter efeito direto na esteroidogênese ovariana, todavia os mecanismos envolvidos neste processo não estão totalmente esclarecidos.

Na avaliação do microambiente hormonal intrafolicular, observamos maiores concentrações de progesterona no grupo de mulheres com ciclos ovulatórios, quando comparadas com as mulheres com SOP tratadas e não tratadas

com metformina, repercutindo em menores valores séricos de progesterona no grupo de mulheres com SOP tratadas com metformina. La Marca *et al.* (55) observaram diminuição da atividade da 17 hidroxiprogesterona após teste com hCG em mulheres com SOP tratadas com metformina . Mansfield *et al.* (56) avaliaram o efeito da metformina na produção de estradiol e progesterona em células da teca e da granulosa. Nas células da teca, observaram uma diminuição da produção de androstenediona com a presença da metformina e, nas células da granulosa, observaram diminuição na produção de estradiol e progesterona com adição da metformina, sugerindo que uma provável ação da metformina seria inibir a ação da 3 β desidrogenase na estimulação da produção de progesterona. Recente estudo de Legro *et al.* (57) concluiu que o uso do citrato de clomifeno foi mais efetivo que a metformina na indução da ovulação e na taxa de nascidos vivos. Uma provável explicação para este fato poderia ser a diminuição na produção de progesterona nas mulheres com SOP tratadas com metformina conforme estudos *in vitro* de Mansfield *et al*. (56) e *in vivo* como nosso trabalho. Outro dado importante a ser discutido é o fato de que as mulheres tratadas com citrato de clomifeno ou metformina apresentarem altas taxas de ovulação comparadas com baixos resultados de gravidez e nascidos vivos. Essas terapêuticas são muito mais eficazes, no que diz respeito à ovulação do que a ocorrência de gravidez. Com relação ao citrato de clomifeno, uma provável razão para este fato seria ação anti-estrogênica endometrial. Com os achados deste trabalho, podemos sugerir que problemas decorrentes da qualidade oocitária com menores níveis de progesterona em associação com dados da literatura, como diminuição de GDF-9 na SOP, seriam explicações plausíveis para as

menores taxas de gravidez comparadas com as altas taxas de ovulação observadas nessas mulheres com a indução da ovulação.

Além das hipóteses da ação da insulina via receptor de IGF-1, maior sensibilidade das células ovarianas na produção de androgênios por estímulo da insulina, outra hipótese para explicar o paradoxo da ação insulínica no ovário seria ativação de diferentes vias metabólicas na ligação da insulina ou do IGF-1 nos receptores de insulina, IGF-1 ou híbrido (58, 59).

Uma explicação para a diferença na esteroidogênese observada nas maiores concentrações séricas de testosterona no grupo de mulheres com SOP não tratadas com metformina, além do maior número de oócitos, poderia ser conseqüência de maior ativação enzimática ou devido a alterações nos receptores de insulina ou no equilíbrio dos substratos dos receptores de insulina, ou mesmo a diferentes caminhos enzimáticos ativados, uma vez que não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de insulina, no microambiente folicular de estradiol, testosterona, SHBG, insulina e IGF-1 nem na expressão gênica do receptor de IGF-1, nos três grupos avaliados. Com relação ao papel dos substratos de insulina na regulação da função ovariana, podemos citar o estudo de Wu *et al.* que avaliou a expressão de receptor de insulina e de IGF-1 em células da granulosa *in vitro* de mulheres com SOP comparadas com mulheres com ciclos ovulatórios e não observou nenhuma diferença entre os dois grupos, porém a expressão do RNA mensageiro e os níveis de proteína de *insulin receptor substrate* (IRS-1) foram significativamente maiores nas células da granulosa de mulheres com SOP comparadas com o grupo-controle, e o inverso foi observado com relação ao IRS-2, sugerindo que, para adequada função ovariana, é necessário equilíbrio entre os

substratos do receptor de insulina. (46). Com relação às diferentes vias de ação da insulina no ovário é importante destacar que a ação metabólica permite aporte de glicose intracelular, a ação mitogênica estimula a proliferação celular observada no desenvolvimento folicular, e a insulina ainda atua como co-gonadotrofina estimulando a esteroidogênese. As três principais vias ativadas com a ligação da insulina no receptor de insulina são: ativação da via fosfatidilinositol (PI-·3 Kinase) que depende de ativação tirosina cinase, esta via é responsável pela entrada de glicose para dentro das células por proteínas transportadoras de glicose (*glucose transporter proteins* - GLUTs), em especial GLUT-4 (15), outra via seria a ativação da proteína cinase ativadora mitose (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK), provavelmente responsável pela ação mitogênica da insulina (60) e a terceira seria via ativação *inositol-glican*, supostamente responsável pela esteroidogênese (59). A ativação desta última via provavelmente não depende de ativação tirosina cinase, isso explicaria em parte por que as células ovarianas permanecem com capacidade de produção androgênica, mesmo nos estados de resistência insulínica. Quando o receptor de IGF-1 é ativado, apresenta respostas muito mais potentes com menores concentrações de IGF-1 ou insulina na estimulação da esteroidogênese, sendo que provavelmente a via ativada nesse caso poderia ser a MAPK (58).

Analisando os resultados deste trabalho e buscando esclarecimentos na literatura, para compreender os principais mecanismos "hipotetizados" para explicar a possível participação do sistema IGF na ação da insulina ovariana e tentando entender como a metformina atuaria na regulação do sistema IGF no hipeandrogenismo na SOP, podemos chegar a algumas importantes conclusões.

Em primeiro lugar, a padronização da técnica descrita neste estudo nos permitiu avaliar semiquantitativamente a expressão gênica do receptor de IGF-1 com êxito tanto em mulheres ovulatórias como anovulatórias com e sem tratamento com metformina, acreditamos que novos trabalhos poderão ser realizados com a mesma técnica, avaliando não só outros genes, como outras doenças e opções terapêuticas. Sendo esta técnica uma importante ferramenta para os novos estudos de biologia molecular das células da granulosa. Uma das principais limitações dessa técnica, neste estudo, foi a utilização de *pool* de células e fluido folicular e não de um só folículo, uma vez que individualmente cada oócito e cada folículo expressam e secretam de maneira distinta. Para minimizar esta limitação, optamos por utilizar oócitos provenientes de folículos maiores ou iguais a 18 mm de diâmetro médio. Outra limitação importante a ser citada foi a não-realização de técnicas para avaliar a proteína decorrente da expressão gênica do receptor de IGF-1, por ser um estudo preliminar optamos incialmente por avaliar o RNA por RT-PCR. O fato de utilizarmos células provenientes de ciclos estimulados não nos permite extrapolar nossos resultados para situações fisiológicas de ovulação, bem como impossibilita a avaliação das células da granulosa dos diferentes estágios de desenvolvimento folicular.

As altas concentrações de estradiol plasmático, associadas a maiores níveis de testosterona sérica e número de oócitos obtidos no grupo de mulheres com SOP, nos permitem concluir que essas mulheres apresentam uma maior sensibilidade à estimulação da esteroidogênese ovariana. Valores reduzidos destas variáveis e similares, entre as mulheres com ciclos ovulatórios e com SOP tratadas

com metformina, nos levam a sugerir que provavelmente a metformina teria um papel na regulação da esteroidogênese ovariana.

As maiores concentrações foliculares de progesterona, no grupo de mulheres com ciclos ovulatórios quando comparadas com mulheres com SOP tratadas e não tratadas com metformina, em associação com as menores concentrações séricas de progesterona, no grupo de mulheres com SOP tratadas com metformina nos levam a concluir que o desequilíbrio na produção de progesterona com o uso da metformina poderia ser um fator limitante na qualidade oocitária.

Embora as ferramentas utilizadas na detecção da resistência insulínica ainda sejam controversas, o fato de não termos encontrado resistência insulínica nas mulheres deste estudo nos permite concluir que a insulina provavelmente apresenta uma ação no ovário, independente da detecção periférica de hiperinsulinemia.

E finalmente o fato de não observamos diferenças entre os níveis séricos e foliculares de IGF-1, insulina e expressão gênica do receptor de IGF-1, nos três grupos, nos leva a "hipotetizar" que os efeitos da metformina, na regulação do sistema IGF na modulação da estereidogênese ovariana, devem ser provavelmente por outros receptores, e/ou por mecanismos pós-receptores. Assim, novos estudos são necessários para melhor compreender os complexos mecanismos envolvidos no processo de regulação das células da granulosa em mulheres com SOP tratadas com metformina.

3.7 Referências bibliográficas

1. **Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF** 2000 A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab 85:2434-2438

2. **Homburg R** 1996 Polycystic ovary syndrome - from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. Hum Reprod 11:29-39

3. **Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL** 2005 The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. Endocr Rev 26:251-282

4. **Reis RM, Foss MC, de Moura MD, Ferriani RA, Silva de Sa MF** 1995 Insulin secretion in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome and its relationship with hyperandrogenism. Gynecol Endocrinol 9:45-50

5. 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 81:19-25

6. **Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG** 2006 Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Trends Mol Med 12:324-332

7. **Teede HJ, Hutchison S, Zoungas S, Meyer C** 2006 Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS. Endocrine 30:45-53

8. **Baillargeon JP, Nestler JE** 2006 Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? J Clin Endocrinol Metab 91:22-24

9. **Poretsky L** 2006 Commentary: Polycystic ovary syndrome--increased or preserved ovarian sensitivity to insulin? J Clin Endocrinol Metab 91:2859-2860

10. **Reis RM, De Ângelo A.G, Romão G.S., Santana L.F. dMMD, Ferriani R.A.** 2004 Can Polycystic Ovary Syndrome Interfere with the Outcome of In Vitro Fertilization? Rev Bras Ginecol Obstet 26:727-733

11. **Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A** 1989 Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. Diabetes 38:1165-1174

12. **Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL** 1995 Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 92:10619-10623

13. **Nestler JE** 1997 Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. Semin Reprod Endocrinol 15:111-122

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

15. **Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC** 1999 The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev 20:535-582

16. **Federici M, Lauro D, D'Adamo M, Giovannone B, Porzio O, Mellozzi M, Tamburrano G, Sbraccia P, Sesti G** 1998 Expression of insulin/IGF-I hybrid receptors is increased in skeletal muscle of patients with chronic primary hyperinsulinemia. Diabetes 47:87-92

17. **LeRoith D, Yakar S** 2007 Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3:302-310

18. **Santana LF, de Sa MF, Ferriani RA, de Moura MD, Foss MC, dos Reis RM** 2004 Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 19:88-96

19. **Wang HS** 2006 The role of metformin in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS). Chang Gung Med J 29:445-447

20. **Neveu N, Granger L, St-Michel P, Lavoie HB** 2007 Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 87:113-120

21. **Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, Steinkampf MP, Coutifaris C, McGovern PG, Cataldo NA, Gosman GG,**

Nestler JE, Giudice LC, Leppert PC, Myers ER 2007 Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 356:551-566

22. **Costello MF, Chapman M, Conway U** 2006 A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 21:1387-1399

23. **Khattab S, Mohsen IA, Foutouh IA, Ramadan A, Moaz M, Al-Inany H** 2006 Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 22:680-684

24. **Glueck CJ, Goldenberg N, Wang P, Loftspring M, Sherman A** 2004 Metformin during pregnancy reduces insulin, insulin resistance, insulin secretion, weight, testosterone and development of gestational diabetes: prospective longitudinal assessment of women with polycystic ovary syndrome from preconception throughout pregnancy. Hum Reprod 19:510-521

25. **Marcondes JA, Yamashita SA, Maciel GA, Baracat EC, Halpern A** 2007 Metformin in normal-weight hirsute women with polycystic ovary syndrome with normal insulin sensitivity. Gynecol Endocrinol 23:273-278

26. **Hutchison SK, Zoungas S, Teede HJ** 2007 Insulin levels, insulin resistance and the use of metformin in polycystic ovary syndrome. Med J Aust 186:268-269; author reply 271-262

27. **Seibel SA, Chou KH, Capp E, Spritzer PM, von Eye Corleta H** 2007 Effect of metformin on IGF-1 and IGFBP-1 levels in obese patients with polycystic ovary syndrome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol

28. 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 19:41-47

29. **Ferriman D, Gallwey JD** 1961 Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 21:1440-1447

30. **Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ** 2000 Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. J Clin Endocrinol Metab 85:2402-2410

31. **Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS, Spritzer PM** 2003 Gene expression of type 2 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. Steroids 68:641-649

32. **Kolodziejczyk B, Duleba AJ, Spaczynski RZ, Pawelczyk L** 2000 Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 73:1149-1154

33. **De Leo V, La Marca A, Orvieto R, Morgante G** 2000 Effect of metformin on insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein I in polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 85:1598-1600

34. **el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Yen SS** 1994 Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. J Clin Endocrinol Metab 78:1488-1496

35. **Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB** 2000 Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. Biol Reprod 63:839-845

36. **Latham KE, Wigglesworth K, McMenamin M, Eppig JJ** 2004 Stage-dependent effects of oocytes and growth differentiation factor 9 on mouse granulosa cell development: advance programming and subsequent control of the transition from preantral secondary follicles to early antral tertiary follicles. Biol Reprod 70:1253-1262

37. **Eppig JJ** 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 122:829-838

38. **Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH** 2002 Bmp15 mutations and ovarian function. Mol Cell Endocrinol 191:15-18

39. **Knight PG, Glister C** 2006 TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 132:191-206

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

41. **Willis DS, Mason HD, Watson H, Franks S** 1998 Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. J Clin Endocrinol Metab 83:1256-1259

42. **Seino S, Seino M, Bell GI** 1990 Human insulin-receptor gene. Diabetes 39:129-133

43. **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr.** 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev 16:143-163

44. **Mohseni-Zadeh S, Binoux M** 1997 Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. Endocrinology 138:5645-5648

45. **Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D, Roberts CT, Jr.** 1992 Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab 74:419-425

46. **Wu XK, Zhou SY, Liu JX, Pollanen P, Sallinen K, Makinen M, Erkkola R** 2003 Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 80:954-965

47. **Book CB, Dunaif A** 1999 Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 84:3110-3116

48. **Poretsky L, Grigorescu F, Seibel M, Moses AC, Flier JS** 1985 Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal human ovary. J Clin Endocrinol Metab 61:728-734

49. **Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton RN** 1996 Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol Metab 81:1979-1983

50. **Phy JL, Conover CA, Abbott DH, Zschunke MA, Walker DL, Session DR, Tummon IS, Thornhill AR, Lesnick TG, Dumesic DA** 2004 Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. J Clin Endocrinol Metab 89:3561-3566

51. **Poretsky L, Glover B, Laumas V, Kalin M, Dunaif A** 1988 The effects of experimental hyperinsulinemia on steroid secretion, ovarian [125I]insulin binding, and ovarian [125I]insulin-like growth-factor I binding in the rat. Endocrinology 122:581-585

52. **Poretsky L, Chun B, Liu HC, Rosenwaks Z** 1996 Insulin-like growth factor II (IGF-II) inhibits insulin-like growth factor binding protein I (IGFBP-1) production in luteinized human granulosa cells with a potency similar to insulin-like growth factor I (IGF-I) and higher than insulin. J Clin Endocrinol Metab 81:3412-3414

53. **Sonntag B, Gotte M, Wulfing P, Schuring AN, Kiesel L, Greb RR** 2005 Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. Fertil Steril 84 Suppl 2:1173-1179

54. **Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S** 1996 Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 81:302-309

55. **la Marca A, Egbe TO, Morgante G, Paglia T, Cianci A, De Leo V** 2000 Metformin treatment reduces ovarian cytochrome P-450c17alpha response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 15:21-23

56. **Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H** 2003 Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. Fertil Steril 79:956-962

57. **Legro RS, Zaino RJ, Demers LM, Kunselman AR, Gnatuk CL, Williams NI, Dodson WC** 2007 The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. Am J Obstet Gynecol 196:402 e401-410; discussion 402 e410-401

58. **Seto-Young D, Zajac J, Liu HC, Rosenwaks Z, Poretsky L** 2003 The role of mitogen-activated protein kinase in insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling cascades for progesterone and IGF-binding protein-1 production in human granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 88:3385-3391

59. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F** 1998 Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. J Clin Endocrinol Metab 83:2001-2005

60. **Suga J, Yoshimasa Y, Yamada K, Yamamoto Y, Inoue G, Okamoto M, Hayashi T, Shigemoto M, Kosaki A, Kuzuya H, Nakao K** 1997 Differential activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and epidermal growth factor in 3T3-L1 adipocytes: a possible involvement of PI3-kinase in the activation of the MAP kinase by insulin. Diabetes 46:735-741

Anexos

Anexo 1 – Características clínicas das mulheres incluídas neste estudo

A. Características clínicas das mulheres com ciclos ovulatórios com relação à idade, peso, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril, relação C/Q e QUICKI

Mulheres	**Idade**	**Peso (kg)**	**IMC (kg/m^2)**	**Cintura (cm)**	**Quadril (cm)**	**Relação C/Q**	**QUICKI**
VJF	20,00	46,50	19,86	70,00	90,00	0,78	0,45
MRG	23,00	72,00	28,12	84,00	118,00	0,71	0,41
ALG	25,00	50,30	19,17	69,00	94,00	0,73	0,45
ABR	21,00	50,00	20,55	67,00	87,00	0,77	0,47
NPM	20,00	62,00	21,45	74,00	102,00	0,73	0,46
RGG	28,00	60,00	21,01	74,00	104,00	0,71	0,45
MBMF	29,00	67,00	25,22	79,00	106,00	0,75	0,46
MJMB	30,00	58,00	21,83	68,00	95,00	0,72	0,45
TBL	28,00	49,00	20,13	64,00	87,00	0,74	0,41
NDO	22,00	63,00	23,14	79,00	115,00	0,69	0,37
AJC	27,00	58,00	22,94	74,00	94,00	0,79	0,44
FEM	31,00	70,00	27,01	86,00	110,00	0,78	0,41
Mediana	**26,00**	**59,00**	**21,64**	**74,00**	**98,50**	**0,74**	**0,45**
Média	**25,33**	**58,82**	**22,54**	**74,00**	**100,20**	**0,74**	**0,44**
Desvio Padrão	**4,01**	**8,50**	**2,88**	**6,88**	**10,62**	**0,03**	**0,03**

B. Características clínicas das mulheres com síndrome dos ovários policísticos com relação à idade, peso, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril, relação C/Q e QUICKI

Mulheres	**Idade**	**Peso (kg)**	**IMC (kg/m^2)**	**Cintura (cm)**	**Quadril (cm)**	**Relação C/Q**	**QUICKI**
JNC	19,00	48,00	18,52	70,00	90	0,78	0,36
AGSP	23,00	55,00	20,96	73,00	97	0,75	0,41
MDMV	24,00	71,00	24,86	78,00	100	0,78	0,38
FGA	38,00	59,00	23,05	79,00	90	0,88	0,38
VCM	25,00	58,00	22,94	78,00	99	0,79	0,43
RFG	27,00	56,50	23,22	72,00	95	0,76	0,45
VCP	25,00	63,50	26,43	74,00	102	0,73	0,47
CRG	22,00	50,50	21,86	68,00	94	0,72	0,43
IRC	27,00	73,40	28,67	85,00	106	0,80	0,38
Mediana	**25,00**	**58,00**	**23,05**	**74,00**	**97,00**	**0,78**	**0,41**
Média	**25,56**	**59,43**	**23,39**	**75,22**	**97,00**	**0,78**	**0,41**
Desvio Padrão	**5,29**	**8,56**	**2,99**	**5,26**	**5,36**	**0,05**	**0,04**

C. Características clínicas das mulheres com síndrome dos ovários policísticos tratadas com metformina com relação à idade, peso, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril, relação C/Q e QUICKI

Mulheres	**Idade**	**Peso (kg)**	**IMC (kg/m^2)**	**Cintura (cm)**	**Quadril (cm)**	**Relação C/Q**	**QUICKI**
STS	35,00	77,00	29,34	90,50	105,00	0,86	0,37
MGC	32,00	60,00	19,37	65,00	93,00	0,70	0,45
MJTA	31,00	72,00	23,24	86,00	107,00	0,80	0,40
MBSR	31,00	62,80	23,35	73,00	97,00	0,75	0,45
KFG	29,00	58,80	20,35	71,00	90,00	0,79	0,45
MJMJ	31,00	84,90	29,73	89,00	114,00	0,78	0,44
RLB	34,00	44,00	18,55	68,00	88,00	0,77	0,45
TOM	37,00	58,00	21,83	70,00	90,00	0,78	0,45
Mediana	**31,50**	**61,40**	**22,54**	**72,00**	**95,00**	**0,78**	**0,45**
Média	**32,50**	**64,69**	**23,22**	**76,56**	**98,00**	**0,78**	**0,43**
Desvio-Padrão	**2,62**	**12,80**	**4,25**	**10,22**	**9,56**	**0,05**	**0,03**

Anexo 2 – Comparação das características clínicas entre as mulheres com ciclos ovulatórios e com SOP tratadas e não tratadas com metformina

Características	Ovulatórias (N = 12)	SOP (N = 9)	SOP - Metormina (N = 8)	*P*
Idade (anos)	25,33±4,01	25,56±5,29	32,50±2,62	0,001
Peso (Kg)	58,82±8,50	59,43±8,56	64,69±12,80	0,40
ICM (Kg/m^2)	22,54±2,88	23,39±2,99	23,22±4,25	0,82
Cintura (cm)	74,00±6,88	75,22±5,26	76,56±10,22	0,76
Quadril (cm)	100,20±10,62	97,00±5,36	98,00±9,56	0,71
Relação C/Q	0,74±0,03	0,78±0,05	0,78±0,05	0,08
QUICKI	0,44±0,03	0,41±0,04	0,43±0,03	0,19

Nota: a comparação das características clínicas foi realizada utilizando-se os teste *One-way analysis of variance ANOVA* e pós-teste *Newman-Keuls Multiple*

Anexo 3 – Avaliação dos dados referentes à estimulação ovariana controlada das mulheres incluídas neste estudo

A. Resultados referentes à estimulação ovariana controlada com relação às mulheres com ciclos ovulatórios

Mulheres	**Duração (dias)**	**Dose FSH (UI)**	**Dose HMG (UI)**	**Nº total de oócitos**
VJF	9,00	825,00	600,00	14,00
MRG	10,00	1350,00	675,00	10,00
ALG	13,00	1650,00	900,00	20,00
ABR	11,00	1500,00	750,00	5,00
NPM	11,00	1500,00	750,00	12,00
RGG	12,00	825,00	825,00	13,00
MBMF	12,00	1650,00	1350,00	8,00
MJMB	13,00	1725,00	900,00	13,00
TBL	8,00	1050,00	525,00	13,00
NDO	11,00	1200,00	750,00	14,00
AJC	11,00	1275,00	750,00	17,00
FEM	13,00	1800,00	1425,00	18,00
Mediana	**11,00**	**1425**	**750,00**	**13,00**
Média	**11,17**	**1363**	**850,00**	**13,08**
Desvio-Padrão	**1,59**	**335,20**	**273,90**	**4,17**

B. Resultados referentes à estimulação ovariana controlada com relação às mulheres com síndrome dos ovários policísticos

Mulheres	**Duração (dias)**	**Dose FSH (UI)**	**Dose HMG (UI)**	**Nº total de oócitos**
JNC	8,00	450,00	375,00	17,00
AGSP	8,00	450,00	375,00	40,00
MDMV	10,00	862,50	675,00	22,00
FGA	10,00	712,50	750,00	21,00
VCM	11,00	637,50	525,00	10,00
RFG	10,00	1275,00	675,00	29,00
VCP	10,00	1350,00	675,00	19,00
CRG	11,00	1425,00	750,00	15,00
IRC	12,00	1275,00	825,00	11,00
Mediana	**10,00**	**862,50**	**675,00**	**19,00**
Média	**10,00**	**937,50**	**625,00**	**20,44**
Desvio-Padrão	**1,32**	**396,40**	**163,50**	**9,36**

C. Resultados referentes à estimulação ovariana controlada com relação às mulheres com síndrome dos ovários policísticos e tratadas com metformina durante 8 semanas

Mulheres	**Duração (dias)**	**Dose FSH (UI)**	**Dose HMG (UI)**	**Nº total de oócitos**
STS	9,00	822,00	600,00	7,00
MGC	15,00	975,00	525,00	11,00
MJTA	10,00	1350,00	675,00	12,00
MBSR	14,00	975,00	975,00	13,00
KFG	13,00	1496,00	900,00	14,00
MJMJ	9,00	700,00	600,00	10,00
RLB	13,00	450,00	450,00	11,00
TOM	9,00	748,00	600,00	14,00
Mediana	**11,50**	**898,50**	**600,00**	**11,50**
Média	**11,50**	**939,50**	**665,60**	**11,50**
Desvio-Padrão	**2,51**	**344,00**	**181,20**	**2,33**

Anexo 4 – Avaliação das concentrações séricas de estradiol e progesterona das mulheres incluídas neste estudo no dia do HCG

A. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4) das mulheres com ciclos ovulatórios, no dia do HCG

Mulheres	**E2 (pcg/mL)**	**P4 (ng/mL)**
VJF	1685,00	2,91
MRG	1012,00	0,83
ALG	2729,00	1,42
ABR	767,00	2,62
NPM	1614,00	2,84
RGG	1391,00	0,98
MBMF	1260,00	1,32
MJMB	1792,00	0,95
TBL	1119,00	0,72
NDO	2681,00	1,12
AJC	2052,00	0,87
FME	---	----
Mediana	**1614,00**	**1,12**
Média	**1646,00**	**1,51**
Desvio-Padrão	**640,20**	**0,85**

B. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (E2) das mulheres com síndrome dos ovários policísticos, no dia do HCG

Mulheres	**E2 (pcg/mL)**	**P4 (ng/mL)**
JNC	1679,00	1,28
AGSP	2893,00	----
MDMV	2743,00	1,02
FGA	3481,00	0,91
VCM	1959,00	1,25
RFG	2995,00	2,62
VCP	1795,00	1,37
CRG	2876,00	1,71
IRC	528,00	0,77
Mediana	**2743,00**	**1,27**
Média	**2328,00**	**1,37**
Desvio-Padrão	**911,60**	**0,59**

C. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4) das mulheres com síndrome dos ovários policísticos tratadas com metformina durante 8 semanas, no dia do HCG

Mulheres	**E2 (pcg/mL)**	**P4 (ng/mL)**
STS	694,00	0,74
MGC	907,00	0,75
MJTA	1331,00	0,88
MBSR	1298,00	0,92
KFG	3421,00	1,12
MJMJ	1425,00	0,72
RLB	1636,00	0,63
TOM	2241,00	1,15
Mediana	**1378,00**	**0,82**
Média	**1619,00**	**0,86**
Desvio-Padrão	**863,60**	**0,19**

Anexo 5 - Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres incluídas neste estudo, no dia da punção oocitária

A. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com ciclos ovulatórios, realizadas, no dia da punção oocitária

Mulheres	**E2**	**P4**	**FSH**	**LH**	**T**	**SHBG**	**Insulina**	**Glicemia**	**IGF-1**
	pcg/mL	**ng/mL**	**mUI/mL**	**mUI/mL**	**ng/mL**	**nmol/L**	**mcU/mL**	**ng/dL**	**ng/mL**
VJF	674,00	15,33	6,60	0,08	0,66	165,00	2,00	83,00	151,00
MRG	384,00	5,35	5,54	0,00	0,78	74,70	2,96	91,00	201,00
ALG	1393,00	12,43	5,83	0,11	0,94	223,00	2,00	81,00	108,00
ABR	703,00	19	9,11	0,32	0,93	52,80	2,00	69,00	185,00
NPM	625,00	15,98	3,57	0,21	1,17	132,00	2,00	73,00	166,00
RGG	1154,00	6,6	3,61	0,11	1,19	315,00	2,00	88,00	167,00
MBMF	622,00	10,15	9,22	0,11	0,47	98,20	2,00	77,00	162,00
MJMB	998,00	3,72	5,24	0,11	0,66	241,00	2,00	83,00	159,00
TBL	1630,00	3,79	7,69	0,18	1,13	167,00	3,03	92,00	183,00
NDO	1540,00	5,46	7,48	0,51	0,97	354,00	5,27	92,00	157,00
AJC	1096,00	7,21	4,70	0,08	0,90	113,00	2,82	70,00	110,00
FME	1003,00	3,08	6,11	0,17	0,97	124,00	3,07	93,00	127,00
Mediana	**1001,00**	**6,91**	**5,97**	**0,11**	**0,94**	**148,50**	**2,00**	**83,00**	**160,50**
Média	**985,20**	**9,01**	**6,23**	**0,17**	**0,90**	**171,60**	**2,60**	**82,67**	**156,30**
DP	**396,70**	**5,45**	**1,88**	**0,14**	**0,22**	**94,15**	**0,97**	**8,82**	**28,84**

Nota: desvio-padrão (DP)

B. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com síndrome dos ovários policísticos, realizadas no dia da punção oocitária

Mulheres	**E2**	**P4**	**FSH**	**LH**	**T**	**SHBG**	**Insulina**	**Glicemia**	**IGF-1**
	pcg/mL	**ng/mL**	**mUI/mL**	**mUI/mL**	**ng/mL**	**nmol/L**	**mcU/mL**	**ng/dL**	**ng/mL**
JNC	1994,00	5,06	3,63	0,30	2,59	160,00	7,63	78,00	194,00
AGSP	4902,00	24,49	3,44	0,08	2,11	146,00	3,32	80,00	248,00
MDMV	1538,00	9,67	4,49	0,04	0,76	285,00	5,16	81,00	113,00
FGA	1324,00	15,79	2,91	0,14	0,59	328,00	4,95	93,00	121,00
VCM	1102,00	5,39	2,33	0,15	2,18	289,00	2,88	-----	-----
RFG	2412,00	10,82	5,23	0,07	1,47	142,00	2,00	75,00	160,00
VCP	1329,00	9,12	7,98	0,11	0,82	102,00	2,00	87,00	227,00
CRG	2211,00	19,16	6,23	0,11	1,67	108,00	2,84	68,00	196,00
IRC	251,00	4,48	4,41	0,09	0,69	74,80	2,00	76,00	191,00
Mediana	**1538,00**	**9,67**	**4,41**	**0,11**	**1,47**	**146,00**	**2,88**	**79,00**	**192,50**
Média	**1896,00**	**11,55**	**4,52**	**0,12**	**1,43**	**181,60**	**3,64**	**79,75**	**181,30**
DP	**1300,00**	**6,92**	**1,76**	**0,08**	**0,75**	**93,62**	**1,92**	**7,630**	**47,45**

Nota: desvio-padrão (DP)

C. Avaliação das concentrações séricas de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com síndrome dos ovários policísticos tratadas com metformina durante 8 semanas, realizadas, no dia da punção oocitária

.

Mulheres	**E2**	**P4**	**FSH**	**LH**	**T**	**SHBG**	**Insulina**	**Glicemia**	**IGF-1**
	pcg/mL	**ng/mL**	**mUI/mL**	**mUI/mL**	**ng/mL**	**nmol/L**	**mcU/mL**	**ng/dL**	**ng/mL**
STS	365,00	4,24	3,72	0,21	0,47	71,40	6,23	84,00	177,00
MGC	349,00	2,77	3,81	0,07	0,82	116,00	2,00	86,00	146,00
MJTA	770,00	5,17	3,84	0,23	0,88	111,00	3,78	84,00	---
MBSR	689,00	3,66	5,87	0,13	0,69	105,00	2,00	82,00	201,00
KFG	1412,00	9,09	8,45	0,38	0,77	216,00	2,00	81,00	182,00
MJMJ	867,00	5,1	3,58	0,17	0,88	75,90	2,17	89,00	142,00
RLB	1016,00	3,84	3,45	0,27	1,07	169,00	2,00	86,00	145,00
TOM	1797,00	4,03	4,73	0,25	1,03	102,00	2,00	80,00	140,00
Mediana	**818,50**	**4,14**	**3,83**	**0,22**	**0,85**	**108,00**	**2,00**	**84,00**	**146,00**
Média	**908,10**	**4,74**	**4,68**	**0,21**	**0,83**	**120,80**	**2,77**	**84,00**	**161,90**
DP	**497,40**	**1,92**	**1,72**	**0,09**	**0,19**	**48,65**	**1,52**	**2,98**	**24,41**

Nota: desvio-padrão (DP)

Anexo 6 – Valores de referência adotados no Laboratório Geral do IVI Sevilha Espanha, para as concentrações séricas avaliadas neste estudo

Concentrações Séricas	Valores de Referência
Glicose	70-110 mg/dL
Insulina	6-27 mcU/mL
Testosterona	0,2 -1,2 ng/mL
Estradiol	Fase Folicular: 39-189 pcg/mL
	Pico Ovulatório: 94-508 pcg/mL
	Fase Lútea: 48-308 pcg/mL 1298
Progesterona	Fase Folicular: 0,1-0,54 ng/mL
	Pico Ovulatório: 0,12-6,22 ng/mL
	Fase Lútea: 1,5-20 ng/mL
FSH	Fase Folicular: 4-13 mUI/mL
	Pico Ovulatório: 5-22 mUI/mL
	Fase Lútea: 2-13 mUI/mL
LH	Fase Folicular: 1-18 mUI/mL
	Pico Ovulatório: 24-105 mUI/mL
	Fase Lútea: 0,4-20 mUI/mL
SHBG	16-120 nmol/mL
IGF-1	55-358 ng/mL

Anexo 7 – Avaliação das concentrações foliculares de estradiol, progesterona, FSH, LH, testosterona, SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres incluídas neste estudo

A. Avaliação das concentrações foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com ciclos ovulatórios

Mulheres	E2 pcg/mL	P4 ng/mL	FSH mUI/mL	LH mUI/mL	T ng/mL	SHBG nmol/L	Insulina mcU/mL	Glicemia ng/dL	IGF-1 ng/mL
VJF	962000	44180	4,73	0,06	8,28	135,00	2,00	85,00	183,00
MRG	301000	83100	3,41	0,00	4,72	53,20	2,000	72,00	165,00
ALG	466000	52240	3,50	0,05	4,80	199,00	2,00	66,00	83,70
ABR	320000	110000	9,97	0,47	7,91	44,40	7,04	74,00	165,00
NPM	904000	18500	3,77	0,16	16,00	112,00	5,18	64,00	182,00
RGG	211000	5580	3,23	0,00	5,64	143,00	2,00	70,00	108,00
MBMF	1026000	120260	7,35	0,00	6,40	68,70	4,86	40,00	118,00
MJMB	1361000	14740	3,28	0,00	7,37	206,00	2,00	64,00	121,00
TBL	772000	14860	4,99	0,11	3,52	84,80	2,00	83,00	90,80
NDO	520000	85600	4,89	0,24	5,10	172,00	3,33	69,00	106,00
AJC	307000	8770	2,97	0,00	5,23	70,80	3,07	69,00	116,00
FEM	-	-	4,51	0,00	6,75	92,00	2,00	81,00	93,60
Mediana	**520000**	**44180**	**4,14**	**0,03**	**6,02**	**102,00**	**2,00**	**69,50**	**117,00**
Média	**650000**	**50710**	**4,72**	**0,09**	**6,81**	**115,10**	**3,12**	**69,75**	**127,70**
DP	**376200**	**42520**	**2,05**	**0,14**	**3,22**	**55,69**	**1,69**	**11,77**	**36,16**

Nota: desvio-padrão (DP)

B. Avaliação das concentrações foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com síndrome dos ovários policísticos

Mulheres	**E2**	**P4**	**FSH**	**LH**	**T**	**SHBG**	**Insulina**	**Glicemia**	**IGF-1**
	pcg/mL	**ng/mL**	**mUI/mL**	**mUI/mL**	**ng/mL**	**nmol/L**	**mcU/mL**	**ng/dL**	**ng/mL**
JNC	952000	7020	2,23	0,20	10,15	95,10	3,85	82,00	155,00
AGSP	1330000	16770	1,85	0,00	7,88	283,00	3,78	93,00	157,00
MDMV	386000	13730	2,84	0,00	4,66	156,00	5,76	69,00	131,00
FGA	436000	14140	2,28	0,03	3,62	157,00	5,14	90,00	77,40
VCM	1662000	27200	0,92	0,01	12,89	163,00	2,56	52,00	125,00
RFG	603000	21870	4,39	0,01	4,79	102,00	2,00	67,00	115,00
VCP	436000	11880	3,09	0,00	4,03	58,40	2,00	70,00	138,00
CRG	966000	25060	5,49	0,00	4,57	69,80	3,22	66,00	130,00
IRC	552000	21460	2,92	0,00	8,58	47,10	2,43	83,00	135,00
Mediana	**603000**	**16770**	**2,84**	**0,00**	**4,79**	**102,00**	**3,22**	**70,00**	**131,00**
Média	**813700**	**17680**	**2,89**	**0,03**	**6,80**	**125,70**	**3,42**	**74,67**	**129,30**
DP	**448600**	**6644**	**1,36**	**0,07**	**3,24**	**73,62**	**1,35**	**13,21**	**23,60**

Nota: desvio-padrão (DP)

C. Avaliação das concentrações foliculares de estradiol (E2), progesterona (P4), FSH, LH, testosterona (T), SHBG, insulina, glicemia e IGF-1 das mulheres com síndrome dos ovários policísticos tratadas com metformina durante 8 semanas

Mulheres	**E2**	**P4**	**FSH**	**LH**	**T**	**SHBG**	**Insulina**	**Glicemia**	**IGF-1**
	pcg/mL	**ng/mL**	**mUI/mL**	**mUI/mL**	**ng/mL**	**nmol/L**	**mcU/mL**	**ng/dL**	**ng/mL**
STS	-	-	3,10	0,10	4,17	44,30	3,14	88,00	122,00
MGC	614000	20460	2,36	0,00	4,36	94,60	3,24	79,00	108,00
MJTA	1082000	17950	2,95	0,00	4,81	83,90	4,38	76,00	119,00
MBSR	643000	9200	4,58	0,01	5,02	73,60	2,00	71,00	143,00
KFG	494000	18440	5,88	0,10	6,59	159,00	2,44	67,00	136,00
MJMJ	688000	10790	2,99	0,00	4,43	64,70	2,00	100,00	118,00
RLB	698000	11750	2,29	0,03	4,00	131,00	2,00	84,00	104,00
TOM	896000	7050	4,51	0,00	6,75	92,00	2,00	81,00	93,60
Mediana	**688000**	**11750**	**3,05**	**0,01**	**4,62**	**87,95**	**2,22**	**80,00**	**118,50**
Média	**730700**	**13660**	**3,58**	**0,03**	**5,02**	**92,89**	**2,60**	**80,75**	**118,00**
DP	**196200**	**5212**	**1,27**	**0,04**	**1,07**	**36,71**	**0,87**	**10,31**	**16,29**

Nota: desvio-padrão (DP)

Anexo 8 – Resultados referentes à semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 das células da granulosa do *cumulus* oócitos das mulheres incluídas neste estudo

A. Resultados referentes à semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 das células da granulosa do *cumulus* oócitos das mulheres com ciclos ovulatórios, realizada através da relação entre expressão do gene de referência da β-actina com a expressão do receptor de IGF-1

Mulheres	**Expressão semiquantitativa do receptor de IGF-1**
VJF	6,60%
MRG	24,14%
ALG	18,60%
ABR	25,89%
NPM	26,10%
RGG	15,51%
MBMF	21,77%
MJMB	38,68%
TBL	27,64%
NDO	21,93%
AJC	39,44%
FEM	21,92%
Mediana	**23,04%**
Média	**24,02%**
Desvio-Padrão	**9,01%**

B. Resultados referentes à semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 das células da granulosa do *cumulus* oócitos das mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), realizada através da relação entre expressão do gene de referência da β-actina com a expressão do receptor de IGF-1

Mulheres	**Expressão semiquantitativa do receptor de IGF-1**
JNC	20,35%
AGSP	21,15%
MDMV	22,40%
FGA	34,57%
VCM	29,98%
RFG	26,07%
VCP	52,37%
CRG	66,52%
IRC	31,51%
Mediana	**29,98%**
Média	**33,88%**
Desvio-Padrão	**15,68%**

C. Resultados referentes à semiquantificação da expressão gênica do receptor de IGF-1 das células da granulosa do *cumulus* oócitos das mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) e tratadas com metformina durante 8 semanas, realizada através da relação entre expressão do gene de referência da β-actina com a expressão do receptor de IGF-1

Mulheres	**Expressão semiquantitativa do receptor de IGF-1**
STS	20,14%
MGC	21,80%
MJTA	15,80%
MBSR	27,74%
KFG	27,19%
MJMJ	25,19%
RLB	50,53%
TOM	31,99%
Mediana	**26,19%**
Média	**27,55%**
Desvio-Padrão	**10,55%**