

**OSWALDO DA ROCHA GRASSIOTTO**

---

---

**REDUÇÃO DA RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES  
COM ANOVULAÇÃO CRÔNICA HIPERANDROGÊNICA E SUA  
REPERCUSSÃO NOS NÍVEIS DOS ANDROGÊNIOS E DA  
GLOBULINA LIGADORA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**

---

---

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ALOISIO JOSÉ BEDONE**

**1998**

**OSWALDO DA ROCHA GRASSIOTTO**

---

---

**REDUÇÃO DA RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES  
COM ANOVULAÇÃO CRÔNICA HIPERANDROGÊNICA E SUA  
REPERCUSSÃO NOS NÍVEIS DOS ANDROGÊNIOS E DA  
GLOBULINA LIGADORA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Medicina,  
área de Tocoginecologia da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do  
Título de Doutor em Medicina, na área  
de Tocoginecologia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ALOISIO JOSÉ BEDONE**

**UNICAMP  
1998**

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: OSWALDO DA ROCHA GRASSIOTTO**

**Orientador: Prof. Dr. ALOISIO JOSÉ BEDONE**

**Membros:**

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**Data: 17/09/98**

*Dedico esta tese ...*

*... aos meus pais, Oswaldo e Martha.*

*... à Angela.*

*... ao Sérgio, Fábio, Eduardo, Cristina e Cesar.*

# AGRADECIMENTOS

---

*Ao Prof. Dr. Aloisio José Bedone, pela orientação, estímulo e amizade.*

*Ao Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto, pelo apoio mais que amigo.*

*Ao Prof. Dr. José Hugo Sabatino, pela amizade, apoio e estímulo.*

*À Profa. Dra. Margareth de Castro e ao Prof. Dr. Gilberto de Assunção Fernandes pelo interesse, pela crítica instigante e pelo suporte nas dosagens hormonais.*

*À equipe técnica do Laboratório de Fisiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, na pessoa da Biologista Laurione Candido de Oliveira pela execução minuciosa das dosagens hormonais.*

*Ao Prof. Dr. José Guilherme Cecatti e Prof. Dr. Marcos Tambascia pela dedicação ao meu exame de qualificação, pelas contribuições e sugestões.*

*Ao Edson Zangiacomi Martinez, pela qualidade da contribuição que superou a análise estatística.*

*À Mariana Segatto, pelo apoio que permitiu o contato contínuo com as voluntárias da pesquisa.*

*Aos amigos e colaboradores da ASTEC: Sueli Chaves, Cylene Camargo, Waltraut Karla Matos Dias, Maria do Rosário G. R. Zullo, William Alexandre de Oliveira, Néder Piagentini do Prado, Fernanda Atibaia, Sueli Regina Teixeira, Marisa D. Almeida, co-responsáveis pela qualidade da apresentação deste trabalho.*

*À equipe de enfermagem dos Ambulatórios Especializados da Ginecologia do CAISM, na pessoa da enfermeira Patrícia Ferreira Nomellini.*

*Aos colegas do Ambulatório de Ginecologia Endócrina do CAISM.*

*Aos médicos residentes do Departamento de Tocoginecologia e da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.*

*Aos meus alunos, pela amizade, carinho e reconhecimento.*

*Às mulheres, participantes voluntárias da pesquisa, pela disposição, desvelo e confiança.*

Ne me méprise pas tant! Je ne suis pas  
pauvre. Pauvre est plutôt celui qui désire  
beaucoup de choses. Léonard de Vinci

# SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	Androstenediona
<b>ACH</b>	Anovulação crônica hiperandrogênica
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>ASCGlicose</b>	Área sob a curva da glicose
<b>ASCInsulina</b>	Área sob a curva da insulina
<b>Ameno</b>	Amenorréia
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CAISM</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CA</b>	Circunferência abdominal
<b>cc</b>	Centímetro cúbico
<b>CQ</b>	Circunferência do quadril
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DCV</b>	Doença cardiovascular
<b>DMNID</b>	Diabete melito não insulino-dependente
<b>DTG</b>	Departamento de Tocoginecologia
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GnRH</b>	Gonadorelina
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>IAL</b>	Índice de Androgênios Livres
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal

<b>IRP</b>	International Reference Program
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mUI</b>	Miliunidade internacional
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µmol</b>	Micromol
<b>µUI</b>	Microunidade internacional
<b>ng</b>	nanograma
<b>nmol</b>	nanomol
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>Oligo</b>	Oligomenorréia
<b>P</b>	Progesterona
<b>p</b>	Significância estatística
<b>PAI-1</b>	Fator inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1
<b>pg</b>	Picograma
<b>pmol</b>	Picomol
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Desvio padrão
<b>SDHEA</b>	Sulfato de dehidroepiandrosterona
<b>SHBG</b>	Globulina ligadora dos hormônios sexuais
<b>T</b>	Testosterona
<b>TI</b>	Testosterona livre
<b>TTG</b>	Teste de tolerância à glicose
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>UI</b>	Unidade internacional
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de densidade muito baixa
<b>X</b>	Média
<b>α</b>	Erro tipo I
<b>β</b>	Erro tipo II
<b>Δ4Andro</b>	Androstenediona
<b>17OHP</b>	17-hidroxi-progesterona

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

1. Introdução.....	1
1.1. Relação ACH e Insulina.....	4
1.2. Resistência a Ação da Insulina.....	7
1.3. Efeitos Ovarianos Da Hiperinsulinemia <i>in vivo</i> .....	10
1.4. ACH, Obesidade e Hiperandrogenismo.....	12
1.5. Conseqüências para a Saúde Feminina.....	14
1.6. Correção da Hiperinsulinemia.....	17
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3. Casuística e Métodos.....	22
3.1. Desenho do Estudo.....	22
3.2. Tamanho Amostral.....	22
3.3. Seleção dos Sujeitos.....	23
3.4. Variáveis e Conceitos.....	24
3.5. Instrumento para Coleta dos Dados.....	26
3.6. Coleta e Processamento dos Dados.....	27
3.7. Acompanhamento dos Sujeitos.....	29
3.8. Análise Estatística.....	30
3.9. Avaliação Hormonal.....	31
3.10. Aspectos Éticos.....	34
5. Resultados.....	36
4.1. Apresentação dos casos estudados.....	36
4.2. Estudo do efeito do tratamento com metformina sobre as características antropométricas.....	39
4.3. Estudo dos efeitos do tratamento com metformina sobre os níveis sanguíneos da glicose e da insulina.....	40
4.4. Estudo dos efeitos do tratamento com metformina sobre as concentrações das gonadotrofinas, dos esteróides e da SHBG.....	43
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	67
8. Summary.....	68
9. Referências Bibliográficas.....	70
10. Bibliografia de Normatizações.....	85
11. Anexos.....	86

# RESUMO

---

Este estudo prospectivo foi conduzido para avaliar os efeitos do tratamento com a biguanida metformina nos níveis insulínicos e androgênicos de mulheres obesas e hirsutas, testando a hipótese de que a resistência insulínica hiperinsulinêmica influencia o hiperandrogenismo destas mulheres. Foram estudadas 11 mulheres hirsutas, obesas e oligomenorréicas que tiveram avaliadas suas concentrações sanguíneas de insulina, androgênios, gonadotrofinas e globulina ligadora dos hormônios sexuais antes e depois de período médio de cinco semanas de tratamento com metformina. Não ocorreram variações significativas do peso corporal durante o estudo. Durante teste de tolerância à glicose oral, identificaram-se duas mulheres como intolerantes e duas outras como diabéticas. Os níveis sanguíneos da insulina sofreram redução significativa de 31%. Também ocorreram reduções das concentrações da testosterona e de sua fração livre de 27% e 41%, respectivamente. As concentrações da globulina ligadora dos hormônios sexuais aumentaram significativamente em 19%. A análise univariada das correlações hormonais mostrou relações diretas e significativas entre as modificações da testosterona livre, do hormônio luteinizante e da área sob a

curva da insulina. Observou-se, também, correlação inversa entre as modificações da globulina fixadora dos hormônios sexuais e as do hormônio folículo-estimulante. A análise de regressão linear múltipla das modificações nas concentrações hormonais mostrou que as reduções das concentrações insulínicas foram o único determinante significativo da redução das concentrações da testosterona. Os resultados deste estudo indicaram que o tratamento com metformina para mulheres hirsutas, obesas e oligomenorréicas acarreta redução da hiperinsulinemia, que se acompanha de diminuição do hiperandrogenismo destas mulheres, credenciando a metformina como uma terapêutica alternativa promissora para pacientes portadoras desta condição.

# 1. INTRODUÇÃO

---

Existe ainda considerável controvérsia a respeito do hiperandrogenismo em mulheres obesas. A descrição de uma síndrome consistindo de “irregularidade menstrual ou amenorréia, história de esterilidade, hirsutismo andróide e, menos freqüentemente, atraso do desenvolvimento mamário e obesidade” (STEIN & LEVENTHAL, 1935), esclareceu parte das correlações entre os sinais clínicos e as disfunções de órgãos específicos, associando estas manifestações a alterações esclerocísticas dos ovários. Desde então, definiu-se um conjunto nosológico que incluiu ovários esclerocísticos, manifestações de anovulação e hirsutismo, sob a denominação de Síndrome dos Ovários Policísticos ou Síndrome de Stein e Leventhal.

Subseqüentemente, novos relatos passaram a mostrar que existia uma variedade de apresentações clínicas em mulheres que possuíam os aspectos ovarianos típicos, mais ampla que aquela descrita em 1935 (GIVENS et al., 1976; ADAMS, POLSON, FRANKS, 1986). Esta heterogeneidade de manifestações clínicas da síndrome dos ovários policísticos tem desafiado os melhores esforços dos pesquisadores em explicar, de forma definitiva, a etiopatogenia

subjacente, havendo debate se a síndrome representa uma ou múltiplas etiologias. A definição clínica atual mais amplamente aceita é a associação de hiperandrogenismo com anovulação crônica em mulheres que não apresentam moléstias subjacentes da adrenal ou da hipófise, chamada de anovulação crônica hiperandrogênica ou ACH (FRANKS, 1995). O hiperandrogenismo se caracteriza clinicamente por hirsutismo, acne e alopecia androgênio-dependente e bioquimicamente pela concentração sérica aumentada de androgênios, particularmente testosterona e androstenediona (FRANKS, 1995). A anovulação se manifesta por distúrbio menstrual - amenorréia, oligomenorréia ou sangramento uterino disfuncional - e infertilidade. Em muitos casos o antecedente de distúrbio menstrual data desde a menarca (YEN, 1980). Cerca da metade das portadoras da síndrome são obesas. Algumas portadoras da ACH, particularmente as obesas, apresentam *acantose nigricans*, um indicador cutâneo de hiperinsulinemia (DUNAIF et al., 1987).

Subjacente a estas manifestações clínicas há um conjunto de anormalidades bioquímicas que se manifestam de forma heterogênea. Dentre estas, as mais importantes são o aumento da concentração sérica da testosterona total e de sua fração livre, a redução da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), o aumento da concentração do hormônio luteinizante e a hiperinsulinemia (WEBER et al., 1993). Nem todas as mulheres afetadas apresentam todas estas anormalidades bioquímicas, mas, no conjunto, estes achados, juntamente com as manifestações clínicas, são característicos da ACH (FRANKS, 1995).

O início puberal da moléstia e a natureza bilateral do distúrbio ovariano sinalizam para a participação de fatores externos à gônada no processo de iniciar ou manter a hipersecreção androgênica. Um fator reconhecido nesse processo é o hormônio luteinizante (BARBIERI & RYAN, 1983; GRULET et al., 1993), estimulador potente do crescimento das células tecais e da produção de androgênios. Os pequenos aumentos na concentração sérica do LH em mulheres com ACH têm sido imputados aos efeitos positivos de retrocontrole dos estrogênios e androgênios (LOBO & GOEBELSMANN, 1982) porém, tem-se também sugerido que ocorram em resposta a um estímulo hipofisário direto da hiperinsulinemia (ADASHI, HSUEH, YEN, 1981).

Fatores que afetam a concentração da SHBG podem ser causadores de anovulação crônica e de manifestações androgênicas, visto que é a capacidade de ligação da globulina que determina a fração livre - ativa - do estradiol e da testosterona (YEN, 1980). Altos níveis de androgênios estão associados a baixos teores da globulina ligadora e manifestação clínica de hirsutismo, como ocorre na ACH (PLYMATE et al., 1981).

Atualmente, é bastante conhecida a existência de correlação inversa entre o índice de massa corporal (IMC) e os níveis de SHBG (PLYMATE et al., 1988). Esta correlação se intermedia pela participação direta da insulina, que reduz a produção hepática da globulina ligadora (NESTLER et al., 1991). Tem-se observado que mulheres obesas com ACH, submetidas à dieta de baixas calorias por curto tempo apresentam um aumento nas concentrações de SHBG e uma diminuição da insulina sérica (NESTLER, 1993). Estas mudanças

também se observam em mulheres com ACH, hiperandrogenismo e resistência insulínica documentada, quando submetidas à dieta emagrecedora (BARBIERI et al., 1986; CRAVE et al., 1995): a restrição calórica por seis meses acarretou diminuição dos níveis da insulina e dos androgênios e foi acompanhada de melhora clínica, com regularização dos ciclos menstruais em uma proporção significativa das mulheres.

É fato conhecido que a deficiência ou excesso de insulina altera significativamente a função ovariana. A deficiência insulínica de mulheres com diabetes melito tipo I se associa a manifestações de hipofunção ovariana, amenorréia primária, menarca tardia, anovulação, esterilidade e menopausa precoce. Por outro lado, resistência à insulina com conseqüente hiperinsulinemia se relaciona a diversas manifestações de hiperestimulação ovariana, notadamente hiperandrogenismo (PORETSKY & KALIN, 1987).

### **1.1. RELAÇÃO ACH E INSULINA**

Relatos recentes convergem no sentido de que a hiperinsulinemia, conseqüência da resistência à ação da insulina na ACH, é fenômeno central na resistência ovariana à ação do hormônio folículo-estimulante e na síntese androgênica excessiva, característica da síndrome (DUNAIF et al., 1990).

A exata etiologia da ACH ainda não é conhecida. Considerada uma síndrome multifatorial, as propostas para explicar sua patogênese concordam

nas modificações morfológicas ovarianas características e na origem, também ovariana, do excesso androgênico.

Portanto, a questão principal é descobrir qual a fonte da produção ovariana excessiva.

O citocromo P450c17 $\alpha$  é uma enzima bifuncional com atividades 17-hidroxilase e 17,20-lyase, sendo também a enzima-chave na biossíntese dos androgênios ovarianos. Nas célula tecais P450c17 $\alpha$  converte progesterona em 17-hidroxi-progesterona, por sua atividade 17-hidroxilase e então a converte em androstenediona por sua atividade 17,20-lyase. A androstenediona é então convertida em testosterona pela ação da enzima 17-beta-redutase (EHRMANN, BARNES E ROSENFELD, 1995).

Muitas mulheres com ACH têm a atividade do citocromo P450c17 $\alpha$  aumentada, evidenciada pelo aumento da atividade da 17-hidroxilase e em menor grau da 17,20-lyase, resultando no acréscimo da produção ovariana de androgênios, particularmente da testosterona, que deve atuar localmente causando atresia folicular prematura e anovulação (FRANKS, 1995).

Nestas mulheres observa-se uma resposta exagerada do aumento de 17-hidroxi-progesterona como resultado da estimulação com agonistas GnRH: Nafarelina (BARNES et al., 1989; EHRMANN et al., 1995), Leuprolide (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996) e Buserelina (DUNAIF, 1997).

Não se tem esclarecido, no entanto, se a atividade excessiva do citocromo P450c17 $\alpha$  em mulheres com ACH é um fenômeno congênito ou adquirido. Diversos mecanismos que podem causar aumento da atividade do citocromo P450c17 $\alpha$  têm sido sugeridos. A participação do hormônio luteinizante parece óbvia, sendo o principal regulador da produção de androgênios pelas células tecais durante um ciclo ovulatório normal. É razoável supor que concentrações elevadas e persistentes desse hormônio causem aumento na produção de androstenediona por hiperatividade do citocromo P450c17 $\alpha$ . Entretanto, uma parcela significativa das mulheres com características típicas da ACH não tem concentrações elevadas do LH, particularmente aquelas que são obesas. Assim, um mecanismo alternativo deve ser o responsável pelo desencadeamento do hiperandrogenismo.

Neste sentido, tem-se investigado a participação da insulina e de outros fatores que incluem o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I). Em 1980, BURGHEN, GIVENS, KITABCHI, demonstraram que a ACH se associava com hiperinsulinemia. Outros estudos confirmaram estes achados e ficou claro que a síndrome acumula importante morbidade metabólica e não somente reprodutiva (DAHLGREN et al., 1994).

Em 1921, descreveram-se casos de mulheres diabéticas que apresentavam sinais de virilização, como “diabetes de mulheres barbadas” (ACHARD & THIERS, 1921). Posteriormente, descreveram-se outras condições em que se associavam hiperandrogenismo, *acantose nigricans* e hiperinsulinemia,

em condições de resistência insulínica (KAHN et al., 1976). O estudo de BURGHEN e colaboradores, em 1980, mostrou que mulheres com ACH mostravam hiperinsulinemia tanto em condições basais como em resposta ao estímulo com ingestão oral de glicose, se comparadas a mulheres-controle de peso semelhante, sugerindo a existência de insulino-resistência. Além disso, ficou evidente a correlação positiva e linear entre os níveis de insulina e de androgênios circulantes, o que lhes pareceu de significado clínico. DUNAIF e colaboradores (1985) estudaram as características clínicas, bioquímicas e os aspectos morfológicos ovarianos de mulheres com *acantose nigricans* e sinais de virilização, e verificaram que elas apresentavam os sinais típicos da ACH associados ao aumento da hipertecose ovariana com a observação de ilhas de células tecais luteinizadas no estroma ovariano. Este parece ser um achado comum em mulheres com a síndrome (GILLING-SMITH et al., 1997) e, em situações extremas, é denominado "hipertecose ovariana" e se associa com hiperandrogenismo mais intenso. A observação de hiperinsulinemia associada à hipertecose ovariana tem sido confirmada, tanto em mulheres pré (NAGAMANI, DINH, KELVER, 1986) como pós-menopáusicas (BARTH, JENKINS, BELCHETZ 1997).

## **1.2. RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA**

A resistência à insulina é definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada quantidade da insulina (DUNAIF, 1997). Ainda que este conceito possa se referir a qualquer das ações insulínicas, esse termo aplica-se,

na prática, às ações exercidas na metabolização da glicose. Há tempos se reconhece que síndromes caracterizadas por grande resistência insulínica se associam com hiperandrogenismo ovariano. A partir da década de 80, no entanto, centrou-se atenção em mulheres que apresentam a síndrome da anovulação crônica hiperandrogênica (ACH) mais que naquelas com fenótipo típico de síndromes que envolvem resistência insulínica. Mulheres com a ACH têm maiores grau e frequência, tanto de hiperinsulinemia quanto de resistência insulínica, do que controles com peso similar (DUNAIF et al., 1988). A ocorrência da resistência insulínica entre mulheres com ACH independe do efeito da obesidade - mulheres magras e obesas com ACH têm diminuição da sensibilidade insulínica - mas a resistência à ação da insulina é maior quando existe interação entre obesidade e a síndrome (PEIRIS et al., 1989; ROBINSON et al., 1996).

Há muitas evidências de que a ACH se caracteriza por um estado hiperinsulinêmico secundário à resistência da ação insulínica. Desde 1980, quando BURGHEN e colaboradores demonstraram a existência de hiperinsulinemia em mulheres com as características da síndrome, tem-se multiplicado estudos que mostram ser as portadoras da síndrome significativamente mais hiperinsulinêmicas e insulino-resistentes que as mulheres normais, quando pareadas por peso corporal e idade (CHANG et al., 1983; DUNAIF et al., 1987, PASQUALI & CASIMIRRI, 1993; DAHLGREN et al., 1992, EHRMANN et al., 1995).

As mulheres avaliadas nesses estudos mostram diversas características distintivas, como a expressão do androgenismo, que entre as ocidentais se

acompanha de hirsutismo, o que, praticamente, não ocorre entre as japonesas (FRANKS, 1995). A obesidade também se manifesta em graus variados, de acordo com a procedência da população estudada (LEFÉBVRE, et al., 1997). No entanto, mulheres de etnias diferentes com ACH, com características clínicas também diferentes, apresentam em comum a resistência insulínica e o hiperinsulinismo, sugerindo que esta condição acompanha a síndrome de forma universal (FRANKS, 1989).

Parece improvável que a hiperinsulinemia decorrente de resistência insulínica seja resultante de hiperandrogenismo. A resistência insulínica persiste em mulheres com ACH, mesmo após ooforectomia (NAGAMANI et al., 1986) ou quando a produção androgênica ovariana é suprimida pelo uso de agonistas do GnRH (DUNAIF et al., 1990; NESTLER et al., 1991). Meninas pré-puberais com *acantose nigricans* são hiperinsulinêmicas, mas o hiperandrogenismo somente se manifesta muitos anos após identificada a resistência insulínica (McKENNA & CUNNINGHAM 1995). Finalmente, homens apresentam níveis androgênicos entre 10 a 30 vezes maiores que os de mulheres, mas não têm, necessariamente, resistência à insulina (DUNAIF, 1997).

Assim, parece mais razoável supor que a hiperinsulinemia na ACH é fator causal e não conseqüente ao hiperandrogenismo.

A resistência à insulina e hiperinsulinemia são aspectos bem identificados da ACH, ainda que a magnitude e o mecanismo de resistência insulínica não sejam completamente conhecidos. A hiperinsulinemia associada

à ACH aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes melito não-insulino-dependente (DMNID) e predispõe ao risco de desenvolver doença cardiovascular (DAHLGREN et al., 1992). A obesidade tem sido responsabilizada por desencadear resistência à insulina e hiperinsulinemia. Estudos demonstram resistência insulínica em pacientes com ACH, inclusive não relacionada ao peso corporal, havendo efeito deletério sinérgico da obesidade e da ACH na sensibilidade insulínica (DUNAIF & FINEGOOD, 1996).

Tem-se demonstrado hiperinsulinemia em mulheres obesas e não-obesas com ACH, associada com hiperandrogenismo e distúrbios menstruais (DUNAIF et al., 1988; CONWAY & JACOBS, 1993), sendo que a hiperinsulinemia é mais freqüente e mais intensa nas obesas. Porém, ocorre e tem participação significativa na caracterização metabólica da síndrome entre as mulheres magras (DUNAIF, 1995).

### **1.3. EFEITOS OVARIANOS DA HIPERINSULINEMIA *in vivo***

Os ovários humanos possuem receptores para a insulina, o que permite inferir um papel deste hormônio na regulação da função ovariana (PORETZKY, 1991). Estudos *in vitro* demonstraram que a insulina pode estimular diretamente as células do estroma ovariano a produzir androgênios (BARBIERI et al., 1986). Além disso, a insulina e o IGF-I produzem aumento na capacidade do hormônio luteinizante em estimular a biossíntese androgênica nas células tecais (DUNAIF, 1997).

É, entretanto, muito mais difícil demonstrar o efeito da insulina sobre os androgênios ovarianos *in vivo*. Diversos estudos buscaram avaliar tal efeito monitorando a testosterona circulante durante elevações agudas da insulinemia, e os resultados observados em mulheres com a ACH têm sido ainda muito conflitantes, havendo relatos de elevação, queda ou não-alteração dos níveis da testosterona (SMITH, RAVNIKAR, BARBIERI, 1987; NESTLER et al., 1989; NESTLER et al., 1990; DUNAIF et al., 1996). Existem diversos problemas relacionados com os estudos de infusão de insulina que podem ser responsabilizados pelos resultados discordantes da literatura. Em primeiro lugar, a própria característica da situação de hiperinsulinemia, que pode ser mantida apenas por pouco tempo, horas no máximo. Segundo, as interações resultantes da hiperinsulinemia aguda sobre outros fatores que atuam sobre o metabolismo ovariano, como os níveis do GH, do LH e das catecolaminas (HOMBURG, 1996).

O que foi, provavelmente, o único caso estudado de hiperinsulinemia induzida e monitorizada a longo prazo, foi publicado em 1991 (DeCLUE et al., 1991): uma mulher com a ACH, altamente insulino-resistente e diabética foi tratada com doses elevadas de insulina e mantida nessa condição por meses. Durante esse período de elevação da insulinemia, os níveis de testosterona se elevaram gradativamente e os volumes ovarianos, aferidos por ultra-sonografia, mais que dobraram. Quando o tratamento com insulina foi suspenso e as concentrações séricas de insulina passaram a cair, os níveis de testosterona também se reduziram em ritmo semelhante, atingindo, ao final, níveis dentro

dos limites normais. Observou-se clara concordância entre os níveis de insulina e testosterona, sugerindo existência de relação causa-efeito.

#### **1.4. ACH, OBESIDADE E HIPERANDROGENISMO**

A natureza complexa da interação de hiperandrogenismo, distribuição da gordura corporal e resistência insulínica permanece ainda não esclarecida (NESTLER et al., 1989), mas a insulina parece afetar a secreção e metabolismo dos androgênios, e não o contrário. A insulina aumenta a resposta androgênica ao hormônio luteinizante (LH) no tecido ovariano *in vitro* (BARBIERI et al., 1986) e tem-se observado correlações positivas entre as concentrações sanguíneas de androgênios e de insulina em alguns (PORETSKY & KALIN, 1987; DUNAIF et al., 1988), mas não em outros estudos (SHARP et al., 1991; AÇBAY & GÜNDOĞDU, 1996). O hiperinsulinismo também pode afetar a expressão androgênica ao reduzir as concentrações da globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG) (PLYMATE et al., 1988).

A resistência insulínica em mulheres com ACH tem sido destacada por alguns autores como uma entidade etiológica distinta (MOLLER & FLIER, 1991). Caracteriza-se por sensibilidade reduzida à insulina em tecidos periféricos, notadamente músculos e tecido adiposo (DUNAIF, 1995), mas não há resistência hepática, o que a distingue da resistência insulínica observada no diabetes tipo II (PEIRIS et al., 1989). A hiperinsulinemia em mulheres com ACH parece refletir a hipersecreção de insulina *per se*, e não a secreção de pró-

insulina ou de seus metabólitos (CONWAY, CLARK, WONG, 1993). O mecanismo celular da resistência insulínica ainda é controverso, com sugestão de déficit na ligação do hormônio ao receptor (MOLLER & FLIER, 1991) e, mais recentemente, a descrição de um defeito pós-receptor (DUNAIF et al., 1995).

No entanto, a resistência insulínica não é característica de todas as mulheres com hiperandrogenismo e ovários policísticos. Ela ocorre em mulheres com a expressão clássica da síndrome (que inclui alteração menstrual), mas as hirsutas, hiperandrogênicas e com ovários policísticos que têm ciclos menstruais regulares apresentam níveis de insulina em jejum e, após estímulo com glicose similares aos de mulheres normais com o mesmo peso (CONWAY & JACOBS, 1993). Estas também têm sensibilidade insulínica normal (ROBINSON et al., 1996).

É pouco provável que a anovulação seja a causa da redução da sensibilidade insulínica. Há relatos de modificações cíclicas da sensibilidade insulínica, que se caracterizam pela redução da sensibilidade durante a fase lútea do ciclo menstrual ovulatório (VALDES & ELKIND-HIRSCH, 1991). Além disso, a completa supressão da esteroidogênese ovariana não altera a sensibilidade insulínica (GEFFNER et al., 1986; DUNAIF et al., 1990). Portanto, é mais provável que a resistência insulínica e a hiperinsulinemia conseguinte contribuam para o mecanismo da anovulação (BARBIERI & HORNSTEIN, 1988).

A implicação prática destes achados é que a ACH pode ser um indicativo de resistência insulínica e possivelmente de dislipidemia (WILD et al.,

1990). A intolerância à glicose e mesmo o diabetes tipo II franco são mais prevalentes em mulheres jovens obesas com ACH do que em controles pareados pela idade e peso (DUNAIF et al., 1987). Estudos de seguimento a longo prazo de mulheres com a síndrome têm mostrado uma prevalência sete vezes maior de diabetes tipo II neste grupo que na população de referência (DAHLGREN et al., 1992). Estas mulheres têm hiperlipidemia e um risco muito aumentado de doença cardiovascular (DAHLGREN et al., 1994).

### **1.5. CONSEQÜÊNCIAS PARA A SAÚDE FEMININA**

Os dados originados no estudo de moléstias cardiovasculares de Framingham mostraram que, em média, o surgimento dessas doenças ocorre em um subgrupo de mulheres afetadas dez anos mais tarde que em homens (CASTELLI, 1988).

Diversas linhas de evidências convergem, todas elas sugerindo que este subgrupo de mulheres, com risco paralelo ao dos homens, inclui as com hiperandrogenismo. Elas podem apresentar maior risco para doença cardiovascular (DCV) devido a alterações desfavoráveis na ação da insulina e/ou em sua produção, acompanhadas de alterações no metabolismo das apolipoproteínas, além de modificações no metabolismo androgênico e estrogênico.

Um conjunto de indicadores de risco cardiovascular que inclui obesidade central, resistência insulínica (com a hiperinsulinemia conseqüente),

níveis elevados de triglicérides, baixos níveis de colesterol de alta densidade e/ou diabetes melito tendem a se expressar nestas mulheres (WILD, 1995).

Uma condição patológica comumente associada ao hiperandrogenismo é a ACH. Há evidências de que os ovários, ou comumente os ovários e as adrenais, são as fontes do excesso de androgênios em pacientes com a ACH. Além de sua associação com hirsutismo, anovulação, infertilidade e anomalias na secreção de gonadotrofinas, mulheres com ovários policísticos tendem a acumular antecedentes familiares, tanto do lado materno quanto do paterno, de fatores de risco para DCV, incluindo diabetes, obesidade, nefrosclerose arteriolar, resistência insulínica e dislipidemia (RITTMASER, 1992).

Ainda que a obesidade esteja presente em 50%-80% das mulheres com ACH, a relação precisa entre obesidade e ACH não é clara. A resistência insulínica parece ser importante. Tanto as mulheres obesas quanto as magras com ACH apresentam maior incidência de resistência insulínica que as mulheres-controle (BJORNTORP, 1997) e maior risco de desenvolver diabetes melito tipo II relativamente cedo na vida, na terceira ou quarta década (DUNAIF, 1995).

Um outro fator de risco importante para DCV em pacientes com ACH é a dislipidemia. WILD e colaboradores (1985) compararam os perfis lipídicos e androgênicos de um grupo de mulheres com ACH aos de mulheres-controle, não hirsutas: as pacientes com ACH apresentaram níveis de triglicérides maiores (quase o dobro) e níveis de HDL-colesterol 20% menores que as do grupo-controle.

No sentido de confirmar que esses padrões masculinos de lipoproteínas não se deviam exclusivamente a diferenças do peso corporal, os perfis lipídicos e androgênicos foram avaliados em dois outros grupos de mulheres (ACH versus normal), pareadas pelo percentual do peso ideal. Novamente, as pacientes com ACH tiveram níveis significativamente maiores de triglicérides e colesterol de muito baixa densidade (VLDL-colesterol ) e níveis menores de HDL-colesterol (WILD & BARTHOLOMEW, 1988).

Há muito tempo se sabe que o padrão andróide de distribuição de gordura corporal, caracterizado pela adiposidade abdominal excessiva e uma alta relação abdômino-glútea em mulheres, associa-se com hirsutismo, hipertensão e diabetes. Por sua vez, todos se associam com o hiperandrogenismo.

Quando se examinam os níveis de lipoproteínas de mulheres hirsutas com resistência insulínica, notam-se que seus níveis elevados de triglicérides e baixos de HDL-colesterol se relacionam não só à insulinemia de jejum como também, e de forma independente, com os níveis de testosterona livre (WILD et al., 1990).

Ainda que todos estes dados sugiram que mulheres hiperandrogênicas apresentam maior risco de doença coronariana, ainda faltam resultados definitivos vinculando-os com DCV.

No sentido de elucidar este aspecto, um outro estudo avaliou 102 mulheres consecutivamente admitidas para cateterismo cardíaco, sob os aspectos da relação abdômino-glútea e de problemas relacionados a hiperandrogenismo anterior.

Essas informações foram correlacionadas com os resultados do cateterismo. Revelou-se uma correlação positiva entre o antecedente de excesso de pêlos faciais e acne com a doença coronariana confirmada na ocasião.

A relação abdômino-glútea se mostrou associada tanto com hirsutismo quanto com doença coronariana, indicando que o excesso androgênico pode ser um sinal de risco para a doença coronariana (WILD et al., 1990).

## **1.6. CORREÇÃO DA HIPERINSULINEMIA**

Objetivando a correção do fator metabólico que se associa às manifestações da ACH, tem-se procurado diminuir os níveis insulínicos através de dietas, emagrecimento e uso de drogas que reduzam sua liberação pancreática ou que aumentem sua atuação periférica.

A redução da insulinemia em mulheres obesas com ACH pelo uso do diazóxido diminuiu os níveis sanguíneos da testosterona em 20% e os níveis da testosterona livre em 30% e aumentou a concentração da SHBG, sem variação significativa do peso corporal. (NESTLER, et al., 1989). O diazóxido não tem sido utilizado no tratamento do hiperinsulinismo, pois seu mecanismo de ação - bloqueio de secreção pancreática da insulina - acarreta hiperglicemia, estado diabetogênico e não corrige o distúrbio metabólico primário, que é a resistência periférica à ação da insulina.

A metformina é uma biguanida, droga comumente usada para aumentar a sensibilidade insulínica em diabéticos não-insulino-dependentes, sem produzir

hipoglicemia (BELL & HADDEN, 1997). Ainda que o preciso mecanismo envolvido na ação de metformina não seja completamente esclarecido (CHAN et al., 1993), sua administração aumenta a captação periférica da glicose com alguma redução da gliconeogênese hepática, sem aumentar a secreção insulínica (DEFRONZO, BARZILAI, SIMONSON, 1991; BAILEY, 1992). Administrada a mulheres obesas e hirsutas, a metformina reduziu os níveis de insulina em jejum de 30% e aumentou a relação glicose/insulina no TTG oral de 25%, ao final de quatro meses de tratamento (CRAVE, et al., 1995). Nesse estudo não foi possível discriminar os efeitos diretos da droga na resistência insulínica e os efeitos indiretos na redução do peso, fato que incidiu na maioria dos sujeitos do estudo, em média de 10%.

No sentido de estudar o efeito de elevações fisiológicas da insulina em mulheres obesas com ACH, contornando problemas relacionados à infusão de insulina, foi testado o efeito da redução da secreção endógena da insulina pelo uso do diazóxido, por via oral, durante um período de dez dias. Associado à redução marcada dos níveis basais e estimulados de insulina, observou-se queda média de 17% nos níveis de testosterona, com a concomitante redução dos níveis livres do hormônio da ordem de 28%. A mesma forma de tratamento, ministrada para mulheres normais com níveis insulínicos também normais, não produziu variações significativas dos níveis hormonais, evidenciando que a ação medicamentosa se fez indiretamente e não por efeito do diazóxido sobre a secreção androgênica (NESTLER et al., 1989).

Recentemente, tem-se aprofundado a avaliação do efeito do hiperinsulinismo sobre a esteroidogênese ovariana na ACH, pelo estudo da atividade do citocromo P450c17 $\alpha$ , enzima-chave no processo de síntese androgênica do ovário que, consistentemente, tem sido identificada como hiperativa em mulheres portadoras da síndrome (EHRMANN et al., 1992). Mulheres obesas com ACH, submetidas à avaliação da atividade do citocromo P450c17 $\alpha$  pelo estímulo com agonista GnRH, antes e depois do tratamento com metformina, mostraram que a redução dos níveis de jejum e estimulado da insulina produzidos pela metformina se acompanhou de reduções substanciais dos níveis de 17 hidroxiprogesteroona em resposta ao estímulo com agonista GnRH, evidenciando menor atividade do citocromo P450c17 $\alpha$ . Mais que isso, o tratamento com metformina nesse estudo produziu ainda uma redução de 44% nos níveis de testosterona livre e um aumento de três vezes na concentração da globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG), que foram acompanhados por significativa redução dos níveis basais e estimulados do LH (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996).

Estes achados sugerem que a hiperinsulinemia aumenta a atividade do citocromo P450c17 $\alpha$  em mulheres obesas com ACH, tanto por estimular diretamente a atividade enzimática no ovário quanto por estimular indiretamente a esteroidogênese gonadal pelo aumento da liberação hipofisária de gonadotrofinas.

Neste estudo pretendeu-se diminuir os níveis circulantes da insulina pela ação da metformina, através da redução da resistência periférica à ação

insulínica em mulheres obesas com ACH, sem incorrer em perda de peso corporal, um fator confundidor na análise do efeito medicamentoso. O período de observação deste efeito - quatro semanas - foi estimado como suficiente para avaliar as conseqüências na esteroidogênese ovariana e na síntese hepática da SHBG. Os hipotéticos aumentos dos níveis da SHBG e a queda dos níveis circulantes de androgênios deveriam produzir redução maior na fração livre dos androgênios, que se pretenderam aferir pela concentração de testosterona livre. O impacto clínico esperado, a médio prazo, destes efeitos inclui redução do peso corporal, redução dos efeitos androgênicos na pele e fâneros e melhoria nos padrões metabólicos das lipoproteínas, na direção de um perfil menos aterogênico.

Espera-se, a partir deste estudo, obter subsídios no sentido de utilizar a redução da resistência insulínica como terapêutica alternativa da ACH em mulheres obesas.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do uso de medicação sensibilizadora à ação da insulina em mulheres obesas com anovulação crônica hiperandrogênica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Avaliar os efeitos do tratamento com metformina sobre a insulinemia durante teste de tolerância à glicose.
2. Avaliar os efeitos do tratamento com metformina sobre os níveis de androgênios e gonadotrofinas.
3. Avaliar os efeitos do tratamento com metformina sobre a concentração sérica da SHBG.

## 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

### 3.1. Desenho do estudo

Ensaio clínico não-randomizado, com análise antes-depois, em que cada caso foi seu próprio controle.

### 3.2. Tamanho amostral

A variável definidora do tamanho amostral foi a insulinemia durante teste de tolerância à glicose. Esta variável é estimada pela área sob a curva que integra os níveis de insulina no plasma, com o tempo variando de zero a 180 minutos, aferidos a cada 60 minutos. Estudos metabólicos prévios com a metformina indicam uma redução de 30% a 50%, em média, neste parâmetro, quando o produto é utilizado por mulheres insulino-resistentes (DE FRONZO, et al., 1991; CRAVE, et al., 1995).

Obteve-se que o número mínimo de observações onde se podiam detectar modificações da ordem de 30%, aceitando-se margens de erro tipo I de 0,05 e de erro tipo II de 0,20 era pouco maior que nove, portanto, deviam bastar

dez mulheres no estudo, considerando-se que os grupos de estudo e controle seriam compostos pelos mesmos indivíduos (pré e pós-intervenção).

### **3.3. Seleção de sujeitos**

Os sujeitos do estudo foram mulheres obesas, portadoras de ACH, oriundas do Ambulatório de Endocrinologia Ginecológica, da área de Ginecologia do DTG-FCM/UNICAMP/CAISM. Foram convidadas a fazer parte do estudo aquelas que preencheram os critérios de inclusão.

#### **3.3.1. Critérios de inclusão**

- Presença de alterações menstruais como oligomenorréia (ciclos mais longos que 35 dias) ou amenorréia (ciclos mais longos que 90 dias), desde a menarca (DEWIS et al., 1986).
- Índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 27 (EDMANN & MACDONALD, 1978; KOPELMAN, 1994).
- Presença de hirsutismo, caracterizado por índice de Ferriman e Gallwey (FERRIMAN & GALLWEY, 1961) maior ou igual a oito.
- Ausência de desejo de gestação no período do estudo e disposição ao uso de método contraceptivo de barreira, dentre as sexualmente ativas.
- Concordância com os procedimentos previstos no protocolo, mediante consentimento informado.

As mulheres que aceitaram participar do estudo foram avaliadas quanto à presença de algum dos fatores que definem critérios de exclusão.

### **3.3.2. Critérios de exclusão**

- Glicemia de jejum igual ou maior que 110mg/100mL.
- Hiperprolactinemia ou testes de função tireoideana alterados (FRANKS, 1995).
- Níveis de 17 hidroxiprogesteroa superiores a 6ng/mL (20,4nmol/L) em dosagens realizadas em teste de estímulo com ACTH com 60 minutos de observação (LANZONE et al., 1992)
- Uso de qualquer medicação hormonal no período de 90 dias anteriores à admissão (PETSOS, RATCLIFFE, ANDERSON, 1986; ANTILA et al., 1992).
- Presença de contra-indicação ao uso da metformina: gravidez; insuficiência renal; patologias agudas com risco de alteração de função renal como desidratação, febre, estados infecciosos e/ou hipóxicos graves, insuficiência hepato-celular (DEFRONZO et al., 1991; BAILEY, 1992; BELL & HADDEN, 1997).

### **3.4. Variáveis e Conceitos**

#### **3.4.1. Variável independente**

Uso de metformina.

#### **3.4.2. Variáveis descritivas e de controle**

- Idade: anos completos na ocasião da admissão.
- Peso: aferido em quilogramas e fração decimal.
- Estatura: aferida em centímetros.

- Circunferência abdominal: comprimento em centímetros da circunferência do abdome, medida na altura da cicatriz umbilical.
- Circunferência do quadril: comprimento em centímetros da circunferência do quadril medida na maior proeminência dos glúteos (maior diâmetro do quadril).
- Índice de massa corporal: quociente entre o peso em quilogramas e o quadrado da estatura em metros (PETTIGREW & HAMILTON-FARLEY, 1997).
- Hirsutismo: valor apurado do índice de Ferriman e Gallwey superior a sete (FERRIMAN & GALLWEY, 1961).
- Oligomenorréia: ocorrência de ciclos menstruais com intervalos entre 35 e 90 dias.
- Amenorréia: paciente há 90 ou mais dias sem menstruar.

### **3.4.3. Variáveis dependentes**

- SHBG: concentração da globulina ligadora dos hormônios sexuais no soro, medida em nmol/L
- T: concentração de testosterona no soro, medida em nmol/L
- TI: concentração de testosterona livre no soro, medida em pmol/L
- P: concentração da progesterona no soro, medida em nmol/L
- A: concentração de androstenediona no soro, medida em nmol/L
- 17OHP: concentração de 17 hidroxiprogestero no soro, medida em nmol/L

- FSH: concentração do hormônio folículo estimulante no soro, medida em UI/L
- LH: concentração do hormônio luteinizante no soro, medida em UI/L
- SDHEA: concentração do sulfato de dehidroepiandrosterona no soro, medida em  $\mu\text{mol/L}$ .
- Insulina: concentração de insulina no soro medida em pmol/L.
- ASCinsulina: função integral das concentrações da insulinemia nas três horas de duração do teste de tolerância à glicose oral, calculada pela soma da metade dos valores de jejum e de 180 minutos e os valores de 60 e 120 minutos, segundo a regra de cálculo da área dos trapézios (CONWAY et al., 1993).
- Glicose: concentração de glicose no sangue, medida em mmol/L.
- ASCglicose: função integral das concentrações da glicemia nas três horas de duração de teste de tolerância à glicose oral, calculada pela soma da metade dos valores de jejum e 180 minutos e os valores de 60 e 120 minutos, segundo a regra de cálculo da área dos trapézios.
- Índice de androgênios livres (IAL): relação molar entre as concentrações séricas da testosterona e da SHBG multiplicada por 100 (SIITERI & SIMBERG, 1986).

### 3.5. Instrumentos para coleta de dados

Utilizaram-se as fichas clínicas do Ambulatório de Endocrinologia Ginecológica do HC/UNICAMP como fonte primária de dados (ANEXO 1). As informações oriundas dos laboratórios de dosagens hormonais foram obtidas a

partir dos laudos emitidos pelos laboratórios, instrumentos tradicionais de uso dos serviços.

### **3.6. Coleta e processamento de dados**

As mulheres admitidas no estudo foram submetidas a tratamento com metformina, administrada diariamente por via oral, em doses iniciais de 850mg (um comprimido) no horário do jantar, na primeira semana e em doses de 850mg (um comprimido) no desjejum e no horário do jantar, diariamente, a partir da segunda semana do estudo. Foram instruídas a manter a dieta que usualmente haviam utilizado durante todo o período de uso de medicação. O tratamento com metformina iniciou-se no dia 01 do estudo, que se definiu para cada mulher de acordo com seu ritmo menstrual.

Nas mulheres com oligomenorréia o dia 01 estava entre o terceiro e sexto dias pós-início de menstruação espontânea.

Naqueles com amenorréia o dia 01 distava ao menos 90 dias do último fluxo menstrual, tendo-se excluído gravidez por dosagem sanguínea de gonadotrofina coriônica e realizado dosagem de progesterona no soro, verificada sua concentração em nível inferior a 6,4nmol/L e confirmado que a mulher se encontrava no período folicular do ciclo.

No dia 01 do estudo, às 8:00 horas, cada mulher foi atendida no Ambulatório de Endocrinologia Ginecológica, confirmado estado de jejum de doze horas (previamente orientado na admissão), levada para local de repouso

em posição sentada e submetida à coleta da amostra de sangue (20cc) para análise das concentrações basais sangüíneas de glicose, insulina, FSH, LH, progesterona, testosterona, SHBG, testosterona livre, androstenediona e 17 hidroxiprogesteroína.

Esta coleta de sangue se fez por punção de veia na prega cubital com cateter (Abocath®) ou agulha, que permaneceu *in situ* pelo período de 180 minutos, mantido pérvio mediante perfusão de solução fisiológica de cloreto de sódio. Imediatamente após a coleta sangüínea, ministrou-se solução de glicose a 25% em água, por via oral, na quantidade de 75g de glicose, ingerida no prazo de até cinco minutos. O início de ingestão da solução de glicose se convencionou como o minuto zero do teste de tolerância à glicose. Amostras de sangue (5cc) foram então coletadas nos minutos +60, +120 e +180 para dosagem de glicose em frasco com anticoagulante e insulina em frasco seco. O volume de sangue coletado atingiu o total de 40cc neste procedimento. As mulheres permaneceram em repouso na cadeira durante todo o procedimento, não lhes sendo permitido fumar ou ingerir líquidos ou alimentos.

Todas as amostras sangüíneas foram acondicionadas em frascos previamente rotulados, aqueles destinados à dosagem da glicose foram resfriados a temperatura entre zero e 5°C por até 240 minutos. As dosagens de glicose foram realizadas no mesmo dia, no Laboratório de Patologia Clínica do HC-UNICAMP, pelo método de glicose oxidase. As alíquotas restantes, destinadas a dosagens hormonais foram deixadas coagular, em temperatura ambiente, tendo-se separado o soro por pipetagem e centrifugação a 2500 rpm por dez minutos

e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior análise por técnicas convencionais de radioimunoensaio ou ensaio imunoenzimático, sendo todas as amostras analisadas simultaneamente em um mesmo ensaio, com os mesmos *kits* comerciais.

Após ser realizada coleta sangüínea de 180 minutos, a mulher recebeu desjejum (café-da-manhã usual da enfermaria) e foi orientada no uso da medicação, na manutenção da dieta e no retorno agendado para quatro semanas após, no caso de mulheres amenorrêicas. As mulheres oligomenorrêicas tiveram seu retorno agendado posteriormente, para o período entre o terceiro e sexto dia pós-menstrual, após contato telefônico. No retorno, os procedimentos do dia 01 foram exatamente repetidos. Ao final das coletas a mulher foi orientada a suspender o uso da medicação, agendando retorno no ambulatório para 60 dias, sendo reforçadas instruções sobre cuidados cosméticos e outros, relacionados à sua patologia. Se necessário, prescreveu-se medicação específica.

### **3.7. Acompanhamento de sujeitos**

As mulheres admitidas no estudo passaram por quatro momentos de atendimento:

1. Consulta rotineira do Ambulatório de Endocrinologia Ginecológica, na fase de recrutamento.
2. Coleta de sangue para dosagem de progesterona e pesquisa de gonadotrofina coriônica.
3. Primeiro teste de tolerância à glicose (pré-medicação).
4. Segundo teste de tolerância à glicose (pós-medicação).

O intervalo entre o primeiro atendimento e o terceiro dependeu da fase menstrual da mulher. Entre o terceiro e quarto atendimentos decorreram-se 28 a 42 dias. A falta da mulher ao segundo atendimento foi interpretada como desistência à participação.

### **3.8. Análise estatística**

Os dados coletados foram ordenados em tabelas de contingência e processados para obtenção de médias e desvios-padrão. As áreas sob as curvas das concentrações da glicose e da insulina foram calculadas segundo a regra de cálculo da área dos trapézios, utilizando-se os valores de zero, 60, 120 e 180 minutos. Os resultados se expressam em valores individuais ou em médias e desvios-padrão.

Dentro do grupo os resultados das dosagens hormonais, da glicose e da SHBG antes e depois do tratamento foram comparados em um mesmo indivíduo utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (HOLLANDER & WOLFE, 1973), tendo em vista que o número de sujeitos não permitiu inferir a normalidade de distribuição dos dados.

Identificadas as variáveis que sofreram modificações significativas com o tratamento, foram então buscadas as correlações entre estas variações e as modificações das outras variáveis, por estudo pareado de correlação de Pearson (COX, 1987).

Finalmente, foram estudadas as relações independentes entre as variações das concentrações hormonais através de técnica de regressão linear múltipla buscando modelos explanatórios para as variáveis dependentes, definidas anteriormente pela modificação detectada pela análise dos resultados pré e pós-tratamento.

Nesta análise, utilizou-se a técnica de seleção *stepwise* de regressão múltipla (MONTGOMERY & PECK, 1982) através do pacote estatístico *SAS-Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Considerou-se em todo o processo analítico, o nível de significação inferior a 0,05 para a rejeição da hipótese de nulidade.

### **3.9. Avaliação hormonal**

O sangue colhido, após coagulado, teve o soro separado por pipetagem e centrifugação, separado em alíquotas e então congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise. Para evitar variação de resultados entre os ensaios, todas as dosagens foram realizadas em duplicata, dentro de um mesmo procedimento, para cada hormônio ou fator a se dosar.

- *Insulina*: foi realizada dosagem em duplicata por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando o Iodo 125 como marcador e calibradores standardizados segundo o primeiro IRP para insulina da Organização Mundial da Saúde (OMS) de número 66/304. Utilizou-se o procedimento de incubação longa (18 horas) que tem sensibilidade para  $1,2\mu\text{UI/mL}$ , reação cruzada com pró-insulina de 40% nas

concentrações intermediárias e CV intra-ensaio inferior a 9% nas concentrações entre 5 e 400 $\mu$ UI/mL. Quando necessário, realizou-se diluição da amostra a 50%. A leitura de cintilação se fez em câmara gamma. Utilizou-se *kit* comercial fornecido pela empresa *Diagnostic Products Corporation* (DPC) de Los Angeles, EUA, com nome fantasia de *Coat-a-count insulin*.

- *Testosterona total*: realizada em duplicata, sem prévia diluição, por ensaio imunoenzimático, quemiluminescência e análise automatizada, pelo sistema Immulite usando *kit* comercial fornecido pela DPC, Los Angeles, EUA. Foram utilizados calibradores entre 0,2 e 16ng/mL (0,7 e 55nmol/L). Os CV intra-ensaio foram de 4,3% para concentrações altas, 7,4% para médias e 13% para baixas. O limite inferior de detecção do método foi de 0,1ng/mL.
- *Testosterona livre*: realizada em duplicata, sem prévia diluição, por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando o Iodo 125 como marcador e calibradores standardizados em concentrações de 0,55 a 50pg/mL (1,9 a 173pmol/L), pelo sistema *Coat-a-count* em *kit* comercial fornecido pela DPC, de Los Angeles, EUA. O ensaio tem sensibilidade para concentrações de 0,15pg/mL (3,5pmol/L) com CV intra-ensaio inferior a 4,3% na faixa de calibragem.
- *Sulfato de Dehidroepiandrosterona*: realizada em duplicata, sem prévia diluição, por enzimoimunoensaio, quemiluminescência e leitura automatizada pelo sistema Immulite, usando *kit* comercial fornecido pela DPC, Los Angeles, EUA. Foram usados calibradores entre 30 e 1000 $\mu$ g/dL (0,12 e 27,14 $\mu$ mol/L). Os CV intra-ensaio foram inferiores a 9,5%, o limite de detecção do método de 2 $\mu$ g/dL (0,05 $\mu$ mol/L).
- *SHBG*: realizado em duplicata após prévia diluição, por enzimoimunoensaio, quemiluminescência e leitura automatizada pelo sistema Immulite, usando *kit* comercial fornecido pela DPC, Los Angeles, EUA. Foram

usados calibradores de baixa e alta concentrações que permitem leitura de concentrações entre 0,2 e 180nmol/L com CV intra-ensaio inferior a 7,8%.

- *Androstenediona*: realizado em duplicata, sem prévia diluição, por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando o Iodo 125 como marcador e calibradores estandardizados entre 0,1 e 10ng/mL (0,34 e 34,5nmol/L), com kit comercial fornecido pelo *Diagnostic System Laboratories, Inc, Webster, EUA*. O ensaio tem sensibilidade para concentrações a partir de 0,03ng/mL (0,10nmol/L) e CV intra-ensaio inferior a 5,7%.
- *17 hidroxiprogesteron*: realizado em duplicata, sem prévia diluição, por radioimunoensaio em fase sólida utilizando o Iodo 125 como marcador e calibradores estandardizados em concentrações de 0,1 a 25ng/mL (0,34 a 85nmol/L) com *kit* comercial fornecido pela *ICN Biomedicals, Inc, Costa Mesa, EUA*. O ensaio tem sensibilidade para concentrações de 0,34nmol/L com CV intra-ensaio inferior a 8,4%.
- *Hormônio luteinizante*: realizado em duplicata, sem prévia diluição, por enzimoimunoensaio fluorimétrico e análise automatizada pelo sistema Stratus, usando *kit* comercial fornecido por *DADE International Inc, Miami, EUA*. Foram utilizados calibradores entre 0 e 200mUI/mL estandardizados segundo o 2<sup>nd</sup> IRP da OMS 80/552, com CV intra-ensaio de 1,85 a 8,12%.
- *Hormônio folículo-estimulante*: realizado em duplicata, sem prévia diluição, por enzimoimunoensaio fluorimétrico e análise automatizada pelo sistema Stratus usando *kit* comercial fornecido por *DADE International Inc, Miami, EUA*. Foram utilizados calibradores entre zero e 150mUI/mL estandardizados segundo o 2<sup>nd</sup> IRP da OMS 78/549, com CV intra-ensaio de 2,1 a 4,34%.

### 3.10. ASPECTOS ÉTICOS

Neste estudo, incluíram-se somente mulheres portadoras de condições mórbidas - obesidade, hirsutismo e disfunção menstrual – que implicam em controle médico e terapêutico. Introduziram-se, no entanto, três componentes novos à rotina assistencial do serviço: o primeiro se refere à aplicação do teste de tolerância à glicose com coleta de amostras sangüíneas para dosagem da insulina.

O segundo se refere ao tratamento com metformina para mulheres sob o pressuposto da existência de hiperinsulinemia decorrente de resistência insulínica secundária à obesidade, e agravada pelo estado inerente à síndrome da anovulação crônica hiperandrogênica.

Finalmente, o terceiro componente novo incluiu a repetição da coleta sangüínea para dosagem dos mesmos produtos analisados na fase diagnóstica, para efeitos de comparação e avaliação de resultados.

A metformina é produto utilizado amplamente no Brasil e no mundo, sob a indicação terapêutica do controle do diabete melito tipo II e para a redução da resistência à insulina associada à obesidade da síndrome X (obesidade, insulino-resistência, dislipidemia, doença cardio-vascular). Extensas revisões sobre farmacocinética, farmacodinâmica, toxicologia, uso terapêutico e contra-indicações do produto foram consultadas e embasaram a definição de critérios de admissão e exclusão ao estudo.

Às voluntárias ao estudo foram explicitados os três novos componentes que se somavam aos protocolos rotineiros do serviço e, dentre aquelas incluídas

na pesquisa, foram obtidos consentimentos expressos após informação detalhada dos procedimentos, de seus benefícios e riscos potenciais.

Os benefícios pessoais conseqüentes ao diagnóstico apurado da condição endócrino-metabólica de cada mulher foram evidentes. Permitiu-se, por um lado, o diagnóstico de quatro casos de intolerância à glicose ou diabetes melito. Por outro lado, cada mulher avaliada teve a oportunidade de receber terapêutica não mais voltada exclusivamente para suas queixas mais relevantes, e sim para a condição metabólica subjacente, com alcance que se estende além do sintoma presente.

O protocolo da pesquisa e o termo de consentimento informado foram avaliados e aprovados pelas comissões institucionais de Revisão de Pesquisa e Ética Médica, com os pressupostos de que todos os princípios contidos na DECLARAÇÃO DE HELSINKI (1990), incluindo suas emendas, assim como as determinações legais nacionais que regem a pesquisa envolvendo seres humanos estavam sendo cumpridos.

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Apresentação dos casos estudados

Foram admitidas ao estudo 11 mulheres, entre junho e outubro de 1997, cujas características se apresentam na Tabela 1. A idade das voluntárias variou entre 17 e 35 anos. Todas, com exceção de uma, eram nuligestas.

De conformidade com os critérios de admissão todas apresentavam hirsutismo (índice de Ferriman e Gallwey de 14 a 24), eram obesas (IMC 28 a 40) e tinham alterações menstruais: seis tinham ritmo menstrual predominantemente oligomenorrêico e cinco se encontravam em amenorréia.

Todas as mulheres apresentaram relação abdômino-glútea superior a 0,8, evidenciando padrão andróide de obesidade; a lesão cutânea de *acantose nigricans* foi observada no exame clínico de três.

Quatro pacientes referiram antecedente de cirurgia para tratamento de cistos ovarianos: um caso teve diagnóstico histopatológico de cisto teca-luteínico; três casos tiveram diagnóstico de cistoadenoma seroso do ovário. Dentre estas

pacientes, três foram submetidas à remoção simples do cisto com preservação da gônada e uma foi submetida à ooforectomia unilateral.

O tempo de tratamento com metformina foi em média de  $5,1 \pm 0,6$  semanas. Todas as mulheres referiram a ocorrência de sintomatologia de náuseas na primeira e segunda semanas de tratamento, que diminuiu na terceira semana, inexistindo como sintoma referido a partir de então. Quatro voluntárias apresentaram queixa de episódios eventuais de evacuações líquidas ou semilíquidas. Em nenhum caso foi necessário suspender a ingestão do medicamento por mais de uma dose.

**TABELA 1**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS MULHERES NA ADMISSÃO AO ESTUDO**

Paciente	Paridade	Peso	IMC	CA/CQ	Ritmo Menstrual	Índice de Ferriman	<i>Acantose Nigricans</i>
1	0	95,3	33	0,84	Oligo	20	não
2	0	80,5	34	0,80	Oligo	15	não
3	0	74,5	28	0,96	Oligo	20	não
4	2	65,3	28	0,89	Oligo	23	<i>sim</i>
5	0	77,3	36	0,99	Ameno	18	não
6	0	66,0	28	0,89	Ameno	14	não
7	0	110,9	40	0,94	Ameno	18	<i>sim</i>
8	0	72,0	29	0,80	Oligo	14	não
9	0	84,1	32	1,04	Ameno	24	<i>sim</i>
10	0	117,5	39	0,92	Ameno	18	não
11	0	85,9	33	0,92	Oligo	16	não

Na avaliação dos níveis glicêmicos observados durante o teste de tolerância à glicose oral (Tabela 2), considerados os níveis de normalidade definidos pelo *National Diabetes Data Group* e pela Organização Mundial da Saúde, foram consideradas como normais sete mulheres, como intolerantes à glicose duas e como diabéticas duas mulheres. Não foram observados casos com hiperglicemia em jejum, o que corresponde ao critério de exclusão previsto na metodologia de admissão ao estudo.

**TABELA 2**  
**NÍVEIS GLICÊMICOS AFERIDOS DURANTE TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE NA FASE PRÉ-TRATAMENTO**

Paciente	Glicemia(mg/dL)	
	Jejum	120 min
1	88	121
2	94	66
3	88	<b>140</b>
4	91	100
5	87	<b>146</b>
6	88	93
7	76	108
8	72	82
9	80	<b>222</b>
10	109	<b>206</b>
11	84	107

Níveis glicêmicos de referência no TTG oral (mg/dL)

	Jejum	120 minutos
Normal	< 110	< 140
Intolerante	110 – 125	140 – 200
Diabético	> 125	> 200

Fator de conversão da glicose para SI = x 0,055.

Fonte: Expert Committe on the Diagnosis and Classification of Diabete melito, 1997.

#### 4.2. Estudo do efeito do tratamento com metformina sobre as características antropométricas

A utilização da metformina no período estudado não produziu modificações significativas nas características antropométricas das mulheres participantes, como se vê na Tabela 3. O peso corporal, considerando cada mulher individualmente, não sofreu variação superior a 1,8 %, tendo ocorrido algum aumento do peso em cinco e alguma redução em seis mulheres. Da mesma forma, não houve variação individual ou coletiva de alguma significação do índice de massa corporal e da relação abdômino-glútea (CA/CQ) nas mulheres deste estudo.

**TABELA 3**  
**CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DAS MULHERES**  
**ANTES E APÓS TRATAMENTO COM METFORMINA**

Paciente	Peso		IMC		CA/CQ	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
1	95,3	94,0	33	33	0,84	0,82
2	80,5	79,0	34	34	0,80	0,81
3	74,5	74,0	28	28	0,96	0,98
4	65,3	66,0	28	28	0,89	0,89
5	77,3	78,0	36	36	0,99	1,00
6	66,0	66,5	28	28	0,89	0,89
7	110,9	112,0	40	40	0,94	0,92
8	72,0	71,0	29	29	0,80	0,80
9	84,1	83,5	32	32	1,04	1,06
10	117,5	118,4	39	39	0,92	0,90
11	85,9	85,7	33	33	0,92	0,92
Média	84,5	84,4	33	33	0,92	0,92
Desvio-padrão	16,3	16,6	4,2	4,3	0,06	0,06
P	>0,517		>0,517		>0,517	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

#### **4.3. Estudo dos efeitos do tratamento com metformina sobre os níveis sanguíneos da glicose e da insulina**

Não ocorreram modificações significativas nas médias dos valores glicêmicos durante TTG oral entre as fases pré e pós-tratamento. A Figura 1 mostra os valores individuais das áreas sob as curvas da glicose no TTG. Pode-se observar alguma redução dos níveis glicêmicos no caso de número 9, provavelmente traduzindo o efeito terapêutico da metformina sobre níveis francamente hiperglicêmicos na curva da tolerância à glicose. A Tabela 4 ilustra as médias de concentração da glicose durante TTG oral realizado antes e após tratamento, com quase superposição dos valores e diferenças mínimas sem significado estatístico.

**TABELA 4**  
**VALORES MÉDIOS DAS GLICEMIAS DURANTE TTG ORAL ANTES E**  
**APÓS TRATAMENTO COM METFORMINA**

	Tratamento		p
	Antes	Depois	
Jejum (mg/dL)	87,0 ± 9,7	84,4 ± 7,9	0,31
60 minutos	143,0 ± 42,8	143,6 ± 44,1	0,96
120 minutos	126,4 ± 49,2	122,7 ± 29,8	0,68
180 minutos	91,8 ± 27,1	84,7 ± 23,4	0,36

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

A comparação dos valores das áreas sob as curvas da insulina durante TTG, considerando um limite arbitrário de normalidade de 1800 pmol/L x 3 horas, permitiu classificar nove mulheres como hiperinsulínicas no primeiro teste. Após tratamento, ocorreu normalização das curvas em duas mulheres e redução dos valores em todas as outras (Figura 2). A comparação das áreas sob as curvas insulínicas mostrou redução significativa, em média de 31% (p=0,034) e se ilustra na Figura 3.



#### 4.4. Estudo dos efeitos do tratamento com metformina sobre as concentrações das gonadotrofinas, dos esteróides e da SHBG

Individualmente (Tabela 5), duas mulheres tinham níveis superiores ao limite de referência da testosterona (ANEXO 2), que se normalizaram após tratamento com metformina. Havia cinco mulheres com níveis superiores ao limite de referência da testosterona livre, tendo tais valores se reduzido em todas, normalizando-se em duas. Dentre duas mulheres que apresentavam níveis sanguíneos muito baixos de SHBG, menores que o limite inferior de referência, em uma ocorreu elevação acima desse patamar.

**TABELA 5**  
**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS GONADOTROFINAS, ESTERÓIDES**  
**E SHBG ANTES E APÓS TRATAMENTO COM METFORMINA**

	Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	$\bar{X} \pm s$	P
<b>FSH</b> (UI/L)	Pré	7,7	3,6	3,6	8,6	8,8	7,3	7,8	6,9	7,0	5,7	3,6	6,4±1,9	>0,517
	Pós	6,4	3,5	5,3	8,1	3,7	7,2	7,2	7,2	8,0	5,2	4,0	6,0±1,6	
<b>LH</b> (UI/L)	Pré	6,8	2,9	2,2	6,4	6,5	11,0	5,3	2,8	4,9	4,4	2,5	5,1±2,5	>0,517
	Pós	4,9	2,0	3,5	2,8	2,9	15,8	4,5	3,2	3,6	4,2	3,7	4,6±3,6	
<b>LH/FSH</b>	Pré	0,9	0,8	0,6	0,7	0,7	1,5	0,7	0,4	0,7	0,8	0,7	0,8±0,3	>0,517
	Pós	0,8	0,6	0,7	0,3	0,8	2,2	0,6	0,4	0,5	0,8	0,9	0,8±0,5	
<b>Testosterona</b> (nmol/L)	Pré	3,2	1,6	1,8	3,2	4,2	3,0	3,3	1,6	5,2	3,5	1,9	2,9±1,1	=0,021
	Pós	2,8	1,8	1,0	1,8	3,2	1,9	3,0	1,5	3,8	1,6	1,5	2,1±0,8	
<b>Testo Livre</b> (pmol/L)	Pré	9,2	7,6	7,1	30,1	28,1	9,0	28,5	6,2	29,2	24,3	7,7	17,0±10,1	=0,034
	Pós	2,2	4,6	7,1	6,8	7,4	11,3	24,0	3,8	19,7	16,2	7,3	10,1±6,6	
<b>Progesterona</b> (nmol/L)	Pré	2,7	3,5	3,2	3,5	5,2	3,4	2,4	2,1	4,1	3,8	1,8	3,2±0,9	>0,517
	Pós	3,1	4,1	2,4	3,5	4,2	3,8	2,5	2,3	3,3	2,8	1,0	3,1±0,7	
<b>17αOHProg</b> (nmol/L)	Pré	7,0	7,6	3,2	7,3	15,2	4,4	5,5	3,1	4,6	6,6	7,1	6,5±3,1	=0,087
	Pós	2,9	7,1	2,2	6,0	6,5	4,9	5,2	2,7	5,1	4,3	2,3	4,5±1,7	
<b>SDHEA</b> (μmol/L)	Pré	3,0	3,1	3,3	4,9	5,8	4,4	1,8	5,3	5,5	12,6	2,7	4,8±2,7	>0,517
	Pós	2,7	3,5	4,5	4,6	4,2	4,3	2,6	5,2	4,4	12,3	2,7	4,6±2,6	
<b>Δ4-Androst</b> (nmol/L)	Pré	10,5	7,4	7,9	9,9	15,2	8,9	10,3	9,0	9,7	11,9	9,4	10,1±2,0	=0,087
	Pós	7,7	5,7	7,8	8,7	9,8	11,0	9,4	9,4	9,0	7,7	7,1	8,3±1,4	
<b>SHBG</b> (nmol/L)	Pré	41	45	53	18	20	70	46	124	14	21	58	46±30	=0,042
	Pós	48	50	40	44	51	80	64	153	12	25	41	55±35	
<b>IAL</b>	Pré	7,9	3,5	3,5	17,5	20,8	4,3	7,2	1,3	37,1	16,5	3,3	11,2±10,4	=0,027
	Pós	5,9	3,6	2,4	4,2	6,3	2,4	4,7	1,0	31,8	6,5	3,6	6,6±8,1	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

Comparados os resultados das dosagens hormonais antes e após tratamento (Tabela 6), observaram-se reduções significativas nas concentrações da testosterona livre (em média, - 41%), da testosterona total (- 27%), do índice de androgênios livres (- 41%) e aumento da SHBG (+ 19%). Foram ainda observadas reduções de 31% nas concentrações da 17 hidroxiprogesteroona e de 17% nas de androstenediona, que, no entanto, não alcançaram significação estatística (em ambos os casos  $0,05 < p < 0,10$ ). As concentrações do sulfato de DHEA e das gonadotrofinas LH e FSH passaram por modificações muito discretas no período de tratamento, não havendo significação estatística, e foram menores que os limites dos coeficientes de variação intra-ensaio que os métodos de análise apresentaram.

**TABELA 6**

**CONCENTRAÇÕES HORMONAIS E DA SHBG ( MÉDIA E DESVIO-PADRÃO) NAS MULHERES COM ANOVULAÇÃO CRÔNICA HIPERANDROGÊNICA ANTES E APÓS TRATAMENTO**

	Pré tratamento	Pós tratamento	Varição %	P
<b>FSH</b> (UI/L)	6,41 ( 1,90)	5,98 ( 1,64)	- 6	>0,517
<b>LH</b> (UI/L)	5,06 ( 2,47)	4,64 ( 3,61)	- 8	>0,517
<b>ASCInsulina</b> (pmol/L x 3 h.)	5076 (3168)	3468 (2850)	- 32	<b>=0,034</b>
<b>Testosterona</b> (nmol/L)	2,95 ( 1,07)	2,15 ( 0,83)	- 27	<b>=0,021</b>
<b>Testosterona livre</b> (pmol/L)	16,99 (10,05)	10,05 ( 6,59)	- 41	<b>=0,034</b>
<b>Sulfato de DHEA</b> (μmol/L)	4,75 ( 2,77)	4,61 ( 2,55)	- 3	>0,517
<b>Δ4-Androstenediona</b> (nmol/L)	10,01 ( 2,00)	8,28 ( 1,38)	- 17	=0,087
<b>17αOHProgesterona</b> (nmol/L)	6,39 ( 3,09)	4,42 ( 1,63)	- 31	=0,087
<b>SHBG</b> (nmol/L)	46,40 (30,10)	55,30 (35,20)	19	<b>=0,042</b>
<b>Índice Androgênios Livres</b>	11,16 (10,39)	6,57 ( 8,13)	- 41	<b>=0,027</b>

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

Foram avaliadas as correlações entre as variações nos níveis hormonais ocorridas no período de tratamento com metformina (Tabela 7). Analisados os coeficientes de correlação de Pearson (Cox, 1987) entre as variáveis que se modificaram significativamente com o tratamento, foram evidenciadas correlações fortes, diretas e altamente significativas entre os níveis da testosterona livre e o índice de androgênios livres ( $p=0,0001$ ), o LH ( $p=0,0007$ ) e a área sob a curva da insulina ( $p=0,008$ ). A testosterona e o IAL exibiram correlação direta também significativa ( $p=0,023$ ) e ocorreu correlação inversa entre as variações da SHBG e do FSH ( $p=0,043$ ).

**TABELA 7**  
**CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIAÇÕES HORMONAIIS E AS MODIFICAÇÕES DAS VARIÁVEIS QUE SE ALTERARAM SIGNIFICATIVAMENTE COM O TRATAMENTO PELA METFORMINA**

		R	p
ASCInsulina	Testosterona livre	0,75	0,008
	IAL	0,65	0,030
	Sulfato DHEA	0,63	0,039
Testosterona	IAL	0,67	0,023
Testosterona livre	IAL	0,91	0,0001
	LH	0,86	0,0007
	Insulina	0,75	0,008
	Sulfato DHEA	0,63	0,037
	FSH	0,62	0,040
IAL	Testosterona livre	0,91	0,0001
	Testosterona	0,67	0,023
	Sulfato DHEA	0,65	0,031
	Insulina	0,65	0,031
	LH	0,64	0,034
	FSH	0,64	0,035
SHBG	FSH	- 0,62	0,043

Dentre todos os fatores estudados, aquele que mostrou a máxima correlação com as modificações da área sob a curva da insulina durante o TTG oral foi a concentração de testosterona livre, com coeficiente de correlação positiva de Pearson de 0,75,  $p=0,008$ .

Foi então estudada a regressão linear múltipla das variações das concentrações hormonais, visando a identificar o relacionamento independente entre as concentrações dos diversos hormônios e da SHBG, ocorridos no período de tratamento com metformina. Neste passo, o índice de androgênios livres deixou de ser considerado no conjunto de variáveis explanatórias, visto que já estavam considerados seus dois determinantes numéricos (testosterona total e SHBG) e que se buscavam modelos integrando variáveis. Foi utilizada a técnica de seleção *stepwise* de regressão múltipla, cujos resultados se resumizam na tabela 8.

**TABELA 8**

**RELAÇÕES ENTRE AS MODIFICAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES HORMONAIS ANTES E APÓS TRATAMENTO COM METFORMINA – SUMÁRIO DA REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA**

Variável dependente	Variável explanatória	R modelo	P
Insulina	Testosterona livre	0,560	0,008
Testosterona	Insulina	0,429	0,036
SHBG	FSH		0,043
	(17 $\alpha$ OHprogesterona)	0,704	0,018
IAL	Testosterona livre		0,0001
	Testosterona		0,007
	FSH		0,02
	Insulina	0,985	0,05
Testosterona livre	LH		0,0007
	Testosterona		0,023
	( SHBG )	0,930	0,04

As reduções nas concentrações da testosterona livre foram o único determinante significativo identificado para as reduções das áreas sob as curvas da insulina, com coeficiente de determinação de 0,56 ( $p=0,008$ ).

A redução da área sob a curva da insulina foi o único determinante significativo da redução da concentração sérica da testosterona identificado ( $R^2=0,43$ ,  $p=0,036$ ).

A variação das concentrações da SHBG pode ser parcialmente explicada por um modelo que integra duas variáveis significativas, as variações do FSH em relação direta e as da 17 hidroxiprogesteroona em relação inversa ( $R^2=0,704$ ,  $p=0,007$ ).

As variações observadas no índice de androgênios livres puderam ser explicadas por um modelo de regressão integrando quatro variáveis: testosterona livre, testosterona, FSH e área sob a curva da insulina, com coeficiente de determinação  $R^2=0,985$  (quase a totalidade da variância) e  $p=0,0001$ .

O modelo de regressão linear que melhor se ajustou às variações das concentrações da testosterona livre incluiu as variações do LH, da testosterona e da SHBG, também com altos coeficiente de determinação e significação estatística ( $R^2=0,930$ ,  $p=0,0002$ ).

## 5. DISCUSSÃO

---

Este estudo demonstrou que o uso da metformina acarreta redução da resposta insulínica ao estímulo com glicose, por via oral, em mulheres obesas, com características de anovulação crônica e sinais de hiperandrogenismo.

Além disto, esta redução se acompanha da diminuição dos níveis sangüíneos da testosterona, de sua fração livre, do índice de androgênios livres e de aumento das concentrações da SHBG.

Mulheres obesas com anovulação e hiperandrogenismo freqüentemente têm resistência insulínica aumentada, expressa por hiperinsulinemia durante TTG oral, como ocorreu com nove dentre as 11 mulheres participantes deste estudo. Este fato tem sido demonstrado desde 1980 (BURGHEN et al., 1980), através de estudos que analisaram a curva insulínica durante TTG oral com glicose (DUNAIF et al., 1987; KE, SHAN, HUA, 1996), o ritmo de desaparecimento da circulação da glicose injetada por via intravenosa (HERBERT, HILL, DIAMOND, 1990; GELDING, et al., 1994) ou o metabolismo da insulina exógena em estudos de *clamps* euglicêmicos hiperinsulínicos (HOLTE et al., 1994; MORALES et al., 1996).

As mulheres participantes deste estudo eram predominantemente hiperinsulinêmicas. Nove dentre as 11 tiveram curvas insulínicas com área superior a 1800pmol/L x 3 horas, limite arbitrário baseado em população feminina brasileira (PUPO & PUPO, 1989).

As concentrações da glicose observadas no TTG oral identificaram duas mulheres com intolerância e duas com curvas diabéticas, que não apresentaram hiperglicemia em jejum. Estes achados concordam com outros estudos envolvendo mulheres obesas com anovulação crônica e hiperandrogenismo.

Estudo metabólico envolvendo mulheres brasileiras obesas e magras, hiperandrogênicas e normais, identificou quatro mulheres com intolerância à glicose dentre 14 mulheres magras e seis dentre 15 obesas com ACH (REIS, 1993); outro estudo nacional encontrou duas intolerantes dentre nove mulheres obesas com ACH (ARIÊ, 1995).

Em 1987 já havia consenso nos estudos do metabolismo da glicose em mulheres com hiperandrogenismo e anovulação (DUNAIF, 1987): 20% a 40% das mulheres portadoras de tal diagnóstico preencheram os critérios da Organização Mundial da Saúde (MODAN, HARRIS, HALKIN, 1989) para intolerância à glicose.

A despeito do fato de que a hiperinsulinemia como reflexo de algum grau de resistência insulínica seja reconhecida desde o início da década de 80 (BURGHEN et al., 1980), o estudo da fisiopatologia do metabolismo da glicose em mulheres hiperandrogênicas anovulatórias data de dez anos.

Tem-se desenvolvido técnicas bastante precisas para avaliar a sensibilidade à ação da insulina *in vivo*, particularmente nos seus efeitos sobre o metabolismo da glicose. Atualmente, a técnica mais valorizada pela sua precisão é a que utiliza o *clamp* euglicêmico hiperinsulínico, que afere a captação periférica da glicose mediada pela insulina. Esta captação tem-se mostrado consistentemente reduzida de 35% a 40 % em mulheres portadoras da ACH (DUNAIF et al., 1988; DUNAIF et al., 1991), redução de magnitude similar a que se observa no diabetes melito não-insulino dependente.

A obesidade *per se*, a distribuição corporal da adiposidade (YKI JARVINEN & KOIVISTO, 1983) e a massa muscular (DUNAIF, 1995) têm efeitos independentes e importantes na sensibilidade insulínica. Modificações em quaisquer destes parâmetros poderão potencialmente contribuir para a resistência insulínica da ACH.

As mulheres participantes de nosso estudo apresentam características que favorecem a resistência insulínica: são obesas, têm alta relação abdômino-glútea e são hiperandrogênicas – o hiperandrogenismo pode indiretamente estar contribuindo para a resistência insulínica ao estimular o desenvolvimento da massa muscular.

É ainda possível que o hiperandrogenismo contribua para a resistência insulínica se forem extrapoladas as observações relacionadas ao uso exógeno de androgênios (POLDERMAN et al., 1994; DIAMANTI KANDARAKIS et al., 1995).

Era, portanto, esperada a alta incidência de resistência insulínica observada neste estudo, considerando as características dos sujeitos participantes.

Em 1994, no que talvez tenha sido o primeiro estudo a avaliar o tratamento com metformina para mulheres anovulatórias hiperandrogênicas (VELAZQUEZ et al., 1994), evidenciou-se uma redução dos níveis insulínicos de 35% após oito semanas de tratamento, com simultâneas reduções das concentrações da testosterona e de sua fração livre e aumento das concentrações da SHBG, entre outras alterações bioquímicas. No entanto, em decorrência de um efeito já conhecido da metformina, observou-se significativa perda de peso corporal nas mulheres estudadas durante o período de tratamento, a que se pode imputar pelo menos parte da redução dos níveis insulínicos.

Consistente com esta hipótese, estudo acompanhando mulheres sob tratamento com metformina, e que perderam peso, mostrou que o tratamento não foi melhor que a perda de peso na redução do hiperandrogenismo de mulheres com anovulação crônica hiperandrogênica (CRAVE et al., 1995).

O presente estudo foi realizado no sentido de determinar se a metformina administrada a mulheres obesas, com anovulação crônica hiperandrogênica resulta na redução da hiperinsulinemia enquanto se mantém o peso corporal. Neste sentido, os dados demonstram que, mantidos os índices de massa corporal e as relações abdômino-glúteas destas mulheres, o tratamento a curto prazo com a metformina reduziu em média em 31% a resposta insulínica ao TTG oral.

Estudo com resultados semelhantes (DUNAIF, 1996) utilizando um outro agente com o objetivo de reduzir a resistência insulínica ratifica as conclusões deste trabalho: o tratamento com troglitazona de mulheres obesas com anovulação crônica hiperandrogênica se acompanhou de redução dos níveis insulínicos durante TTG oral de, em média, 32%. Não houve alterações significativas do IMC das mulheres e a aferição da sensibilidade insulínica através do teste de tolerância à glicose endovenosa (FSIGT) confirmou os achados da curva insulínica no TTG oral.

O efeito redutor dos níveis insulínicos por drogas “sensibilizadoras da insulina” também se manifesta em mulheres magras insulino-resistentes.

O tratamento com metformina de mulheres com peso normal (IMC=21,7±0,3) produziu redução de 45% na área sob a curva insulínica aferida no TTG oral (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996); também os níveis insulínicos de jejum se reduziram significativamente, em média, de 56%. Nesse estudo também não se detectaram variações significativas na massa corporal das mulheres.

Ainda se discutem os mecanismos pelos quais a hiperinsulinemia produz hiperandrogenismo e se a fonte deste é exclusivamente ovariana ou se envolve também as adrenais.

Em nosso estudo foram identificadas quatro dentre 11 mulheres com níveis basais elevados de androstenediona (>10,32 nmol/L) e 11 dentre 11 com níveis basais elevados de 17 hidroxiprogesteroína (>2,72 nmol/L). Os números para a 17 hidroxiprogesteroína parecem excessivamente altos; provavelmente,

o critério de normalidade utilizado, com limite superior em 2,72 nmol/L seja inadequado para mulheres obesas. Deve-se lembrar que estas mulheres apresentaram resposta adrenal normal ao estímulo com ACTH.

Neste estudo, as concentrações médias desse hormônio na fase pré-tratamento foram de  $6,4 \pm 3,1$  nmol/L, cerca de 50% maiores que as concentrações referidas para mulheres obesas com ACH nos estudos de NESTLER & JAKUBOWICZ (1996).

Após tratamento, os níveis se reduziram para  $4,4 \pm 1,6$  nmol/L ( $0,05 < p < 0,10$ ). Fato semelhante ocorreu com as concentrações da androstenediona – eram de  $10,0 \pm 2,0$  nmol/L e se reduziram para  $8,5 \pm 1,4$  nmol/L ( $0,05 < p < 0,10$ ).

Este estudo identificou também uma média elevada das concentrações da testosterona livre, devido, principalmente, aos valores muito elevados apresentados por cinco das mulheres estudadas.

As concentrações da testosterona total não estiveram elevadas na média das 11 mulheres, fato concordante com muitos outros estudos envolvendo mulheres obesas com anovulação crônica hiperandrogênica (BARDIN & LIPSETT, 1967; DEVANE et al., 1975; BARBIERI, & HORNSTEIN, 1988; FRANKS, 1989), havendo entre as 11 mulheres, duas com níveis da testosterona total claramente aumentados.

A análise de regressão linear permitiu identificar a redução da área sob a curva da insulina durante TTG oral, como o único determinante significativo da redução dos níveis séricos da testosterona. Como a área sob a curva da

insulina expressa os níveis insulínicos alcançados nas horas que se seguem ao estímulo glicêmico, pode-se inferir que os níveis aumentados de testosterona nestas pacientes estavam, ao menos em parte, determinados pela sua hiperinsulinemia, e que sua redução foi acarretada pela redução dos níveis insulínicos em decorrência do tratamento com metformina.

A observação das reduções nos níveis destes androgênios após tratamento com metformina, tendo em vista que este tratamento não altera os níveis androgênicos de mulheres normais (EHRMANN et al., 1997a; NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996), sinaliza para uma participação importante da hiperinsulinemia na gênese do hiperandrogenismo de mulheres obesas com anovulação crônica hiperandrogênica.

Tendo em vista que não se detectaram modificações significativas das concentrações das gonadotrofinas, há que supor uma ação direta da hiperinsulinemia sobre a produção de androgênios dos ovários e adrenais.

Existe considerável evidência de que a insulina possa estar envolvida na esteroidogênese adrenal, podendo influenciar sua resposta ao estímulo com ACTH (LANZONE et al., 1992; McKENNA & CUNNINGHAM, 1995; GONZALES et al., 1996; MARTIKAINEN et al., 1996).

Parece que as adrenais de mulheres com anovulação crônica hiperandrogênica são hiper-responsivas ao ACTH e que as anormalidades nelas não se restringem à produção excessiva de androgênios, podendo envolver também a produção e *clearance* do cortisol (LOUGHLIN et al., 1986).

BARNES et al., (1989) sugeriram que a enzima responsável pela produção da 17 hidroxiprogesteroona, a 17 hidroxilase, e a enzima responsável pela conversão em androstenediona, a 17-20 lyase, estão hiperativas nos ovários e nas adrenais de mulheres com anovulação crônica hiperandrogênica. Eles se basearam na constatação de que ocorre resposta excessiva da 17 hidroxiprogesteroona e da androstenediona quando a adrenal é estimulada com ACTH, fato comprovado durante supressão ovariana com GnRH (GONZALES et al., 1996) e através de cateterização seletiva das veias ovarianas e adrenais (MARTIKAINEN et al., 1996).

No presente estudo, observou-se correlação significativa entre os níveis do sulfato de dehidroepiandrosterona e os valores da área sob a curva insulínica no TTG oral, havendo ainda correlações entre os níveis deste com os da testosterona livre e com o índice de androgênios livres. Esta constatação sugere que a insulina estimula o hiperandrogenismo também por ação adrenal, considerando a origem tipicamente adrenal do sulfato de DHEA (HOFFMAN , KLOVE, LOBO , 1984).

A insulina se mostra experimentalmente capaz de estimular *in vivo* a produção ovariana de estrogênios, androgênios e da progesterona (NESTLER & STRAUSS III, 1991). Ainda que alguns estudos avaliem a ação ovariana de grandes concentrações de insulina, este efeito tem sido demonstrado com concentrações fisiológicas, da ordem de 600pmol/L, níveis que se detectam em mulheres obesas, não insulino-resistentes, durante as primeiras duas horas após uma refeição (HOLTE et al., 1994; DUNAIF & FINEGOOD, 1996 ).

Recentemente têm surgido informações que ajudam a esclarecer aspectos do mecanismo de ação da hiperinsulinemia sobre o tecido ovariano.

Estudos *in vitro* sugerem que a insulina pode estimular a produção ovariana de testosterona por ação direta nas células tecais e o faz ativando o seu próprio receptor, o que permanece preservado mesmo nos estados de insulino-resistência.

Parece estranho que a insulina mantenha sua capacidade de estimular a esteroidogênese ovariana em uma mulher que é resistente à ação insulínica, pelo menos no metabolismo da glicose (PORETZKY, 1991). No entanto, tem-se demonstrado que os ovários permanecem sensíveis à ação da insulina nestas mulheres, pela observação de que a redução insulínica se acompanha de diminuição significativa das concentrações dos androgênios ovarianos (NESTLER et al., 1989).

Durante algum tempo supôs-se que a insulina estimularia a produção androgênica por atuar sobre os receptores do IGF-1 ou por reagir com receptores insulínicos anômalos (híbridos), possivelmente presentes no tecido ovariano (PORETZKY, 1991). Estas suposições não se confirmaram; por um lado não se demonstraram receptores híbridos no ovário (NESTLER et al., 1998), por outro, os aumentos insulínicos observados nestas mulheres são muito discretos, tornando improvável que a insulina reaja com os receptores de IGF-1 de maneira apreciável.

Tem-se então proposto que a insulina atue sobre a esteroidogênese ovariana através de seu próprio receptor, porém, envolvendo a ativação de um

sistema de transdução distinto do sistema de cascata do fosfato de tirosina, que é o usado na ativação do aumento da captação e da utilização da glicose (CIARALDI et al., 1992).

Algumas ações da insulina envolvem mediadores de baixo peso molecular como mensageiros secundários, os *inositol-glicans*, que têm sido investigados como responsáveis pela ação insulínica sobre a esteroidogênese ovariana (LARNER, 1983; SALTIEL, 1990).

Estudo recente sugere que os *inositol-glicans* servem como sistema de transdução do sinal insulínico na estimulação da biossíntese da testosterona pela célula tecal humana, o que explica a preservação da ação insulínica ovariana nos estados de insulino-resistência (NESTLER et al., 1998).

Três estudos sobre os efeitos ovarianos da insulina podem estar esclarecendo de forma mais definitiva esta questão.

NESTLER & JAKUBOWICZ (1996) têm avaliado consecutivamente a atividade do citocromo P450-c-17 $\alpha$  através da aferição da curva de concentração da 17 hidroxiprogesteroína após ministração de Leuprolide, um análogo do GnRH, que resulta em liberação hipofisária de LH.

Sabe-se que mulheres com ACH exibem clara hiper-resposta a este estímulo (ROSENFELD et al., 1990; EHRMANN et al., 1995) se comparadas a controles adequadamente pareados. Após a utilização da metformina no tratamento da hiperinsulinemia em mulheres obesas com ACH, verificou-se que a resposta da 17 hidroxiprogesteroína ao estímulo com Leuprolide reduziu-se

em média de 41%, o mesmo ocorrendo com os níveis basais desse hormônio (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996).

No sentido de esclarecer se tal efeito depende da redução insulínica ou se há algum efeito independente e direto do medicamento empregado, repetiu-se o experimento em mulheres obesas com ACH, usando como estratégia para reduzir a hiperinsulinemia a perda de peso através de dieta. Com redução média de 7,5% no índice de massa corporal das mulheres observou-se redução da área insulínica no TTG oral em média de 34%. Esta redução se acompanhou de queda de 26% nos níveis basais da 17 hidroxiprogesteroína e redução de 40% na área sob a curva de resposta da 17 hidroxiprogesteroína ao estímulo com Leuprolide (JAKUBOWICZ & NESTLER, 1997).

Estudo subsequente avaliou os mesmos aspectos em mulheres magras com ACH (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996): a uma redução na área da insulina durante TTG oral de 45% pelo tratamento com metformina correspondeu redução de 39% na área da curva da 17 hidroxiprogesteroína em resposta ao Leuprolide.

Nos três estudos ocorreram simultaneamente quedas significativas nas concentrações da testosterona, de sua fração livre e aumentos na concentração da SHBG.

É importante ressaltar que a redução da hiperinsulinemia em mulheres-controladas (obesas, ovulatórias, não-hiperandrogênicas) não produziu modificações nos níveis esteroidais e não alterou a resposta da 17 hidroxiprogesteroína ao Leuprolide. Isto sugere que a capacidade da insulina de estimular a atividade do

citocromo P450-c-17 $\alpha$  está provavelmente limitada a mulheres com ACH, o que pode representar anormalidade bioquímica hereditária (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996) e é concordante com a observação de que muitas mulheres obesas ovulatórias não apresentam hiperandrogenismo nem hiper-resposta ovariana ao estímulo com GnRH (ROSENFELD et al., 1990).

Esta capacidade da insulina estimular a atividade do citocromo P450-c-17 $\alpha$  pode não estar restrita ao tecido ovariano.

Estudo recente (MOGHETTI et al., 1996) sugere que a hiperinsulinemia também amplia a produção adrenal de 17alfahidroxicorticosteróides durante teste de estímulo adrenal com ACTH.

Assim, parece que dois aspectos da síndrome da ACH – resistência insulínica hiperinsulinêmica e hiperatividade do citocromo P450-c-17 $\alpha$  - estão patogeneticamente interligadas, e que a hiperinsulinemia estimula a atividade dessa enzima, provavelmente por mecanismo direto.

Demonstrou-se que a insulina estimula a liberação de gonadotrofinas em células hipofisárias isoladas de rato (ADASHI et al., 1981).

A infusão aguda de insulina em mulheres anovulatórias hiperandrogênicas altera a produção esteroidal ovariana sem afetar a liberação do FSH, do LH e a sensibilidade ao GnRH (DUNAIF et al., 1987).

A supressão da insulina com o uso do diazóxido não altera os níveis de LH (NESTLER et al., 1989). No entanto, a redução da insulina com metformina

(VELAZQUEZ et al., 1994) ou troglitazona (DUNAIF et al., 1996) se acompanhou de reduções significativas dos níveis do LH.

Esta redução pode ocorrer devido a ação hipofisária da insulina, mas também pode ser consequência da perda ou redução do *feed-back* positivo dos estrogênios.

Nesses estudos ocorreram quedas nas concentrações dos androgênios, estrogênios e LH, sugerindo-se que a hiperinsulinemia acarreta um incremento geral na esteroidogênese e na liberação de gonadotrofinas.

No presente estudo não houve como detectar modificações significativas nas concentrações das gonadotrofinas. Isto pode, ao menos em parte, ser consequência das características desta casuística, que não foi selecionada tendo por base altos níveis do LH ou elevada relação LH/FSH. Também a metodologia empregada para coleta das amostras sanguíneas, que não utilizou *pool* de amostras, pode ser responsável pelas discrepâncias observadas em relação a outros estudos.

Na população deste estudo os níveis de LH e FSH, assim como a relação LH/FSH, mostraram-se dentro dos limites normais para a fase folicular do ciclo de mulheres ovulatórias.

Estes dados parecem concordantes com as hipóteses dualistas para explicar a fisiopatologia da manutenção da anovulação e do hiperandrogenismo na ACH onde se propõe a existência de dois mecanismos operantes: no primeiro, mais comum em mulheres magras, haveria aumento das concentrações do LH;

no segundo, comum entre mulheres obesas, a estimulação ovariana se faria mais às custas da hiperinsulinemia, não havendo níveis elevados do LH (PORETZKY, 1991; ANTILA et al., 1992; DUNAIF, 1995).

A SHBG é uma globulina plasmática que se liga e transporta a dihidrotestosterona e a testosterona e, em menor grau, o estradiol. Alterações nos níveis sanguíneos da SHBG afetam o metabolismo e o *clearance* destes esteróides, além de influenciar a sua biodisponibilidade e ação tecidual. Sua produção ocorre no fígado e sua regulação parece depender da testosterona (inibição), da tiroxina e do estradiol (estimulação) (PLYMATE et al., 1981).

Recentemente, tem-se identificado um papel importante para a hiperinsulinemia no desencadeamento das reduções dos níveis de SHBG observados em mulheres com anovulação crônica e hiperandrogenismo.

Estudos *in vitro* mostram que a insulina suprime a produção da SHBG em cultura de células de hepatoma (PLYMATE et al., 1988).

Além disso, estudos epidemiológicos demonstram correlação inversa entre os níveis séricos da insulina e da SHBG em mulheres obesas e não-obesas (PEIRIS et al., 1989), na menacme ou após a menopausa (PREZIOSI et al., 1993). Estas correlações parecem independem dos níveis sanguíneos de androgênios ou do grau de adiposidade.

Diversos estudos têm buscado avaliar o impacto da redução dos níveis insulínicos sobre a concentração da SHBG por diferentes metodologias.

A supressão dos níveis insulínicos, em média de 60%, durante dez dias se acompanhou do aumento, em média de 32%, na concentração da SHBG (NESTLER et al., 1991).

A redução da insulinemia por intermédio da perda de peso corporal se acompanhou de aumento significativo dos níveis previamente baixos da SHBG (CRAVE et al., 1995; JAKUBOWICZ & NESTLER, 1997) e a redução do hiperinsulinismo de mulheres magras com ACH pela ação da metformina, associou-se à elevação significativa dos níveis da SHBG em estudo controlado com placebo (NESTLER & JAKUBOWICZ, 1996).

Neste estudo, os resultados do tratamento com metformina sobre os níveis de SHBG concordam com a experiência desses autores. A redução dos níveis insulínicos aferidos pelo TTG oral em 32% se acompanhou de aumento da concentração da SHBG de 19% ( $p < 0,05$ ), o que contribuiu para as reduções observadas no índice de androgênios livres (41%), e deve ter influenciado na redução da testosterona livre (41%) contraposta a uma queda menor (27%), nos níveis da testosterona.

Não podemos excluir a possibilidade de que o aumento observado nas concentrações da SHBG se deva à redução da concentração dos androgênios, mas esta possibilidade parece remota.

É conhecido o fato de que a SHBG é também regulada, por inibição, pelos androgênios (PLYMATE et al., 1988).

Em homens, à elevação matinal fisiológica dos níveis da testosterona corresponde pequena queda das concentrações da SHBG (CLAIR et al., 1985), provavelmente, por aumento do seu *clearance* metabólico mediado pela testosterona e não por redução da produção.

Existem evidências de que o hiperinsulinismo é mais ativo que a testosterona na inibição da síntese da SHBG. Estudo controlado envolvendo mulheres hiperinsulinêmicas, com e sem hiperandrogenismo, encontrou diferenças nas concentrações da SHBG que não se relacionaram com as concentrações de androgênios e sim com a insulinemia (HAMILTON-FARLEY et al., 1995).

O estudo de NESTLER e colaboradores (1991) em que foram controlados os efeitos da redução androgênica e insulínica mostrou que a supressão ovariana com GnRH não acarretou modificações significativas na concentração da SHBG em mulheres obesas hiperandrogênicas. No entanto, a redução insulínica pelo diazóxido durante o bloqueio ovariano acarretou aumento rápido (dez dias) e significativo de 32% nas concentrações da SHBG. Ainda que neste estudo os níveis da SHBG possam não ter sido alterados durante o tratamento com GnRH, porque houve redução simultânea dos androgênios e estrogênios, surge a hipótese de que, ao menos em mulheres obesas hiperandrogênicas, o regulador primário da produção hepática da SHBG seja a insulina e não os esteróides.

Suporta esta hipótese o fato de que em mulheres obesas hiperinsulinêmicas com anovulação crônica hiperandrogênica, os níveis da

SHBG são menores que os de homens normais, apesar de estas serem menos androgênicas e mais estrogênicas (PLYMATE et al., 1981).

PLYMATE e colaboradores (1988) analisaram os efeitos *in vitro* da adição de testosterona e de outros hormônios a culturas de células de hepatoma, na produção de SHBG. Verificaram que a adição de testosterona *aumentou* a produção da globulina, em proporção semelhante à desencadeada pelo estradiol, o que corrobora a idéia de que em mulheres com características das participantes em nosso estudo –obesidade, anovulação crônica e hiperandrogenismo– a hiperinsulinemia decorrente de resistência insulínica é o principal determinante dos distúrbios endócrinos e metabólicos.

O hiperandrogenismo é, provavelmente, o distúrbio endócrino mais comum em mulheres. Apesar de sua alta prevalência, estes distúrbios continuam sendo pouco compreendidos e, geralmente, abordados de maneira muito fragmentada, voltada para solucionar a queixa imediata que a mulher apresenta ao médico.

Esta abordagem desperdiça uma ótima oportunidade de prover cuidados primários de saúde, importantes para pacientes que podem estar em condição de alto risco para o desenvolvimento de complicações metabólicas associadas com seu hiperandrogenismo.

As informações decorrentes deste trabalho, corroboradas por ampla experiência obtida nos últimos 15 anos, indicam que é prudente considerar todas as mulheres portadoras de anovulação crônica hiperandrogênica em risco para o desenvolvimento de resistência insulínica e para as complicações de

saúde associadas a ela: dislipidemia, doença arterial coronariana e hipertensão arterial (DUNAIF, 1997).

Estudos de correlação têm evidenciado que é a hiperinsulinemia, mais que o hiperandrogenismo, que se associa com a dislipidemia. A supressão dos níveis androgênicos não corrige a dislipidemia; o tratamento da resistência insulínica corrige (VELAZQUEZ et al., 1994; DUNAIF et al., 1996; EHRMANN et al., 1997b).

Nos últimos anos têm surgido informações confirmando que realmente as mulheres com anovulação crônica hiperandrogênica têm alto risco de desenvolver doença cardiovascular: mulheres com antecedentes de hiperandrogenismo, submetidas à cinecoronariografia, mostram maiores incidência e gravidade de doença coronariana (WILD et al., 1990). A extensão da doença coronariana é maior dentre as mulheres que apresentam aspecto policístico dos ovários à ultra-sonografia (BIRDSALL & FARQUHAR, 1996; BIRDSALL, FARQUHAR, WHITE, 1997).

Estudo recente investigou o prognóstico remoto de mulheres diagnosticadas como portadoras de ACH entre 1956 e 1965 (DAHLGREN et al., 1992). Evidenciou-se que 20 a 30 anos após o diagnóstico, estas mulheres apresentavam altas incidências de hipertensão arterial e de diabetes melito não dependente da insulina. Estudos antigos e recentes continuam identificando altas incidências de intolerância à glicose, inclusive em adolescentes portadoras de ACH (BERGMAN, FINEGOOD, ADER, 1985; MODAN et al., 1989; BJORNTORP, 1997). Estas incidências de 20% a 40% são superiores, em duas a quatro vezes, a incidência estimada pela OMS para mulheres em idade

reprodutiva, cerca de 10% (DUNAIF, 1997). Diversos estudos comparando mulheres hiperandrogênicas anovulatórias com controles pareadas por idade, peso, índice de massa corporal e etnia têm corroborado estes achados, com identificação de intolerância à glicose em frequência duas a quatro vezes maior que nos controles (HOLTE et al., 1995; HOMBURG, 1996; NORMAN, MAHABEER, MASTERS, 1995).

O estudo de DAHLGREN e colaboradores (1992), realizado em 1987, já indicava o que as pesquisas mais recentes viriam a confirmar: mulheres suecas na quinta e sexta décadas de vida, avaliadas 22 a 31 anos após terem se submetido à cirurgia de ressecção em cunha dos ovários, para tratamento das complicações decorrentes de anovulação crônica hiperandrogênica, apresentaram incidências três vezes maior de hipertensão arterial e seis vezes maior de diabetes melito do que o grupo-controle adequadamente pareado (HOLTE et al., 1994; LANZONE et al., 1996).

O presente estudo demonstrou a existência de intolerância à glicose ou diabetes em quatro dentre 11 mulheres assintomáticas; nove delas se mostraram, em algum grau, insulino-resistentes. Todas as mulheres contaram antecedentes de regimes dietéticos e algumas de tratamentos com anorexígenos, sem sucesso.

O tratamento com metformina produziu modificações favoráveis no perfil endócrino e metabólico destas mulheres; o seguimento a longo prazo permitirá conhecer se tem sido também um bom auxiliar no tratamento dietético e fisioterápico a que se encontram submetidas atualmente.

## 6. CONCLUSÕES

---

1. O uso da metformina, durante período de quatro a seis semanas, por mulheres obesas com anovulação crônica hiperandrogênica se associa à redução significativa das concentrações séricas da insulina, expressa por diminuição da área sob a curva insulínica, durante teste de tolerância à glicose oral, em média de 31%.
2. O uso da metformina, durante o mesmo período, associa-se nestas mulheres à redução significativa dos níveis séricos da testosterona, em média de 27%, e da fração livre da testosterona, em média de 41%.
3. O uso da metformina, durante o mesmo período e nestas mesmas mulheres, associa-se ao aumento significativo dos níveis séricos da globulina ligadora dos hormônios sexuais (SHBG), em média de 19%.

## 7. SUMMARY

---

This prospective study has been conducted in order to evaluate the effects of the biguanid metformin treatment on the insulin and androgen levels of obese and hirsute women. Testing the hypothesis that the hyperinsulinemic insulin resistance influences the hyperandrogenism of these women has carried this out. A total of eleven women experiencing hirsutism, obesity and oligomenorrhea were studied. This study has evaluated these women's serum levels of insulin, androgens, gonadotropins and sex hormone-binding globulin, before and after a weight maintenance period of five weeks treating with metformin. During the oral glucose tolerance test two women have been identified as intolerant and two other as diabetic. The serum levels of insulin have been reduced by 31%. The concentrations of testosterone and its free fraction have also suffered reductions of 27% and 41% respectively. The concentration of the sex hormone-binding globulin has increased by 19%. The univariate hormonal correlation analysis has shown a direct and significant relation between the modifications of the free testosterone and luteinizing hormone levels and the area under the insulin curve. An inverse correlation between the modifications of the sex hormone-binding globulin and the

modifications of the follicle-stimulating hormone has been also observed. The linear regression analysis of the modifications in the hormone concentrations has shown the reductions of the insulin concentrations as the only significant determinant for the reduction of testosterone concentrations. The results of this study have indicated that the treatment with metformin for hirsute, obese and oligomenorrheic women, leads to reductions of hyperinsulinemia that are followed by decrease on the hyperandrogenism of these women. As a result, the metformin has been accredited as a promising optional therapy for patients experiencing these conditions.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AÇBAY, O. & GÜNDOĞDU, S. - Can metformin reduce insulin resistance in polycystic ovary syndrome?. **Fertil. Steril.**, **65**:946-9, 1996.

ADAMS, J.; POLSON, D.W.; FRANKS, S. - Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. **Br. Med. J.**, **293**:355-9, 1986.

ADASHI, E. Y.; HSUEH A. J. W., YEN, S. S. C. – Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. **Endocrinology**, **108**:1441-9, 1981.

ANTTILA, L.; KOSKINEN, P.; KAIHOLA, H-L.; ERKKOLA, R.; IRJALA, K.; RUUTIAINEN, K. - Serum androgen and gonadotropin levels decline after progestogen-induced withdrawal bleeding in oligomenorrheic women with or without polycystic ovaries. **Fertil. Steril.**, **58**: 697-702, 1992.

ACHARD, C. & THIERS, J. – Le virilisme pileire et son association a l'insuffisance glycolytique (diabete des femmes a barbe). **Bull. Acad. Natl. Med.**, **86**:51-64, 1921.

ARIÊ, W. M. Y.- **Síndrome dos ovários policísticos: contribuição para o estudo da resistência à insulina**. São Paulo, 1995. (Tese – Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

- BAILEY, C.J. - Biguanides and NIDDM. **Diabetes Care**, **15**:755-72, 1992.
- BARBIERI, R.L. & RYAN, K.J. - Hyperandrogenism, insulin resistance, and *acanthosis nigricans* syndrome: a common endocrinopathy with distinct pathophysiologic features. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **147**:90-101, 1983.
- BARBIERI, R.L.; MAKRIS, A.; RANDALL, R.W.; DANIELS, G.; KISTNER, R.W.; RYAN, K.J. - Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **62**:904-10, 1986.
- BARBIERI, R.L. & HORNSTEIN, M.D. - Hyperinsulinemia and ovarian hyperandrogenism: cause and effect. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, **17**:685-703, 1988.
- BARDIN, C.W. & LIPSETT, M.B. - Testosterone and androstenedione blood production rates in normal women and women with idiopathic hirsutism or polycystic ovaries. **J. Clin. Invest.**, **46**:891-902, 1967.
- BARNES, R.B.; ROSENFELD, R.L.; BURNSTEIN, S.; EHRMANN, D.A. - Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. **New Engl. J. Med.**, **320**: 559-65, 1989.
- BARTH, J.H.; JENKINS, M.; BELCHETZ, P.E. - Ovarian hyperthecosis, diabetes and hirsuties in post-menopausal women. **Clin. Endocrinol.**, **46**: 123-8, 1997.
- BELL, P.M. & HADDEN, D.R. - Metformin. **Curr. Therap. Diab.**, **26**:523-37, 1997.
- BERGMAN, R.N. & FINEGOOD, D.T.; ADER, M. - Assessment of insulin sensitivity *in vivo*. **Endocr. Rev.**, **6**:45-86, 1985.
- BIRDSALL, M.A. & FARQUHAR, C.M. - Polycystic ovaries in pre and post-menopausal women. **Clin. Endocrinol.**, **44**:269-76, 1996.

- BIRDSALL, M.A.; FARQUHAR, C.M., WHITE, H. D. – Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cvardiac catheterization. **Ann. Intern. Med.**, **126**: 32-5, 1997.
- BJORNTORP, P. - Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. **Nutrition**, **13**:795-803, 1997.
- BURGHEN, G.A.; GIVENS, J.R.; KITABCHI, A.E. - Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **50**:113-6, 1980.
- CASTELLI, W. P. – Cardiovascular disease in women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **158**:1553-60, 1988.
- CHANG, R.J.; LAUFER, L.R.; MELDRUM, D.R.; DEFAZIO, J.; LU, J.K.H.; VALE, W.W.; RIVIER, J.E.; JUDD, H.L. - Steroid secretion in polycystic ovarian disease after ovarian suppression by a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **56**: 897-903, 1983.
- CHAN, J.C.N.; TOMLINSON, B.; CRITCHLEY, J.A.J.H.; COCKRAM, C.S.; WALDEN, R.J. - Metabolic and hemodynamic effects of metformin and glibenclamide in normotensive NIDDM patients. **Diabetes Care**, **16**:1035-8, 1993.
- CIARALDI, T.P.; EL-ROEIY, A.; MADAR, Z.; REICHART, D.; OLEFSKY, J.M.; YEN, S.S.C. - Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **75**:577-83, 1992.
- CLAIR, P.; CLANSTRACT, B.; JORDAN, D.; DECLARD, H., SUSSOLAS, G. - Daily variations of plasma sex hormone binding globulin capacity, testosterone and LH concentrations in healthy rested adult males. **Horm. Res.**, **21**:220-3, 1985.

- CONWAY, G.S.; CLARK, P.M.S.; WONG, D. - Hyperinsulinaemia in the polycystic ovary syndrome confirmed with a specific immunoradiometric assay for insulin. **Clin. Endocrinol.**, **38**:219-22, 1993.
- CONWAY, G.S. & JACOBS, H.S. - Clinical implications of hyperinsulinaemia in women. **Clin. Endocrinol.**, **39**:623-32, 1993.
- COX, C. P. - A handbook of introductory statistics methods. 2. ed. New York, J. Wiley & Sons, 1987.
- CRAVE, J-C.; FIMBEL, S.; LEJEUNE, H.; CUGNARDEY, N.; DECHAUD, H.; PUGEAT, M. - Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**:2057-62, 1995.
- DAHLGREN, E.; JOHANSSON, S.; LINDSTEDT, G.; KNUTSSON, F.; ODEN, A.; JANSON, P.O.; MATTSON, L-A.; CRONA, N.; LUNDBERG, P-A. - Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. **Fertil. Steril.**, **57**:505-13, 1992.
- DAHLGREN, E.; JANSON, P.O.; JOHANSSON, S.; LAPIDUS, L.; LINDSTEDT, G.; TENGBORN, L. - Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**, **61**:455-60, 1994.
- DECLARACION DE HELSINKI - **Bol Of Sanit Panam**, **108**:626-37, 1990.
- DeCLUE, T. J.; SHAH, S.C.; MARCHESE, M.; MALONE, J.I. - Insulin resistance and hyperinsulinemia induce hyperandrogenism in a young type B insulin-resistant female. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, **72**:1308-11, 1991.
- DEFRONZO, R.A.; BARZILAI, N.; SIMONSON, D.C.- Mechanism of metformin action in obese and lean non-insulin-dependent diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **73**:1294-301, 1991.

- DEVANE, G.M.; CZEKALA, N.M.; JUDD, H.L.; YEN, S.S.C. - Circulating gonadotropins, estrogens and androgens in polycystic ovarian syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **121**:496-500, 1975.
- DEWIS, P.; NEWMAN, M.; RATCLIFFE, W.A.; ANDERSON, D.C. - Does testosterone affect the normal menstrual cycle?. **Clin. Endocrinol.**, **24**:515- 21, 1986.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; MITRAKOU, A.; HENNES, M. M. I.; PLATANISSIOTIS, D.; KAKLAS, N.; SPINA, J.; GEORGIADOU, E.; HOFFMAN, R. G.; KISSEBAH, A. H.; RAPTIS, S. – Insulin sensitivity and antiandrogenic therapy in women with polycystic ovary syndrome. **Metabolism**, **44**:525-31, 1995.
- DUNAIF, A.; HOFFMAN, A.R.; SCULLY, R.E.; FLIER, J.S.; LONGCOPE, C.; LEVY, L.J.; CROWLEY, W.F. - Clinical, biochemical, and ovarian morphologic features in women with *acanthosis nigricans* and masculinization. **Obstet. Gynecol.**, **66**:545-52, 1985.
- DUNAIF, A.; GRAF, M.; MANDELI, J.; LAUMAS, V.; DOBRJANSKY, A. - Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance and/or hyperinsulinemia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **65**:499-507, 1987.
- DUNAIF, A.; MANDELI, J.; FLUHR, H.; DOBRJANSKY, A. - The impact of obesity and chronic hyperinsulinemia on gonadotropin release and gonadal steroid secretion in the polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **66**:131-9, 1988.
- DUNAIF, A.; GREEN, G.; FUTTERWEIT, W.; DOBRJANSKY, A. - Suppression of hyperandrogenism does not improve peripheral or hepatic insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **70**:699-704, 1990.

- DUNAIF, A.; GREEN, G.; PHELPS, R.G.; LEBWOHL, M.; FUTTERWEIT, W.; LEWWY, L. - *Acanthosis nigricans*, insulin action, and hyperandrogenism: clinical, histological, and biochemical findings. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **73**:590-5, 1991.
- DUNAIF, A. - Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, **98(suppl1A)**:33-9, 1995.
- DUNAIF, A. & FINEGOOD, D.T. -  $\beta$ -Cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**: 942-47, 1996.
- DUNAIF, A.; SCOTT, D.; FINEGOOD, D.; QUINTANA, B.; WHITCOMB, R. - The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**: 3299-306, 1996.
- DUNAIF, A. - Insulin resistance and polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr. Rev.**, **18**:774-800, 1997.
- EDMAN, C.D. & MACDONALD, P.C. - Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione in ovulatory and anovulatory young women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **130**:456-61, 1978.
- EHRMANN, D. A.; ROSENFELD, R. L.; BARNES, R. B.; BRIGELL, D. F.; SHEIKH, Z. - Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. **N. Engl. J. Med.** **327**:157-62, 1992.
- EHRMANN, D.A.; BARNES, R.B.; ROSENFELD, R.L. - Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. **Endocr. Rev.**, **16**:322-53, 1995.

- EHRMANN, D. A.; CAVAGHAN, M. K.; IMPERIAL, J.; STURIS, J.; ROSENFELD, R. L.; POLONSKY, K. S.- Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **82**: 524-30, 1997a.
- EHRMANN, D. A.; SCHNEIDER, D. J.; SOBEL, B. E.; CAVAGHAN, M. K.; IMPERIAL, J.; ROSENFELD, R. L.; POLONSKY, K. S. – Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **82**:2108-16, 1997b.
- FERRIMAN, D. & GALLWEY, J. D. – Clinical assessment of body hair growth in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **21**:1440-7, 1961.
- FRANKS, S. - Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. **Clin. Endocrinol.**, **31**:87-120, 1989.
- FRANKS, S. - Polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **333**:853-61, 1995.
- GEFFNER, M.E.; KAPLAN, S.A.; BERSCH, N.; GOLDE, D.W.; LANDAW, E.M.; CHANG, R.J. - Persistence of insulin resistance in polycystic ovarian disease after inhibition of ovarian steroid secretion. **Fertil. Steril.**, **45**:327-33, 1986.
- GELDING, S.V.; ROBINSON, S.; LOWE, S.; NITHTHYANANTHAN, R.; JOHNSTON, D.G. - Validation of the low dose short insulin tolerance test for evaluation of insulin sensitivity. **Clin. Endocrinol.**, **40**:611-15, 1994.
- GILLING-SMITH, C.; STORY, H.; ROGERS, V.; FRANKS, S. - Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.**, **47**:93-9, 1997.

- GIVENS, J.R.; ANDERSEN, R.N.; UMSTOT, E.S.; WISER, W.L. - Clinical findings and hormonal responses in patients with polycystic ovarian disease with normal versus elevated LH levels. **Obstet. Gynecol.**, **47**:388-93, 1976.
- GONZALES, F.; CHANG, L.; HORAB, T.; LOBO, R. A. – Evidence for heterogeneous etiologies of adrenal dysfunction in polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**, **66**:354-61, 1996.
- GRULET, H.; HECART, A.C.; DELEMER, B.; GROSS, A.; SULMONT, V.; LEUTENEGGER, M.; CARON, J. - Roles of LH and insulin resistance in lean and obese polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.**, **38**:621-6, 1993.
- HAMILTON-FAIRLEY, D.; WHITE, D.; GRIFFITHS, M.; ANYAOKU, V.; KOISTINEN, R.; SEPPALA, M.; FRANKS, S. - Diurnal variation of sex hormone binding globulin and insulin-like growth factor binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.**, **43**:159-65, 1995.
- HERBERT, C.M.; HILL, G.A.; DIAMOND, M.P. - The use of intravenous glucose tolerance test to evaluate nonobese hyperandrogenic women. **Fertil. Steril.**, **53**:647-53, 1990.
- HOFFMAN, D. I.; CLOVE, K., LOBO, R.A. – Prevalence and significance of elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels in anovulatory women. **Fertil. Steril.** **42**: 76-81, 1984.
- HOLLANDER, M. & WOLFE, D. A. – Nonparametric statistical methods. 1. ed. New York, John Wiley & Sons, 1973.
- HOLTE, J.; BERGH, T.; BERNE, C.; BERGLUND, L.; LITHELL, H. - Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **78**:1052-8, 1994.

- HOLTE, J.; BERGH, T.; BERNE, C.; WIDE, L.; LITHELL, H. - Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**:2586-93, 1995.
- HOMBURG, R. - Polycystic ovary syndrome: from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. **Hum. Reprod.**, **11**:29-39, 1996.
- JAKUBOWICZ, D. J. & NESTLER, J. E. -  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone responses to Leuprolide and serum androgens in obese women with and without polycystic ovary syndrome after dietary weight loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **82**:556-60, 1997.
- KAHN, C. R.; FLIER, J. S.; BAR, R. S.; ARCHER, J. A.; GORDEN, P.; MARTIN, M. M., ROTH, J. - The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. **N. Engl. J. Med.**, **294**:739-45, 1976.
- KE, W.X.; SHAN, G.Q.; HUA, S.Y. - Different responses of insulin, C-peptide, and testosterone to an oral glucose tolerance test in two groups of women with polycystic ovarian syndrome. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **75**:166-9, 1996.
- KOPELMAN, P.G. - Investigation of obesity. **Clin. Endocrinol.**, **41**:703-8, 1994.
- LANZONE, A.; FULGHESU, A.M.; GUIDO, M.; FORTINI, A.; CARUSO, A.; MANCUSO, S. - Differential androgen response to adrenocorticotrophic hormone stimulation in polycystic ovarian syndrome: relationship with insulin secretion. **Fertil. Steril.**, **58**:296-301, 1992.
- LANZONE, A.; FULGHESU, A.M.; CUCINELLI, F.; GUIDO, M.; PAVONE, V.; CARUSO, A.; MANCUSO, S. - Preconceptional and gestational evolution of insulin secretion in patients with polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod.**, **11**:2382-6, 1996.

- LEFEBVRE, P.; BRINGER, J.; RENARD, E.; BOULET, F.; CLOUET, S.; JAFFIOL, C. - Influences of weight, body fat patterning and nutrition on the management of PCOS. **Hum. Reprod.**, **12 (suppl 1)**:72-81, 1997.
- LARNER, J. – Mediators of postreceptor action of insulin. **Am. J. Med.**, **74**:38-51, 1983.
- LOBO, R.A. & GOEBELSMANN, U. - Effect of androgen excess on inappropriate gonadotropin secretion as found in the polycystic ovary syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **142**: 394-401, 1982.
- LOUGHLIN, T.; CUNNINGHAM, S.; MOORE, A.; SMITH, P. P. A.; MCKENNA, T. J. – Adrenal abnormalities in polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **62**: 142-7, 1986.
- MARTIKAINEN, H.; SALMELA, P.; NUOJUA-HUTTUNEN, S.; PERALA, J.; LEINONEN, S.; KNIP, M.; RUOKONEN, A. – Adrenal steroidogenesis is related to insulin in hyperandrogenic women. **Fertil. Steril.**, **66**:564-70, 1996.
- MCKENNA, T.J. & CUNNINGHAM, S.K. - Adrenal androgen production in polycystic ovary syndrome. **Eur. J. Endocrinol.**, **133**: 383-9, 1995.
- MODAN, M.; HARRIS, M. I.; HALKIN, H. – Evaluation of WHO and NDDG criteria for impaired glucose-tolerance. **Diabetes** **38**:1603-35, 1989.
- MOGHETTI, P.; CASTELLO, R.; NEGRI, C.; TOSI, F.; SPIAZZI, G. G.; BRUN, E.; BALDUCCI, R.; TOSCANO, V.; MUGGEO, M. – Insulin infusion amplifies  $17\alpha$ -hidroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of  $17,20$  lyase activity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**:881-6, 1996.
- MOLLER, D. E. & FLIER, J. S. – Insulin resistance – mechanisms, syndromes, and implications. **N. Engl. J. Med.**, **325**:938-48, 1991.

- MONTGOMERY, D. C. & PEEK, E. A.- Introduction to linear statistics. 1 ed.  
New York, J. Wiley & Sons, 1982.
- MORALES, A.J.; LAUGHLIN, G.A.; BUTZOW, T.; MAHESHWARI, H.;  
BAUMANN, G.; YEN, S.C. - Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone  
axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common  
and distinct features. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**:2854-64, 1996.
- NAGAMANI, M.; DINH, T.V.; KELVER, M.E. - Hyperinsulinemia in hyperthecosis  
of the ovaries. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **154**:384-9, 1986.
- NESTLER, J.E.; BARLASCINI, C.O.; MATT, D.W.; STEINGOLD, K.A.; PLYMATE,  
S.R.; CLORE, J.N.; BLACKARD, W.G. - Suppression of serum insulin by  
diazoxide reduces serum testosterone levels in obese women with polycystic  
ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **68**:1027-32, 1989.
- NESTLER, J.E.; SINGH, R.; MATT, D.W.; CLORE, J.N.; BLACKARD, W.G. -  
Suppression of serum insulin level by diazoxide does not alter serum  
testosterone or sex hormone-binding globulin levels in healthy, nonobese  
women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **163**:1243-6, 1990.
- NESTLER, J.E.; POWERS, L.P.; MATT, D.W.; STEINGOLD, K.A.; PLYMATE,  
S.R.; RITTMASER, R.S.; CLORE, J.N.; BLACKARD, W.G. - A direct  
effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in  
obese women with the polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol.  
Metab.**, **72**:83-9, 1991.
- NESTLER, J.E. & STRAUSS III, J.F. - Insulin as an effector of human ovarian  
and adrenal steroid metabolism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**,  
**20**:807-23, 1991.
- NESTLER, J.E. - Sex hormone-binding globulin: a marker for hyperinsulinemia  
and/or insulin resistance? **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **76**: 273-4, 1993.  
[Editorial]

- NESTLER, J. E. & JAKUBOWICZ, D. J. – Decreases in ovarian cytochrome P450c17 $\alpha$  activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **335**:617-23, 1996.
- NESTLER, J.E. - Insulin regulation of human ovarian androgens. **Hum. Reprod.**, **12 (suppl.1)**:53-62, 1997.
- NESTLER, J.E. & JAKUBOWICZ, D.J. - Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decrease in ovarian P450c17 $\alpha$  activity and serum androgens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **82**:4075-79, 1997.
- NESTLER, J.E.; JAKUBOWICZ, D.J.; FALCON de VARGAS, A.; BRICK, C.; QUINTERO, N.; MEDINA, F. – 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**:2001-5, 1998.
- NORMAN, R.J.; MAHABEER, S.; MASTERS, S. - Ethnic differences in insulin and glucose response to glucose between white and indian women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**, **63**:58-62, 1995.
- PASQUALI,R. & CASIMIRRI, F. - The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. **Clin. Endocrinol.**, **39**:1-16, 1993.
- PEIRIS, A.N.; AIMAN, E.J.; DRUCKER, W.D.; KISSEBAH, A.H. - The relative contributions of hepatic and peripheral tissues to insulin resistance in hyperandrogenic women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **68**:715-20, 1989.
- PETSOS,P.; RATCLIFFE, W.A.; ANDERSON, D.C. - Effects of medroxyprogesterone acetate in women with polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.**, **25**:651-60, 1986.

- PETTIGREW, R. & HAMILTON-FAIRLEY, D. - Obesity and female reproductive function. **Br. Med. Bull.**, **53**: 341-58, 1997.
- PLYMATE, S.R.; FARISS, B.L.; BASSETT, M.L.; MATEJ, L. - Obesity and its role in polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **52**:1246-8, 1981.
- PLYMATE, S.R.; MATEJ, L.A.; JONES, R.E.; FRIEDL, K.E. - Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **67**:460-4, 1988.
- POLDERMAN, K.H.; GOOREN, L.J.G.; ASSCHEMAN, H.; BAKKER, A.; HEINE, R.J. - Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **79**: 265-71, 1994.
- PORETSKY, L. & KALIN, M.F. - The gonadotropic function of insulin. **Endocr. Rev.**, **8**: 132-41, 1987.
- PORETSKY, L. - On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. **Endocr. Rev.**, **12**:3-13, 1991.
- PREZIOSI, P.; BARRET-CONNOR, E.; PAPOZ, L.; ROGER, M.; SAINT-PAUL, M.; NAHOUL, K.; SIMON, D. - Interrelation between plasma sex hormone-binding globulin and plasma insulin in healthy adult women: the telecom study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **76**:283-7, 1993.
- PUPO, A. A. & PUPO, Y. K. A. – Estudo comparativo sobre a influência do corticosteróide deflazacort (DL458)\* e prednisona na tolerância à glicose e a secreção de insulina em mulheres normais. **Folha Medica**, **99**:179-82, 1989.
- REIS, R. M.- **Resistência à insulina e hiperandrogenismo na síndrome dos ovários policísticos**. Ribeirão Preto, 1993. (Tese -Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
- RITTMASER, R. S.- Hyperandrogenism – what is normal? **N. Engl. J. Med.** **327**:194-6, 1992.

- ROBINSON, S.; HENDERSON, A.D.; GELDING, S.V.; KIDDY, D.; NITHTHYANANTHAN, R.; BUSH, A.; RICHMOND, W.; JOHNSTON, D.G.; FRANKS, S. - Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. **Clin. Endocrinol.**, **44**: 277-284, 1996.
- ROSENFELD, R.L.; BARNES, R.B.; CARA, J.F.; LUCKY, A.W. - Dysregulation of cytochrome P450c17 $\alpha$  as the cause of polycystic ovarian syndrome. **Fertil. Steril.**, **53**:785-91, 1990.
- SALTIEL, A. R. – Second messengers in insulin action. **Diabetes Care** **13**: 244-56, 1990.
- SIITERI, P.K. & SIMBERG, N.H. - Changing concepts of active androgens in blood. **Clin. Endocrinol. Metab.** **15**:247-58, 1986.
- SMITH, S.; RAVNIKAR, V.A.; BARBIERI, R.L. - Androgen and insulin response to an oral glucose challenge in hyperandrogenic women. **Fertil. Steril.**, **48**:72-7, 1987.
- STEIN, I. F. & LEVENTHAL, M. L. – Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **29**:181-91, 1935.
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETE MELITO - Committee report. **Diabetes Care**, **20(7)**: 1183-97, 1997.
- VALDES, C.T. & ELKIND-HIRSCH, K.E. - Intravenous glucose tolerance test: derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **72**: 642-6, 1991.

- VELAZQUEZ, E. M.; MENDOZA, S. G.; HAMER, T.; SOSA, F.; GLUECK, C. J.–  
Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia,  
insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while  
facilitating normal menses and pregnancy. **Metabolism**, **43**:647-54, 1994.
- WEBER, R.F.A.; PACHE, T.D.; JACOBS, M.L.; DOCTER, R.; LORIAUX, D.L.;  
FAUSER, B.C.J.M.; BIRKENHAGER, J.C. - The relation between clinical  
manifestations of polycystic ovary syndrome and  $\beta$ -cell function. **Clin.**  
**Endocrinol.**, **38**:295-300, 1993.
- WILD, R. A.; PAINTER, P. C.; COULSON, P. B.; CARRUTH, K. B.; RANNEY, G.  
B. – Lipoprotein lipid concentration and cardiovascular risk in women with  
polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **61**:946-51, 1985.
- WILD, R. A. & BARTHOLOMEW, M. J. – The influence of body weight on  
lipoprotein lipids in patients with polycystic ovary syndrome. **Am. J.**  
**Obstet. Gynecol.**, **159**:423-7, 1988.
- WILD, R. A.; GRUBB, B.; HARTZ, A. VAN NORT, J.J.; BACHMAN, W.;  
BARTHOLOMEW, M.- Clinical signs of androgen excess as risk factor for  
coronary artery disease. **Fertil. Steril.**, **54**:255-9, 1990.
- WILD, R. A. – Obesity, lipids, cardiovascular risk and androgen excess. **Am. J.**  
**Med.** **98(Suppl 1<sup>A</sup>):27S-32S**, 1995.
- YEN, S.S.C. - The polycystic ovary syndrome. **Clin. Endocrinol.**, **12**:177-208,  
1980.
- YKI-JARVINEN, H. & KOIVISTO, V. A. – Effects of body composition on insulin  
sensitivity. **Diabetes**, **32**:965-9, 1983.

## 9. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

---

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.

# 10. ANEXOS

---

ANEXO 1







## ANEXO 2

### VALORES DE REFERÊNCIA PARA A FASE FOLICULAR DE MULHERES NORMAIS EM JEJUM

---

0 – 180 pmol/L	Insulina	0 – 30 $\mu$ UI/mL
2,25 – 4,13 nmol/L	Testosterona	0,65 – 1,19 ng/mL
0 – 13,17 pmol/L	Testosterona livre	0 – 3,80 pg/mL
0,95 – 11,67 $\mu$ mol/L	Sulfato de DHEA	35 – 430 $\mu$ g/dL
0,35 – 10,32 nmol/L	Androstenediona	0,10 – 2,99 ng/mL
0,34 – 2,72 nmol/L	17 $\alpha$ hidroxiprogesterona	0,10– 0,80 ng/mL
18 – 114 nmol/L	SHBG	
< 6,9 nmol/L	Progesterona	< 2,0 ng/mL
	Hormônio luteinizante	1,1 – 11,1 UI/L
	Hormônio foliculoestimulante	3,6 – 16,0 UI/L

---