

ROBERTA RASSI MAHAMED

**EFEITOS DA METFORMINA NO SISTEMA
REPRODUTOR EM RATAS ANDROGENIZADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA RASSI MAHAMED

**EFEITOS DA METFORMINA NO SISTEMA
REPRODUTOR EM RATAS ANDROGENIZADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Co-orientador:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Mestre Dra. Carla Cristina Maganhin

São Paulo

2010

Mahamed Rassi, Roberta

EFEITOS DA METFORMINA NO SISTEMA REPRODUTOR EM RATAS ANDROGENIZADAS / Roberta Rassi Mahamed - São Paulo, 2010. 73f, XXVI.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ginecologia.

Título em Inglês: **EFFECTS OF METFORMIN ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF ANDROGENIZED FEMALE RATS.**

1. Síndrome dos Ovários Policísticos. 2. Sistema Reprodutor. 3. Metformina. 4. Estro-Permanente. 5. Ratos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA**

Chefe do Departamento

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Coordenador do Curso de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

ROBERTA RASSI MAHAMED

**EFEITOS DA METFORMINA NO SISTEMA REPRODUTOR
EM RATAS ANDROGENIZADAS**

Presidente da banca:

Prof. Dr. José Maria Soares Jr

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Rossi

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Prof. Dr. Abês Mahmed Amed

Suplentes:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Prof. Dr^a Lucrecia Regina Gomes Romeu

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado:

A Deus,

pela graça da vida e às bençãos recebidas por cada dia.

Aos meus pais, Assad e Myrna,

pela presença e dedicação constante, amor, estímulo e ensinamentos que se tornaram fundamentais na minha formação moral e profissional.

Ao meu marido Marcelo,

pelo apoio e incentivo em todos os momentos durante a realização deste trabalho e pelo amor e companherismo que tornam minha vida mais completa e feliz.

Aos meus familiares,

pelo carinho e pela amizade que sempre demonstraram.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Júnior,

pela sua dedicação em ensinar, pelo incentivo constante, pela orientação, pela amizade e pelo apoio científico e humano durante todo este tempo de convívio.

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões,

pela orientação, pela atenção e pelas valiosas correções deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat,

pela atenção e incentivo nas orientações e exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP-EPM** por ter me recebido como aluno do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, possibilitando minha titulação.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Leme Alves da Motta**, pelos ensinamentos, atenção e apoio na Disciplina de Ginecologia Endócrina e Transição Menopausal.

Ao **Prof. Dr. Mauro Abi Haidar**, pela acolhida e apoio na Disciplina de Ginecologia Endócrina e Transição Menopausal.

Ao **Prof. Dr Afonso Nazário**, pela sua dedicação ao ensino e pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão**, pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro** pela atenção e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Rodrigues de Lima**, pelo exemplo de profissional.

Ao **Prof. Dr. Abês Mahmed Amed**, pelo constante incentivo, carinho e exemplo para minha formação profissional e acadêmica.

Aos demais, **Docentes da Disciplina de Ginecologia Endócrina e Transição Menopausal, Dr^a Rita Dardes, Dr. Cláudio Bonduki, Dr^a Márcia Gaspar Nunes, Dr. Ivaldo Silva** pelas orientações, ensinamentos e convívio na vida universitária.

Aos amigos e Pós-graduandos da Disciplina de Ginecologia Endócrina e Transição Menopausal, com os quais compartilhei o aprendizado, as

responsabilidades e o entusiasmo da Pós-Graduação.

Aos demais funcionários da Disciplina de Ginecologia Endócrina e Transição Menopausal: **Valéria dos Santos Medina, Karin Martins dos Santos, Zélia Maria Gomes Macedo, Maria Cecília dos Santos** pelo apoio e incentivo.

À **Dra. Carla Maganhin**, pelo importante apoio e amizade neste trabalho com dedicação e paciência em ajudar e ensinar.

Ao **Luiz Fernando Portugal Fuchs**, pelo carinho, apoio e ajuda na parte experimental.

À **Lílian Macedo**, pelo companherismo, carinho e amizade que cresceram durante a evolução do projeto.

Ao Biólogo **Paulo Celso Franco** do Laboratório de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Histologia da UNIFESP-EPM, pela ajuda no preparo do material e confecção das lâminas histológicas.

Aos Funcionários da Disciplina de Histologia que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais, sem os quais este trabalho não seria possível.

À **Capes e a UNIFESP** agradeço a concessão da Bolsa de Estudo.

Objetivo: Analisar os efeitos da metformina no sistema reprodutor de ratas androgenizadas no período neonatal e que desenvolveram estro-permanente. Material e Métodos: Foram utilizados 75 ratas albinas da linhagem EPM-1 Wistar, recém-natas, que foram divididas aleatoriamente, no terceiro dia de vida, em três grupos de vinte e cinco animais: Controle (GC), Androgenizado (GA) e Androgenizado + Metformina (GAmet). Os animais do GA e GAmet receberam 0,1 mL de propionato de testosterona (1,25 mg/animal), diluído em óleo de mamona (veículo) em dose única e ao Grupo Controle, apenas o veículo. O local da injeção foi a região subcutânea do dorso. Nove animais morreram durante a ministração do fármaco, ficando o total reduzido a 66. Após 90 dias, iniciou-se o tratamento por gavagem, as ratas dos grupos GC e GA receberam água destilada, enquanto as do GAmet foram tratadas com metformina (dose de 50 mg/kg). O tratamento foi diário durante seis semanas. Após este período, 12 animais do GC, 10 do GA e 14 do GAmet foram anestesiados e coletados sangue para dosagem de glicose, insulina de jejum e retirado o útero e ovários para análise histológica (experimento I). Os 30 animais restantes foram acasalados para avaliação da capacidade reprodutiva (experimento II). Os dados foram analisados pelo testes de ANOVA e de Tukey. Resultados: Os valores da glicose e HOMA-IR foram superiores no GA do que nos outros grupos ($p < 0,01$). Na análise histomorfométrica dos ovários, o GAmet apresentou o aparecimento de corpos lúteos, redução da área ocupada pelos folículos em degeneração, e das células intersticiais, e no útero redução da espessura do endométrio, diminuição do colágeno e número de eosinófilos, quando comparados ao GA ($p < 0,01$). No experimento II, foram identificados espermatozóides na luz vaginal em todos os

animais do GC (n=10) e em quatro animais do GAmet e nenhum do GA. Contudo, apenas um animal do GAmet conseguiu progredir com a gestação. Todos os animais do GC tiveram gestação a termo. Conclusão: A metformina determinou melhora da glicemia, índice de HOMA-IR e reversão parcial da função reprodutiva e das características histomorfométricas do ovário e do útero em ratas androgenizadas.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effects of metformin on the reproductive system of neonatally androgenized female rats that developed permanent estrus.

Materials and methods: A total of 75 three-day-old female albino wistar EPM-1 rats were randomized to three 25-animal groups: control (CG), androgenized (AG), and androgenized + metformin (AGmet). The animals in AG and AGmet were administered 0.1 mL of testosterone propionate (1.25 mg/animal) diluted in castor oil (vehicle), and controls were given vehicle only. The injection site was in the dorsal subcutaneous region. Nine animals died during drug administration. After 90 days a daily six-week gavage treatment was initiated with the rats in CG and AG receiving vehicle (distilled water) and those in AGmet getting metformin (50mg/kg). Afterwards, 12 animals from CG, 10 from AG, and 14 from AGmet were sacrificed. Blood was collected for biochemical measurements and the uteri and ovaries were extracted for histological analyses (experiment 1). The remaining 30 animals were mated (experiment II). Data analyses were carried out with Tukey's test and ANOVA. Results: In terms of fasting glucose and HOMA-IR, indices were highest in AG ($p < 0.01$) and there was no significant difference between AGmet and CG. Histomorphometric analyses of the ovaries and uteri revealed, in AGmet, reduction in the area covered by degenerating follicles, reduction in the number of interstitial cells and identified corpora lutea, diminution of endometrial thickness, and a decrease in the amount of collagen and the number of eosinophiles, typical in comparison with AG ($p < 0.01$). After mating, spermatozooids were identified in the vaginal ring, in all of the animals in CG ($n=10$), four in AGmet, and none in AG. All of the animals in CG had full-term deliveries, but only one in AGmet. Conclusion: Metformin led to improvement of

the fasting glucose and HOMA-IR index and to partial reversion of the histomorphometric characteristics of the ovaries and the uterus in neonatally androgenized female rats.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| Dedicatória | v |
| Agradecimentos especiais | vii |
| Agradecimentos | ix |
| Resumo | xii |
| Abstract | xv |
| Sumário | xviii |
| Lista de Figuras | xx |
| Lista de Tabelas | xxiii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | xxv |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Objetivos | 12 |
| 3. Material e Métodos | 14 |
| 4. Resultados | 26 |
| 5. Discussão | 48 |
| 6. Conclusões | 57 |
| 7. Referências Bibliográficas | 59 |
| 8. Anexos | 68 |
| Anexo I Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo | 69 |
| Anexo II Dados obtidos na determinação da glicose pertencentes aos grupos estudados | 71 |
| Anexo III Dados obtidos na determinação da insulina pertencentes aos grupos estudados. | 72 |
| Anexo IV Dados obtidos no peso dos animais pertencentes aos grupos estudados | 73 |

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Representação dos resultados da glicemia de ratas nos grupos 29 estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 2 Representação dos resultados da insulina de ratas nos grupos 29 estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 3 Representação dos resultados de HOMA IR de ratas nos grupos 30 estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 4 Representação dos resultados do peso dos animais de ratas nos 30 grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GA e GAmet.
- Fig. 5 Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de ratas adultas: 33
Notar a presença de corpos lúteos (CA) nos Grupos Controle (GC) e Androgenizado associado com Metformina (GAmet). Observar cistos ovarianos (*) no Grupo Androgenizado (GA). H.E.
- Fig. 6 Representação dos folículos em degeneração de ovários de ratas 36 nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 7 Representação de corpos lúteos nos ovários de ratas nos grupos 36 estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GA e GAmet.
- Fig. 8 Representação dos folículos não-antrais nos ovários de ratas nos 37 grupos estudados.
- Fig. 9 Representação dos folículos antrais nos ovários de ratas nos grupos 37 estudados.

- Fig. 10 Representação das células intersticiais nos ovários de ratas nos 38 grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 11 Representação da espessura do epitélio de revestimento nos ovários 38 de ratas nos grupos estudados.
- Fig. 12 Fotomicrografia de cortes histológicos de úteros de ratas adultas: 41
Notar a presença de queratina (seta) no epitélio endometrial no Grupo Androgenizado (GA), em relação aos Grupos Controle (GC) e Androgenizado associado com Metformina (GAmet). H.E.
- Fig. 13 Representação da espessura do epitélio do endométrio nos úteros 44 de ratas nos grupos estudados.
- Fig. 14 Representação da espessura do epitélio do endométrio nos úteros 44 de ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 15 Representação do número de glândulas endometriais nos úteros de 45 ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 16 Representação da espessura do epitélio do miométrio nos úteros de 45 ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 17 Representação do número de eosinófilos nos úteros de ratas nos 46 grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.
- Fig. 18 Representação da quantidade de colágeno nos úteros de ratas nos 46 grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Resultados da glicemia de jejum, insulina, HOMA IR e peso dos animais pertencentes aos grupos: GC, GA e GAmet. | 28 |
| Tabela 2 | Média e desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos dos ovários avaliados nos grupos estudados. | 35 |
| Tabela 3 | Média e desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos do útero avaliado nos grupos estudados. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| Abreviaturas | Descrição |
|---------------------|--|
| LH | Hormônio luteinizante |
| FSH | Hormônio folículo-estimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofina |
| IGF-I | Fator de crescimento insulinóide tipo I |
| SOP | Síndrome dos ovários policísticos |
| IR | Resistência à insulina |
| SHBG | Globulina ligadora de hormônios sexuais |
| GLUT4 | Proteína transportadora de glicose tipo quatro |
| DHEA | Deidroepiandrosterona |
| DM | “Diabetes mellitus” |
| IRS-1 | Substrato-1 do receptor da insulina |
| PI3K | Phosphoinositide-3-quinase |
| HOMA-IR | “Homeostatic model assessment” |
| GC | Grupo controle |
| GA | Grupo androgenizado |
| GAmet | Grupo androgenizado associado a metformina |

1. INTRODUÇÃO

A SOP é a endocrinopatia mais comum na fase reprodutiva da mulher, com prevalência entre 4% a 12%. A ocorrência familiar é freqüente principalmente quando há parentesco de primeiro grau, entre 20-60% (BARACAT e SOARES JR, 2007). Estima-se que, no mundo todo, 105 milhões de mulheres entre 15 e 45 anos de idade (sendo quatro milhões americanas) apresentem a SOP, a qual é responsável por 72 a 82% das causas de hiperandrogenismo (SILVA et al., 2008).

A Síndrome dos ovários policísticos (SOP) é conhecida há muito tempo. Os primeiros relatos de irregularidade menstrual associada com alterações ovarianas são conhecidos desde o início do século XX (TEIXEIRA et al., 2004).

Em 1935, STEIN e LEVENTHAL avaliaram os ovários de mulheres obesas com anovulação crônica. Estes autores reportaram haver relação das características destas pacientes com alterações morfológicas ovarianas e, descreveram a síndrome composta por ovários aumentados com múltiplos cistos bilaterais, amenorréia, hirsutismo e obesidade. Por esta razão, a Síndrome dos ovários policísticos é também conhecida como a Síndrome de STEIN e LEVENTHAL (1935). Contudo em 1921, ACHARD e THIERS descreveram associação entre desordem do metabolismo dos carboidratos e hiperandrogenismo. Estes autores denominaram de “Diabetes da mulher barbada”, sugerindo que o distúrbio do metabolismo da glicose estaria relacionado com aumento dos androgênios.

Em geral, a SOP tem início nos primeiros anos após a menarca e, é caracterizada por incapacidade de estabelecer um padrão menstrual regular,

podendo variar de ciclos espaniomenorréicos (fluxos menstruais com intervalo de 45 a 90 dias) até a amenorréia. Este padrão menstrual pode resultar em sangramento disfuncional do endométrio por deficiência da produção de progesterona (HAIDAR et al., 2004). Além disso, o hiperandrogenismo cutâneo pode também estar presente, acometendo de 70 a 85% das mulheres com esta síndrome. A primeira manifestação pode ocorrer na infância com a pubarca precoce (LEGRO et al, 2004). Aproximadamente 50% das mulheres com esta síndrome são obesas, sendo sua incidência superior a população geral em 30% (PASQUALI et al., 2000). Outro fator importante que deve ser citado é a hiperinsulinemia na maioria dos casos de SOP. Em revisão da literatura, LEGRO et al. (2007) relataram que aproximadamente 70% das mulheres com SOP tinham resistência periférica à insulina, que agravaria o quadro de hiperandrogenismo. Salienta-se ainda que clinicamente, a hiperinsulinemia pode ser avaliada pela presença de “acanthosis nigricans” (ROSENFELD, 2001).

A SOP engloba um amplo espectro de sinais e sintomas de disfunção ovariana. Em 1990, em reunião de consenso promovido pelo “National Institute of Health” (NIH) definiu-se como critério para caracterizar a síndrome a presença de hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e de ciclos espaniomenorréicos ou amenorréia (menos que seis ciclos por ano), desde que afastadas outras alterações como hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita - forma não clássica, síndrome de “Cushing”, distúrbios da tireóide e neoplasias secretoras de androgênios (DUNAIF, 1995). Em 2003, o consenso de ROTTERDAM propôs que a SOP pode ser diagnosticada após a exclusão de outras causas

de irregularidade menstrual e hiperandrogenismo e a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: espaniomenorréia ou amenorréia, níveis elevados de androgênios no sangue (hiperandrogenemia) e ou manifestações clínicas de excesso de androgênios, bem como cistos de ovários definidos pela ultrassonografia (10 ou mais cistos entre 2 e 8 mm) (ROTTERDAM CONSENSUS, 2003). Mais recentemente, em 2006 a Sociedade para o Estudo de Excesso de Androgênios (AEPS) estabeleceu os seguintes critérios: hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou hiperandrogenismo); disfunção ovariana (anovulação e/ou ovários policísticos); exclusão de outras endocrinopatias (BARACAT e SOARES JR, 2007).

Devemos reforçar que a clínica nesta síndrome é essencial. O diagnóstico não deve ser firmado apenas nos resultados de imagem, visto que dependendo da fase do ciclo, poderíamos ter presença de pequenas imagens císticas que representam folículos em crescimento, dando falsa impressão sobre policistose ovariana (FERREIRA et al., 2008).

Outro aspecto é a redução da fertilidade em mulheres com SOP que pode estar associada com a anovulação crônica, bem como a hiperinsulinemia. Além disso, podemos citar que a qualidade do oócito e do embrião, os defeitos no desenvolvimento do endométrio e as anormalidades de implantação são outros fatores que contribuem para infertilidade nestas mulheres (PALOMBA et al., 2008; HULL, 1987). As gestantes com SOP teriam risco elevado para abortamento, diabete gestacional, doença hipertensiva da gestação e pré-eclâmpsia (PALOMBA et al., 2008). A hiperinsulinemia está associada a

elevado risco de desenvolver “diabetes mellitus” (DM) do tipo 2, Síndrome metabólica e doença cardiovascular. A prevalência de DM tipo 2 em pacientes com SOP é 5 a 10 vezes mais elevada em comparação a mulheres sem a afecção (MATHUR et al., 2008).

A etiologia da SOP permanece desconhecida. A patogenia parece ser multifatorial, incluindo fatores ambientais que modulam a expressão para a predisposição genética como obesidade, dieta, excesso de androgênios no início da gestação, peso ao nascimento, puberdade precoce, stress psicológico e, mais recente, hiperinsulinemia com resistência a insulina (RI) (DUNAIF, 1997; PALOMBA et al., 2008). O reconhecimento desta associação é provavelmente a base da fisiopatologia da SOP, com melhor compreensão da síndrome e complicações a curto e longo prazo (ROSENFELD, 2001).

Sabe-se que a concentração excessiva de androgênios inibe a emergência de um folículo dominante e conduz a atresia folicular, inibindo o ciclo normal e levando ao micro ambiente ovariano hiperandrogênico. Este desarranjo funcional produzido pelo acúmulo de androgênios resulta em anovulação crônica. O ovário policístico é consequência de “ciclo vicioso” que pode ser iniciado em vários pontos e emerge quando um estado de anovulação persiste por qualquer duração de tempo (YEN et al., 1999).

A descoberta de uma forma específica de resistência periférica à insulina e a consequente hiperinsulinemia fez conexão entre anormalidades do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (DUNAIF et al., 1989). Em altas concentrações não fisiológicas, a insulina liga-se a receptores IGF-1 (fator de crescimento

insulinóide-1) que estão amplamente distribuídos pelo ovário. Então, quando os receptores de insulina estão bloqueados ou deficientes em número, ela se liga aos receptores de IGF-1 nas células da teca, levando a ativação deste receptor com aumento na produção de androgênios (SPEROFF et al., 1999). Parece haver uma predisposição genética hereditária nos mecanismos pós-receptores à ação da insulina, pois há muitas mulheres obesas e com resistência à insulina que não desenvolvem a SOP.

O defeito pós-receptor pode estar relacionado com a fosforilação da serina no receptor da insulina, que é geneticamente determinado. Este pertence à família de receptores tirosina-quinase, que inclui IGF-1. O Substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1) é uma proteína sinalizadora que acopla uma proteína-quinase (Phosphoinositide-3-quinase – PI3K) ao receptor de insulina levando a cascata de sinalização intracelular. A fosforilação da serina do IRS-1 impede esta conexão da PI3K, impedindo o sinal celular pelo receptor de insulina (ALLEMAND et al., 2009). Sem este sinal celular, não há recrutamento de proteínas GLUT-4 para a superfície celular e transporte de glicose para dentro da célula. Assim, haverá mais glicose circulante, resultando em aumento compensatório da insulina pelo pâncreas. Este seria o mecanismo teórico da resistência à insulina (LEGRO et al., 1999).

A insulina também pode inibir a produção hepática da globulina carreadora dos hormônios sexuais (SHBG) e da proteína carreadora de IGF-1, que modulam a biodisponibilidade da forma livre dos esteróides sexuais (testosterona) e dos fatores de crescimento, respectivamente, nas células alvo.

Em concentrações elevadas de androgênios a produção de SHBG no fígado também é diminuída (DUNAIF et al., 1997). Os receptores de IGF-1 estão diminuídos nas células da granulosa e aumentados nas células da teca interna em mulheres com SOP, contribuindo assim para o aumento do hiperandrogenismo (SMANIOTTO, 1996).

A descoberta do papel da insulina e dos fatores insulinóides de crescimento na esteroidogênese ovariana e na fisiopatologia da Síndrome dos ovários policísticos deu impulso às pesquisas e gerou novos conhecimentos e possibilidades no tratamento e condução clínica desta afecção (EHRMANN, 1998). Apesar de haver uma série de tratamentos para a SOP, nenhum deles parece intervir no mecanismo que está presente em boa parte dos casos, a resistência à insulina (MACIEL, 2000). O emprego de fármacos sensibilizadores do receptor de insulina (metformina e glitazonas) é promissor. Estas substâncias atuam em uma das etapas da fisiopatologia da hiperinsulinemia (DUNAIF, 1997).

A metformina (dimetilbiguanida) é um agente hipoglicemiante oral, derivado da guanidina, para controle de DM do tipo 2 (MATHUR et al., 2008). Este fármaco atua principalmente no aumento da sensibilidade periférica à insulina e da utilização celular da glicose. Atua também reduzindo a gliconeogênese hepática e no retardo da absorção intestinal da glicose (MACIEL, 2000; PASQUALI et al., 2000). Suprimindo-se a gliconeogênese, diminuem-se lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos. Na melhoria da sensibilidade tecidual à insulina a metformina aumenta a atividade tirosina

quinase nos receptores de insulina, facilitando o transporte de glicose. Foi demonstrado que a metformina não tem efeito direto na secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas. Em consequência verifica-se uma queda dos níveis de insulina (SILVA et al., 2008).

É incerto quais níveis de insulina de jejum ou em resposta a um teste de tolerância à glicose são correlacionados ao quadro clínico (YEN et al., 1999). Entretanto é muito importante que seja dosado os níveis de insulina e glicemia de jejum. Taxa de insulina em jejum acima de 15 mcU/mL ou relação glicose/insulina jejum menor que 4,5 é indicativo de resistência periférica à insulina (FRANKS, 2006). O índice de HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment*) também pode ser utilizado para determinar resistência à insulina. É um cálculo de execução simples, que se fundamenta nas dosagens da insulinemia e da glicemia, ambas de jejum, descrito em 1985 por DAVID MATTHEWS. Na literatura científica, percebe-se que falta um valor de corte estabelecido como referência para classificar os resultados dos pacientes, havendo variações de valores propostos por diferentes autores. Utiliza-se a fórmula: $\text{insulina de jejum } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicemia de jejum } (\text{mg/dl}) \times 0,0555 / 22,5$ (Para conversão da glicose de mg/dL para mmol/L, multiplica-se o valor em mg/dL por 0,0555). Em nosso meio, no estudo nomeado BRAMS (Brazilian Metabolic Syndrome study), encontramos o valor de corte para o diagnóstico da RI quando o HOMA-IR for maior que 2,7 (GELONEZE et al., 2006).

A SOP cursa frequentemente com infertilidade, que reflete uma alteração na foliculogênese. Não há números exatos que identifiquem a fertilidade natural

dessas mulheres, mas é provavelmente baixa. O diagnóstico da SOP, o mais cedo possível, tem conseqüências importantes para o futuro reprodutivo e pode diminuir os riscos de doença metabólica e cardiovascular. Como as mulheres com SOP têm um risco elevado para carcinoma de endométrio devido ao estímulo estrogênico de longa duração sem oposição, a função menstrual deve ser continuamente monitorada (LOBO e CARMINA, 2000).

A redução da resistência a insulina com agentes sensibilizadores da insulina deve ser uma estratégia em longo prazo, pois foi demonstrado seu efeito benéfico em melhorar os fatores de risco (LOBO e CARMINA, 2000). A diminuição da resistência periférica à insulina na SOP após o uso da metformina leva à diminuição da hiperinsulinemia e interrompe o mecanismo de desencadeamento e perpetuação do hiperandrogenismo nestas pacientes (SPEROFF et al., 1999). Esta biguanida vem se constituindo em opção terapêutica nas pacientes com SOP, uma vez que poderia reverter a resistência à insulina e assim evitar possíveis alterações metabólicas, tais como alteração do perfil lipídico, diabetes melitos e infertilidade (YEN et al., 1999).

Pesquisas com animais para o estudo da SOP permitiram avaliar diferentes aspectos da sua patogenia. A ministração de hormônios esteróides no início da vida de ratas leva a estado de anovulação crônica com ausência de corpo lúteo, cornificação do epitélio vaginal (aumento da produção de esteróides) e alterações nas células hipofisárias (WRENN et al., 1969). Em torno de 1961, BARRACLOUGH demonstrou em estudos com modelos animais

em ratas albinas, haver período de sensibilidade aos esteróides entre o nascimento e o décimo dia de vida, no qual uma única injeção de androgênio leva a infertilidade. A utilização de 1,25 mg de propionato de testosterona em veículo oleoso, aplicado via subcutâneo nos primeiros dias de vida, leva a perda da ciclicidade ou estro permanente no animal adulto, e vagina fechada (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961). A utilização de 250µg de benzoato de estradiol em ratas recém-natas via subcutâneo, também produz esterilidade, mas após um determinado período de tempo variável, pode retornar a ciclar novamente e apresentar abertura da vagina (WRENN et al., 1969). Outro modelo experimental utilizando injeção de deidroepiandrosterona (DHEA) na fase prepuberal (25 dias de vida) induziu anovulação em ratas, que induz a perda de ciclicidade (LEE et al., 1991). As alterações morfológicas nos ovários induzidos com propionato de testosterona e benzoato de estradiol levam a ausência de corpos lúteos, aumento de microcistos, diminuição dos folículos em desenvolvimento, aumento de atresia folicular e número de células intersticiais. Os ovários destes animais apresentam-se com tamanho menor em comparação a ratas normais, sendo mais evidente com o propionato de testosterona (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961; WRENN et al., 1969). Os ovários das ratas tratadas com DHEA apresentam também as características da SOP, com cistos foliculares grandes, com pouco desenvolvimento das células da granulosa e vários folículos atrésicos (MISUGI et al., 2006).

Atualmente novos estudos experimentais em ratas obesas conseguiram demonstrar que a exposição à testosterona aumenta a fosforilação da serina no

substrato-1 do receptor de insulina no músculo esquelético e tecido hepático, prejudicando a sinalização para a entrada da insulina e desencadeando a hiperinsulinemia (KHAMZINA et al., 2005). Outro estudo atual mostra a conexão entre um micro ambiente hiperinsulinêmico e hiperandrogênico e a elevação da fosforilação da serina no receptor de insulina, sendo associado com a resistência à insulina. Doses altas e baixas de testosterona determinam aumento na estimulação da fosforilação da serina no substrato-1 do receptor de insulina. Existem outros fatores que estão envolvidos neste processo incluindo o fator de necrose tumoral α , ácidos graxos livres, estresse celular, e insulina (ALLEMAND et al., 2009).

Contudo, faltam dados se a ministração de metformina poderia atenuar os efeitos androgênicos sobre o sistema reprodutor. Portanto, nosso estudo pretende avaliar este tratamento em ratas com estro-permanente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da metformina no sistema reprodutor de ratas em estro permanente.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os valores de insulina de jejum, glicose de jejum, HOMA-IR e peso dos animais após o tratamento com metformina;
- Análise histomorfométrica dos ovários e do útero após o tratamento com metformina;
- Avaliar a taxa de gestação dos animais após tratamento com metformina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram utilizadas ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), adultas, com idade variando entre 90 a 120 dias de idade, fêmeas virgens, 250grs, da linhagem EPM-1 Wistar, procedente do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), manipulados de acordo com os princípios éticos para experimentação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP-EPM (Projeto N°0302/07, Anexo I).

Os animais foram transportados e mantidos no biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia da UNIFESP – EPM, onde foram confinados em gaiolas plásticas com grade de metal e alimentadas com ração padrão (Labina-Purina) e água ad libitum em temperatura ambiente que variou de 21 a 25°C, com iluminação artificial obtida por lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia de 40 W), sendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas.

Após um período de, aproximadamente, quinze dias de adaptação os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para cada macho, em cada gaiola, e mantidos na gaiola no período das 19:00 às 7:00 horas, sem água e sem alimento. Na manhã seguinte realizou-se o teste de acasalamento pela técnica preconizada por HAMILTON e WOLFE (1938), que se baseia na

presença ou ausência de espermatozóides na vagina das ratas. O teste, quando positivo, foi considerado como sendo o início da prenhez (primeiro dia).

Após o parto os filhotes foram separados em machos e fêmeas, com base na distância do orifício anogenital (GRIFFITH e FARRIS, 1942). Foram selecionadas 75 fêmeas recém-natas e mantidas juntamente com suas mães, sendo que os machos foram descartados. No terceiro dia do nascimento foi ministrado propionato de testosterona, diluído em óleo de mamona (veículo), 0,1ml a 50 ratas recém-natas (1,25 mg/animal), por via dorsal subcutânea, inserindo-se a agulha desde a região lombar até a cervical (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961). As 25 ratas restantes formaram o grupo controle do estudo, sendo ministrado apenas o veículo. Durante o experimento alguns recém-natos (n=09) evoluíram para óbito após a ministração de propionato de testosterona e veículo, sendo n=3 do grupo controle, n=5 do grupo androgenizado e n=1 do grupo androgenizado + metformina.

Todas as ratas recém-natas foram mantidas nas condições ambientais descritas anteriormente, juntamente com suas mães, durante o aleitamento, por 90 dias. Após este período os animais foram avaliados por coleta de esfregaços vaginais por quatro dias. Os animais medicados com propionato de testosterona apresentaram vagina fechada e colpocitologia com estro permanente (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961; WRENN et al., 1969; SMANIOTTO, 1996).

Os animais foram empregados em dois experimentos. O primeiro para avaliar a histomorfometria ovariana e uterina e o segunda para avaliar a

fertilidade dos animais. Durante o experimento, os animais que tiveram abertura vaginal foram selecionados para o experimento II.

3.2 Método

3.2.1 Experimento I

3.2.1.1 Efeitos da metformina sobre ovários e útero de ratas androgenizadas.

Foram selecionados trinta e seis animais que foram divididos em três grupos:

- Grupo Controle (GC): Vinte e cinco ratas sem medicação. Receberam por via oral 0,5 ml de água destilada, por gavagem por seis semanas seguidas – n=12;
- Grupo Androgenizado (GA): Vinte e cinco ratas em estro-permanente tratadas com propionato de testosterona. Receberam por via oral 0,5 ml de água destilada, por gavagem por seis semanas seguidas – n=10;
- Grupo Androgenizado associado com Metformina (GAmet): Vinte e cinco ratas em estro-permanente tratadas com propionato de testosterona e após, com metformina por via oral, através de gavagem, durante seis semanas seguidas – n=14.

Todos os animais foram pesados antes do início do tratamento com metformina e após o término da medicação. No grupo GAmet a medicação foi introduzida por meio de sonda gástrica, no estômago de cada animal, na dose de 50 mg/kg de metformina (SANDER et al., 2006), preparada em água destilada. Foram colhidos do GAmet esfregaços vaginais (SHORR, 1941) diários durante seis semanas após o primeiro dia de uso da metformina para caracterizar o ciclo estral. Após este período os animais foram sacrificados na fase de proestro.

3.2.1.1.1 Eutanásia

Nos dois experimentos, após a eutanásia foi coletado sangue para dosagem de glicemia e insulina de jejum após jejum de 12h antes do procedimento e foram anestesiados com 15mg/kg de Xilazina (Rompun®) associado a 30mg/kg de Ketamina (Ketalar®), via intraperitoneal. Cada animal foi imobilizado em prancha de cortiça e após abertura da parede torácica e coleta de sangue intracardíaco para dosagem de glicemia e insulina. Realizado após incisão xifo-púbica da parede, com retirada de ambos os ovários e fragmento de útero (terço médio do corno uterino). O material foi mergulhado em formalina a 10% para fixação e em seguida processamento histológico segundo a metodologia preconizada por MICHALANY (1998).

3.2.1.1.2 Dosagem da glicemia e Insulina

A glicemia de jejum foi dosada por método enzimático-hexoquinase. Já a dosagem de insulina foi obtida pelo método Insulina Coat-A-Count (Diagnostic Products Corporation, LA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O exame é realizado por radioimunoensaio em fase sólida marcada com Iodo ¹²⁵I, designado para a mensuração quantitativa de insulina no soro.

3.2.1.1.3 Cálculo matemático da avaliação da resistência insulínica.

A resistência insulínica foi determinada pelo HOMA IR (*Homeostatic Model Assessment*) que é calculado pela fórmula:

$$\text{HOMA IR} = (\text{insulina de jejum [mU/mL]}) \times (\text{glicemia de jejum [mmol/L]} \div 22,5)$$

(GELONEZE, 2006).

Obs: Para conversão da glicose de mg/dl para mmol/L, multiplica-se o valor em mg/dl por 0,0555.

3.2.1.1.4 Análise morfológica.

No experimento I, os ovários e fragmento do terço médio do útero, de cada animal foram, convenientemente, fixados em formaldeído (tamponado

10%) por 24 horas e depois, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 60°C, segundo a metodologia preconizada por MICHALANY (1998). Em seqüência, os blocos foram cortados em micrótomo da marca Leica, ajustado para 4 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas. Após, as lâminas foram coradas pela hematoxilina e eosina (H.E) para análise histomorfométrica.

Outros cortes do útero foram submetidos à técnica de Picro-Sirius para avaliação das fibras colágenas. Para tanto, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool, e evidenciados pela hematoxilina por 6 minutos. Em seguida foram lavados em água corrente por 5 minutos, passados rapidamente em água destilada, e corados em solução de Sírius Red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado por 30 minutos (Picro-Sirius). Após, os cortes foram lavados em solução de HCl 0,01N por 2 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados e diafanizados pelo xilol. As lâminas foram montadas com *Entellan* para análise histomorfométrica.

3.2.1.1.5 Análise histomorfométrica

A histomorfometria foi processada em sistema de captura de imagens AxionVision (Carl Zeiss). Este sistema consiste em um microscópio de luz Axiolab Standart 20, acoplado a uma vídeo câmera de alta resolução (AxionCam Carl Zeiss, Jena, Alemanha), que transmite as imagens a um computador contendo programa de análise de imagens (Axion Vision 4.6 REL) (ROSSI et al., 2006). As medidas foram realizadas automaticamente através do programa Imagelab-Softium (São Paulo, Brasil).

Para cada animal, foram feitas 10 leituras por lâmina. Os ovários foram incluídos, sendo realizados cortes da região central para a periférica. As estruturas de interesse foram medidas em μm . Na secção histológica foi quantificada: 1 – espessura do epitélio de revestimento (μm); 2 – números de folículos antrais ($n^{\circ}/10$ campos); 3 – números de folículos não- antrais ($n^{\circ}/10$ campos); 4 - números de folículos degenerados ($n^{\circ}/10$ campos); 5 – números de corpo lúteo ($n^{\circ}/10$ campos); 6 – números de células intersticiais ($n^{\circ}/$ área de $780 \mu\text{m}^2$).

A contagem de folículos e classificação obedeceu a critérios da literatura estabelecidos por PEDERSEN e PETERS, 1968; ISRAELY et al., 2006 e MACIEL et al., 2004.

Os folículos ovarianos foram classificados em três categorias: folículos não-antrais, folículos antrais e em degeneração; e também foram contados os corpos lúteos.

Os folículos não-antrais foram definidos pela ausência da cavidade antral, caracterizado por folículos primordiais, primário e secundário (ACUNÃ et al., 2009). Os folículos primordiais apresentavam uma camada de células pavimentosas ao redor do oócito. O folículo primário apresentava o oócito circundado por uma camada de células cuboidais da granulosa. O folículo secundário apresentava de duas a oito camadas de células da granulosa, sem cavidade antral ao redor do oócito e terciários, com mais de 8 camadas de células da granulosa e sem cavidade antral (MACIEL et al., 2004).

Os folículos com cavidade antral, independente do seu tamanho, foram considerados folículos antrais. O folículo em degeneração apresentava núcleos picnóticos na camada da granulosa, de acordo com a classificação de PEDERSEN e PETERS, 1968. O corpo lúteo era o que apresentava células lúteas características, com núcleo volumoso e vasos na periferia (YOSHIDA et al., 2009).

O útero foi separado em quatro quadrantes para facilitar a orientação das medidas, sendo avaliados os seguintes parâmetros: 1 – espessura do epitélio endometrial (μm); 2 – espessura do endométrio (μm); 3 – números de glândulas endometriais ($\text{n}^\circ/\text{área de } 780 \mu\text{m}^2$); 4 – números de eosinófilos ($\text{n}^\circ/\text{área de } 780 \mu\text{m}^2$); 5 – espessura do miométrio (μm).

Dez medidas distintas das áreas de endométrio de cada animal foram

feitas por traçado em torno da imagem na tela do computador com um cursor. O perímetro externo do útero (P1) e a superfície interna da luz (P2) foram delimitados; a área delimitada por este último foi subtraída da área circundada, e o valor resultante foi tomada como a área total da secção transversal do corno uterino. Da mesma forma, a interface entre as camadas miometrial e endometrial também foram delimitadas, a superfície luminal interna foi subtraída, e o resultado foi considerado como a área de endométrio e mais utilizado para determinar a espessura do endométrio de ratos. O índice de espessura endometrial (IET) foi calculado pela fórmula: $ETI = 2AI (P1+P2)$ (ROSSI et al., 2002). Um método semelhante foi utilizado para calcular a área miometrial e a espessura miometrial (MTI). A média do número de glândulas endometriais, e de eosinófilos foram determinadas pela contagem total de cada seção transversal do corno uterino. Dois observadores, que não conheciam os grupos, realizaram as medidas da histomorfometria, separadamente.

Para a determinação do colágeno no útero foram utilizadas lâminas coradas pelo Picro-Sírius Red, em quatro campos (áreas). A porcentagem de colágeno presente no útero foi avaliada utilizando um software de processamento e análise de imagem- Imagelab® (Softium Informática Ltda, Brasil). A área de cada imagem foi medida automaticamente por diferencial colorimétrico. O analisador fornece ao sistema o padrão de cor a ser quantificado, e o sistema identifica a cor, preenche a área de interesse e processa a mensuração do colágeno.

3.2.2 Experimento II

3.2.2.1 Efeitos da metformina sobre a reprodução de ratas androgenizadas.

Trinta ratas foram separadas para este experimento, sendo divididas em:

- Grupo Controle (GC): Vinte e cinco ratas sem medicação. Receberam por via oral 0,5 ml de água destilada, por gavagem por seis semanas seguidas – n=10;
- Grupo Androgenizado (GA): Vinte e cinco ratas em estro-permanente tratadas com propionato de testosterona. Receberam por via oral 0,5 ml de água destilada, por gavagem por seis semanas seguidas – n=10;
- Grupo Androgenizado associado Metformina (GAmet): Vinte e cinco ratas em estro-permanente tratadas com propionato de testosterona e após com metformina por via oral, durante seis semanas seguidas por gavagem – n=10.

Os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para cada macho durante o período de 12 horas (19h às 7h). O teste para prenhez foi determinado por HAMILTON e WOLFE (1938), que identifica o espermatozóide na luz vaginal confirmado pela retirada de material para avaliação ao microscópio de luz. Ainda, durante a inspeção, a visualização de tampão vaginal é o outro sinal indicativo. Todas as ratas prenhas foram sacrificadas após o nascimento dos filhotes. Já os animais que não tiveram o espermatozóide positivo ou que após 22 dias após o encontro do espermatozóide, não tiveram os filhotes, também foram sacrificados (BARRETO et al., 2006).

3.3 Método estatístico.

Os resultados foram avaliados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) e, posteriormente, o teste de comparações múltiplas de Tukey para a análise das variáveis (NETTER et al., 1996), para identificação dos grupos que apresentarem diferenças significantes no experimento I. A comparação do número de ratas acasaladas e de gestações foi feita pela análise do teste do qui quadrado (X^2) no experimento II. Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Experimentos I

4.1.1. Efeitos da metformina sobre os ovários e útero de ratas.

4.1.1.1. Resultados da glicemia de jejum, insulina, HOMA IR e peso dos animais.

Os resultados da glicemia de jejum, insulina, HOMA IR e peso dos animais estão resumidos na Tabela 1 e Figuras 1, 2, 3 e 4. O GA apresentou maiores níveis de glicemia e HOMA IR em relação aos outros grupos: GC e GAmet ($P < 0,01$). Houve diferença significativa no nível de insulina, onde o GC apresentou menor valor comparados ao GA e GAmet ($P < 0,01$).

Os resultados obtidos dos pesos dos animais apresentaram no GC menor peso em relação aos outros grupos, GA e GAmet ($P < 0,01$).

Tabela 1 – Resultados da glicemia de jejum, insulina, HOMA IR e peso dos animais pertencentes aos grupos: GC, GA e GAmet.

| Variável | GC (n=12) | GA (n=10) | GAmet (n=14) |
|-------------------|--------------|--------------|-----------------|
| Glicemia (mmol/L) | 5,28±0,52 | 6,86±0,86* | 5,72±0,49 |
| Insulina (mU/mL) | 10,35±4,11* | 36,29±14,60 | 26,16±14,34 |
| HOMA IR | 2,43±0,24 | 11,06±1,39* | 6,66±0,57 |
| Peso(g) | 239,20±3,86* | 263,20±18,28 | 264,50±23,09 |

GC-Grupo Controle, GA- Grupo Androgenizado, GAmet – Grupo Androgenizado associado com Metformina. Os dados estão resumidos em média ± desvio padrão para ambos os grupos. O teste estatístico aplicado foi o teste de Análise de Variância (ANOVA) e, posteriormente, o teste de comparações múltiplas de Tukey. HOMA IR (Homeostatic Model Assessment) é uma fórmula matemática para avaliar resistência insulínica. * p<0.01 comparado com os animais dos outros grupos.

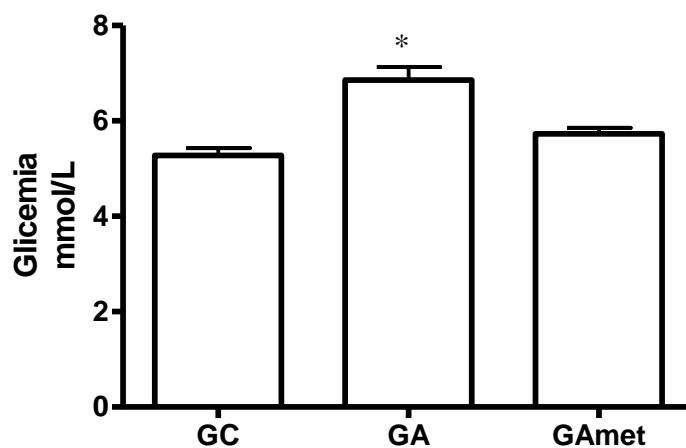


Fig.1 – Representação dos resultados da glicemia de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

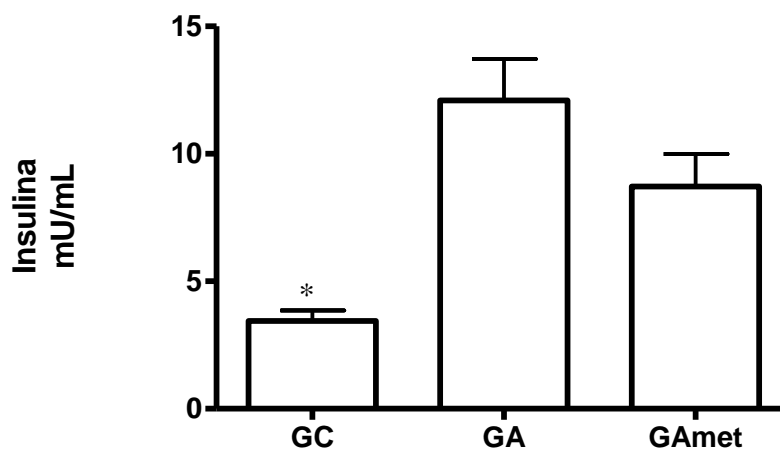


Fig.2 – Representação dos resultados da insulina de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

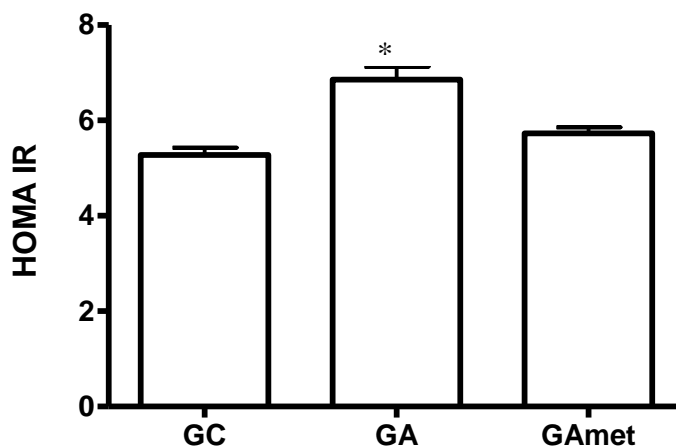


Fig.3 – Representação dos resultados de HOMA IR de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

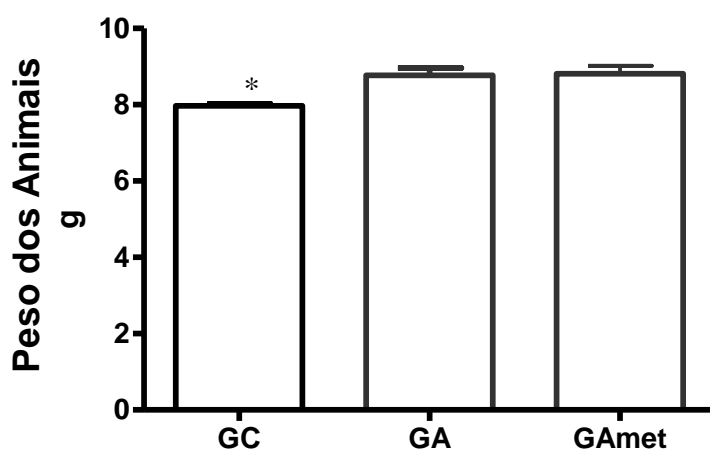


Fig. 4 – Representação dos resultados do peso dos animais de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GA e GAmet.

4.1.1.2. Ovário

4.1.1.2.1. Análise histológica

Os animais de cada grupo apresentaram as seguintes características:

Grupo Controle (GC) – Nota-se que o ovário apresenta-se revestido por epitélio tipo cúbico simples e está formado por duas regiões bem delimitadas: a cortical e a medular, seguindo o padrão de normalidade destes animais. Na região cortical, inúmeros folículos ovarianos em várias fases de desenvolvimento são detectados, desde primordiais até pré-ovulatórios. Evidenciam-se, ainda, vários corpos lúteos não degenerados e outros em estágio de involução, em quantidade superior aos animais do GA e GAmet. No estroma ovariano, notam-se várias células intersticiais com citoplasma claro e eosinofílico, contendo núcleos esféricos e centrais em menor concentração do que nos do GA e do GAmet. Estas células se localizam, principalmente, em torno dos vasos sanguíneos. A região medular mostra-se rica em vasos sanguíneos e tecido conjuntivo bem organizado (Figura 5).

Grupo Androgenizado (GA) – Observa-se que o epitélio de revestimento superficial do ovário mostrou-se do tipo cúbico simples e com algumas áreas de estratificação. Na região cortical, todos os ovários apresentam-se folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, com ausência de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos. Esta característica foi vista em todos os animais analisados deste grupo. Em alguns folículos de grande volume, nota-se a redução no número de camadas da granulosa e ausência de oócito, bem como, infiltração leucocitária ou desorganização das células na região em

contato com a teca interna, sugerindo a formação de cistos ovarianos nos cortes histológicos avaliados em todas as ratas deste grupo. No estroma ovariano, observou concentração bem maior de células intersticiais (estromais) do que nos GC e GAmet. Estas estruturas formam cordões, ou como estruturas maciças ou vesiculares de várias dimensões em todos os animais. Observou-se maior área estromal em relação à área cortical em todos os animais (Figura 5).

Grupo Androgenizado associado com Metformina (GAmet) – Nota-se que o epitélio de revestimento superficial do ovário é semelhante ao GA. Os ovários apresentaram grande concentração de folículos, em vários estágios de desenvolvimento, inclusive pré-ovulatórios em 36% (n=5) dos animais deste grupo. Este padrão parecia muito semelhante ao grupo controle. Em 21 % (n=3) das ratas deste grupo, não encontramos a presença de corpos lúteos e o aspecto do corte ovariano era muito semelhante ao GA. Além disso, observamos corpos lúteos em 43% (n=6) dos animais. Contudo, a quantidade era inferior ao do GC. No estroma ovariano, observa-se a presença de alguns cordões de células volumosas, com citoplasma claro e eosinofílico, núcleo esférico e central em 80%, mas a quantidade era inferior ao GA, mas maior do que GC. Estas células compõem às células intersticiais e se localizam próximas aos vasos sanguíneos. Salienta-se que em 20% (n=2) dos animais, as células estromais (intersticiais) tinham o mesmo padrão ao GC (Figura 5).

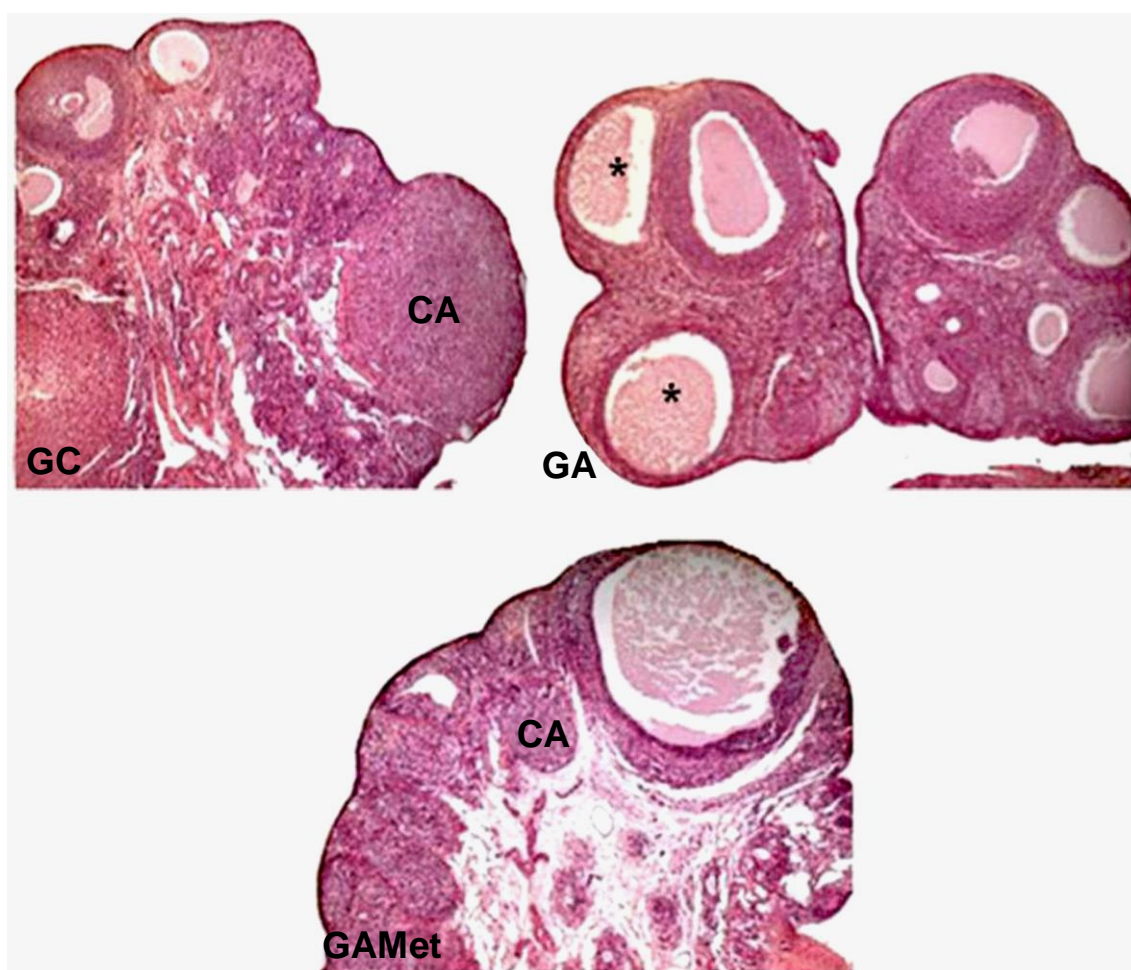


Fig. 5 - Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de ratas adultas: Notar a presença de corpos lúteos (CA) nos Grupos Controle (GC) e Androgenizado associado com Metformina (GAMet). Observar cistos ovarianos (*) no Grupo Androgenizado (GA). H.E.

4.1.1.2.2. Análise histomorfométrica

Os dados histomorfométricos dos ovários das ratas nos vários grupos estudados estão representados na Tabela 2 e Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

Nota-se grande quantidade de folículos em degeneração e células intersticiais no GA, sendo respectivamente, $p < 0,01$, comparados com os GC e GAmet. Não houve diferença estatística significativa no número de folículos não-antrais e antrais, bem com na espessura do epitélio de revestimento ovariano nos três grupos estudados. Observou-se, ainda, a ausência de corpos lúteos no GA, e em menor quantidade no GAmet comparado ao GC ($p < 0,01$).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos dos ovários avaliados nos grupos estudados.

| | GC (n= 12) | GA (n= 10) | GAmet (n= 14) |
|--|--------------|---------------|---------------|
| Folículo em degeneração (nº/ lâmina) | 3,10±1,15 | 4,72±1,90* | 2,06±1,28 |
| Corpo lúteo (nº/10 campos) | 7,16±2,71* | 0,0±0,0 | 2,06±1,52 |
| Folículo não-antral (nº/10 campos) | 3,33±1,61 | 4,60±4,78 | 3,57±3,80 |
| Folículo antral (nº/ campos) | 1,98±1,75 | 2,88±1,77 | 2,78±1,67 |
| Células intersticiais (nº/ área de 780 µm ²) | 165,30±25,20 | 310,10±27,30* | 178,40±47,80 |
| Espessura do epitélio (µm) | 8,37±0,08 | 8,49±0,18 | 8,45±0,04 |

Foram analisadas 10 lâminas por animal. GC-Grupo Controle, GA- Grupo Androgenizado, GAmet – Grupo Androgenizado associado com Metformina. Os dados estão resumidos em média ± desvio padrão para ambos os grupos. O teste estatístico aplicado foi o teste de Análise de Variância (ANOVA) e, posteriormente, o teste de comparações múltiplas de Tukey. * p<0.01 comparado com os animais dos outros grupos.

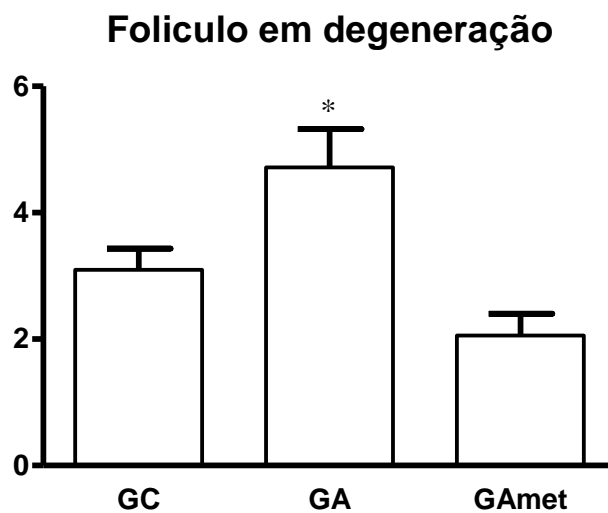


Fig. 6 – Representação dos folículos em degeneração de ovários de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

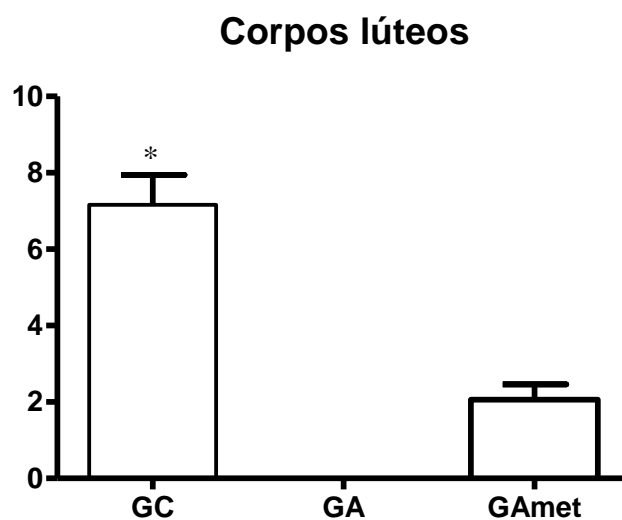


Fig. 7 – Representação de corpos lúteos nos ovários de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GA e GAmet.

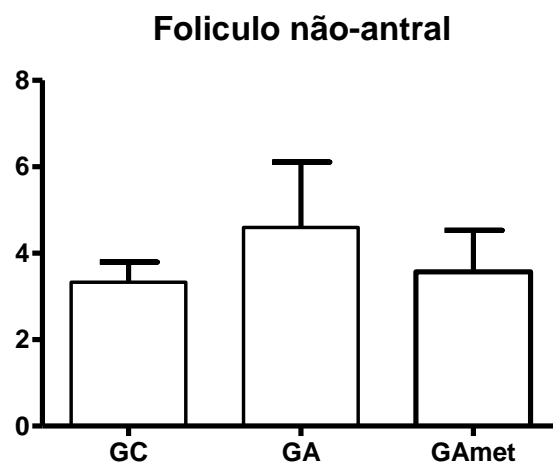


Fig. 8 – Representação dos folículos não-antrais nos ovários de ratas nos grupos estudados.

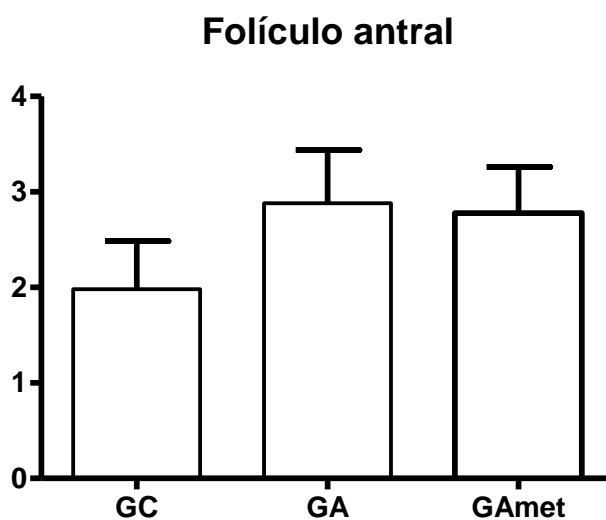


Fig. 9 – Representação dos folículos antrais nos ovários de ratas nos grupos estudados.

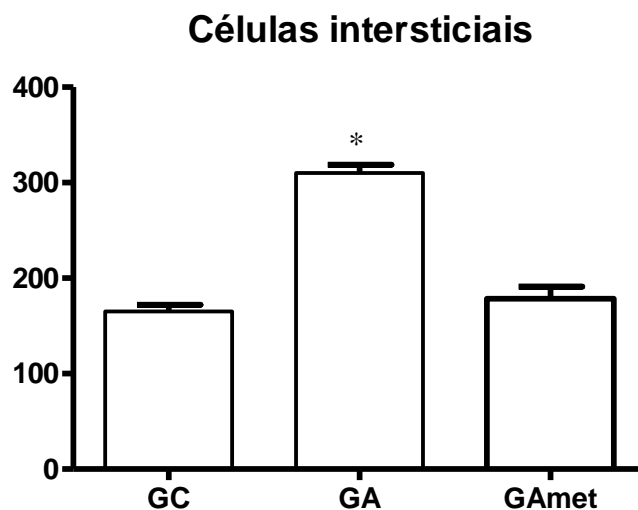


Fig. 10 – Representação das células intersticiais nos ovários de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAmet.

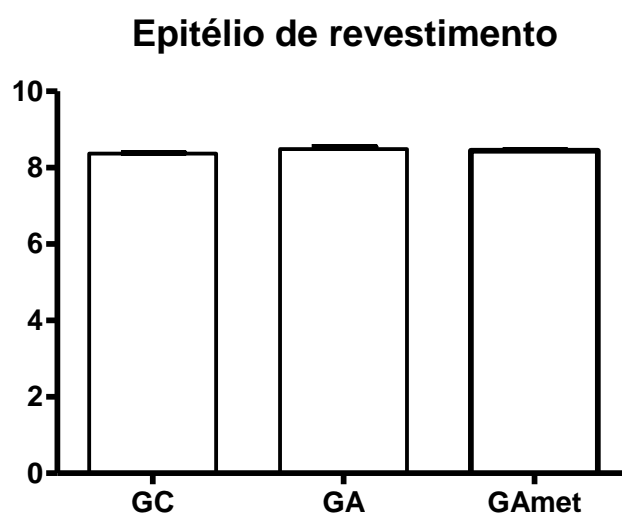


Fig. 11 – Representação da espessura do epitélio de revestimento nos ovários de ratas nos grupos estudados.

4.1.1.3. Corno uterino

4.1.1.3.1. Análise histológica

Grupo Controle (GC) – O endométrio mostrou-se bem desenvolvido, revestido internamente por epitélio cilíndrico simples, cujas células apresentavam núcleo elíptico, localizado no pólo basal, com um ou mais nucléolos bem evidentes. Observou-se ainda, em alguns pontos, infiltração leucocitária. O estroma endometrial, por sua vez, apresentou duas regiões bem distintas: uma rica em células, localizada logo abaixo do epitélio superficial, e outra, rica em fibras colágenas próxima ao miométrio. Verificou-se, também, grande quantidade de glândulas revestidas por epitélio cúbico simples. Identificaram-se, ainda, alguns leucócitos do tipo eosinófilo próximo ao miométrio (Figura 12).

Grupo Androgenizado (GA) – Neste grupo, o endométrio mostrou-se revestido por epitélio cilíndrico simples queratinizado, em alguns pontos, com células colunares altas, bem desenvolvido, apresentando intenso infiltrado leucocitário, comparado ao GC. O estroma, por sua vez, apresentava grande concentração de fibras colágenas, e, em alguns pontos, notava-se maior concentração de células estromais. As glândulas endometriais, em menor número, achavam-se revestidas por epitélio cúbico ou cilíndrico simples (Figura 12).

Grupo Androgenizado associado com Metformina (GAmet) – O endométrio apresentou-se bem desenvolvido em relação ao GC. Já no estroma endometrial observaram-se duas regiões bem distintas: uma rica em células, localizada logo abaixo do epitélio superficial, e outra, rica em fibras colágenas próxima ao miométrio quando comparado ao GC. Verificou-se, também, redução quantidade de glândulas endometriais revestidas por epitélio cúbico simples, em comparação ao GC. Identificaram-se, ainda, aumento de leucócitos do tipo eosinófilo próximo ao miométrio, em comparação ao GC (Figura 12).

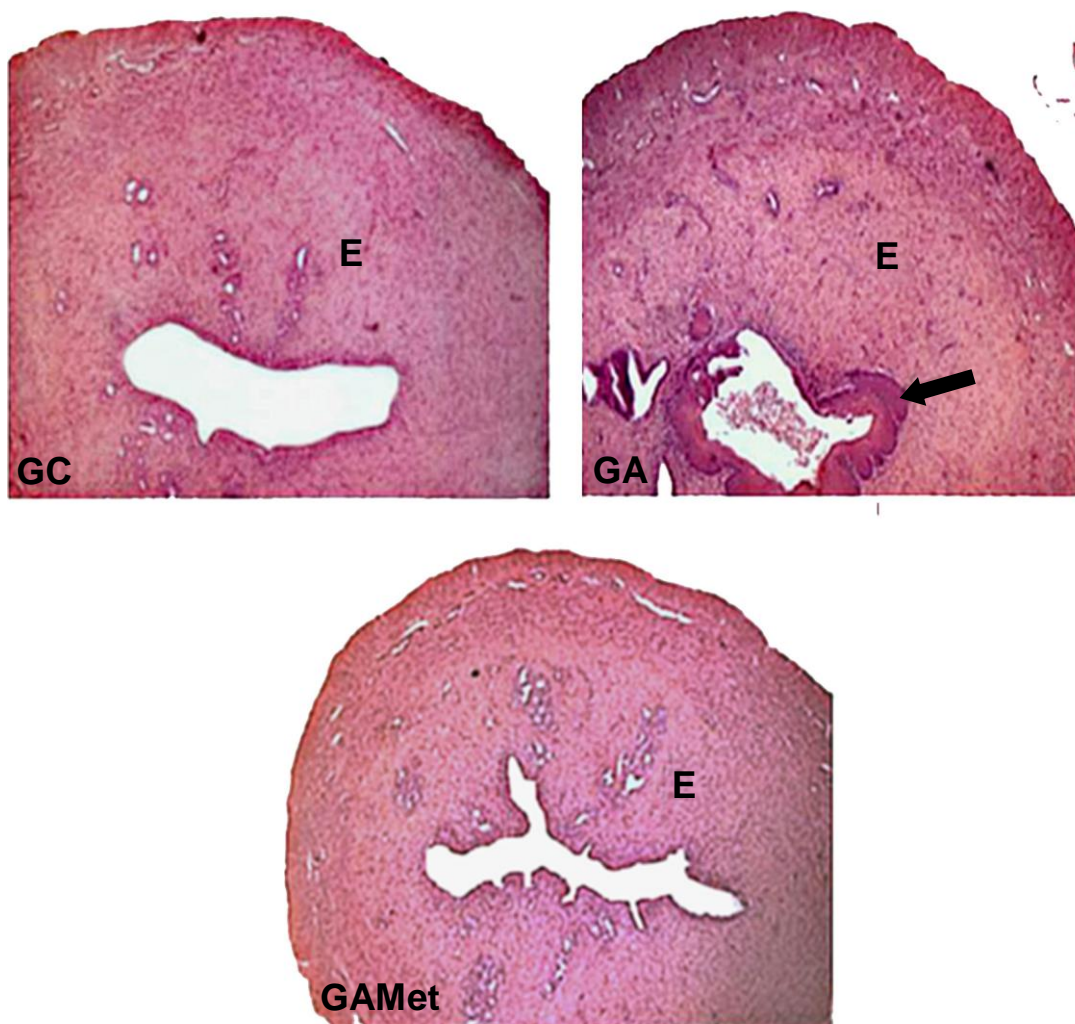


Fig. 12 - Fotomicrografia de cortes histológicos de úteros de ratas adultas: Notar a presença de queratina (seta) no epitélio endometrial no Grupo Androgenizado (GA), em relação aos Grupos Controle (GC) e Androgenizado associado com Metformina (GAMet). H.E.

4.1.1.3.2. Histomorfometria do útero

Os dados histomorfométricos do útero das ratas nos vários grupos estudados estão representados na Tabela 3 e Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18.

Não houve diferença estatística significativa na espessura do epitélio endometrial nos três grupos estudados. Os animais do GA tiveram aumento na espessura do endométrio e miométrio ($p < 0,01$), no número de eosinófilos e na quantidade de colágeno ($p < 0,01$) em comparação aos dos outros grupos (GC e GAMet). Observou-se, ainda, redução número de glândulas endometriais no GA, quando comparado ao GC ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos parâmetros histomorfométricos do útero avaliado nos grupos estudados.

| | GC (n=12) | GA (n=10) | GAmet (n=14) |
|--|--------------------|----------------------|--------------------|
| Espessura epitélio endometrial (μm) | 73,10 \pm 35,41 | 89,88 \pm 44,45 | 78,42 \pm 33,24 |
| Espessura do endométrio (μm) | 740,80 \pm 79,67 | 863,60 \pm 67,85** | 770,80 \pm 77,42 |
| Número de glândulas endometriais (nº/ área de 780 μm^2) | 7,5 \pm 2,07 | 5,51 \pm 1,61** | 6,01 \pm 1,51 |
| Espessura do miométrio (μm) | 423,40 \pm 62,97 | 510,10 \pm 83,87** | 484,80 \pm 97,50 |
| Número de eosinófilos (nº/ área de 780 μm^2) | 24,5 \pm 2,10 | 46,1 \pm 3,1* | 30,2 \pm 6,10 |
| Quantidade de colágeno | 83,5 \pm 1,07 | 95,45 \pm 1,46* | 87,57 \pm 1,81 |

Foram analisadas 10 lâminas por animal. GC-Grupo Controle, GA- Grupo Androgenizado, GAmet – Androgenizado associado com Metformina Os dados estão resumidos em média \pm desvio padrão para ambos os grupos. O teste estatístico aplicado foi o teste de Análise de Variância (ANOVA) e, posteriormente, o teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0.01$ comparado aos animais dos outros grupos. ** $p < 0.05$ comparado ao do GC.

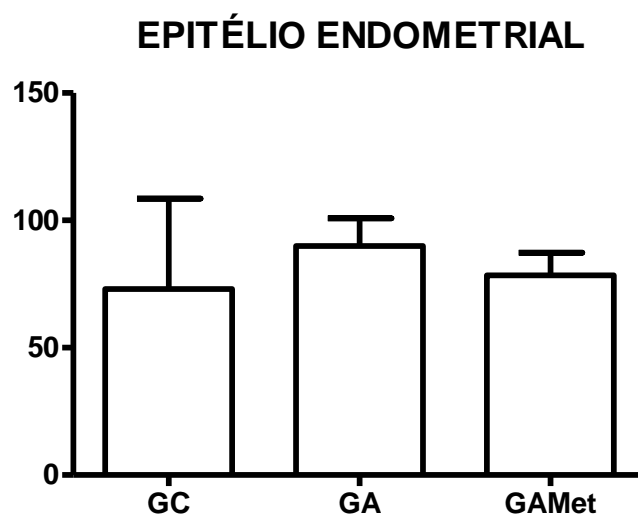


Fig. 13 – Representação da espessura do epitélio do endométrio nos úteros de ratas nos grupos estudados.

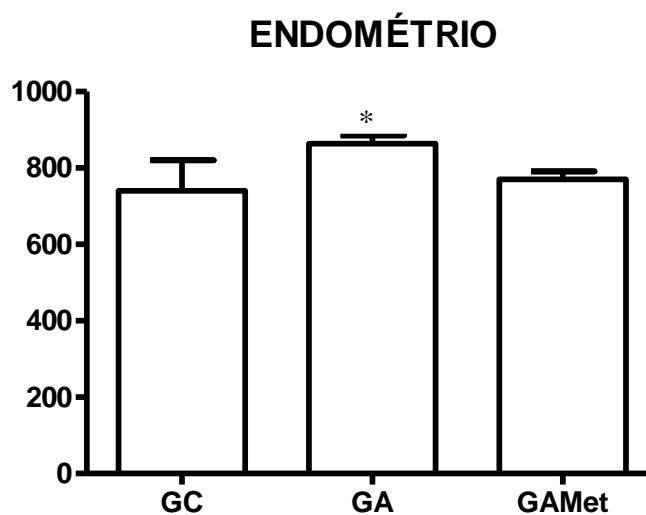


Fig. 14 – Representação da espessura do epitélio do endométrio nos úteros de ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAMet.

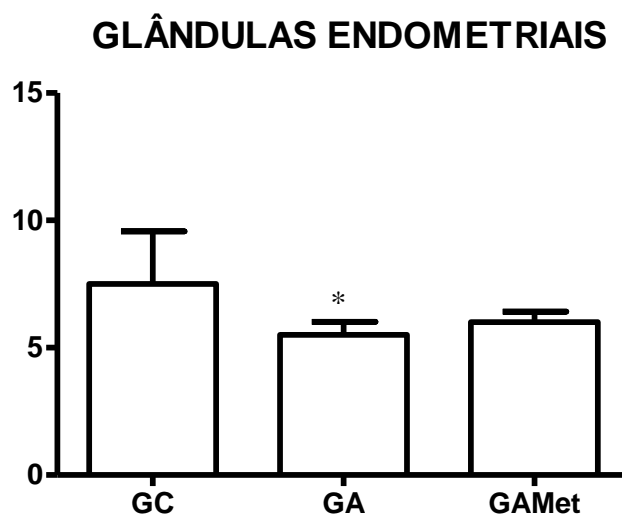


Fig. 15 – Representação do número de glândulas endometriais nos úteros de ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAMet.

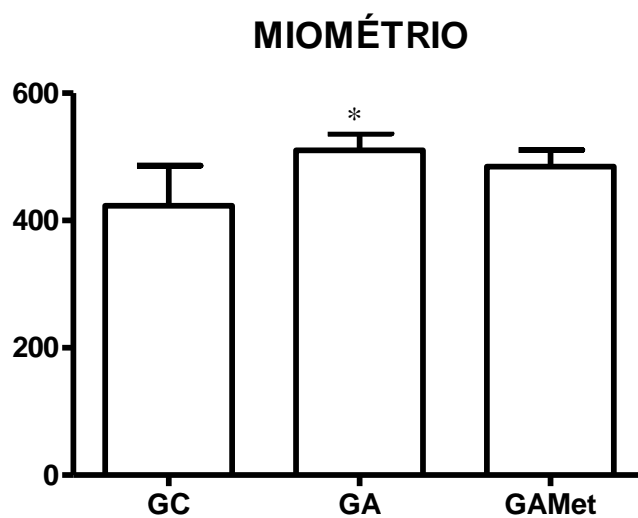


Fig. 16 – Representação da espessura do epitélio do miométrio nos úteros de ratas nos grupos estudados. ** $P < 0,05$ comparado aos grupos GC e GAMet.

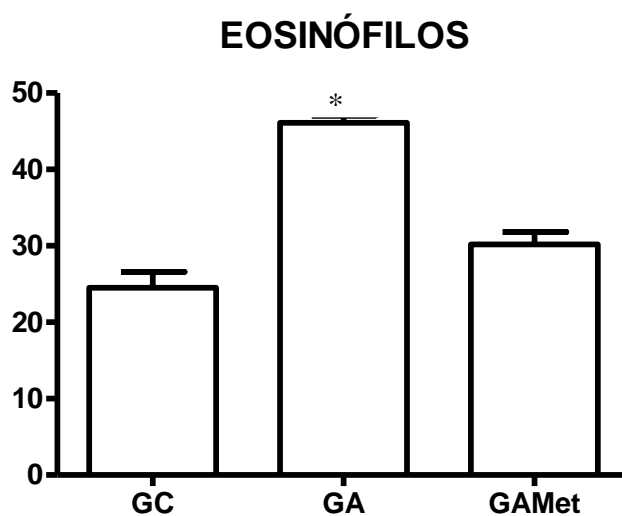


Fig. 17 – Representação do número de eosinófilos nos úteros de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAMet.

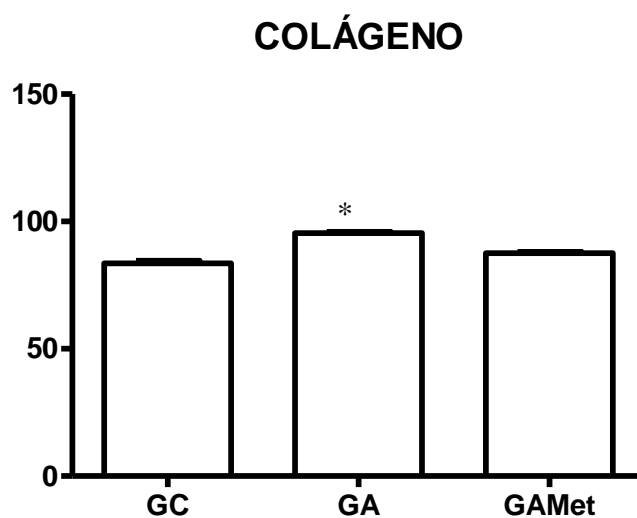


Fig. 18 – Representação da quantidade de colágeno nos úteros de ratas nos grupos estudados. * $P < 0,01$ comparado aos grupos GC e GAMet.

4.2 Experimento II

No Grupo Controle (GC), todas as ratas (n=10) avaliadas tinham espermatozóide presente na luz vaginal. Foram analisadas até o final da prenhez e parturição com 10 (11,14±1,04) filhotes para cada rata.

No Grupo Androgenizado (GA), não houve abertura do óstio vaginal não houve a cópula dos animais, ou seja, todos os óstios vaginais estavam fechados.

No Grupo Androgenizado associado com Metformina (GAmet) duas ratas apresentaram óstio vaginal fechado (não tiveram cópula) e oito com abertura vaginal, sendo identificado espermatozóide na luz vaginal em quatro animais. Somente uma rata apresentou gestação a termo com apenas um filhote. Os outros três animais, não foram identificados sinais de implantação ou reabsorção fetal após 20 dias do coito.

5. DISCUSSÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) ainda continua um enigma, apesar de todos os estudos na literatura. É considerada um distúrbio com vários aspectos, isto é, tem componente endócrino (função ovariana), bem como metabólico (carboidratos), em muitas mulheres com esta afecção (LEGRO et al., 2007). Estas alterações endócrino-metabólicas podem trazer conseqüências em longo prazo como aumento no risco de doença cardiovascular, incrementando o risco de morbidade e também, se não for adequadamente corrigida, pode levar ao maior risco de mortalidade (FERREIRA et al, 2008). Assim, a identificação precoce da resistência insulínica em mulheres jovens e o impacto sobre o sistema reprodutor é um ponto crucial nesta síndrome. Este pode ter conseqüência metabólica negativa às mulheres com SOP (LOBO e CARMINA, 2000). Contudo, o diagnóstico da resistência insulínica, bem como ação da hiperinsulinemia sobre a função ovariana são motivos de controvérsias e discussão, principalmente em mulheres não obesas, bem como sua interação com o estado de hiperandrogenismo (DOI, 2008). Assim, o incremento da compreensão entre a anovulação crônica e a resistência insulínica deve auxiliar na melhora da terapia nas mulheres com SOP. Portanto, alguns investigadores sugerem emprego de modelos experimentais para avaliação deste distúrbio endócrino-metabólico e testar alguns fármacos que poderão beneficiar as mulheres com SOP (LEE et al., 1991; MISUGI et al., 2006; ALLEMAND et al., 2009).

Em animais, há várias técnicas que podem determinar anovulação crônica como o uso de propionato de testosterona, de benzoato de estradiol e de

deidroepiandrosterona (DHEA). No nosso experimento, utilizamos a ministração subcutânea de propionato de testosterona, técnica desenvolvida por BARRACLOUGH E LEATHEM (1954) em camundongos e por BARRACLOUGH (1961) em ratas, e aprimorada em nosso meio pelo Prof. GERALDO RODRIGUES DE LIMA (1966).

Acredita-se que o estado de anovulação induzido pelo propionato de testosterona no estágio pré-puberal leva a alteração na função normal do hipotálamo com diminuição ou falta de liberação de GnRH e incapacidade da hipófise em regular a secreção de gonadotrofinas, principalmente de LH (LAMOND, 1969 e KATAYAMA et al., 1984). REZNIKOV et al. (1995) relataram que a administração de testosterona a ratas levaria a conversão desta em estradiol no hipotálamo, o que poderia bloquear o GnRH e conseqüentemente reduzir a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise no período ovulatório (proestro e estro). Este por sua vez é essencial à ovulação e à manutenção do corpo lúteo. Assim estas alterações levam ao estado de anovulação e também a modificações histomorfológicas no ovário e no endométrio no nosso estudo. Esta idéia foi reforçada pelos estudos de BARRACLOUGH E GORSKI (1961) que estimularam a área pré-óptica e região médio basal do hipotálamo (responsáveis pela liberação de GnRH) e conseguiram induzir a ovulação em ratas androgenizadas e em estro-permanente. Estes dados sugerem que o propionato de testosterona teria um efeito central na determinação de anovulação crônicas em animais.

Em nosso estudo o grupo androgenizado apresentou inúmeros folículos

degenerados e cistos ovarianos, bem como a ausência de corpo lúteo. Estes dados estão de acordo com os demais autores que descreveram sobre estas ratas androgenizadas (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961; GERENDAI et al., 2005; MANNI et al., 2005). Estes achados sugerem que estes animais teriam alteração na ovulação e até mesma, ausência da postura ovular. A consequência deste processo seria um desequilíbrio endócrino com aumento de androgênios nestes animais. Estas características junto com a não abertura vaginal podem indicar um estado de estro permanente (ou anovulação crônica) nestes animais.

Além da presença de cistos ovarianos volumosos, deve-se salientar a presença de grande concentração de células intersticiais nos animais androgenizados. Estas estruturas são especializadas na produção de androgênios e são oriundas de células que se desprenderam da proliferação intensa da teca interna ou de folículos atrésicos (IZQUIERDO et al., 2004). Deve-se mencionar que estas células podem perpetuar o estado hiperandrogênico. Este padrão de destruição é muito semelhante ao descrito por SOARES JR et al. (2003) que descreveu este aspecto em ratas com estro permanente após a pinealectomia (redução de melatonina). Estas células também aumentam o componente estromal ovariano. Além disso, outro estudo também observou características semelhantes após ministração de androgênios (BARRACLOUGH e GORSKI, 1961; GERENDAI et al, 2005).

A metformina é biguanida e constitui opção terapêutica para correção da resistência insulínica em mulheres com SOP, evitando possíveis complicações

metabólicas a curto e em longo prazo. A contribuição do nosso estudo foi mostrar que a metformina pode melhorar a hiperinsulinemia e reverter parcialmente os efeitos ovarianos e endometriais determinados pelo estado hiperandrogênico nas ratas em estado de estro-permanente induzido pela propionato de testosterona.

Os nossos dados mostraram que a metformina melhorou a postura ovular em alguns animais, evidenciado pela presença de corpos lúteos. Contudo, este número foi menor do que os animais normais durante a fase de proestro. Possivelmente, a dose ministrada e o tempo de emprego não foram suficientes para reverter este quadro em todos os animais androgenizados. Outra hipótese que a metformina não seria capaz de anular totalmente o processo de anovulação crônica determinado após o nascimento pela injeção de propionato de testosterona. Contudo, deve-se citar que a concentração empregada foi baseada nos estudos de SANDER et al. (2006) que usaram camundongas androgenizadas por deidroepiandrosterona.

Fisiologicamente, a redução do número de células intersticiais com o tratamento de metformina pode amenizar o microambiente hiperandrogênico ovariano, possibilitando o crescimento folicular, postura ovular e formação de corpo lúteo. Este fato pode ter ocorrido em nossos animais. Contudo, isto não foi evidenciado em outro modelo experimental com DHEA. Neste modelo, houve formação de cistos ovarianos gigantes com pouco número de células da granulosa e, também, inúmeros folículos atrésicos. Após tratamento com metformina, pioglitazona ou troglitazona ministrados na ração diária, os autores

observaram que não houve melhora na morfologia e descreveram piora da atresia folicular com a troglitazona (MISUGI et al., 2006). Deve-se ressaltar que estes autores não injetaram ou ministraram os fármacos por via oral pela gavagem. Assim, a quantidade destes pode ter sido desigual entre os grupos, o que dificulta a interpretação dos dados.

Na análise dos valores de insulina e glicemia dos grupos de ratas podemos observar que o tratamento com metformina melhorou o índice de HOMA-IR. Estes dados estão de acordo com o trabalho de SANDER et al, 2006. Possivelmente, a melhora da insulinemia leva a melhora do microambiente hiperandrogênico possibilitando que ocorra desbloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-gonâda, e possível ovulação. Alguns investigadores acreditam que o excesso de insulina atue nos receptores dos fatores insulinóides que agem sinergicamente com o LH, aumentando a produção de androgênios. Assim, a normalização da ação da insulina pode justificar, em parte, a redução da ação androgênica nos ovários, permitindo a postura ovular (ALLEMAND et al, 2009).

O maior peso registrado nos animais em estro-permanente em nosso estudo pode estar relacionado com ação androgênica no metabolismo do animal. Provavelmente, este efeito está relacionado à ação da testosterona sobre o tecido gorduroso, visto que este esteróide é um potente regulador da lipólise por interferência na tradução dos sinais induzidos pelas catecolaminas nas células adiposas, aumentando as reservas de gordura intracelular. Na SOP que é caracterizada por um estado de hiperandrogenismo, o efeito lipolítico das

catecolaminas encontra-se diminuído nos adipócitos subcutâneos devido ao baixo conteúdo de adrenoreceptores beta2, causando aumento no peso corporal (ARNER, 2005). Contudo, em camundongas (SANDER et al., 2006) esta ação da metformina não foi observada.

Outra área pouco explorada em ensaios clínicos é o efeito de agentes sensibilizadores da insulina no endométrio de mulheres com SOP. Salienta-se que estas mulheres têm maior incidência de abortamentos e risco aumentado para câncer de endométrio (MATHUR et al., 2008). A SOP por estímulo constante e prolongado do estrogênio com redução da oposição de seu efeito pela progesterona pode resultar em processo proliferativo, evoluindo para hiperplasia e até para adenocarcinoma do tipo I, em alguns casos (PALOMBA, 2008). Portanto, o entendimento do efeito potencial da metformina na proteção do endométrio em longo prazo, bem como na taxa de implantação é muito importante para prática clínica (LEGRO et al., 2007).

No que diz respeito à morfologia do endométrio de ratas em estro permanente, BARRACLOUGH (1961) descreve o estroma endometrial como sendo compacto e não edematoso, contendo poucas glândulas, enquanto o epitélio se mostra hipertrófico e constituído por células prismáticas altas. Estes dados sugerem uma mucosa mais compacta e que pode ser de difícil penetração pelo embrião, podendo explicar também a infertilidade nestes animais. Em nosso meio, PARDI et al. (1993), SMANIOTTO e SIMÕES (1996), estudando o endométrio de ratas em estro-permanente, induzido pelo propionato de testosterona, notaram que o estroma é rico em células colágenas

e diminuição da hidratação endometrial. Estes fatos podem dificultar muito a implantação endometrial. Em mulheres, LEGRO et al. (2007) avaliou o efeito da metformina e da rosiglitazona no endométrio de 16 mulheres com SOP com monoterapia ou associados. A análise da histologia endometrial foi feita pela biópsia do endométrio antes e após o tratamento. Observou-se que as alterações na histologia apresentaram tendência a normalização durante o curso do tratamento. Em revisão da literatura MATHUR et al. (2008) demonstrou que a metformina tem o potencial em reduzir o risco de proliferação endometrial e hiperplasia devido a melhora da função ovulatória e por redução dos efeitos da hiperinsulinemia no endométrio. Entretanto, observou que ainda faltam estudos definitivos para melhor avaliação do endométrio nestas mulheres. Estes autores acreditam que a melhora da ovulação com maior produção de progesterona teriam papel central na transformação endometrial e redução do risco de proliferação endometrial excessiva.

Em nosso estudo, identificamos o espermatozóide na luz vaginal em quatro animais, sugerindo o acasamento destas ratas, contudo o restante não foi constatado sinais de cruzamento. Além disso, apenas uma rata apresentou gestação a termo com apenas um filhote. Estes dados sugerem que não houve melhora substancial na capacidade reprodutiva destes animais apesar de ocorrer redução da hiperinsulinemia nestes animais e regressão parcial das alterações histológicas ovarianas e endometriais determinadas pela ministração de androgênios no período neonatal em ratas. Provavelmente,

futuros estudos com diferentes doses, bem como vários tempos de início e de duração de tratamento serão necessários para avaliar os efeitos da metformina sobre a reprodução dos animais em estro-permanente induzido pelo propionato de testosterona.

6.CONCLUSÕES

O presente estudo permite-nos concluir que o tratamento com metformina em ratas androgenizadas:

1. Reduziu os níveis de glicemia e melhorou o índice HOMA-IR, sem alteração significativa na taxa de insulina e do peso em relação aos animais androgenizados;
2. Determinou redução da área ocupada pelos folículos ovarianos em degeneração, redução das células intersticiais e presença de corpos lúteos, bem como redução da espessura do endométrio, aumento das glândulas endometriais, diminuição da quantidade de colágeno e do número de eosinófilos em relação as ratas androgenizadas;
3. Não houve melhora expressiva da fertilidade com este fármaco em ratas androgenizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARD C, THIERS J. Le virilisme pileux et son association à l'insuffisance glycolytique (diabète des femmes à barbe). Bull Acad. Natl. Med., 1921; 86:51-83.

ACUÑA E, FORNES R, FERNANDOIS D, GARRIDO MP, GREINER M, LARA HE, PAREDES AH. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. Reprod Biol Endocrinol., 2009; 7:64.

ALLEMAND MC, IRVING BA, ASMANN YW, KLAUS KA, TATPATI L, CODDINGTON CC, NAIR KS. Effect of testosterone on insulin stimulated IRS1 Ser phosphorylation in primary rat myotubes—a potential model for PCOS-related insulin resistance. PLoS One. 2009; 4(1): e4274.

ARNER P. Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. Biochimie. 2005; 87(1):39-43.

BARACAT EC, SOARES JR JM. Ovários policísticos, resistência insulínica e síndrome metabólica. RBGO., 2007; 29(3):117-9.

BARRACLOUGH CA, GORSKI RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. Endocrinol., 1961; 68:68-79.

BARRACLOUGH CA. Production of anovulatory sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinol., 1961; 68:62-7.

BARRACLOUGH CA, LEATHEM JH. Infertility induced in mice by a single injection of testosterone propionate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954; 85:673-4.

BARRETO RL, SOARES JM JR, SIMÕES RS, MACIEL GA, SIMÕES MJ, KULAY L JR. Effects of chronic stavudine exposure on liver, pancreas and

kidneys of pregnant rats and their fetuses: morphological and biochemical aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2006; 128(1-2):50-3.

DOI SA. Neuroendocrine dysfunction in PCOS: a critique of recent reviews. *Clin Med Res.*, 2008; 6(2):47-53.

DUNAIF A, SEGAL KR, UTTERWEIT W, OBRJANSKY A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989; 38:1165-74.

DUNAIF A. Hiperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of NIDDM. *Am J Med.*, 1995; 98:33-9.

DUNAIF A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.*, 1997; 18:774-800.

EHRMANN DA. Attenuation of Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome: what are the options? *J. Clin. Invest.*, 1998; 21:632-5.

FERREIRA JAS, FERNANDES CE, MELO NR, AZEVEDO LH, PEIXOTO S. Síndrome dos ovários policísticos: uma visão atual. *Femina.* 2008; 36(8):477-83.

FRANKS S. Diagnostic of polycystic ovary syndrome: in defense of the Rotterdam criteria. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2006; 91(8) 786-9.

GELONEZE B, REPETTO EM, GELONEZE SR, TAMBASCIA MA, ERMETICE MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract.*, 2006; 72:219-20.

GERENDAI I, WIESEL O, TOTH IE, BOLDOGKOI Z, HORNYAK A, HALASZ B. Occasional transsynaptic viral labeling in the central nervous system from the polycystic ovary induced by estradiol valerate. *Microsc Res Tech.*, 2005; 66:186-92.

GRIFFITH JR, FARRIS EJ. *The rat in laboratory investigation*. Philadelphia, Lippencott Company, 1942.

Haidar MA, Massad-Costa AM, Soares JR JM, Baracat EC. Síndrome de anovulação crônica: breve revisão. *Femina*. 2004; 32:579-83.

HAMILTON JB, WOLFE JM. The effect of male hormone substance upon birth and prenatal development in the rat. *Anat. Rec.*, 1938; 70:433-40.

HULL MGR. Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol.*, 1987 ;1 :235.

IZQUIERDO D, FOYOUZI, KWINTKIEWICZ J, DULEBA AJ. Mevastatin inhibits ovarian theca-interstitial cell proliferation and steroidogenesis. *Fertil Steril.*, 2004; 82:193-7.

ISRAELY T, NEVO N, HARMELIN A, NEEMAN M, TSAFRIRI A. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Human Reproduction*. 2006; 21(6):1368-79.

KATAYAMA S, BROWNSCHIEDLE CM, WOOTTEN V, LEE JB. Absent or delayed preovulatory luteinizing hormone surge in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984; 33:324-7.

KHAMZINA L, VCILLEUX A, BERGERON S, MARETTE A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of

obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 2005; 146:1473-81.

LAMOND DR. Alteration of ovarian function of immature mice treated with androgen after birth. *J Endocr.*, 1969; 43:319-20.

LEE MT, ANDERSON E, LEE GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anatomical Record*. 1991; 231:185-92.

LEGRO RS, KUNSELMAN AR, DODSON WC, DUNAIF A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1999; 84:165-9.

LEGRO RS, CASTRACANE VD, KAUFFMAN RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv*, 2004 ; 59 :141-54.

LEGRO RS, ZAINO RJ, DEMERS LM, KUNSELMAN AR, GNATUK CL, WILLIAMS NI, DODSON WC. The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2007; 196(4):402.e1-10; discussion 402.e10-1.

LIMA GR. Contribuição para o estudo da fisiopatologia de ratas em estro permanente – Sensibilidade uterina à ocitocina. São Paulo, 1996. Tese - Escola Paulista de Medicina.

LOBO RA, CARMINA E. The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 2000; 132:989-93.

MACIEL GA, SOARES JR JM, MOTTA ELA, BARACAT EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril.*, 2004; 81:355-60.

MACIEL GA. Tratamento da síndrome dos Ovários policísticos com metformina: Avaliação de resultados clínicos e laboratoriais. São Paulo, 2000 – Tese de Mestrado pela UNIFESP.

MANNI L, HOLMANG A, LUNDEBERG T, ALOE L, STENER-VICTORIN E. Ovarian expression of alpha-1 and beta-2 adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid- induced polycystic ovaries. *Auton. Neurosci.*, 2005; 118:79-87.

MATHUR R, ALEXANDER CJ, YANO J, TRIVAX B, AZZIZ R. Use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol Reviews.*, 2008; 596-609.

MATTHEWS D, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TRECHER DF, TURNER RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 1985; 28:412-9.

MICHALANY J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Editora Michalany, 3ª Ed., São Paulo, 1998.

MISUGI T, OZAKI K, BELTAGY KE, TOKUYAMA O, HONDA K, ISHIKO O. Insulin-Lowering agents inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA-Induced PCOS Rats. *Gynecol Obstet Invest.*, 2006; 61:208-15.

NETTER J, WASFERMAN W, KUTNER MH. Applied linear statistical models: regression, analyses of variance and experimental designs. 3^a ed. Homewood, Richard D Irving, 1996.

PALOMBA S, FALBO A, ZULLO F, ORIO JR F. Evidence-based and potential benefits of metformin in polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev.*, 2008; 30(1):1-50.

PARDI PC, SIMÕES MJ, BIVIGNAT O. Ultrastructural study of the remodeling of the endometrial stroma of persistent-estrous rats. *Rev Chil Cien Morfol.*, 1993; 3:2-4.

PASQUALI R, GAMBINERI A, BISCOTTI D, VICENNATI V, GAGLIARDI L, COLITTA D, FIORINI S, COGNIGNI GE, FILICORI M, MORSELLI-LABATE AM. Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, 2000; 85(8):2767-74.

PEDERSEN T, PETERS H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 1968; 17:555-7.

REZNIKOV OH, SINITSYN PV, TARASENKO LV, POLIAKOV LI. The neuroendocrine mechanisms of the development of the anovulatory hyperandrogenic syndrome in rats. *Fiziol. Zh.*, 1995; 41:33-7.

ROSENFELD RL. Polycystic ovary syndrome and insulin-resistant hyperinsulinemia. *J Am Acad Dermatol.*, 2001; 45:95-104.

ROSSI AG, SOARES JM JR, MOTTA EL, SIMÕES MJ, OLIVEIRA-FILHO RM, HAIDAR MA, LIMA GR, BARACAT EC. Metoclopramide-induced

hyperprolactinemia affects mouse endometrial morphology. *Gynecol Obstet Invest.*, 2002; 54:185-90.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM - sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) *Human Reprod.*, 2004; 19:41-7.

SANDER V, LUCHETTI CG, SOLANO ME, ELIA E, GIROLAMO GD, GONZALEZ C, MOTTA AB. Role of the N,N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepubertal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*. 2006; 131:591-602.

SHORR E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. *Science*. 1941; 94(2449):545-6.

SILVA LAA, ESQUIVEL PC, REIS RM, SILVA DE SA MF, FERRIANI RA, MOURA MD. Metformina pode ser usada em mulheres grávidas com síndrome de ovários policísticos? *Femina*. 2008; 36(12):743-7.

SOARES JM JR, SIMÕES MJ, OSHIMA CT, MORA OA, LIMA GR, BARACAT EC. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecol Endocrinol.*, 2003; 17(2):115-23.

SMANIOTTO S, SIMÕES MJ. Morphological aspects of the endometrial epithelium of persistent estrous rats under estrogenic action. *Braz J Morphol Sci.*, 1996; 13:103.

SPEROFF L, GLASS RH, KASE NC. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 6th edition. Baltimore, Willians, Wilkins, p.487, 1999.

STEIN IF, LEVENTHAL ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1935; 29:181-91.

TEIXEIRA AAC, SIMÕES MJ, TEIXEIRA VW, SOARES JR JM. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int. J. Morphol.*, 2004; 22:189-94.

WRENN TR, WOOD JR, BITMAN J. Oestrogen responses of rats neonatally sterilized with steroids. *J. Endocrinol.*, 1969; 45:415-20.

YEN SSC. Polycystic ovary syndrome. In: YEN SSC, JAFE RB, BARBIERI RL. *Reproductive endocrinology*. 4^a ed. Philadelphia, Saunders, 1999.

YOSHIDA M, SANBUISSYO A, HISADA S, TAKAHASHI M, OHNO Y, NISHIKAWA. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its view points of ovarian toxicity detection. *J. Toxicol Sci.*, 2009; 34:189-97.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 23 de março de 2007
CEP 0302/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ROBERTA RASSI MAHAMED

Co-Investigadores: Edmund Chada Baracat; Manuel de Jesus Simões; Lillian Alves Macedo; Paulo Celso Franco

Disciplina/Departamento: Morfologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos da metformina na fertilidade em ratas em estro-permanente".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos da metformina na fertilidade em ratas em estro-permanente.

RESUMO: Serão utilizadas 50 ratas albinas, adultas, com idade variando entre 90 a 120 dias, fêmeas virgens, oriundas do CEDEME da Unifesp. Os animais serão transportados e mantidos no biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia da Unifesp. Após adaptação, os animais serão acasalados na proporção de duas fêmeas para cada macho em cada gaiola, e mantidos na gaiola no período das 19 as 7 horas, sem água e sem alimento. Após o parto das ratas, os filhotes vão ser separados em machos e fêmeas, sendo os machos escartados e as fêmeas rêm-natas mantidas com suas mães. No terceiro dia do nascimento será administrado propionato de testosterona em 40 ratas recém-natas, por via dorsal subcutânea, e as 10 ratas restantes servirão como controle, recebendo água destilada. Todas as ratas nascidas vão ser mantidas em condições ambientais, com suas mães, durante o aleitamento, por 90 dias. Após esse período os animais serão avaliados por coleta de esfregaços vaginais por 4 dias para caracterizar o estro-permanente. Serão classificados em três grupos: 10 ratas sem medicação(água destilada); grupo II, 20 ratas estro-permanente tratadas com propionato de testosterona e grupo III, 20 ratas em estro-permanente tratadas com metformina 7mg por dia, durante 30 dias por gavagem. E, com coleta de esfregaços vaginais diários (colpocitologia) para caracterizar o ciclo estral, sendo este grupo subdividido em dois grupos; III A, após o exame colpocitológico, serão anestesiados para retirada das tubas uterinas para determinação da contagem dos ovócitos e no subgrupo III B, serão acasalados com ratos machos para verificar-se a capacidade de se reproduzir após tratamento com metformina. Serão colhidas amostras sanguíneas para dosagem de glicemia e insulina após 30 dias do tratamento nesses dois subgrupos e após sacrificados com tiopental sódico 20mg/kg serão retirados ambos os ovários e fragmento de vagina em solução de conservação para estudo histo-morfológico.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: .

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos experimentais.

TCLE: não se aplica.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento específico.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 22/3/2008 e 22/3/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 0302/07

ANEXO II

Anexo II – Dados obtidos na determinação da glicose pertencentes aos grupos estudados

| | GC | GA | GAMet |
|----------------------|-----------|-----------|--------------|
| | 4,91175 | 5,88300 | 5,38350 |
| | 4,88400 | 7,13175 | 5,55000 |
| | 5,24475 | 8,04750 | 5,63325 |
| | 4,71750 | 6,63225 | 6,60450 |
| | 4,68975 | 5,77200 | 6,32700 |
| | 5,55000 | 7,52025 | 5,35575 |
| | 6,58000 | 6,79875 | 6,13275 |
| | 4,88400 | 5,63325 | 5,55000 |
| | 5,27250 | 7,46475 | 6,07725 |
| | 5,57775 | 7,71450 | 5,38350 |
| | 5,49450 | | 6,21600 |
| | 5,55000 | | 5,55000 |
| | | | 4,71750 |
| | | | 5,71000 |
| Média | 5,280 | 6,860 | 5,728 |
| Desvio-Padrão | 0,5296 | 0,8638 | 0,4924 |

ANEXO III

Anexo III – Dados obtidos na determinação da insulina pertencentes aos grupos estudados

| | GC | GA | GAMet |
|----------------------|-----------|-----------|--------------|
| | 6,400000 | 23,60000 | 27,80000 |
| | 9,599999 | 27,80000 | 27,40000 |
| | 5,200000 | 60,80000 | 27,00000 |
| | 17,800000 | 30,80000 | 20,60000 |
| | 14,400000 | 30,60000 | 13,40000 |
| | 5,800000 | 39,80000 | 18,80000 |
| | 13,400000 | 60,60000 | 28,40000 |
| | 8,400001 | 24,60000 | 17,80000 |
| | 10,200000 | 28,00000 | 28,40000 |
| | 8,200000 | 27,80000 | 23,80000 |
| | 14,400000 | | 22,60000 |
| | 8,400001 | | 13,40000 |
| | | | 24,20000 |
| | | | 72,60001 |
| Média | 10,35 | 36,29 | 26,16 |
| Desvio-Padrão | 4,116 | 14,60 | 14,34 |

ANEXO IV

Anexo IV – Dados obtidos no peso dos animais pertencentes aos grupos estudados

| | GC | GA | GAMet |
|----------------------|-----------|-----------|--------------|
| | 237,00000 | 242,00000 | 289,00000 |
| | 231,00000 | 292,00000 | 249,00000 |
| | 243,00000 | 252,00000 | 265,00000 |
| | 233,00000 | 258,00000 | 282,00000 |
| | 239,00000 | 280,00000 | 280,00000 |
| | 260,00000 | 247,00000 | 262,00000 |
| | 232,00000 | 284,00000 | 294,00000 |
| | 235,00000 | 276,00000 | 231,00000 |
| | 240,00000 | 258,00000 | 223,00000 |
| | 240,00000 | 243,00000 | 270,00000 |
| | 245,00000 | | 297,00000 |
| | 235,00000 | | 250,00000 |
| | | | 242,00000 |
| | | | 269,00000 |
| Média | 239,2 | 263,2 | 264,5 |
| Desvio-Padrão | 7,861 | 18,28 | 23,09 |

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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