



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE IL-8 E IL-1 β EM UM MODELO DE
CÉLULAS ESTROMAIS ENDOMETRIAIS HIPERINSULINÊMICAS E
HIPERANDROGÊNICAS *IN VITRO***

Amanda de Barros Machado

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, 08 de março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE IL-8 E IL-1 β EM UM MODELO DE
CÉLULAS ESTROMAIS ENDOMETRIAIS HIPERINSULINÊMICAS E
HIPERANDROGÊNICAS *IN VITRO***

Amanda de Barros Machado

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, 08 de março de 2013

*“All truths are easy to understand once they are discovered;
the point is to discover them”.*

Galileo Galilei

*Dedico este trabalho às pessoas que amo e estão sempre ao meu
lado, proporcionando que eu realize todos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, pelo voto de confiança depositado, o que me fez amadurecer muito como aluna.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum, principalmente pela acolhida como uma de suas alunas, pelos incontáveis ensinamentos, orientação e carinho. Por sempre estar disposta a auxiliar em tudo que fosse necessário, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Helena Corleta, pelas relevantes contribuições em nossos encontros científicos. À Prof^a. Dr^a. Maria Flávia Ribeiro, pelos valorosos ensinamentos como professora.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por terem me proporcionado uma excelente formação.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre: equipe do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, pelo auxílio com as coletas de material cirúrgico.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia, pelas conversas pelos corredores, muitas vezes esclarecedoras de muitas dúvidas.

Aos mais que colegas, grandes amigos, Gustavo Ferreira e Aline Amaral, pela agradável convivência diária, pelos grandes ensinamentos nas muitas horas compartilhadas na sala de cultura. Mas acima de tudo, pela amizade, carinho, compreensão e companheirismo. É um prazer dividir momentos com pessoas como vocês, sempre dispostas a ajudar e incentivando meus passos.

À todos meus colegas de laboratório: Carol Hillebrand, Patrícia, Diego, Carlos, Gabriela, Gisele, Fernanda, Joelson, Anita, Carol Luft, Juliana, Tadeu, por tornarem o ambiente de trabalho muito agradável, por sempre estarem disponíveis a ajudar, incentivando e não deixando eu me abalar com os percalços científicos. Um agradecimento especial aos grandes colegas, Dr.

Vanderlei Biolchi e Dr^a. Ana Santin, as valiosíssimas dicas e pelo auxílio em várias etapas deste projeto.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, possibilitando que eu trilhasse meu caminho com muita segurança e apoio. Ao amor incondicional, pelos ótimos bons exemplos e por sempre estarem antes, durante e depois das minhas escolhas. Às minhas irmãs e sobrinhos por serem pessoas essenciais na minha vida.

Às minhas amigas, Carolina, Emily, Mariana, Ana Paula e Raquel, pelos desabaços, incentivos e momentos de descontração.

À Fiona, minha amável cachorra, por ser fiel companheira na hora dos estudos e por tornar meus dias mais alegres.

E, por fim, ao meu namorado e grande amigo, Renan Bauer, por me acompanhar incansavelmente durante toda essa trajetória com muito amor e paciência. Por ter abdicado de muitos momentos para estar ao meu lado, em vários finais de semana de estudo e trabalho, sempre com muita dedicação e companheirismo. Mas principalmente por ser a pessoa que mais confia na minha capacidade e estar sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	18
INTRODUÇÃO	19
Endométrio e receptividade uterina	19
Citocinas	20
Interleucina-8	21
Interleucina-1β	22
Síndrome dos Ovários Policísticos	24
Características clínicas da SOP	25
Aspectos psicológicos	25
Aspectos reprodutivos	26
Aspectos metabólicos	26
Metformina	28
JUSTIFICATIVA	31
HIPÓTESES	32
OBJETIVOS	33

MATERIAS E MÉTODOS	34
Delineamento	34
Pacientes.....	34
Cálculo do Tamanho da Amostra.....	34
Aspectos Éticos.....	34
Coleta das amostras.....	35
Isolamento das células endometriais estromais e epiteliais	35
Manutenção das células em cultura	36
Imunocitoquímica.....	37
Avaliação da viabilidade e proliferação celular	38
Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) .	39
Extração de RNA total.....	39
Quantificação do RNA.....	40
Síntese do cDNA.....	40
Quantificação do cDNA.....	41
PCR em Tempo Real	41
Curva de Padronização.....	43
Normalização	43
Protocolo da PCR em tempo real para normalização	45
Protocolo da PCR em tempo real para os genes de interesse	46
Análise estatística	47
Locais de realização do Projeto	49

RESULTADOS	50
CAPÍTULO I	51
Estabelecimento da cultura primária de células estromais endometriais com características de SOP	51
DISCUSSÃO CAPÍTULO I	58
CAPÍTULO II	61
Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária com características de SOP	61
DISCUSSÃO CAPÍTULO II	64
CAPÍTULO III	67
Análise da expressão gênica da IL-8 e IL-1β no modelo estabelecido.....	67
DISCUSSÃO CAPÍTULO III	71
CONCLUSÃO.....	73
PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO 1	88

RESUMO

O endométrio é a mucosa que reveste o útero. A receptividade uterina é definida como um estado em que o endométrio se encontra receptivo à implantação do blastocisto. E, a preparação do endométrio para a implantação não é somente uma questão de estimulação hormonal adequada, depende da interação entre o blastocisto e o endométrio. Esta interação envolve uma complexa sequência de eventos de sinalização e uma variedade de moléculas. As concentrações de interleucina-8 (IL-8) e interleucina-1 β (IL-1 β) estão correlacionadas com o processo de implantação. Em humanos, a taxa de insucesso desse processo é alta e ocasionada por diversos fatores. A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino-ginecológico que afeta de 6 a 8 % das mulheres em idade reprodutiva, e se caracteriza, principalmente, por anovulação crônica e hiperandrogenismo, estando diretamente relacionada à infertilidade feminina. Apesar da incerteza sobre a causa primária da SOP, há relatos sobre a importância da hiperinsulinemia na sua promoção. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo de hiperinsulinemia e hiperandrogenismo em células estromais endometriais *in vitro*, simulando características de SOP; identificar o melhor gene normalizador para estudos de expressão gênica em amostras das células em cultivo; avaliar o efeito da metformina sobre a proliferação celular e expressão gênica da IL-8 e IL-1 β no modelo proposto. O tecido endometrial foi obtido de pacientes submetidas a histerectomia. A cultura primária das células estromais foi padronizada e as células foram divididas em sete grupos de tratamento: estradiol (G1); estradiol e progesterona (G2); estradiol, progesterona e insulina (G3); estradiol, progesterona e diidrotestosterona (G4); estradiol, progesterona e metformina (G5); estradiol, progesterona, insulina e diidrotestosterona (G6); estradiol, progesterona, insulina, diidrotestosterona e metformina (G7). Foi realizada análise de imunocitoquímica para vimentina para confirmação do cultivo com células estromais. Para avaliar a viabilidade e proliferação celular ao longo do tempo foi utilizado o ensaio de MTT em dois tempos diferentes de

cultivo. As extrações de RNA foram realizadas e o cDNA obtido das amostras foi utilizado para a amplificação do mRNA de cinco genes candidatos a normalizadores e para avaliar a expressão dos genes da IL-8 e IL-1 β através de PCR em tempo real. O estabelecimento da cultura de células estromais foi confirmado através da coloração positiva para a proteína vimentina. As células mantiveram-se viáveis durante todo o período de cultivo, apresentando aumento significativo na proliferação celular no tempo 8 em relação ao tempo 4 em todos os grupos. O grupo G7 (tratado durante 48 horas com metformina) apresentou uma menor taxa de proliferação em relação aos grupos G2, G3 e G6. Para análise de expressão gênica nestas células, o gene que mostrou os melhores parâmetros de estabilidade de expressão no modelo celular proposto foi o gene *HPRT1*. Observamos uma maior expressão do gene da IL-8 no grupo G5 tratado durante 48 horas em relação ao mesmo grupo tratado durante o período de 24 horas. Verificou-se maior expressão do gene da IL-1 β no grupo G5 quando comparado a todos os outros grupos no período de 48 horas de tratamento com metformina. Entretanto, o grupo G7, também tratado com metformina, não apresentou diferença estatística em relação ao tempo de tratamento em nenhum dos genes estudados. Esses resultados demonstram que o modelo de hiperinsulinemia e hiperandrogenismo em cultura de células estromais endometriais é viável. Neste modelo, em que foram testados cinco genes em relação à sua estabilidade de expressão, o gene *HPRT1* apresentou uma boa estabilidade, ao contrário de outros genes frequentemente utilizados como genes de referência. O tratamento com metformina apresentou um efeito antiproliferativo nas células do grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico. No período de 48 horas aumentou a expressão do gene da IL-1 β no grupo tratado somente com o medicamento. Sugerindo uma ação inibitória da insulina sobre a expressão dos genes da IL-8 e IL-1 β no grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico. Mais estudos são necessários para melhor entendimento do efeito da metformina nos fatores envolvidos durante a implantação.

Palavras-chave: metformina; interleucina-8; interleucina-1 β ; síndrome dos ovários policísticos; gene normalizador; hiperinsulinemia; hiperandrogenismo.

ABSTRACT

The endometrium is the mucosa lining the uterus. The uterine receptivity is defined as a condition in which the endometrium is receptive to implantation of the blastocyst. The preparation of the endometrium for implantation is not only a matter of proper hormonal stimulation, it depends on the interaction between the blastocyst and the endometrium. This interaction involves a complex sequence of events and a variety of signaling molecules. The concentrations of interleukin-8 (IL-8) and interleukin-1 β (IL-1 β) are correlated to the implantation process. In humans, the failure rate of this process is high and caused by several factors. The polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine-gynecological disorder that affects from 6 to 8 % of women of reproductive age. It is characterized mainly by chronic anovulation and hyperandrogenism and directly related to female infertility. Despite the uncertainty about the primary cause of PCOS, there are reports about the importance of hyperinsulinemia in promoting it. The aim of this study was to establish a model of hyperinsulinemia and hyperandrogenism in endometrial stromal cells *in vitro*, simulating features of PCOS; to identify the best housekeeping gene for gene expression studies in the cultured cells; to evaluate the effects of metformin on cell proliferation, as well as IL-8 and IL-1 β gene expression in the proposed culture model. The human endometrial tissue was obtained from patients undergoing hysterectomy. The primary culture of stromal cells was standardized and divided into seven treatment groups: estradiol (G1); estradiol and progesterone (G2); estradiol, progesterone and insulin (G3); estradiol, progesterone and dihydrotestosterone (G4); estradiol, progesterone and metformin (G5); estradiol, progesterone, insulin and dihydrotestosterone (G6); estradiol, progesterone, insulin, dihydrotestosterone and metformin (G7). Immunocytochemistry analysis for vimentin were performed. Cell viability and proliferation were evaluated by MTT assay at two days in different times of cultivation. RNA extractions were performed and the cDNA obtained from primary culture was used to amplify five candidates to

housekeeping genes mRNA and to evaluate IL-8 and IL1 β expression by real time PCR. The stromal culture cell establishment was confirmed by positive staining for vimentin. The cells remained viable throughout the cultivation period, with significant cell proliferation increase at day 8 compared to day 4 in all groups. The G7 group (metformin treated for 48 hours) showed lower proliferation rate than G2, G3 and G6 groups. For gene expression analysis in these cells, the gene showing the best parameters of stability of expression was *HPRT1*. Increased gene expression of IL-8 was observed in G5 group treated for 48 hours compared to the same group during 24 hours. Similarly, the G5 group showed higher IL-1 β gene expression when compared to all other groups treated with metformin for 48 hours. However, the G7 group, also metformin treated, did not show statistically significant difference in treatment time of any studied genes. These results suggest that model of hyperinsulinemia and hyperandrogenism in endometrial stromal cells is viable and provides a good cell sampling to molecular analysis under different experimental conditions. In this model, several genes were tested for expression stability. *HPRT1* presented the best values, unlike others classical housekeeping genes. The metformin treatment showed an antiproliferative effect on cells in hyperinsulinemic and hyperandrogenic group and at 48 hours increased IL-1 β gene expression in the treated group with the drug alone. It suggests an inhibitory action of insulin on these genes expression in the hyperinsulinemic and hyperandrogenic group. More studies are needed to better understand the effect of metformin on the factors involved during implantation.

Keywords: metformin; interleukin-8; interleukin-1 β ; polycystic ovary syndrome; housekeeping genes; hyperinsulinemia; hyperandrogenism.

LISTA DE ABREVIATURAS

18S rRNA	18s ribossomal RNA
ACTB	β -actina
ANOVA	Análise de Variância
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
B2M	β -2-microglobulina
cAMP	3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
C _T	Ciclo limiar
CV	Coefficiente de variação
CYC1	Cytochrome c-1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DHT	Diidrotestosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> High glucose
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
E ₂	Estradiol
ERK	Proteína cinase ativada por sinais extracelulares
ESHRE	Européia de Reprodução Humana e Embriologi
F12	Ham's F12 Coon's modificado
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
GLM	<i>General Linear Model</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPRT1	Hipoxantina fosforibosil-transferase 1
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGFBP-1	Proteína ligadora do fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-8	Interleucina-8
LH	Hormônio luteinizante
MFC	<i>Maximum fold change</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MTT	<i>Dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide</i>
NFQ	<i>Nonfluorescent quencher</i>
P	Progesterona
p38	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
PBS	Tampão Salina-Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
proMMP-3	Metaloproteinase de matrix 3
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de
RT-qPCR	Transcrição Reversa
SBF	Soro bovino fetal
SHBG	Globulina carreadora de esteroides sexuais
SOP	Síndrome dos ovários policístico
	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano,
YWHAZ	polipeptídeo zeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interação entre o endométrio e o trofoblasto	21
Figura 2: Critério de diagnóstico da Síndrome dos Ovários Policístico. Definição ESHRE/ASRM.....	25
Figura 3: Esquema de características clínicas reprodutivas, metabólicas e psicossociais da síndrome dos ovários policísticos.....	28
Figura 4: Algoritmo dos grupos experimentais.	37
Figura 5: Curvas de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real.....	42
Figura 6: Imagens obtidas por microscópio invertido de contraste de fase de células estromais endometriais	52
Figura 7: Imunocitoquímica de fluorescência.	54
Figura 8: Análise da viabilidade celular por MTT nos tempos 4 e 8....	55
Figura 9: Análise da proliferação celular através de MTT no tempo 4..	56
Figura 10: Análise da proliferação celular através de MTT no tempo 8..	57
Figura 11: Estabilidade dos genes normalizadores quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo.....	63
Figura 12: Expressão gênica de IL-8 nos diferentes grupos no tempo de tratamento com metformina de 24 e 48 horas.....	67
Figura 13: Expressão gênica de IL-8 nos diferentes tempos de tratamento com metformina (24 e 48 horas).	68

Figura 14: Expressão gênica de IL-1 β nos diferentes grupos no tempo de tratamento com metformina de 24 e 48 horas..... 69

Figura 15: Expressão gênica de IL-1 β nos diferentes tempos de tratamento com metformina (24 e 48 horas).. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações sobre os genes candidatos a normalizadores para expressão gênica em cultura primária de células estromais endometriais..... 45

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do mRNA dos genes candidatos a normalizadores e tamanho do fragmento amplificado.....46

Tabela 3: Concentração de Estradiol (E2), Progesterona (P), Insulina, Diidrotestosterona (DHT) e Metformina nos diferentes grupos.....53

Tabela 4: Medidas de dispersão dos valores de CT dos genes analisados.....62

Tabela 5: Ordem dos genes candidatos a normalizador de RT-qPCR em cultura primária de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas com base nos valores de estabilidade de expressão calculado pelo programa NormFinder..... 62

INTRODUÇÃO

Endométrio e receptividade uterina

O endométrio é a mucosa que reveste o útero. As oscilações mensais hormonais femininas fazem o endométrio passar por estágios diferentes apresentando espessuras diferentes, a fim de proporcionar um local adequado para a adesão e implantação do blastocisto, o que inclui um estroma espesso e rico em nutrientes (Dallenbach, Sterzik et al. 1987; Gargett and Ye 2012).

A receptividade uterina é definida como um estado em que o endométrio se encontra receptivo à implantação do blastocisto. O sucesso da implantação requer uma precisa sincronização entre o ambiente uterino e o blastocisto (Psychoyos 1986; Bourdieu, Shao et al. 2012).

O endométrio é um órgão especializado e hormonalmente regulado, onde passa por complexas alterações em cada ciclo menstrual, apresentando um curto período de receptividade ao embrião, conhecido como janela de implantação. Inicialmente, o estradiol induz a proliferação do tecido endometrial seguido pela progesterona que induz a diferenciação e o estabelecimento, entre o 19º ao 24º dia do ciclo menstrual, de mudanças estruturais e funcionais que permitem a implantação do blastocisto (Wilcox, Baird et al. 1999; Revel 2012).

Muitos estudos demonstraram que a preparação do endométrio para a implantação não é somente uma questão de estimulação hormonal adequada, mas sim que a implantação depende da interação entre o blastocisto e o endométrio (Giudice 1999). Esta interação envolve uma complexa sequência de eventos de sinalização e uma variedade de moléculas. O diálogo molecular envolve a interação célula-célula mediado por citocinas, lecitinas, integrinas, prostaglandinas, uma variedade de fatores de crescimento, moléculas de adesão, entre outros. Cada uma dessas moléculas quando expressas ou inibidas contribuem para formar um ambiente adequadamente receptivo (Giudice 1999; Diedrich, Fauser et al. 2007; Lessey 2011).

Citocinas

Citocinas são glicoproteínas multifuncionais que atuam de forma não-enzimática, regulando crescimento, diferenciação e função de várias células (Metcalf 1989).

A partir do início do século XX durante o qual houve um crescente aumento do conhecimento bioquímico, pesquisadores como o geneticista Little (1924), começaram a discutir o fato do mamífero do sexo feminino ser capaz de tolerar a presença e o crescimento do embrião, sendo este um “órgão” geneticamente estranho. Porém, foi Medawar (1953) quem trouxe esta questão para o foco científico com o ensaio intitulado “*Some Immunological and Endocrinological Problems Raised by the Evolution of Viviparity in Vertebrates*” (Billington 2003).

Desde então a imunologia reprodutiva demonstrou que as citocinas não se limitam ao sistema hematopoiético, exercendo também papel fundamental em muitos outros sistemas fisiológicos, como no processo reprodutivo (Robertson, Seamark et al. 1994; Chaouat, Menu et al. 1997; Billington 2003; Rajaei, Zarnani et al. 2011). Sabe-se que uma série de citocinas e fatores de crescimento são sintetizados no endométrio em resposta aos hormônios esteroides sexuais e atuam para regulamentar a função endometrial (Figura 1) (Lindhard, Bentin-Ley et al. 2002).

A composição de citocinas da cavidade uterina parece desempenhar um papel central no desenvolvimento do embrião atuando como potentes sinalizadores intracelulares, regulando funções celulares endometriais e interações endométrio-embrião (Simon, Gimeno et al. 1997; Rashid, Lalitkumar et al. 2011).

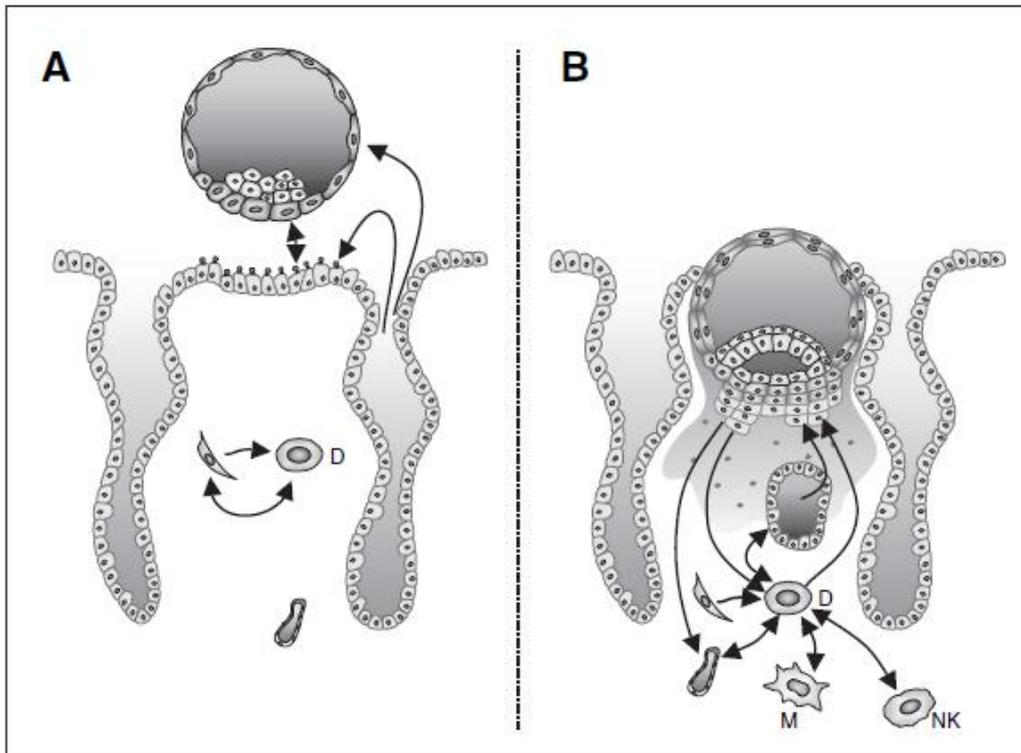


Figura 1: Interação entre o endométrio e o trofoblasto, (A) pré-implantação (B) durante a implantação, mediados pelas citocinas indicadas pelas setas. Durante a fase de pré-implantação as citocinas são secretadas pelas glândulas uterinas, fibroblastos estromais, (D) células deciduais e pelo trofoblasto. Na implantação as citocinas e os leucócitos (predominantemente natural killer uterino – uNK e macrófagos – M) promovem a diferenciação celular, o tráfico de leucócitos e a decidualização. Adaptado de Dimitriadis, White et al., 2005. (Dimitriadis, White et al. 2005).

Interleucina-8

A interleucina-8 (IL-8) é uma quimiocina membro da família das citocinas que funciona como mediador da inflamação. É um potente agente angiogênico (Koch, Poverini et al. 1992), possui habilidade de recrutar e ativar neutrófilos (Mukaida, Shiroo et al. 1989) e linfócitos T (Larsen, Anderson et al. 1989). É produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo monócitos (Yoshimura, Matsushima et al. 1987), células endoteliais (Strieter, Kunkel et al. 1989), fibroblastos (Larsen, Anderson et al. 1989), células mesoteliais (Arici, Tazuke et al. 1996), e células endometriais (Goodman, Wood et al. 1992).

Estudos sugerem que como o recrutamento de leucócitos apresenta muitas características em comum com a invasão do trofoblasto, é provável que as quimiocinas desempenhem um papel importante no período de nidação (Simon, Valbuena et al. 1998; Red-Horse, Drake et al. 2001; Dimitriadis, White et al. 2005). Além disso, concentrações de IL-8 correlacionam-se com a liberação de colagenase, um passo crucial que regula o processo de remodelação da matrix extracelular cervical (Garcia-Velasco and Arici 1999).

As concentrações da IL-8 também são correlacionadas ao crescimento folicular. IL-8 foi detectada em ciclos não estimulados (Gazvani, Bates et al. 2000), implicando no envolvimento desta quimiocina no processo natural de foliculogênese e ovulação (Malizia, Wook et al. 2010).

A IL-8 estimula a secreção trofoblástica de progesterona, contribuindo para a manutenção de uma gravidez com sucesso (Tsui, Chen et al. 2004), enquanto níveis séricos reduzidos está correlacionado com maior risco de gravidez extrauterina (Morelli, Keegan et al. 2008) e altos níveis no fluido folicular está relacionado a gravidez intrauterina normal (Sarapik, Velthut et al. 2012).

Portanto, a IL-8 é conhecida por desempenhar um papel importante nas interações materno-fetal, apresentando dados controversos em relação a seus níveis elevados no soro de pacientes com abortos recorrentes (Bamberg, Fotopoulou et al. 2012).

Interleucina-1 β

A interleucina-1 β (IL- β) é uma das isoformas do polipeptídeo interleucina-1 (IL-1) (Ruoslahti and Pierschbacher 1987), é produzida principalmente por macrófagos do sangue como um mediador de resposta inflamatória, controlando também a proliferação celular, diferenciação e apoptose (Dinarello 1996; Dinarello 2009).

No endométrio humano, a imunorreatividade da IL-1 β foi detectada no estroma e epitélio, bem como sobre os macrófagos e células endoteliais, com expressão máxima de RNA mensageiro (RNAm) no final da fase secretória (Kauma, Matt et al. 1990; Tabibzadeh and Sun 1992; Rossi, Sharkey et al. 2005). É identificada como um fator parácrino que modula a comunicação entre o endométrio materno e o trofoblasto (Simon, Frances et al. 1994; Simon, Frances et al. 1994; Krussel, Bielfeld et al. 2003; Geisert, Fazleabas et al. 2012).

Estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* sugerem que a IL-1 β está relacionada na decidualização das células endometriais, através da reorganização do citoesqueleto de actina e indiretamente pelo aumento das concentrações intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) pela regulação da prostaglandina-endoperóxido sintase 2 e prostaglandina E₂ (Rawdanowicz, Hampton et al. 1994; Strakova, Srisuparp et al. 2000; Ilnatovych, Livak et al. 2009).

Resultados também indicam que a IL-1 β estimula a fosforilação da proteína cinase ativada por sinais extracelulares (ERK) e *mitogen-activated protein kinases* (p38) de uma forma tempo-dependente (Strakova, Srisuparp et al. 2000). Utilizando inibidores específicos foi demonstrado que as vias da ERK e p38 estão envolvidas na síntese de IL-1 β induzida pela metaloproteinase de matrix 3 (proMMP-3) (Strakova, Szmidt et al. 2003; Fazleabas, Kim et al. 2004).

Dados mais recentes sobre a estimulação parácrina pela IL-1 β secretada pelo estroma demonstram que quando níveis de IL-1 β estão elevados a migração do trofoblasto ocorre com sucesso, e quando os níveis estão baixos leva à morte embrionária, ressaltando a importância desta citocina no estabelecimento da gestação (von Wolff, Thaler et al. 2000; Ashley, Henkes et al. 2010; Gonzalez, Neufeld et al. 2011).

Síndrome dos Ovários Policísticos

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino-ginecológico que afeta cerca de 6 a 8 % das mulheres em idade reprodutiva (Gluszk, Stopinska-Gluszk et al. 2012).

A SOP foi descrita pela primeira vez em 1935 por Stein e Leventhal, em mulheres com infertilidade que apresentavam distúrbios menstruais e padrão morfológico policístico ovariano (Gluszk, Stopinska-Gluszk et al. 2012). Ao longo dos anos foram sendo demonstradas outras características endócrinas e bioquímicas, tornando-a clinicamente heterogênea.

A definição atual da SOP foi estabelecida por um consenso patrocinado pela Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), em Rotterdam, em maio de 2003, determinando a presença da síndrome quando a paciente apresentar no mínimo dois dos três seguintes critérios: (1) distúrbios menstruais/anovulação; (2) evidência clínica ou bioquímica de hiperandrogenismo; (3) padrão policístico ovariano ultra sonográfico (Figura 2) (Group 2004; Strowitzki, Capp et al. 2010).

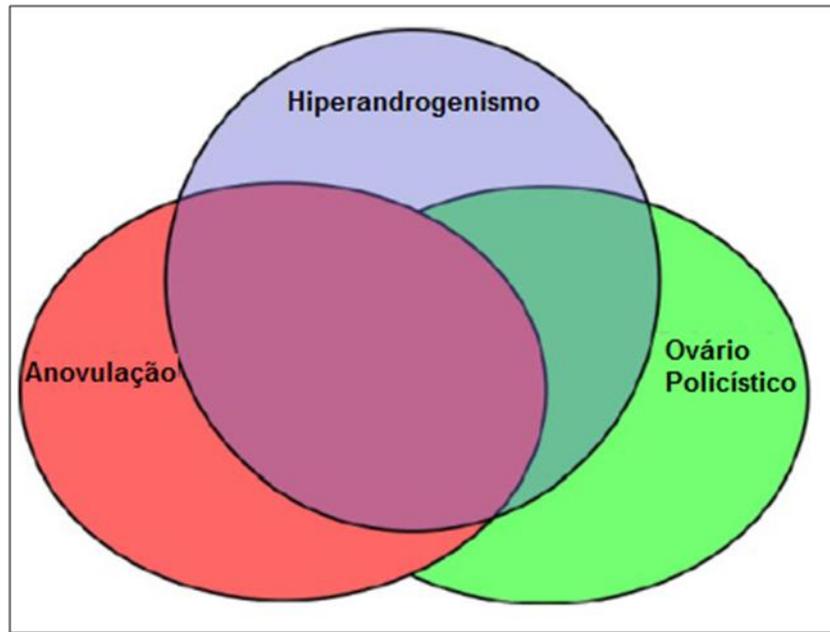


Figura 2: Critério de diagnóstico da Síndrome dos Ovários Policístico, incluindo no mínimo duas das três características. Definição ESHRE/ASRM.

Características clínicas da SOP

As mulheres com SOP podem apresentar uma variedade de sintomas clínicos graves, incluindo aspectos psicológicos, reprodutivos e implicações metabólicas (Figura 3). De acordo com a heterogeneidade da SOP, essas características clínicas podem variar ao longo do ciclo de vida da paciente. A SOP é um distúrbio que começa a se manifestar geralmente na adolescência, progredindo para a infertilidade e aumento de complicações metabólicas ao longo do tempo (Teede, Deeks et al. 2010).

Aspectos psicológicos

A maioria das pesquisas tem se concentrado nos aspectos biológicos e fisiológicos da síndrome. Os desafios para a identidade feminina e imagem corporal devido à obesidade, ao hirsutismo, acne, infertilidade e também ao comprometimento em longo prazo da qualidade de vida são aspectos

importantes a serem discutidos da doença (Coffey, Bano et al. 2006; Deeks, Gibson-Helm et al. 2010).

As mulheres com SOP são mais propensas à depressão, ansiedade, baixa autoestima, percepção negativa da imagem corporal e disfunção psicosssexual (Coffey and Mason 2003; Deeks, Gibson-Helm et al. 2010). Estes aspectos contribuindo para um impacto negativo psicossocial reduzindo a motivação e a capacidade de programar e sustentar as mudanças de estilo de vida que são fundamentais nessa condição (Moran, Pasquali et al. 2009).

Aspectos reprodutivos

A disfunção ovariana geralmente se manifesta como oligomenorréia ou amenorreia resultante de oligo-ovulação ou anovulação crônica, sendo este o principal fator de infertilidade dessas pacientes, estando presente em 70% das mulheres com SOP e, entre as inférteis, a SOP pode ser considerado o fator causal de 30% dos casos de infertilidade (Klonoff-Cohen, Chu et al. 2001; Boivin, Griffiths et al. 2011). Entretanto outros fatores podem contribuir para menor fertilidade destas mulheres: a redução na qualidade dos oócitos e embriões, alterações endometriais e dificuldades na implantação (Brassard, AinMelk et al. 2008).

O excesso de androgênios, o hiperandrogenismo, na SOP é resultado do aumento da síntese e liberação de androgênios ovarianos. Elevado nível do hormônio luteinizante (LH) e da insulina aumentam sinergicamente a produção de androgênios. Mulheres com SOP e hiperinsulinemia apresentam maior produção de testosterona, determinando atresia folicular, anovulação, padrão polimicrocístico a ecografia (efeitos sobre o ovário), acne, hirsutismo, alopecia androgênio-dependente, distribuição central de gordura – efeitos androgênicos.

Aspectos metabólicos

Um importante achado ocorreu em meados de 1980, com a descrição de hiperinsulinemia consequente à resistência periférica à insulina (Diamanti-

Kandarakis and Dunaif 2012). A resistência à insulina resulta em hiperinsulinemia associada com seus complexos efeitos sobre regulação do metabolismo lipídico e proteico, síntese e modulação da produção de androgênios. As causas são complexos mecanismos genéticos e ambientais (Diamanti-Kandarakis and Papavassiliou 2006) e ocorre em cerca de 50 a 80 % das mulheres com SOP (Traub 2011).

O aumento da concentração sérica de insulina relaciona-se também ao aumento da síntese hepática do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), redução da produção hepática de globulina carreadora de esteroides sexuais (SHBG) e da proteína ligadora do fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGFBP-1), além de alterações clínicas como perfil lipídico aterogênico, hipertensão, diabetes mérito tipo 2, que determinam aumento dos riscos cardiovasculares (Dunaif, Graf et al. 1987; Goudas and Dumesic 1997; Harborne, Fleming et al. 2003; Azziz, Carmina et al. 2006; Legro, Schlaff et al. 2010).

A obesidade entre as condições clínicas frequentes parece ser o fator mais importante para a hiperinsulinemia, estando diretamente relacionada à SOP. A incidência de obesidade em mulheres com SOP varia de 30 a 75 % conforme a população estudada (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012).

Estudos em diferentes regiões do mundo demonstram que a prevalência da síndrome metabólica é mais alta nas pacientes com SOP do que nas mulheres controle (proporção aproximada de 47 % versus 4 %) (Dokras, Bochner et al. 2005; Hosseinpanah, Barzin et al. 2011; Mandrelle, Kamath et al. 2012), estando associado com dislipidemia e disfunções endoteliais aumentando os riscos de doenças cardiovasculares (Rajendran, Willoughby et al. 2009; Moran, Arriaga et al. 2012).

A primeira opção de tratamento para mulheres com SOP e obesidade são modificações no estilo de vida, com dietas e exercícios físicos. A perda de peso de 5 a 10 % pode restaurar alterações hormonais associadas à SOP, com

aumento das concentrações plasmáticas de SHBG e diminuição dos níveis séricos de insulina e androgênios, restabelecendo a função ovariana e melhorando a resposta à indução da ovulação (Guzick, Wing et al. 1994; Motta 2012).

Nos casos em que somente mudança no estilo de vida não apresenta êxito, uma das opções terapêuticas seria o uso de agentes insulino-sensibilizantes, sendo a metformina a principal medicação deste grupo, com sua atuação no tratamento da infertilidade amplamente discutida e pesquisada nos últimos anos (Velazquez, Mendoza et al. 1994; Santana, de Sa et al. 2004; Costello, Chapman et al. 2006; Zhang and Liao 2010).

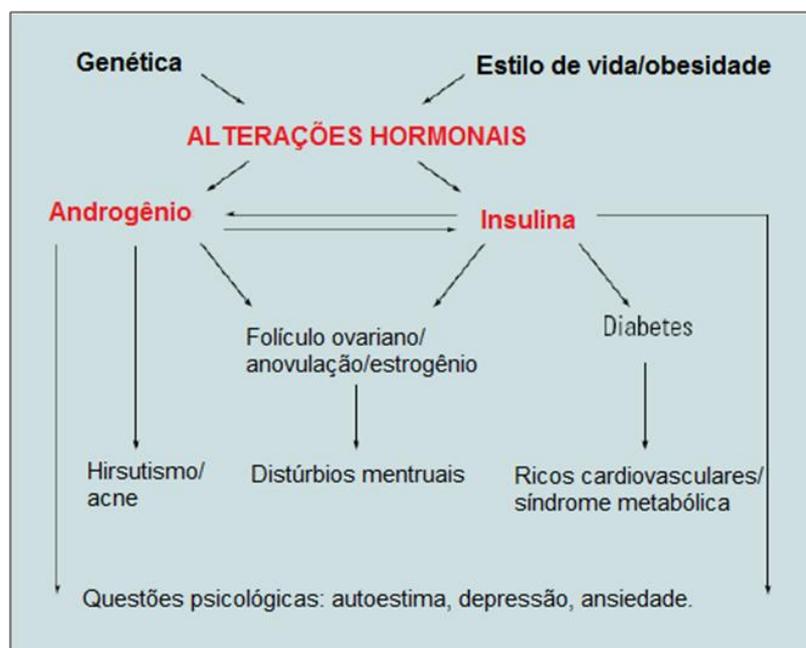


Figura 3: Esquema de características clínicas reprodutivas, metabólicas e psicossociais da síndrome dos ovários policísticos. Adaptado de Teede, Deeks, et al.,2010 (Teede, Deeks et al. 2010).

Metformina

A metformina, (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride), pertencente à classe das biguanidas, é um medicamento insulino-sensibilizante que possui ações pleiotrópicas em vários tecidos afetados pela resistência à insulina e

hiperinsulinemia, tais como o fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, endotélio e ovários (Palomba, Falbo et al. 2009).

Em 1994, Velazquez e colaboradores, publicaram o primeiro estudo relatando os efeitos benéficos da metformina nas pacientes com SOP. O tratamento com metformina durante 2 meses em 26 pacientes obesas com SOP, levou à atenuação da hiperinsulinemia, redução dos níveis de androgênios, e regularização da menstruação (Velazquez, Mendoza et al. 1994). Dois anos mais tarde, Nestler & Jakubowicz, relataram que a administração da metformina em mulheres com SOP diminuía a atividade das enzimas do complexo citocromo P450c17 α e da secreção de androgênio ovariano, enquanto reduzia os níveis de insulina (Nestler and Jakubowicz 1996).

Desde então, uma série de estudos clínicos têm abordado o impacto do tratamento com metformina em mulheres com SOP. Os dados ainda são um pouco controversos, mas a maioria os estudos confirmaram que o tratamento com metformina reduz os níveis de androgênios em mulheres com SOP (Katsiki and Hatzitolios 2010).

O uso de metformina em mulheres obesas com SOP resulta em uma significativa redução nos níveis de androgênios e colesterol total, e ainda são restaurados com regularidade os ciclos menstruais (Chou, von Eye Corleta et al. 2003; Seibel, Chou et al. 2008; Moran, Pasquali et al. 2009) principalmente quando combinado com mudança no estilo de vida da paciente (Ladson, Dodson et al. 2011).

A capacidade da metformina em atenuar o excesso de androgênios e as possíveis ações diretas sobre a função ovariana levou a investigação do seu papel sobre aspectos reprodutivos. Vários estudos foram realizados para determinar seus efeitos metabólicos-hormonais na fertilidade das pacientes com SOP, muitas vezes obtendo resultados conflitantes (Lord, Flight et al.

2003; Palomba, Orio et al. 2005; Legro, Barnhart et al. 2007; Zhang, Legro et al. 2010).

Atualmente estudos demonstram que a metformina é uma opção farmacêutica para indução da ovulação em mulheres com SOP, porém menos eficientes do que quando combinada com citrato de clomifeno (CC), ou comparada a monoterapia do CC (Baran, Api et al. 2010).

Embora tenha sido utilizada clinicamente por mais de 40 anos, pois é o medicamento mais utilizado em diabetes mellitus tipo 2, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. A metformina é uma terapia conhecida para mulheres com SOP anovulatória, no entanto, a função que exerce no tecido endometrial não está bem esclarecida. Germeyer e colaboradores mostraram recentemente e pela primeira vez, que a metformina exerce influência no processo de decidualização das células estromais *in vitro*, levando a uma menor expressão de prolactina e IGFBP-1. Além disso, a expressão gênica das citocinas, IL-8 e IL-1 β , foram modificadas pela metformina (Germeyer, Jauckus et al. 2011).

JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que pacientes com SOP são inférteis devido a disfunções ovulatórias, porém uma vez a ovulação restaurada, muitas pacientes continuam a enfrentar menores taxas de concepção (Kodama, Fukuda et al. 1995; Okon, Laird et al. 1998) e maiores taxas de aborto (Tulppala, Stenman et al. 1993; Clifford, Rai et al. 1994; Okon, Laird et al. 1998; Qiao and Feng 2011). Portanto, a compreensão dos efeitos da metformina sobre o endométrio e fatores relacionados ao processo de decidualização e implantação são importantes para que possíveis novas terapias em medicina reprodutiva possam ser desenvolvidas.

HIPÓTESES

- É possível o desenvolvimento de um modelo de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas em cultura que permaneça viável ao longo de todo o tratamento hormonal;

- O tratamento com metformina altera a resposta da proliferação celular no grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico;

- O tratamento com metformina estimula a resposta da expressão do RNAm do gene da IL-8 e IL-1 β .

OBJETIVOS

- Estabelecer um modelo de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas *in vitro*;
- Avaliar a viabilidade e proliferação celular no modelo de cultura proposto;
- Identificar o melhor gene normalizador para os estudos de expressão gênica;
- Avaliar a ação da metformina sobre expressão do RNAm da IL-8 e IL-1 β no modelo de cultura estabelecido.

MATERIAS E MÉTODOS

Delineamento

O presente estudo trata-se de um estudo experimental *in vitro*.

Pacientes

As células endometriais foram provenientes de pacientes submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cuja indicação foi independente deste estudo. As pacientes foram informadas que as células endometriais normalmente são descartadas e permitiram, mediante assinatura de consentimento livre e esclarecido, a utilização deste material na pesquisa. Foram excluídas do estudo: pacientes pós-menopausa; pacientes que utilizaram hormônios esteroides nos três meses anteriores à cirurgia; pacientes com endocrinopatias ou outras doenças uterinas associadas.

Cálculo do Tamanho da Amostra

Para detectar uma diferença de um desvio padrão (tamanho de efeito de moderado a grande) na expressão proteica da IL-8 entre os grupos, considerando um $\alpha=0,05$, um poder de 90% e uma correlação entre as medidas de 0,7 são necessárias 7 culturas. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa PEPI 4.0.

Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, sob o número 11-0494. As pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no centro cirúrgico imediatamente após a retirada do útero. O tecido foi identificado e fragmentos do mesmo foi coletado sendo o restante do material encaminhado ao exame anátomo-patológico.

Isolamento das células endometriais estromais e epiteliais

O endométrio obtido de úteros pós-histerectomia foi acondicionado em frasco estéril contendo solução com sais de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e solução de penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA). O material foi transportado ao laboratório acondicionado em baixa temperatura. No laboratório, em capela de fluxo laminar foram retirados os coágulos e o material foi reduzido a fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank's. Transferido para um frasco de vidro pesado previamente e determinado o peso do tecido. O tecido foi armazenado em frasco contendo solução de Hank's a 4°C por 12 a 24 horas para posterior dissociação. Após, foi submetido à dissociação enzimática durante 2 horas a 37°C. O meio de dissociação foi preparado com solução de Hank's e a enzima colagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) (7,5 mg/g de tecido). O volume total de meio de dissociação é calculado em função do peso do tecido a ser digerido, mantendo-se uma relação de 10 mL de meio para cada 4 g de tecido. O processo de dissociação enzimática é realizado em frasco de Erlenmeyer estando sob constante agitação. Após a dissociação enzimática, a ação da colagenase foi inibida pela adição de igual volume de solução de Hank's. O isolamento das células endometriais foi baseado na modificação do trabalho de Satyaswaroop e colaboradores (Satyaswaroop, Bressler et al. 1979). O material dissociado foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso com meio (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* High glucose - DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), uma nova centrifugação foi feita, e a suspensão celular foi vertida em filtro de nylon 100 micra (Polylabo, Strasbourg, France) para reter porções de

tecido não digeridas. Para promover a separação das células epiteliais das estromais o filtrado passou por um separador celular de 40 µm (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA) onde as células estromais passaram e as epiteliais ficaram retidas. As células estromais foram suspensas com meio DMEM suplementado com 1 % de antibiótico (penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL), 10 % soro bovino fetal (SBF – Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e estradiol 10^{-5} M para as mesmas serem semeadas em garrafa de cultura (75 cm² - Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse Frickenhausen, Germany).

Manutenção das células em cultura

Inicialmente as células estromais foram mantidas em garrafas e incubadas em estufa (NuAire Inc., Minnesota, USA) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO₂. A proliferação celular foi observada a cada 24 horas em microscópio invertido (Axyover 25, Carl Zeiss Jena, Germany) até que a monocamada de células atingisse aproximadamente 80 % de confluência. A adesão das células foi avaliada nas primeiras 48 horas, e a diferenciação nas 48 horas subsequentes. Foi observado que, em média, as culturas atingiam a subconfluência em torno de 5 dias após a dissociação e a semeadura. Neste dia, as células foram liberadas das garrafas com uso de tripsina. As células em suspensão, antes da semeadura, foram submetidas a um teste de viabilidade por coloração com azul de Tripán e contagem em hemocitômetro. Em seguida, foram distribuídas em placas de plástico estéreis do tipo multiwell (TPP – Techno Plastic Products AG, Suíça) numa concentração de 1×10^4 células/mL por poço para as técnicas de contagem, imunocitoquímica, extração de proteína e RNA, em placas de 6 poços, e numa concentração de 10^2 células/mL para a técnica de MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*) em placas de 96 poços conforme os grupos experimentais definidos de acordo com o algoritmo a seguir (Figura 4).



Figura 4: Algoritmo dos grupos experimentais: Grupo 1: Tratamento com estradiol. Grupo 2: Tratamento com estradiol e progesterona. Grupo 3: Tratamento com estradiol, progesterona e insulina. Grupo 4: Tratamento com estradiol, progesterona e diidrotestosterona. Grupo 5: Tratamento com estradiol, progesterona e metformina. Grupo 6: Tratamento com estradiol, progesterona, insulina e diidrotestosterona. Grupo 7: Tratamento com estradiol, progesterona, insulina, diidrotestosterona e metformina.

Inicialmente, as células foram tratadas somente com a combinação hormonal correspondente a cada grupo, sem o tratamento com metformina, durante os primeiros 6 dias após a semeadura (dia zero), para permitir a adesão, diferenciação e crescimento celular. A cada 48 horas foram feitos os tratamentos correspondentes a cada grupo. No dia 4 foi realizado o experimento de proliferação (MTT). No dia 6 os grupos previstos foram tratados com metformina, e foram realizadas as extração de RNA 24 e 48 horas (dia 7 e 8) após o tratamento, sendo também no dia 8 realizado experimento de proliferação.

Imunocitoquímica

A análise imunocitoquímica foi realizada conforme o método descrito por Loureiro e colaboradores (Loureiro, Romao et al. 2010). As lamínulas de vidro contendo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1%/PBS (Tampão Salina-Fosfato) por 5 minutos em temperatura ambiente. Para o bloqueio de sítios inespecíficos as lamínulas foram incubadas com albumina bovina sérica 5 %/PBS durante duas horas.

Para revelação dos filamentos de actina utilizou-se faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC Labeled-Sigma). Para marcação da vimentina utilizou-se o anticorpo antivimentina.

As células foram então incubadas durante a noite com faloidina – FITC ou com o anticorpo primário antivimentina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA), diluído 1:400 em TTBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8.4). Após, foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com o fluoróforo Cy3 (vermelho, *sheep anti-rabbit*, 1:5000) durante duas horas. Foram realizados controles negativos, sem a incubação com o anticorpo primário, nos quais não foi observada imunoreatividade. Os núcleos foram corados com 0,25 µg/mL do corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 15 minutos. As lâminas foram observadas em microscópio invertido e as imagens foram capturadas através de câmera digital acoplada.

Avaliação da viabilidade e proliferação celular

Para avaliar a viabilidade e proliferação celular foi utilizado a técnica de MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*) (Mosmann 1983), onde as células foram semeadas em placas multiwell de 96 poços numa densidade de 10^2 células/mL de meio de cultura, incubadas com 100 µL de meio respectivo a cada grupo. Nos dias de avaliação foram retirados 10 µL do meio de cultura e adicionados 10 µL de solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma Chem. Co. St Louis, MO, USA) diluído em PBS com pH de 7,2 e incubado por 4 horas a 37°C. O MTT mede a atividade metabólica das células, onde é acumulado por endocitose, quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a redução do tetrazolium a cristais de formazan, intensamente coloridos, que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas o ensaio é frequentemente utilizado para

analisar a viabilidade e proliferação celular resultando em um aumento da atividade do sistema mitocondrial que conduz a um aumento na quantidade de formazan formado. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

Após as 4 horas de incubação, aspirou-se todo o meio ficando o formazan retido no fundo da placa. Adicionou-se 100 µL de solvente orgânico DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Sigma, St Louis, MO, EUA) por poço e a densidade óptica foi medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. A leitura do MTT para cada grupo foi feita em sextuplicata (média da leitura de 6 poços).

Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os níveis de RNAm da IL-8 e IL-1β foram avaliados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa. A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do RNAm a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

Extração de RNA total

Após as células receberem as diferentes condições de tratamento, foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e lisadas diretamente nas placas com solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) usando 1 mL de trizol/10cm². A solução contendo o lisado de células foi transferida para tubos de microcentrífuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foram incubadas por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12000 x g por 15

minutos a 4°C. A amostra era separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa era transferida para tubos novos e identificados, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas ou incubadas a 15-30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, adicionando 1mL de etanol/mL de trizol. As amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas a 12000 xg, 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido e o precipitado seco à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi dissolvido em água ultra pura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60°C. Após este procedimento o RNA foi quantificado e as amostras armazenadas para posterior síntese de cDNA.

Quantificação do RNA

A quantificação da concentração de RNA de cada grupo de tratamento das amostras foi realizada por meio do fluorímetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA) segundo o protocolo específico Qubit Quantitation Platform, com reagentes do kit Quant-it™ (Invitrogen®, EUA), utilizando-se 1 µL de RNA diluído 1:20 para cada 190 µL de *working solution* em cada leitura. Este aparelho utiliza sondas (*dyes*) avançadas que emitem sinais fluorescentes somente quando se ligam a moléculas específicas, mesmo na presença de nucleotídeos livres ou ácidos nucleicos degradados. Esse sistema fluorimétrico de quantificação fornece dados mais sensíveis e específicos em relação à quantidade de RNA, DNA ou proteínas, mesmo em baixas concentrações.

Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita a partir de 0,5 µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estima-se que 0,5 µg dá origem a 10 ng de cDNA. O RNA foi

inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, cloreto de magnésio 25 mM 10 mM e ditioneitol (DTT) 0,1 M sendo incubado por 2 minutos a 42° C. Em seguida foi feita incubação enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

Quantificação do cDNA

Em algumas amostras não foi possível a detecção da quantificação do RNA por apresentar baixas concentrações. Dessa forma, foi necessária a quantificação da concentração de cDNA de cada amostra. A quantificação foi realizada por meio do fluorímetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA) segundo o protocolo específico Qubit Quantitation Platform, com reagentes do kit Quant-it™ (Invitrogen®, EUA), utilizando-se 1 µL de cDNA para cada 199 µL de *working solution* em cada leitura.

PCR em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência.

Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBR Green I* (Reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG - Invitrogen) para análise dos genes normalizadores e do sistema de detecção TaqMan® (Reagente TaqMan PCR Master Mix - Applied Biosystems) para análise dos genes de interesse.

O corante *SYBR Green I* se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação ou

dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso se obteve a especificidade do produto amplificado, uma vez que a T_m é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos. A figura 5 ilustra curvas de dissociação obtidas em reações de PCR em tempo real para o RNAm de genes normalizadores.

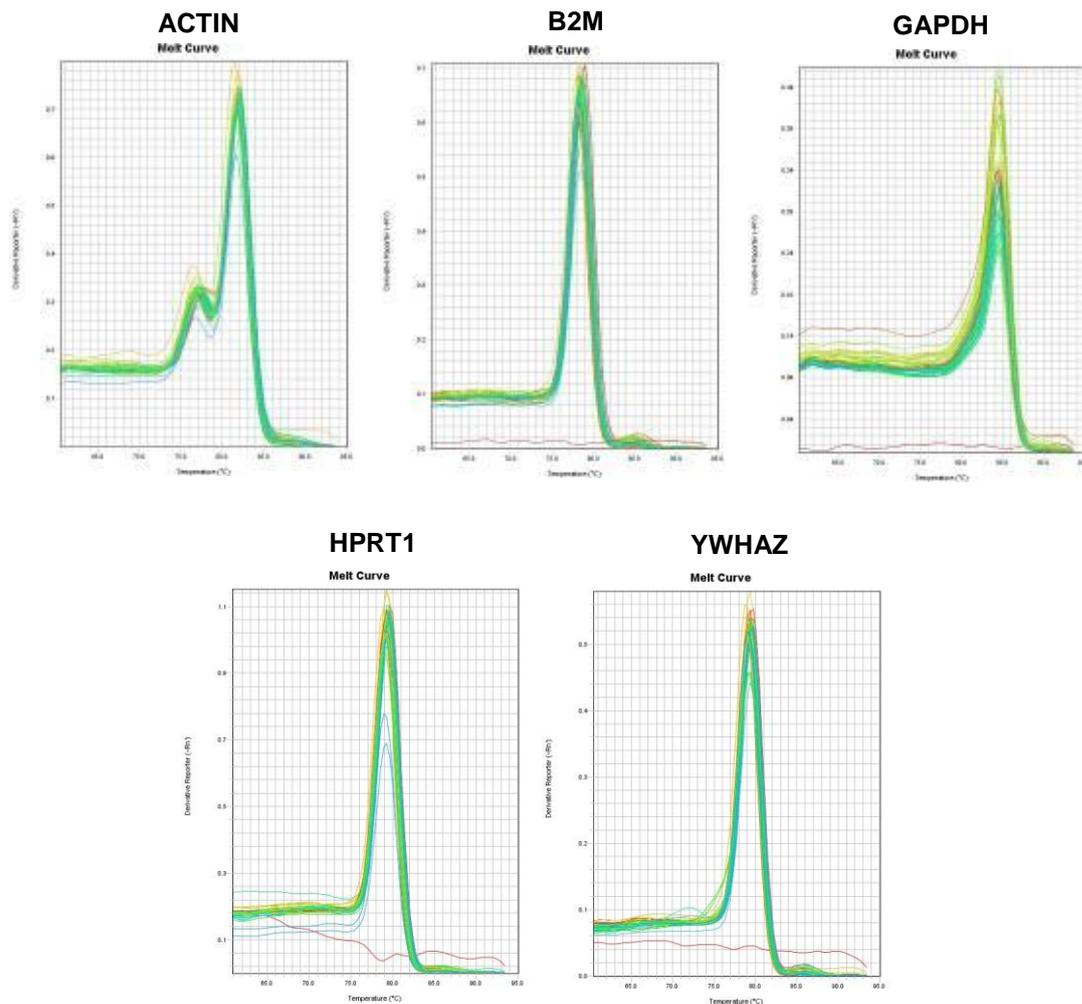


Figura 5: Curvas de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real. As curvas correspondem aos produtos da amplificação das reações para o RNAm de ACTB: β -actina; B2M: β -2-microglobulina; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HPRT1: hipoxantina fosforibosil-transferase 1; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta, respectivamente. As curvas foram construídas com aumentos gradativos de 0,5°C, entre 60 e 99°C. A fluorescência foi lida por 10 s.

Na detecção por TaqMan a sequência de interesse foi marcada com uma molécula fluorescente (repórter) e um silenciador (quencher). Quando estas moléculas estão muito próximas, o quencher absorve a fluorescência que o reporter emite, portanto, o equipamento não lê fluorescência daquela sonda. Porém, após se ligar na sua região complementar nos produtos de amplificação gerados durante os ciclos, a DNA polimerase cliva esta sonda separando o quencher do repórter, e emitindo fluorescência.

Curva de Padronização

Uma curva de padronização foi realizada para cada gene em estudo, onde foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-qPCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA de células estromais endometriais (de 12,5 a 800 pg). As diluições do cDNA foram feitas em duplicata, juntamente com as amostras, e foram escolhidas dentro de uma faixa que incluísse o valor esperado para o RNAm nas amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T , que é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de cDNA (ng). Portanto, a curva de padronização é gerada utilizando-se os valores de C_T , num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do TaqMan correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA.

Normalização

A análise quantitativa da expressão do gene por RT-qPCR envolve a utilização de controles internos conhecidos como genes normalizadores, que são utilizados para a normalização da expressão de genes alvo (Vandesompele, De Preter et al. 2002).

Este é um passo crucial para determinar com precisão os níveis de expressão de genes no tecido. A normalização dos níveis de expressão de um gene alvo é realizada para compensar a variabilidade associada à técnica da

RT-qPCR. As maiores fontes dessas variações são a qualidade da extração, e pureza do RNA total, além da eficiência da síntese de cDNA (Silver, Best et al. 2006).

Os pré-requisitos essenciais para todos normalizadores serem utilizados como controles internos incluem ser expresso adequadamente no tecido alvo, demonstrar mínima variabilidade e alta estabilidade, independentemente das condições fisiológicas ou patológicas (Bustin 2002).

Para a seleção do melhor gene normalizador para as análises de expressão gênica nas amostras de cultura primária de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas foram amplificados 5 genes candidatos a normalizador, cujos resultados foram posteriormente avaliados e comparados por meio do *software NormFinder* (Andersen, Jensen et al. 2004), ferramenta específica para busca de normalizadores de fácil acesso, disponível *on-line* e utiliza o Microsoft Excel (Windows Office) como plataforma de trabalho.

O *NormFinder* compara diferentes grupos experimentais, permitindo uma avaliação intergrupos e intragrupos dos genes candidatos. Examinando a estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados, gerando um valor de estabilidade. O valor de estabilidade mais baixo, ou mais próximo a zero, representa uma expressão mais estável (Andersen, Jensen et al. 2004).

Baseado nos genes de referência comumente usados em células do endométrio e SOP os genes estudados foram: β -actina (*ACTB*), β -2-microglobulina (*B2M*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (*HPRT1*), Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (*YWHAZ*) (Tabela 1).

Tabela 1: Informações sobre os genes candidatos a normalizadores para expressão gênica em cultura primária de células estromais endometriais.

Símbolo	Número de acesso*	Nome	Localização genômica	Função celular
ACTB	NM_001101.3	Beta-actina	7p22	Citoesqueleto
B2M	NM_004048.2	Beta-2-microglobulina [<i>Homo sapiens</i>]	15q21-q22.2	Complexo Principal de Histocompatibilidade
GAPDH	NM_002046.3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [<i>Homo sapiens</i>]	12p13	Metabolismo de carboidratos
HPRT1	NM_000194.2	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 [<i>Homo sapiens</i>]	Xq26.1	Recuperação metabólica de purinas
YWHAZ	NM_001135699.1	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta [<i>Homo sapiens</i>]	8q23.1	Proteína mediadora de transdução de sinal

* Sequência de Referência NCBI (Gene Bank)

Protocolo da PCR em tempo real para normalização

A técnica de PCR quantitativo foi realizada no equipamento PCR real time 7500 Fast (Applied Biosystems, USA) usando o Kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). A amplificação foi realizada em duplicata em placas de 96 poços, com protocolo único para os diferentes genes, constituído de um ciclo inicial por 2 minutos a 95°C, seguido por 45 ciclos por 50 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C para anelamento, 40 segundos 72°C e 2 minutos finais em 72°C. Análise da curva de dissociação foi realizada por execução de um gradiente de 60-95°C para confirmar a presença de um único produto durante a reação. A eficiência da amplificação de cada gene foi determinado com base na inclinação (*slope*) da curva padrão, utilizando quatro diferentes concentrações (não diluído, 1:5, 1:25, 1:125) de um *pool* de cDNA obtidos a partir de 2 µL dos cDNAs das amostras analisadas.

O laboratório dispunha de *primers* para avaliar a expressão gênica de *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* e *YWHAZ* desenhados utilizando a ferramenta PrimeTime qPCR Assay Entry (IDT, Integrated DNA Technologies) e

sintetizados pela IDT (Souza, Brum et al. 2012). As sequências dos oligonucleotídeos estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do mRNA dos genes candidatos a normalizadores e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Fragmento (pb*)
ACTB	Sense: 5' TGCCGACAGGATGCAGAAG 3' Antisense: 5' GCCGATCCACACGGAGTACT 3'	140
B2M	Sense: 5' CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3' Antisense: 5' ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'	165
GAPDH	Sense: 5' CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG 3' Antisense: 5' TCTTCCTCTTGCTCTTGC 3'	133
HPRT1	Sense: 5' AGATGGTCAAGGTCGCAAG 3' Antisense: 5' GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC3'	128
YWHAZ	Sense: 5' CAACACATCCTATCAGACTGGG 3' Antisense: 5' AATGTATCAAGTTCAGCAATGGC 3'	133

* pb: pares de base; ACTB: β -actina; B2M: β -2-microglobulina; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HPRT1: hipoxantina fosforibosil-transferase 1; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta.

Protocolo da PCR em tempo real para os genes de interesse

A análise molecular dos genes de interesse foi a partir do sistema de detecção de sondas Taqman® (Applied Biosystems). Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (*Gene Expression Assays*) consistem em um par de *primers* não marcados e uma sonda TaqMan® com marcação FAM™ ou VIC® na extremidade 5' e MGB (*minor groove binder*) e NFQ (*nonfluorescent quencher*) na extremidade 3'. Este ensaio é baseado na atividade 5' nuclease da enzima *Taq* DNA polymerase. O equipamento utilizado foi o PCR real time 7500 Fast (Applied Biosystems).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 50 ciclos continuando a desnaturação em 94 °C por 50 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. Uma

curva-padrão com 5 pontos em duplicata com concentração conhecida de cDNA (12,5 a 800 pg) foi utilizada para quantificar as amostras. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do número do *threshold cycle* (Ct), onde o aumento do sinal fluorescente está associado com um aumento exponencial do produto da qPCR.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. Os dados obtidos de proliferação celular (MTT) foram representados como média \pm erro padrão da média por terem apresentado distribuição normal (n=4). Os dados obtidos de expressão gênica foram representados como mediana e intervalos interquartis por não ter obtido distribuição normal.

Os dados de proliferação celular e expressão gênica foram avaliados quantitativamente através do teste de Equações de Estimação Generalizadas (*Generalized Estimating Equations – GEE*) e teste de *Least significant difference* como *post hoc*.

O método *GEE* foi proposto por Zeger e Liang (Zeger and Liang 1986) com o objetivo de estimar parâmetros de regressão especialmente quando os dados estão correlacionados. O modelo *GEE* avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em um contexto populacional, e não somente individual, sendo o método mais recomendado para se estudar a diferença na resposta média populacional entre grupos com diferentes fatores de risco (Twisk 2004).

Em situações em que os sujeitos estudados são independentes, mas a informação sobre uma variável é coletada repetidas vezes ao longo do tempo, estas observações são correlacionadas. É possível também que os sujeitos dividam características em comum, e, portanto, não possam ser considerados independentes. Neste caso pode haver uma estrutura natural de correlação entre os sujeitos. O primeiro caso é conhecido como medidas repetidas, e o

segundo caso, como dados agrupados (*clustered data*). A correlação, nestes casos, pode ocorrer, já que as observações feitas em um mesmo indivíduo ou em um mesmo grupo tendem a ser mais semelhantes do que as observações de indivíduos diferentes ou de diferentes grupos (Guimarães 2012).

No caso do presente estudo, foram utilizadas amostras de um tipo de tecido (endométrio) provenientes de cinco pacientes diferentes. No esquema experimental das culturas, as células estromais endometriais de cada paciente foram submetidas a sete diferentes grupos em dois tempos de tratamento, de forma que a combinação grupo-tempo de tratamento totalizou 14 grupos por indivíduo. Desta forma, fica claro que cada um dos grupos não pode ser tratado de forma independente, havendo correlação tanto entre os diferentes grupos (tecido proveniente do mesmo paciente) como entre os tempos de tratamento, caracterizando uma relação de dependência entre as variáveis.

Os modelos tradicionais de regressão, como o *General Linear Model* (GLM), têm uso limitado devido à suposição de independência entre os sujeitos. Este modelo, se utilizado para dados correlacionados, pode levar a inferências estatísticas incorretas devido a distorções nas estimativas dos parâmetros e de seus erros padrões. Uma alternativa seria a utilização da Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas para avaliar mudanças em um desfecho contínuo ao longo do tempo e comparar estas mudanças entre grupos. Entretanto, além deste método ser utilizado somente para desfechos com distribuição normal, não permite ajuste para exposições que se modifiquem ao longo do tempo, além de necessitar de balanceamento em relação ao número de repetições (Guimarães 2012).

O GEE estima coeficientes de regressão e erros padrões com distribuições amostrais normais e não normais. Pode ser utilizado para testar efeitos principais e interações, permitindo avaliar variáveis independentes categóricas ou contínuas. Este método deve ser utilizado quando o objetivo da análise estatística é descrever a esperança da variável resposta em função de

um conjunto de covariáveis considerando a correlação entre as observações (Guimarães 2012).

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas através do processador de dados SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Locais de realização do Projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, instalado no Centro de Pesquisa no HCPA, que dispõem da infraestrutura para a execução dos procedimentos utilizados neste projeto.

RESULTADOS

O presente estudo terá seus resultados divididos em três capítulos:

- I. Estabelecimento da cultura primária de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas;
- II. Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária estimuladas com insulina e androgênio;
- III. Análise da expressão gênica da IL-8 e IL-1 β no modelo estabelecido.

CAPÍTULO I

Estabelecimento da cultura primária de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas

As condições ideais de cultivo primário de células estromais endometriais, onde estas células são capazes de aderir, diferenciar e proliferar-se já estão bem descritas na literatura (Satyaswaroop, Bressler et al. 1979; Arnold, Kaufman et al. 2001; Germeyer, Jauckus et al. 2011). Da mesma forma, foi necessário realizar ensaios iniciais testando a semeadura das células com dois meios de cultivo usualmente utilizados: DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e Ham's F12 Coon's modificado (F12) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). Todos os meios de cultura foram suplementados com 1% de antibióticos (solução de penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL), 10% SBF e E₂ (10⁻⁸ mol/L). A adesão das células foi avaliada nas primeiras 24 horas, e a diferenciação nas 48 horas subsequentes.

A condição que proporcionou maior adesão, diferenciação e proliferação das células foi o cultivo com o meio DMEM.

Mesmo depois de padronizadas as condições de cultivo, diversas culturas não tiveram sucesso devido a não-adesão ou proliferação das células ou ainda, por outras variáveis da técnica (62,5% dos cultivos apresentaram adesão e proliferação, 25% não aderiram ou proliferaram e 12,5% contaminaram). As culturas utilizadas apresentavam morfologia característica e sem contaminação microbiológica ou química evidentes.

Após 2 horas em cultura, as células estromais endometriais se encontravam parcialmente aderidas e entre 24 e 48 horas já se podia observar a morfologia característica destas células. O fenótipo e a confluência das células em cultura foram acompanhados por microscopia diariamente. As células estromais crescem em monocamadas, formando ilhas de alta densidade celular a partir de um aglomerado ou mesmo de uma única célula, e após alguns dias de cultivo apresenta confluência superior a 80% (Figura 6).

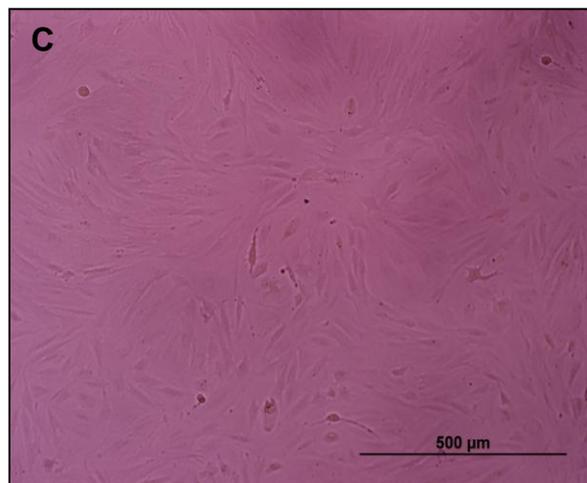
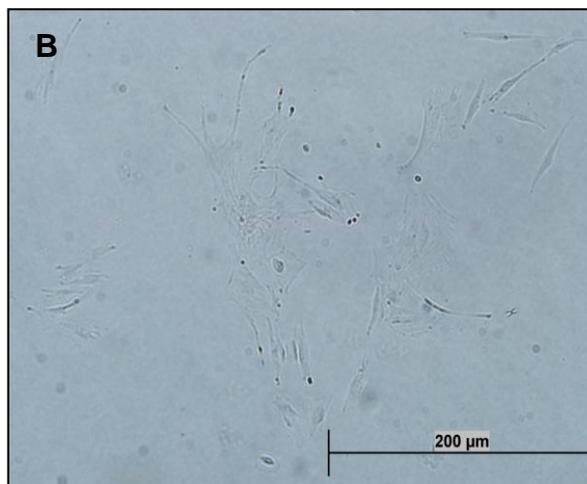
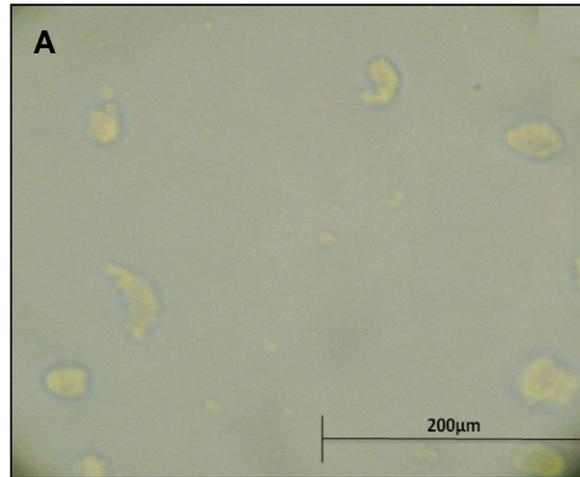


Figura 6: Imagens obtidas por microscópio invertido de contraste de fase de células estromais endometriais, demonstrando sua morfologia característica em monocamada em diferentes escalas e estágios de confluência. A) Primeiro dia de cultivo, após semeadura; B) Terceiro dia de cultivo, células aderidas e diferenciadas; C) Monocamada após 14 dias de cultivo.

As concentrações dos hormônios insulina e diidrotestosterona (DHT), a qual neste modelo confere características hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas, simulando a SOP, foram estabelecidas a partir de uma detalhada revisão de artigos, bem como do tratamento com metformina (Tabela 3) (Apparao, Lovely et al. 2002; Zhang and Liao 2010; Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Tabela 3: Concentração de Estradiol (E₂), Progesterona (P), Insulina, Diidrotestosterona (DHT) e Metformina nos diferentes grupos.

Grupos	E ₂	P	Insulina	DHT	Metformina
G1	10 ⁻⁸ mol/L				
G2	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L			
G3	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	100 ng/mL		
G4	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L		10 ⁻⁶ mol/L	
G5	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L			10 ⁻³ M
G6	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	100 ng/mL	10 ⁻⁶ mol/L	
G7	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	100 ng/mL	10 ⁻⁶ mol/L	10 ⁻³ M

As células estromais endometriais são fisiologicamente dependentes de E₂ para manterem-se viáveis durante todo o cultivo, por tal motivo é necessário a presença deste hormônio, 10⁻⁸ mol/L (Apparao, Lovely et al. 2002) em todos os grupos experimentais. O grupo G1 possui somente E₂, característica da primeira parte do ciclo menstrual. O grupo G2 recebeu 10⁻⁶ mol/L de P (Apparao, Lovely et al. 2002), hormônio que define as características histológicas de um endométrio secretor (Noyes, Hertig et al. 1975) sendo fundamental para receptividade uterina (Lessey 2011). O grupo G3 além de E₂ e P recebeu 100 ng/mL de insulina (Germeyer, Jauckus et al. 2011) e o G4 recebeu DHT, 10⁻⁶ mol/L (Apparao, Lovely et al. 2002). O grupo G5 recebeu E₂, P e metformina, 10⁻³ M (Germeyer, Jauckus et al. 2011),

enquanto o grupo G6 recebeu todos os hormônios, simulando as características de SOP e o grupo G7 além dos hormônios recebeu o tratamento com metformina nas últimas 24 e 48 horas de cultivo.

Com o intuito de estabelecer uma confirmação do cultivo de células estromais endometriais, foi testada a técnica de imunocitoquímica para a proteína vimentina. A vimentina é um marcador de células de origem mesenquimal, apresentando marcação positiva, caracterizando o cultivo de células estromais (Figura 7).

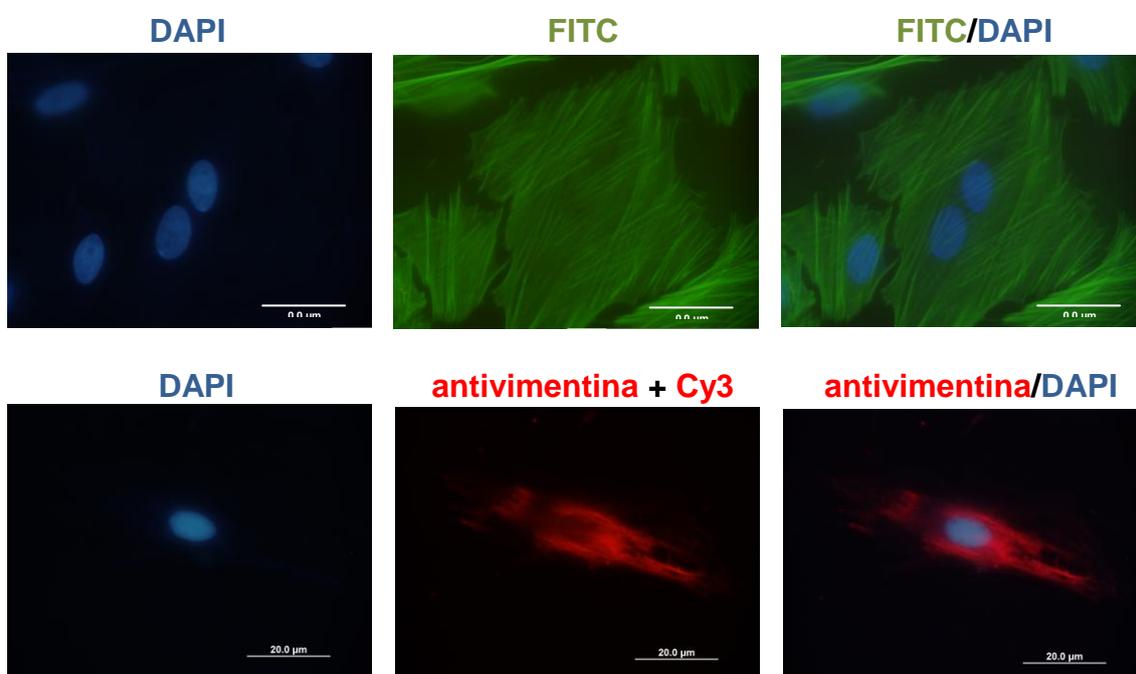


Figura 7: Imunocitoquímica de fluorescência. Células estromais endometriais de cultura primária (A) tratadas com anticorpo primário faloidina – FITC para marcação dos filamentos de actina. (B) tratadas com anticorpo antivimentina e anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo Cy3 (vermelho), marcação positiva para vimentina confirmando o cultivo de células estromais. Os núcleos foram corados com DAPI (azul).

A análise da viabilidade celular serve para avaliar a curva de crescimento, verificando a sobrevivência das células estromais no modelo proposto a partir do ensaio de MTT. Seis grupos foram avaliados em dois

tempos diferentes durante o período de tratamento (tempos 4 e 8), onde o grupo previamente estabelecido (G7) recebeu o tratamento com metformina somente nas últimas 48 horas de cultivo. O grupo G5 não está presente nestas análises, pois o mesmo foi adicionado ao decorrer do estudo. Entretanto, por variáveis da técnica, as culturas (N=3) que possuíam esse grupo contaminaram e foram descartadas.

Os resultados obtidos através do MTT para todos os grupos estão representados na figura 8.

As células mantiveram-se viáveis durante todo o período de cultivo, apresentando aumento significativo na proliferação celular no tempo 8 em relação ao tempo 4 em todos os grupos.

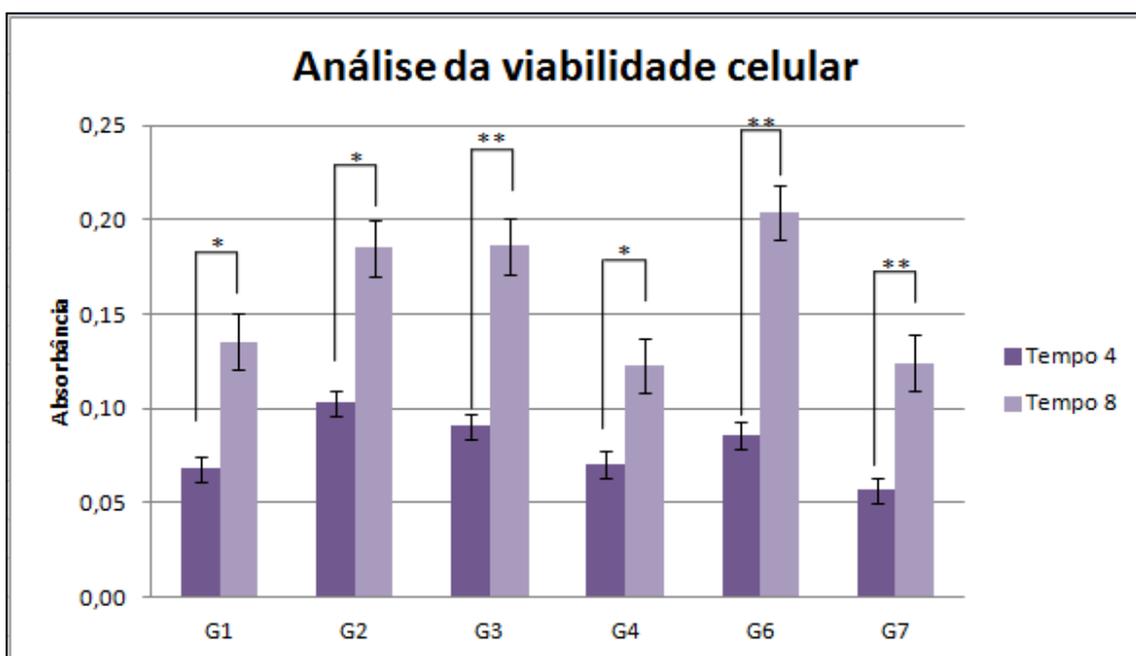


Figura 8: Análise da viabilidade celular por MTT nos tempos 4 e 8. Dados apresentados como média \pm erro padrão (* e ** representam diferença significativa entre MTT no tempo 4 e no tempo 8, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) N=4.

Considerando a análise da proliferação celular no tempo 4, foram observadas diferenças significativas entre os grupos G1, G3, G6 e G7 em

relação ao grupo G2, onde o grupo G2 apresenta maior taxa de proliferação (Figura 9).

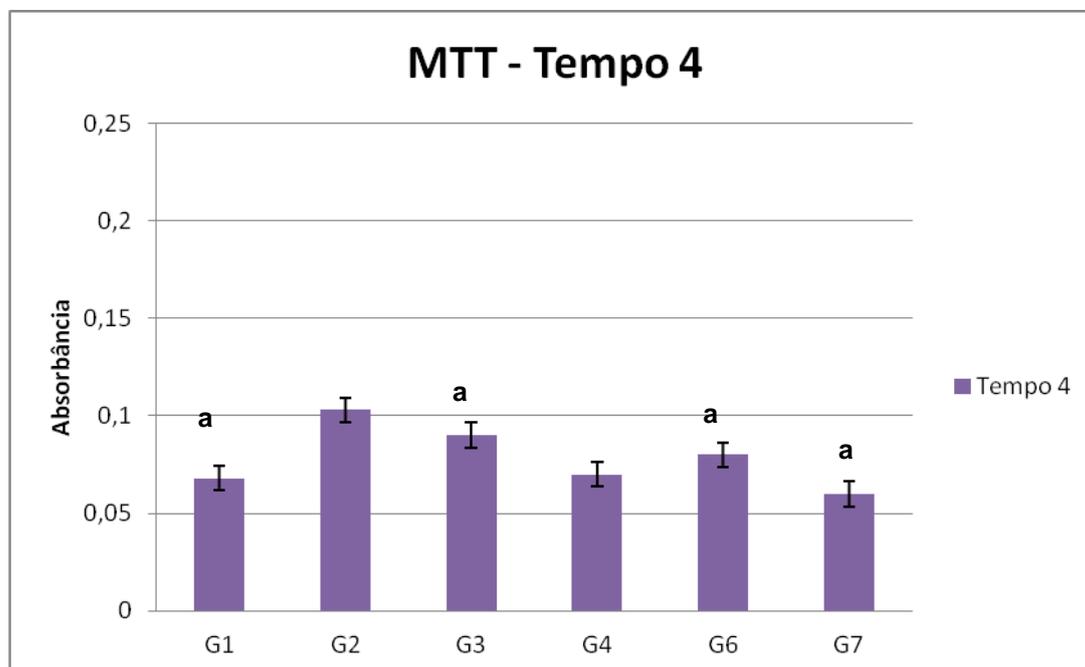


Figura 9: Análise da proliferação celular através de MTT no tempo 4. Dados apresentados como média ± erro padrão. (Letra a representa diferença significativa entre os grupos G1, G3, G6 e G7 em relação ao grupo G2, $p < 0,05$ N=4).

Ao avaliar a proliferação celular no tempo 8, verifica-se que o grupo G7 (tratado com metformina durante o período de 48 horas) apresentou menor taxa de proliferação em relação aos grupos G2, G3 e G6 (Figura 10).

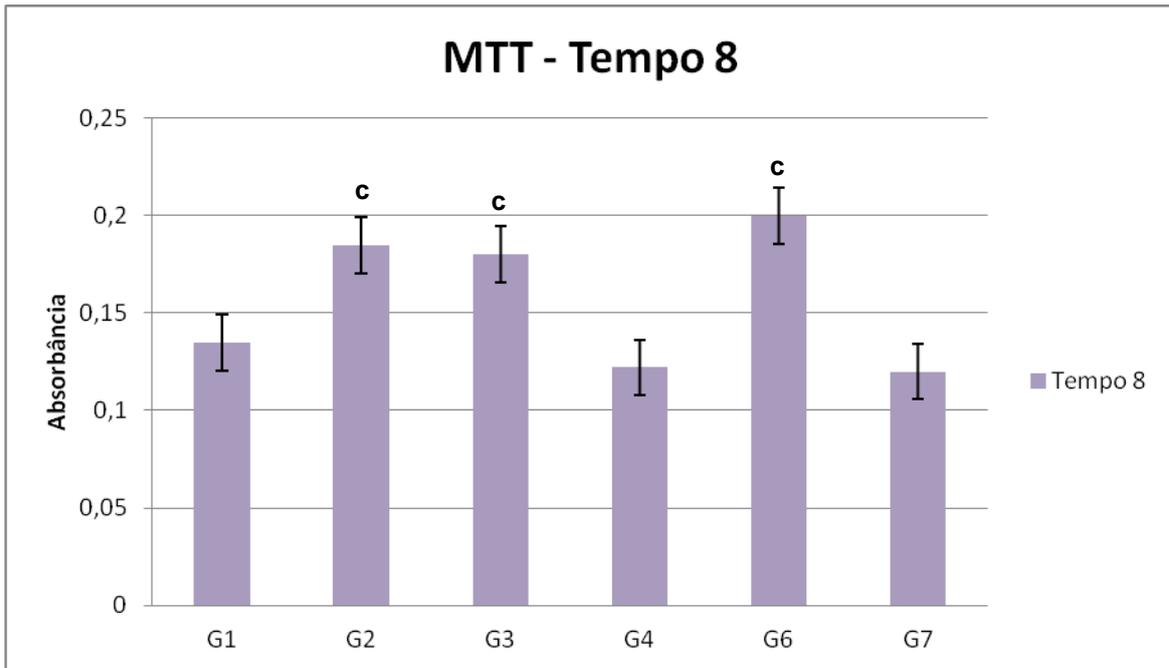


Figura 10: Análise da proliferação celular através de MTT no tempo 8. Dados apresentados como média \pm erro padrão. (Letra c representa diferença significativa entre os grupos G2, G3, G6 em relação ao grupo G7; $p < 0,05$) N=4.

DISCUSSÃO CAPÍTULO I

Estudos envolvendo tecido endometrial podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos em desordens reprodutivas e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para isso, é importante o conhecimento da fisiologia endometrial e uma maneira eficiente de obter informações a esse respeito é por meio de cultivo de células endometriais.

O presente estudo propôs o estabelecimento de um modelo de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas para que se possam analisar fatores relacionados à infertilidade, independente da anovulação, de pacientes com SOP. Além disso, o cultivo primário pode fornecer dados mais representativos da variabilidade de resposta dessa doença.

Pela variabilidade inerente entre os indivíduos, o cultivo celular nem sempre atinge o sucesso esperado para este tipo de estudo. Isto pode ser visualizado pelo alto índice de insucesso das células submetidas ao cultivo (mais de um terço do total de amostras, 37,5 %). Ainda, por se tratar de uma amostra restrita em tamanho, existe o obstáculo do número total de células que pode ser obtido do tecido coletado, o que restringe os grupos experimentais do estudo. Apesar destas dificuldades, as culturas que obtiveram êxito puderam ser utilizadas para o estabelecimento do modelo proposto.

Para a padronização do modelo de cultura de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas, até então não descrito na literatura, foi necessário o estabelecimento das concentrações hormonais. Este tipo celular é fisiologicamente dependente de E_2 para manter-se viável durante o período de cultivo. Desta forma, todos os grupos experimentais possuem este hormônio.

As concentrações de E_2 , P e DHT foram estipuladas a partir do estudo de Apparao e colaboradores (2002), os quais investigaram o perfil de

receptores de androgênio no endométrio de mulheres com ciclos menstruais normais e em mulheres com SOP (Apparao, Lovely et al. 2002). Já as concentrações de insulina e metformina foram determinadas pela análise do trabalho de Germeyer e colaboradores (2011), onde os efeitos da metformina nas células estromais foram avaliados no processo de decidualização e transformação na expressão gênica de fatores relacionados a implantação (Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Através da técnica de imunocitoquímica de fluorescência utilizando-se o anticorpo primário antivimentina, proteína utilizada em diversos estudos como marcador de células estromais, foi possível confirmar que as células em cultivo eram células estromais endometriais (Arnold, Kaufman et al. 2001; Wang, Pilla et al. 2012; Zhu, Wang et al. 2012).

Medida da viabilidade celular e formas de análise de proliferação é a base para inúmeros ensaios *in vitro* da resposta da população celular. A técnica do MTT, por sua vez, é um método indireto baseado no metabolismo celular e que avalia a atividade mitocondrial das células, de forma que o produto da reação de redução (azul de Formazan) é proporcional à respiração celular e, indiretamente, ao número de células viáveis em cultura. No presente estudo, observou-se um aumento na proliferação celular ao longo do período de cultivo, tempo 8 em relação ao tempo 4 (Figura 8), confirmando que as células mantiveram-se viáveis, ou seja, que o modelo proposto é viável para análises.

Embora a presença do grupo G5 seja necessária para maiores discussões sobre o efeito que a metformina exerceu sobre as células, o presente estudo observou uma inibição da proliferação celular no grupo G7 após o tratamento com metformina no tempo 8, tanto em relação aos grupos controles G2 e G3, quanto ao grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico G6, o qual recebeu o mesmo tratamento hormonal até as últimas 48 horas de cultivo.

Esses dados corroboram com Takemura e colaboradores (2007), que testaram diferentes doses de metformina sobre a síntese de DNA de células estromais endometriais em dois tempos diferentes (24 e 48 horas). A maior taxa de inibição da proliferação celular foi na mesma dose utilizada pelo presente estudo, e no mesmo período de tratamento (48 horas) (Takemura, Osuga et al. 2007).

Vários fatores relacionados a SOP, como síndrome metabólica, hiperinsulinemia crônica, diabetes, podem influenciar a proliferação endometrial por meio de ações diretas ou indiretas. Dessa forma, Campagnoli e colaboradores (2013) chegam a propor o uso de metformina como um agente preventivo de carcinoma endometrial. Pois a metformina juntamente com mudança no estilo de vida diminui esses fatores, inibindo a proliferação celular endometrial (Campagnoli, Abba et al. 2013).

O efeito antiproliferativo da metformina tem também sido demonstrado em outros tipos celulares, como em células musculares lisas vasculares (Li, Mamputu et al. 2005), e em diversos tipos de câncer, como em glioblastomas, apresentando ação inibitória sobre a via da Akt (Wurth, Pattarozzi et al. 2013).

No entanto, os efeitos do tratamento a longo prazo com a metformina não são bem elucidados e mais estudos são necessários antes de sugerir o seu uso para a prevenção de hiperplasias e câncer de endométrio.

CAPÍTULO II

Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária estimuladas com insulina e androgênio;

Para a avaliação do melhor gene de referência para as análises de expressão gênica realizadas nas amostras de cultura primária de células estromais endometriais estimuladas com insulina e androgênio, após amplificação e quantificação baseada na curva padrão, os valores obtidos para as amostras foram avaliados pelo *NormFinder* (Andersen, Jensen et al. 2004), *software* específico para busca de genes normalizadores.

As amostras utilizadas para avaliar o melhor gene para ser usado como normalizador foram amostras de células cultivadas em todos diferentes grupos de tratamentos hormonais, de um total de 4 culturas. Foram testados inicialmente os valores de diluição adequados para a amplificação das amostras dentro dos pontos de diluição da curva padrão, sendo utilizada uma concentração de 120 pg/ μ L do cDNA original.

Dos cinco genes analisados, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* e *YWHAZ*, foram obtidos os valores de quantidade média de expressão e de ciclo limiar médio. A tabela 4 mostra uma análise inicial da dispersão das amostras considerando os valores de ciclo limiar, listados em ordem crescente de coeficiente de variação (CV), ou seja, os localizados na parte superior teriam menor variabilidade devido à menor dispersão dos dados. O valor da razão entre os valores mínimo e máximo dos C_T s (MFC, *maximum fold change*) foi inferior a 2, o que também é um indicador de estabilidade de expressão (tabela 4). Os dados de quantidade média (em ng) obtidos a partir dos valores de C_T foram analisados.

Tabela 4: Medidas de dispersão dos valores de CT dos genes analisados.

Gene	Média dos C _T s	Desvio padrão	CV (%)	MFC
HPRT1	27,87	3,18	11,41	1,41
GAPDH	22,11	2,68	12,14	1,43
YWHAZ	26,46	3,21	12,14	1,41
ACTB	19,94	2,57	12,91	1,50
B2M	22,95	3,40	14,85	1,57

CV= coeficiente de variação; MFC=*maximum fold change* (razão entre valores máximo e mínimo); ACTB: β -actina; B2M: β -2-microglobulina; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HPRT1: hipoxantina fosforibosil-transferase 1; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta.

O programa *NormFinder* fornece os valores de estabilidade dos genes analisados, avaliando cada um de maneira independente nas amostras estudadas. Fazendo uma avaliação das amostras analisadas, o gene com menor variabilidade foi o *HPRT1*, com valor de estabilidade de 0,140 (Tabela 5).

Tabela 5: Ordem dos genes candidatos a normalizador de RT-qPCR em cultura primária de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas com base nos valores de estabilidade de expressão calculado pelo programa *NormFinder*. Os genes estão listados do gene mais estável (*HPRT1*) para o gene menos estável (*GAPDH*).

Ordem	Gene	Valor de estabilidade
1	HPRT1	0,140
2	ACTB	0,148
3	B2M	0,158
4	YWHAZ	0,307
5	GAPDH	0,367

ACTB: β -actina; B2M: β -2-microglobulina; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HPRT1: hipoxantina fosforibosil-transferase 1; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta.

O *software* ainda fornece os valores de estabilidade considerando análises intragrupo e intergrupo (Figura 11), as quais confirmam a menor variabilidade do gene *HPRT1* quando considerados os grupos experimentais. A melhor combinação de genes sugerida foi *HPRT1* e *ACTB*.

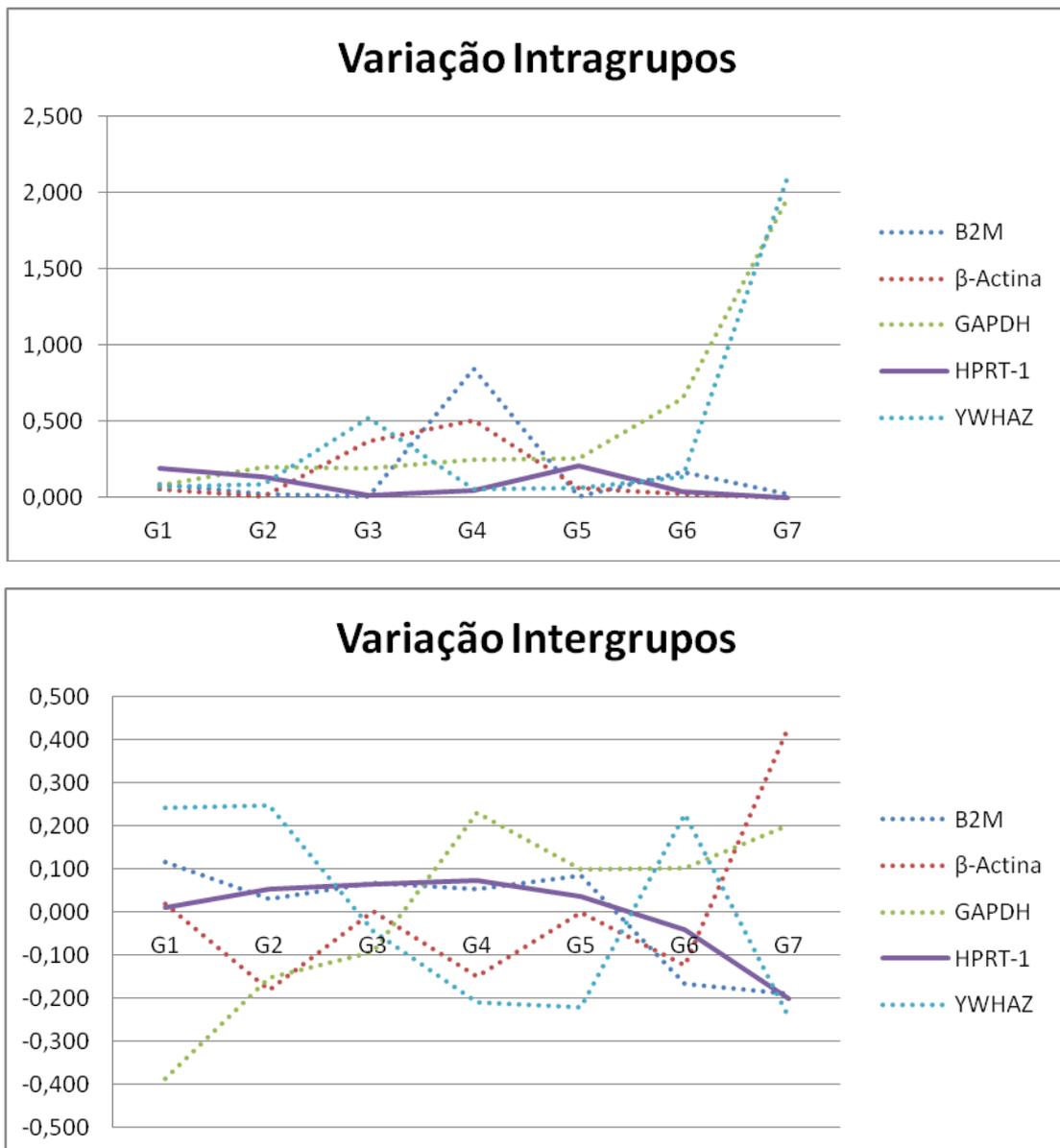


Figura 11: Estabilidade dos genes normalizadores quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo. O gene *HPRT1* mostrou menor variabilidade em ambas as situações.

DISCUSSÃO CAPÍTULO II

Apesar do aumento crescente das pesquisas acerca dos marcadores biológicos relacionados à implantação no endométrio, o perfil de expressão desses mecanismos ainda não está bem esclarecido. Hoje em dia, a quantificação relativa é uma estratégia frequentemente utilizada para avaliar os dados obtidos a partir da amplificação de mRNAs específicos pela reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) (Radonic, Thulke et al. 2004).

Estudos comparativos de expressão de genes de tecido endometrial humano normal e patológico fornecem *insights* sobre os mecanismos moleculares envolvidos em distúrbios ginecológicos tais como a SOP, abortos recorrentes, menorragia, endometriose, hiperplasia e câncer (Sadek, Cagampang et al. 2012). No entanto, para uma comparação exata de transcrição de RNAm nas amostras de diferentes tecidos é crucial a escolha apropriada do gene de referência (Hruz, Wyss et al. 2011). Para isso, o RNAm do gene alvo amplificado é normalizado pela amplificação de um gene constitutivo ou normalizador, que deve apresentar estabilidade, expressão não regulada nas amostras estudadas, não apresentar variação sob condições de tratamento experimental e ter níveis semelhantes ao gene alvo (Bustin 2002).

A maioria estudos anteriores que investigaram a expressão gênica em tecidos ginecológicos, convencionalmente utilizaram o *GAPDH*, *ACTB* ou 18s ribossomal RNA (*18S rRNA*) como genes de referência (Quezada, Avellaira et al. 2006; Burney, Talbi et al. 2007; Narayan, Bourdon et al. 2007; Tone, Begley et al. 2008; Kim, Song et al. 2009; Lee, Du et al. 2009; Xie, Schlumbrecht et al. 2009; Margarit, Taylor et al. 2010). Porém, o consenso é de que não existe um único gene normalizador universal (Huggett, Dheda et al. 2005). Por ter estabelecido um novo modelo experimental, diferente dos até então estudados, decidiu-se avaliar qual o gene normalizador mais adequado para estudos de

expressão gênica em amostras de células estromais endometriais em cultivo primário com características de SOP.

Existem várias formas de identificar a estabilidade de expressão de um gene e indicar qual o gene de referência mais adequado sob diferentes condições experimentais, porém estudos recomendam somente o uso de uma das ferramentas disponíveis para a busca de genes normalizadores (Wan, Whang et al. 2011), desta forma, optou-se por utilizar o software *NormFinder* para analisar os dados de expressão gênica de células estromais endometriais.

O algoritmo *NormFinder* examina a estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados, estimando a variação total na expressão gênica, considerando uma possível variação ao longo de subgrupos amostrais, e classifica como genes mais estáveis aqueles com variação intra e intergrupo mínima (Andersen, Jensen et al. 2004).

O programa indicou o *HPRT1* como gene mais estável mostrando ser a melhor escolha para a normalização dos níveis de mRNA amplificado por RT-qPCR em cultura primária de células estromais endometriais com características de SOP, uma vez que este modelo avalia a influência de um determinado tratamento sobre a expressão de genes alvo, gerando subgrupos amostrais que devem ser levados em consideração.

Em estudos anteriores, Kim e colaboradores (2009) demonstraram que os genes usualmente utilizados, *GAPDH* e *18S rRNA*, são menos adequados para a normalização do tecido endometrial. Em contrapartida, os genes *YWHAZ*, *cytochrome c-1 (CYC1)* e *ACTB* são mais estáveis comumente em tecido endometrial saudável e com SOP (Kim, Song et al. 2009). Corroborando com esses dados, Sadek e colaboradores (2012), avaliaram a variação da estabilidade de genes normalizadores no tecido biopsiado endometrial de pacientes normais e com SOP. Os dados foram analisados pelo programa *geNorm*, e indicaram os genes *YWHAZ*, *CYC1* e *ACTB* estáveis em ambos os grupos (Sadek, Cagampang et al. 2012).

A partir dos dados do atual estudo, o *GAPDH* também se comportou de forma menos estável, juntamente com o *YWHAZ*. O *B2M* apresentou um valor de estabilidade satisfatório, mas a combinação de genes mais estáveis foi *HPRT1* e *ACTB*, sendo o *HPRT1* o mais estável. De acordo com Andersen e colaboradores (2004), algumas discrepâncias nos resultados são devidas às diferenças entre as abordagens analíticas das ferramentas utilizadas (Andersen, Jensen et al. 2004).

Apesar da recomendação de utilizar mais de um gene de referência para uma normalização (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Lisowski, Pierzchala et al. 2008; Tong, Gao et al. 2009), isto nem sempre é possível quando poucos genes alvo estão sendo estudados ou quando existe pouca quantidade de RNA disponível (Andersen, Jensen et al. 2004; Huggett, Dheda et al. 2005). Culturas celulares feitas a partir de uma quantidade limitada de tecido ou a partir de biópsias são exemplos destas situações.

Na Figura 11, pode-se visualizar que a expressão do *HPRT1*, embora estável, apresentou alguma variação na sua expressão nos diferentes subgrupos analisados. E essa variação, no entanto, é esperada. Vários fatores, desde a obtenção do tecido até as condições de extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação, interferem para a variação de expressão de genes em cultura primária. Por isso é necessário uma análise cuidadosa para identificar o gene que apresenta menor variação.

CAPÍTULO III

Análise da expressão gênica da IL-8 e IL-1 β no modelo estabelecido

Os resultados da expressão do RNAm dos genes das citocinas IL-8 e IL-1 β foram obtidos por reação de PCR em tempo real a partir de transcrição reversa. Foi verificada a resposta da expressão dos genes em estudo nos diferentes grupos em dois tempos diferentes (24 e 48 horas de tratamento com metformina nos grupos G5 e G7).

A figura 12 representa a expressão do RNAm da IL-8, onde os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis. Não houve diferença significativa na expressão deste gene quando comparado os diferentes grupos de tratamento no tempo 24 horas. Da mesma forma, não houve diferença na expressão quando comparado no tempo de 48 horas com o tratamento de metformina.

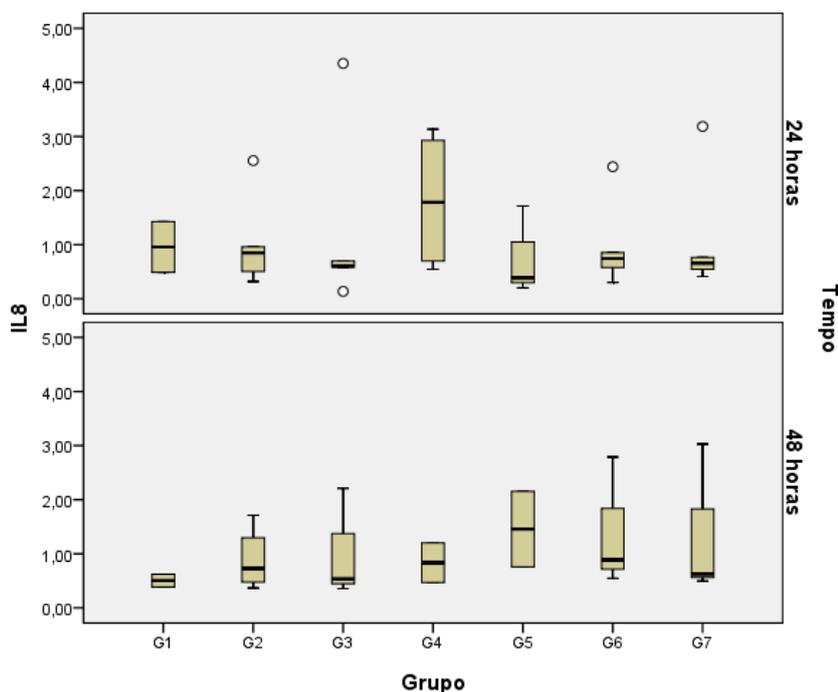


Figura 12: Expressão gênica de IL-8 nos diferentes grupos no tempo de tratamento com metformina de 24 e 48 horas. A expressão do RNAm da IL-8 foi normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). N=4-9.

Após o tratamento com metformina nos grupos previamente estabelecidos, observa-se um aumento da expressão do RNAm da IL-8 no grupo G5 com 48 horas de tratamento em relação ao mesmo grupo no tempo de 24 horas de tratamento. Em relação ao grupo G7, não houve diferença significativa entre os tempos (Figura 13).

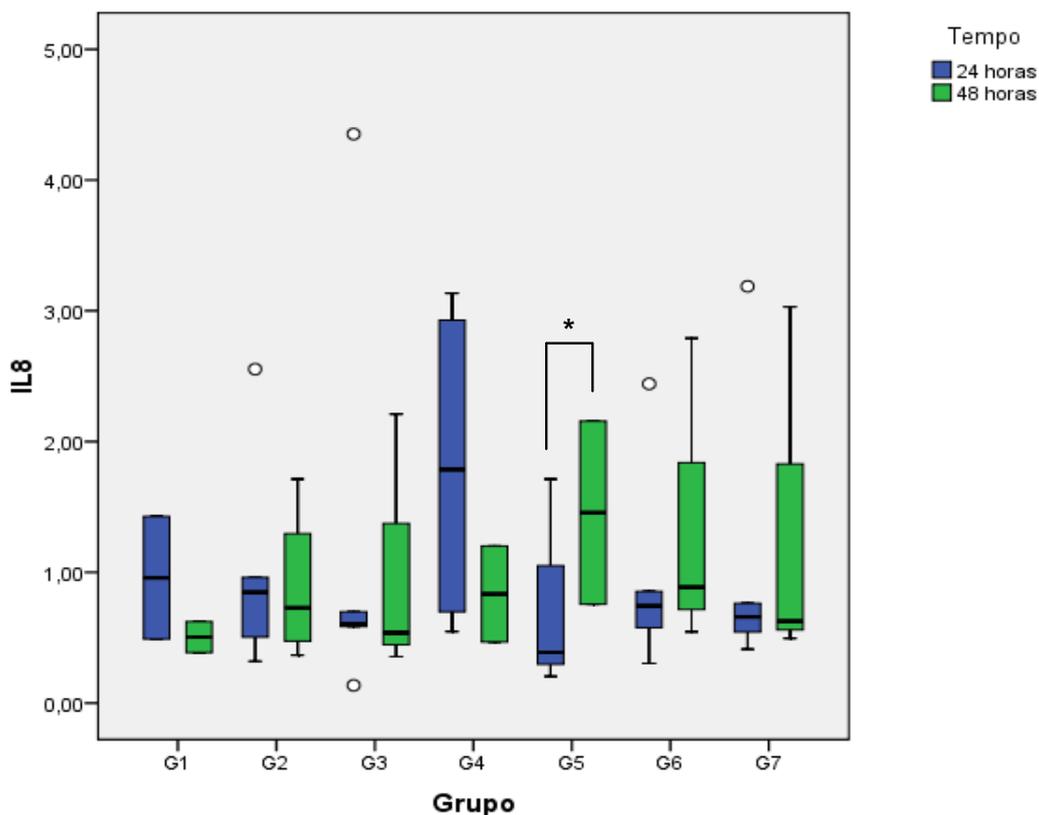


Figura 13: Expressão gênica de IL-8 nos diferentes tempos de tratamento com metformina (24 e 48 horas). A expressão do RNAm da IL-8 foi normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA); Diferença estatisticamente significativa no grupo G5 do tempo de 48 horas em relação ao de 24 horas de tratamento ($p < 0,05$); Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis; N=2-5.

Em relação a expressão do RNAm da IL-1 β não encontra-se diferença na expressão deste gene entre os diferentes grupos no tempo de 24 horas de tratamento com metformina (Figura 14). Entretanto, quando analisamos o tempo de 48 horas de tratamento verifica-se que o grupo G5 apresenta maior expressão deste gene em relação a todos os outros grupos (Figura 14).

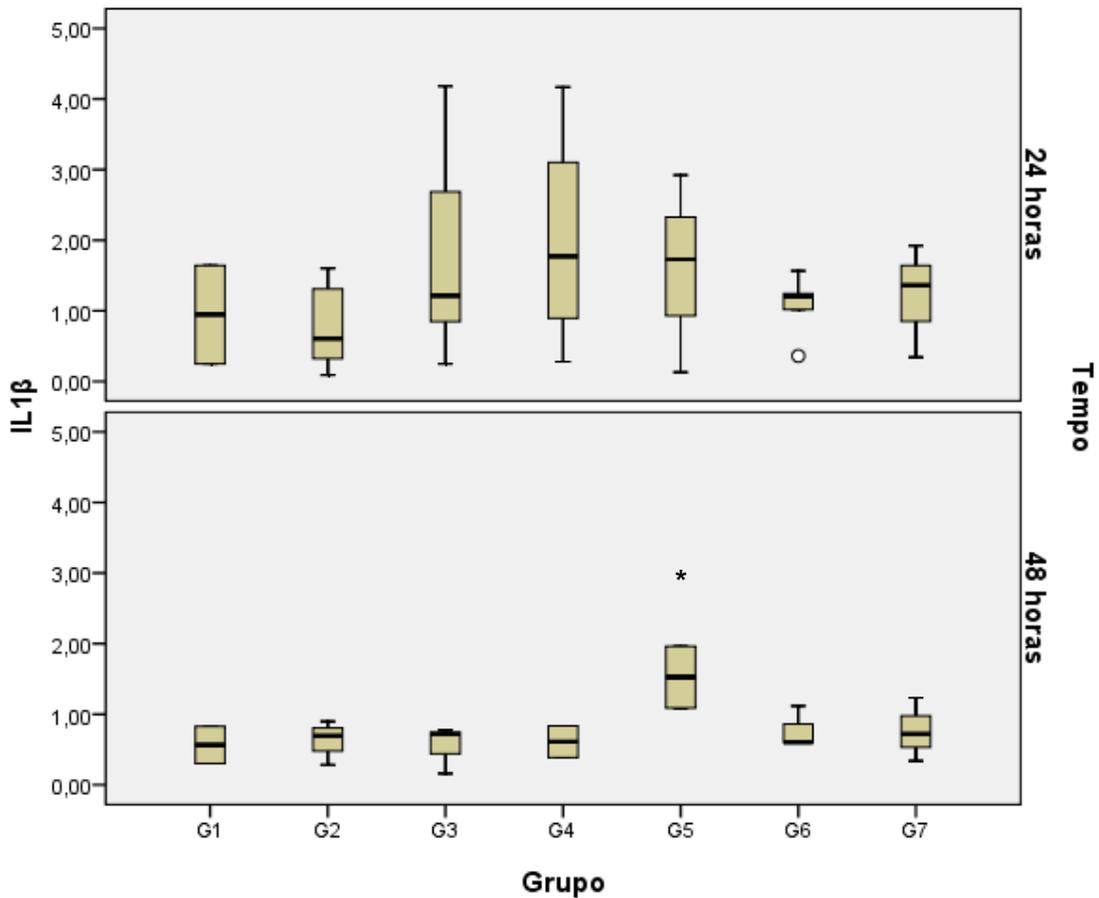


Figura 14: Expressão gênica de IL-1 β nos diferentes grupos no tempo de tratamento com metformina de 24 e 48 horas. A expressão do RNAm da IL-1 β foi normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). Diferença estatisticamente significativa no grupo G5 em relação aos outros grupos com 48 de tratamento ($p < 0,05$); Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis N=4-9

Analisando a resposta da expressão do RNAm da IL-1 β dentro dos grupos G5 e G7 (tratados com metformina), na figura 15 verificamos que não houve diferença significativa da expressão desse gene com 48 horas de tratamento em relação as 24 horas de tratamento em nenhum dos grupos.

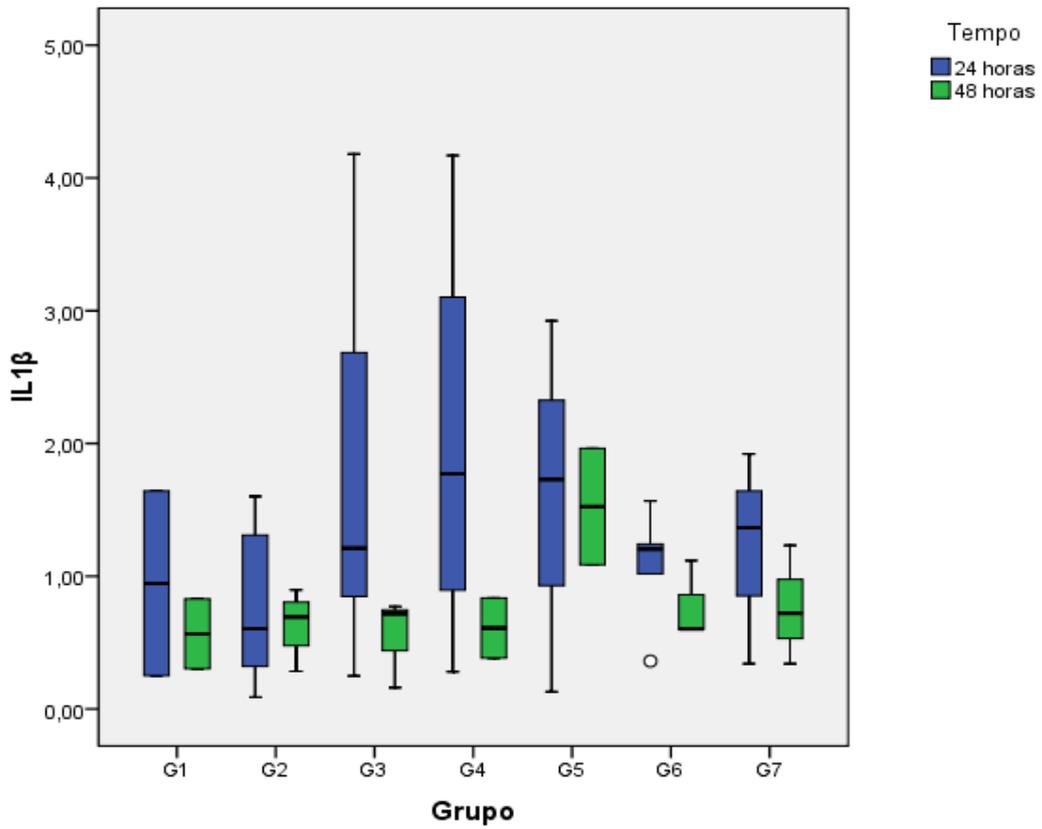


Figura 15: Expressão gênica de IL-1 β nos diferentes tempos de tratamento com metformina (24 e 48 horas). A expressão do RNAm da IL-1 β foi normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA); Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis; N=2-5.

DISCUSSÃO CAPÍTULO III

Atualmente sabe-se que os requisitos para o sucesso da implantação dependem de um desenvolvimento apropriado do blastocisto, como também do endométrio, para que este se encontre em um estado receptivo. Diversos eventos celulares e moleculares estão envolvidos durante o processo de implantação (Singh, Chaudhry et al. 2011).

Pacientes com SOP muitas vezes continuam a enfrentar baixas taxas de implantação (Kodama, Fukuda et al. 1995; Okon, Laird et al. 1998) e altas taxas de abortos (Tulppala, Stenman et al. 1993; Clifford, Rai et al. 1994; Okon, Laird et al. 1998; Qiao and Feng 2011) mesmo após a ovulação restaurada.

O modelo celular desenvolvido pelo presente estudo foi utilizado para analisar fatores quimiotáticos relevantes no processo de implantação, a IL-8 e IL-1 β sob o efeito do tratamento de metformina, insulino-sensibilizante amplamente utilizado por essas pacientes. Na biologia reprodutiva essas citocinas têm demonstrado participação em eventos como ovulação, menstruação, implantação, e também em processos patológicos (Caballero-Campo, Dominguez et al. 2002).

Os níveis de secreção de IL-8 já foram estudados no ciclo menstrual, revelando uma maior taxa da expressão deste gene na fase secretória tardia (Arici, Seli et al. 1998), assim como sua participação no recrutamento de leucócitos, sendo este importante para que ocorra a invasão do trofoblasto (Germeyer, Sharkey et al. 2009). Da mesma forma, estudos correlacionam níveis elevados da IL-1 β com sucesso na migração do trofoblasto (von Wolff, Thaler et al. 2000; Gonzalez, Neufeld et al. 2011). Todos esses dados sugerem fortemente que essas citocinas desempenham um papel importante no período da implantação.

No presente estudo observamos que o grupo G5 tratado durante 48 horas apresentou maior expressão do gene da IL-8 em relação ao mesmo grupo tratado durante o período de 24 horas. Semelhantemente, o grupo G5

apresentou uma maior expressão do gene da IL-1 β quando comparado a todos os outros grupos no período de 48 horas de tratamento com metformina. Entretanto, o grupo G7, também tratado com metformina, não apresentou diferença estatística sobre a expressão dos genes estudados em relação aos outros grupos e aos tempos de tratamento.

Corroborando com os dados do estudo atual, Germeyer e colaboradores (2011) analisaram os efeitos do tratamento a longo prazo (14 dias) e a curto prazo (48 horas) com a metformina nas células estromais no processo de decidualização e transformação na expressão gênica de fatores relacionados a implantação. Demonstrando que a insulina diminuiu a expressão do RNAm dos genes da IL-8 e IL-1 β . E que, a metformina aumentou a expressão desses genes, levemente nos grupos tratados com insulina e fortemente nos grupos tratados somente com metformina (Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Portanto, relacionamos o aumento da expressão do RNAm da IL-1 β no grupo G5 pelo efeito estimulador da metformina, e sugerimos que no grupo G7 a insulina atuou inibindo a expressão dos genes, não sendo possível observar a ação da metformina pelo menor número amostral. Observamos também, que o período de 24 horas de tratamento com metformina não foi suficiente para desenvolver uma resposta na expressão do RNAm dos genes em estudo.

Estes resultados preliminares, no entanto, precisam ser analisados mais precisamente em nível pós-transducional para que se possa relacioná-los ao contexto da complexa interação materno-fetal.

CONCLUSÃO

Este trabalho estabeleceu um novo modelo experimental partir de culturas primárias de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas para podermos entender melhor o funcionamento dos mecanismos moleculares desencadeados por esses fatores. Concluiu-se que o modelo dentro do protocolo proposto é viável e que as células mantiveram-se proliferando durante todo o período de cultivo.

A partir desse modelo podem ser feitas análises sobre fatores envolvidos no processo de implantação, como também o estudo da ação de medicamentos. O conhecimento da fisiologia do endométrio dessas pacientes a partir do cultivo primário celular pode refletir a variabilidade de respostas dos indivíduos *in vitro* e proporcionar uma ferramenta para o estudo de diferentes tratamentos.

O tratamento com metformina apresentou um efeito antiproliferativo nas células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas, conforme estudos demonstram no mesmo e em outros tipos celulares.

A escolha de um gene normalizador para estudos de expressão gênica por RT-qPCR no modelo de cultura primária proposto é uma etapa crítica dos estudos que o utilizam, pois seu sucesso é altamente dependente da escolha do gene de referência adequado, o qual não deve ser afetado pelas condições experimentais, além de exibir uma alta estabilidade em sua expressão gênica. Em nosso trabalho, identificamos o gene *HPRT1* como o mais estável e indicado para a normalização nesse modelo celular.

O tratamento com metformina no período de 48 horas aumenta a expressão do gene da IL-1 β no grupo tratado somente com o medicamento, sugerindo a ação inibitória da insulina sobre a expressão desses genes no grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico.

Mais estudos são necessários para melhor entendimento do efeito da metformina nos fatores envolvidos durante a implantação nas pacientes com SOP, para o desenvolvimento de novas terapias em medicina reprodutiva.

PERSPECTIVAS

O número amostral do presente estudo precisa ser aumentado para melhor análise dos dados obtidos. Além disso, pretende-se avaliar a decidualização das células estromais endometriais a partir das concentrações de prolactina no sobrenadante das células. Também pretendemos avaliar o efeito da metformina na expressão proteica da IL-8 e IL-1 β para que possamos analisar respostas pós-transducionais.

REFERÊNCIAS

- Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res* 64(15): 5245-5250.
- Apparao, K. B., L. P. Lovely, et al. (2002). "Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome." *Biol Reprod* 66(2): 297-304.
- Arici, A., E. Seli, et al. (1998). "Interleukin-8 in the human endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1783-1787.
- Arici, A., S. I. Tazuke, et al. (1996). "Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells." *Mol Hum Reprod* 2(1): 40-45.
- Arnold, J. T., D. G. Kaufman, et al. (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model." *Hum Reprod* 16(5): 836-845.
- Ashley, R. L., L. E. Henkes, et al. (2010). "Deletion of the *Isg15* gene results in up-regulation of decidual cell survival genes and down-regulation of adhesion genes: implication for regulation by IL-1beta." *Endocrinology* 151(9): 4527-4536.
- Azziz, R., E. Carmina, et al. (2006). "Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline." *J Clin Endocrinol Metab* 91(11): 4237-4245.
- Bamberg, C., C. Fotopoulou, et al. (2012). "Correlation of midtrimester amniotic fluid cytokine concentrations with adverse pregnancy outcome in terms of spontaneous abortion, preterm birth, and preeclampsia." *J Matern Fetal Neonatal Med* 25(6): 812-817.
- Baran, S., M. Api, et al. (2010). "Comparison of metformin and clomiphene citrate therapy for induction of ovulation in the polycystic ovary syndrome." *Arch Gynecol Obstet* 282(4): 439-443.
- Billington, W. D. (2003). "The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar." *J Reprod Immunol* 60(1): 1-11.
- Boivin, J., E. Griffiths, et al. (2011). "Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies." *BMJ* 342: d223.

- Bourdiec, A., R. Shao, et al. (2012). "Human Chorionic Gonadotropin Triggers Angiogenesis via the Modulation of Endometrial Stromal Cell Responsiveness to Interleukin 1: A New Possible Mechanism Underlying Embryo Implantation." *Biol Reprod*.
- Brassard, M., Y. AinMelk, et al. (2008). "Basic infertility including polycystic ovary syndrome." *Med Clin North Am* 92(5): 1163-1192, xi.
- Burney, R. O., S. Talbi, et al. (2007). "Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis." *Endocrinology* 148(8): 3814-3826.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39.
- Caballero-Campo, P., F. Dominguez, et al. (2002). "Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation." *Mol Hum Reprod* 8(4): 375-384.
- Campagnoli, C., C. Abba, et al. (2013). "Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women." *Gynecol Endocrinol* 29(2): 119-124.
- Chaouat, G., E. Menu, et al. (1997). "Immunopathology of early pregnancy." *Infect Dis Obstet Gynecol* 5(2): 73-92.
- Chou, K. H., H. von Eye Corleta, et al. (2003). "Clinical, metabolic and endocrine parameters in response to metformin in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind and placebo-controlled trial." *Horm Metab Res* 35(2): 86-91.
- Clifford, K., R. Rai, et al. (1994). "An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases." *Hum Reprod* 9(7): 1328-1332.
- Coffey, S., G. Bano, et al. (2006). "Health-related quality of life in women with polycystic ovary syndrome: a comparison with the general population using the Polycystic Ovary Syndrome Questionnaire (PCOSQ) and the Short Form-36 (SF-36)." *Gynecol Endocrinol* 22(2): 80-86.
- Coffey, S. and H. Mason (2003). "The effect of polycystic ovary syndrome on health-related quality of life." *Gynecol Endocrinol* 17(5): 379-386.

- Costello, M. F., M. Chapman, et al. (2006). "A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome." *Hum Reprod* 21(6): 1387-1399.
- Dallenbach, C., K. Sterzik, et al. (1987). "[Histologic endometrial findings in patients on the day of planned embryo transfer]." *Geburtshilfe Frauenheilkd* 47(9): 623-629.
- Deeks, A. A., M. E. Gibson-Helm, et al. (2010). "Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a comprehensive investigation." *Fertil Steril* 93(7): 2421-2423.
- Diamanti-Kandarakis, E. and A. Dunaif (2012). "Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited: An Update on Mechanisms and Implications." *Endocr Rev*.
- Diamanti-Kandarakis, E. and A. G. Papavassiliou (2006). "Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome." *Trends Mol Med* 12(7): 324-332.
- Diedrich, K., B. C. Fauser, et al. (2007). "The role of the endometrium and embryo in human implantation." *Hum Reprod Update* 13(4): 365-377.
- Dimitriadis, E., C. A. White, et al. (2005). "Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation." *Hum Reprod Update* 11(6): 613-630.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* 87(6): 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* 27: 519-550.
- Dokras, A., M. Bochner, et al. (2005). "Screening women with polycystic ovary syndrome for metabolic syndrome." *Obstet Gynecol* 106(1): 131-137.
- Dunaif, A., M. Graf, et al. (1987). "Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia." *J Clin Endocrinol Metab* 65(3): 499-507.
- Fazleabas, A. T., J. J. Kim, et al. (2004). "Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review." *Placenta* 25 Suppl A: S26-31.
- Garcia-Velasco, J. A. and A. Arici (1999). "Chemokines and human reproduction." *Fertil Steril* 71(6): 983-993.

- Gargett, C. E. and L. Ye (2012). "Endometrial reconstruction from stem cells." *Fertil Steril* 98(1): 11-20.
- Gazvani, M. R., M. Bates, et al. (2000). "Follicular fluid concentrations of interleukin-12 and interleukin-8 in IVF cycles." *Fertil Steril* 74(5): 953-958.
- Geisert, R., A. Fazleabas, et al. (2012). "Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1beta." *Cell Tissue Res* 349(3): 825-838.
- Germeyer, A., J. Jauckus, et al. (2011). "Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells." *Reprod Biomed Online* 22(4): 327-334.
- Germeyer, A., A. M. Sharkey, et al. (2009). "Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts." *Mol Hum Reprod* 15(1): 39-48.
- Giudice, L. C. (1999). "Potential biochemical markers of uterine receptivity." *Hum Reprod* 14 Suppl 2: 3-16.
- Gluszk, O., U. Stopinska-Gluszk, et al. (2012). "Phenotype and metabolic disorders in polycystic ovary syndrome." *ISRN Endocrinol* 2012: 569862.
- Gonzalez, M., J. Neufeld, et al. (2011). "Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by decidualized endometrial stromal cells and enhanced by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1 beta." *Mol Hum Reprod* 17(7): 421-433.
- Goodman, R. B., R. G. Wood, et al. (1992). "Cytokine-stimulated human mesothelial cells produce chemotactic activity for neutrophils including NAP-1/IL-8." *J Immunol* 148(2): 457-465.
- Goudas, V. T. and D. A. Dumesic (1997). "Polycystic ovary syndrome." *Endocrinol Metab Clin North Am* 26(4): 893-912.
- Group, R. E. A.-S. P. C. W. (2004). "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)." *Hum Reprod* 19(1): 41-47.
- Guimarães, L. S. P. (2012). "Use of the Generalized Estimating Equation Model in Longitudinal Data Analysis." *Revista HCPA* 32(4): 503-511.

- Guzick, D. S., R. Wing, et al. (1994). "Endocrine consequences of weight loss in obese, hyperandrogenic, anovulatory women." *Fertil Steril* 61(4): 598-604.
- Harborne, L., R. Fleming, et al. (2003). "Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome." *Lancet* 361(9372): 1894-1901.
- Hosseinpahan, F., M. Barzin, et al. (2011). "The lack of association between polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome: Iranian PCOS prevalence study." *Clin Endocrinol (Oxf)* 75(5): 692-697.
- Hruz, T., M. Wyss, et al. (2011). "RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization." *BMC Genomics* 12: 156.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." *Genes Immun* 6(4): 279-284.
- Ihnatovych, I., M. Livak, et al. (2009). "Manipulating actin dynamics affects human in vitro decidualization." *Biol Reprod* 81(1): 222-230.
- Katsiki, N. and A. I. Hatzitolios (2010). "Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update." *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(6): 466-476.
- Kauma, S., D. Matt, et al. (1990). "Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes." *Am J Obstet Gynecol* 163(5 Pt 1): 1430-1437.
- Kim, J. Y., H. Song, et al. (2009). "Transcriptional profiling with a pathway-oriented analysis identifies dysregulated molecular phenotypes in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 94(4): 1416-1426.
- Klonoff-Cohen, H., E. Chu, et al. (2001). "A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer." *Fertil Steril* 76(4): 675-687.
- Koch, A. E., P. J. Polverini, et al. (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." *Science* 258(5089): 1798-1801.
- Kodama, H., J. Fukuda, et al. (1995). "High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome." *Hum Reprod* 10(8): 1962-1967.

- Krussel, J. S., P. Bielfeld, et al. (2003). "Regulation of embryonic implantation." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1: S2-9.
- Ladson, G., W. C. Dodson, et al. (2011). "The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind study." *Fertil Steril* 95(3): 1059-1066 e1051-1057.
- Larsen, C. G., A. O. Anderson, et al. (1989). "The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes." *Science* 243(4897): 1464-1466.
- Larsen, C. G., A. O. Anderson, et al. (1989). "Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor." *Immunology* 68(1): 31-36.
- Lee, B., H. Du, et al. (2009). "Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium." *Biol Reprod* 80(1): 79-85.
- Legro, R. S., H. X. Barnhart, et al. (2007). "Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome." *N Engl J Med* 356(6): 551-566.
- Legro, R. S., W. D. Schlaff, et al. (2010). "Total testosterone assays in women with polycystic ovary syndrome: precision and correlation with hirsutism." *J Clin Endocrinol Metab* 95(12): 5305-5313.
- Lessey, B. A. (2011). "Assessment of endometrial receptivity." *Fertil Steril* 96(3): 522-529.
- Li, L., J. C. Mamputu, et al. (2005). "Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin." *Diabetes* 54(7): 2227-2234.
- Lindhard, A., U. Bentin-Ley, et al. (2002). "Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation." *Fertil Steril* 78(2): 221-233.
- Lisowski, P., M. Pierzchala, et al. (2008). "Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid." *J Appl Genet* 49(4): 367-372.
- Lord, J. M., I. H. Flight, et al. (2003). "Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD003053.

- Loureiro, S. O., L. Romao, et al. (2010). "Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes." *Brain Res* 1355: 151-164.
- Malizia, B. A., Y. S. Wook, et al. (2010). "The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age." *Fertil Steril* 93(2): 537-543.
- Mandrelle, K., M. S. Kamath, et al. (2012). "Prevalence of metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome attending an infertility clinic in a tertiary care hospital in south India." *J Hum Reprod Sci* 5(1): 26-31.
- Margarit, L., A. Taylor, et al. (2010). "MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 95(12): 5320-5329.
- Metcalf, D. (1989). "The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells." *Nature* 339(6219): 27-30.
- Moran, C., M. Arriaga, et al. (2012). "Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome." *Int J Endocrinol* 2012: 317241.
- Moran, L. J., R. Pasquali, et al. (2009). "Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society." *Fertil Steril* 92(6): 1966-1982.
- Morelli, S. S., D. A. Keegan, et al. (2008). "Early serum interleukin-8 evaluation may prove useful in localizing abnormally implanted human gestations after in vitro fertilization." *Fertil Steril* 90(6): 2068-2072.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Motta, A. B. (2012). "The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome." *Curr Pharm Des* 18(17): 2482-2491.
- Mukaida, N., M. Shiroo, et al. (1989). "Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8." *J Immunol* 143(4): 1366-1371.
- Narayan, G., V. Bourdon, et al. (2007). "Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes." *Genes Chromosomes Cancer* 46(4): 373-384.

- Nestler, J. E. and D. J. Jakubowicz (1996). "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(9): 617-623.
- Noyes, R. W., A. T. Hertig, et al. (1975). "Dating the endometrial biopsy." *Am J Obstet Gynecol* 122(2): 262-263.
- Okon, M. A., S. M. Laird, et al. (1998). "Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function." *Fertil Steril* 69(4): 682-690.
- Palomba, S., A. Falbo, et al. (2009). "Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review." *Endocr Rev* 30(1): 1-50.
- Palomba, S., F. Orio, Jr., et al. (2005). "Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 90(7): 4068-4074.
- Psychoyos, A. (1986). "Uterine receptivity for nidation." *Ann N Y Acad Sci* 476: 36-42.
- Qiao, J. and H. L. Feng (2011). "Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence." *Hum Reprod Update* 17(1): 17-33.
- Quezada, S., C. Avellaira, et al. (2006). "Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome." *Fertil Steril* 85(4): 1017-1026.
- Radonic, A., S. Thulke, et al. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." *Biochem Biophys Res Commun* 313(4): 856-862.
- Rajaei, S., A. H. Zarnani, et al. (2011). "Cytokine profile in the endometrium of normal fertile and women with repeated implantation failure." *Iran J Immunol* 8(4): 201-208.
- Rajendran, S., S. R. Willoughby, et al. (2009). "Polycystic ovary syndrome is associated with severe platelet and endothelial dysfunction in both obese and lean subjects." *Atherosclerosis* 204(2): 509-514.
- Rashid, N. A., S. Lalitkumar, et al. (2011). "Endometrial receptivity and human embryo implantation." *Am J Reprod Immunol* 66 Suppl 1: 23-30.

- Rawdanowicz, T. J., A. L. Hampton, et al. (1994). "Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha." *J Clin Endocrinol Metab* 79(2): 530-536.
- Red-Horse, K., P. M. Drake, et al. (2001). "Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles." *Am J Pathol* 159(6): 2199-2213.
- Revel, A. (2012). "Defective endometrial receptivity." *Fertil Steril* 97(5): 1028-1032.
- Robertson, S. A., R. F. Seamark, et al. (1994). "The role of cytokines in gestation." *Crit Rev Immunol* 14(3-4): 239-292.
- Rossi, M., A. M. Sharkey, et al. (2005). "Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells." *Reproduction* 130(5): 721-729.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* 238(4826): 491-497.
- Sadek, K. H., F. R. Cagampang, et al. (2012). "Variation in stability of housekeeping genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women." *Hum Reprod* 27(1): 251-256.
- Santana, L. F., M. F. de Sa, et al. (2004). "Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome." *Gynecol Endocrinol* 19(2): 88-96.
- Sarapik, A., A. Velthut, et al. (2012). "Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success." *Clin Dev Immunol* 2012: 606459.
- Satyaswaroop, P. G., R. S. Bressler, et al. (1979). "Isolation and culture of human endometrial glands." *J Clin Endocrinol Metab* 48(4): 639-641.
- Seibel, S. A., K. H. Chou, et al. (2008). "Effect of metformin on IGF-1 and IGFBP-1 levels in obese patients with polycystic ovary syndrome." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138(1): 122-124.
- Silver, N., S. Best, et al. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *BMC Mol Biol* 7: 33.

- Simon, C., A. Frances, et al. (1994). "Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function." *J Clin Endocrinol Metab* 78(4): 847-854.
- Simon, C., A. Frances, et al. (1994). "Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist." *Endocrinology* 134(2): 521-528.
- Simon, C., M. J. Gimeno, et al. (1997). "Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 82(8): 2607-2616.
- Simon, C., D. Valbuena, et al. (1998). "Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium." *Fertil Steril* 70(5): 896-906.
- Singh, M., P. Chaudhry, et al. (2011). "Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors." *J Endocrinol* 210(1): 5-14.
- Souza, A. F., I. S. Brum, et al. (2012). "Reference gene for primary culture of prostate cancer cells." *Mol Biol Rep.*
- Strakova, Z., S. Srisuparp, et al. (2000). "Interleukin-1beta induces the expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during decidualization in the primate." *Endocrinology* 141(12): 4664-4670.
- Strakova, Z., M. Szmidt, et al. (2003). "Inhibition of matrix metalloproteinases prevents the synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 during decidualization in the baboon." *Endocrinology* 144(12): 5339-5346.
- Strieter, R. M., S. L. Kunkel, et al. (1989). "Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta." *Science* 243(4897): 1467-1469.
- Strowitzki, T., E. Capp, et al. (2010). "The degree of cycle irregularity correlates with the grade of endocrine and metabolic disorders in PCOS patients." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149(2): 178-181.
- Tabibzadeh, S. and X. Z. Sun (1992). "Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle." *Hum Reprod* 7(9): 1214-1221.
- Takemura, Y., Y. Osuga, et al. (2007). "Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 92(8): 3213-3218.

- Teede, H., A. Deeks, et al. (2010). "Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan." *BMC Med* 8: 41.
- Tone, A. A., H. Begley, et al. (2008). "Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma." *Clin Cancer Res* 14(13): 4067-4078.
- Tong, Z., Z. Gao, et al. (2009). "Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR." *BMC Mol Biol* 10: 71.
- Traub, M. L. (2011). "Assessing and treating insulin resistance in women with polycystic ovarian syndrome." *World J Diabetes* 2(3): 33-40.
- Tsui, K. H., L. Y. Chen, et al. (2004). "Interleukin-8 can stimulate progesterone secretion from a human trophoblast cell line, BeWo." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40(10): 331-336.
- Tulppala, M., U. H. Stenman, et al. (1993). "Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women." *Br J Obstet Gynaecol* 100(4): 348-352.
- Twisk, J. W. (2004). "Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis." *Eur J Epidemiol* 19(8): 769-776.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Velazquez, E. M., S. Mendoza, et al. (1994). "Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy." *Metabolism* 43(5): 647-654.
- von Wolff, M., C. J. Thaler, et al. (2000). "Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion." *Mol Hum Reprod* 6(7): 627-634.
- Wan, Q., I. Whang, et al. (2011). "Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153(3): 259-268.

- Wang, H., F. Pilla, et al. (2012). "A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids." *Mol Hum Reprod* 18(1): 33-43.
- Wilcox, A. J., D. D. Baird, et al. (1999). "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy." *N Engl J Med* 340(23): 1796-1799.
- Wurth, R., A. Pattarozzi, et al. (2013). "Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt." *Cell Cycle* 12(1): 145-156.
- Xie, R., M. P. Schlumbrecht, et al. (2009). "S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling." *Lab Invest* 89(8): 937-947.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, et al. (1987). "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)." *J Immunol* 139(3): 788-793.
- Zeger, S. L. and K. Y. Liang (1986). "Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes." *Biometrics* 42(1): 121-130.
- Zhang, H., R. S. Legro, et al. (2010). "Decision trees for identifying predictors of treatment effectiveness in clinical trials and its application to ovulation in a study of women with polycystic ovary syndrome." *Hum Reprod* 25(10): 2612-2621.
- Zhang, L. and Q. Liao (2010). "Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium." *Fertil Steril* 93(7): 2295-2298.
- Zhu, H. Y., J. X. Wang, et al. (2012). "Three-dimensional cultures of human endometrial cells on Matrigel mimic in vivo morphology." *Chin Med J (Engl)* 125(5): 863-868.

ANEXO 1

Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto: **EFEITO DA METFORMINA NA IL-8 E IL-1 β EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS *IN VITRO* EM UM MODELO DE SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Pesquisadores responsáveis: Amanda de Barros Machado/ Edison Capp

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Ginecologia – Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

Telefones para contato: (051) 33597625

Prezada paciente,

Estamos realizando um estudo com células endometriais (camada interna do útero) para avaliar o efeito do uso de um medicamento, a fim de caracterizar proteínas que auxiliam na implantação do embrião no útero materno. O medicamento que será usado se chama METFORMINA e ele atua diminuindo a resistência dos tecidos à insulina. Como a senhora irá realizar a cirurgia de histerectomia (retirada do útero), gostaria de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que após o término da cirurgia sejam coletadas células do útero removido. Trata-se de um estudo exploratório e sua participação como doadoras das células **não** está necessariamente relacionada com a presença de ovários policísticos, infertilidade ou aumento da resistência à insulina. Cabe salientar que as células endometriais são sempre descartadas após a cirurgia, então, este estudo **não** trará nenhum malefício à sua saúde. Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora. Porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas à infertilidade.

No início do estudo aplicaremos um questionário para obtermos informações gerais de identificação, saúde geral e ginecológica. Ao final do estudo será feita a análise estatística e divulgação dos resultados.

O seu nome será mantido em sigilo, sendo divulgado os resultados em conjunto com outros participante utilizando códigos. A divulgação será apenas para fins científicos.

Você poderá interromper a participação neste estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo no seu atendimento médico. Você não terá custos com sua participação.

Qualquer dúvida que surja ao longo do estudo basta entrar em contato com um dos telefones acima citados, ou com o Centro de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 33598304.

Este termo contém duas vias, ficando uma com a senhora e a outra com o pesquisador.

Eu, _____, concordo em participar do estudo acima nomeado, e afirmo que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão, podendo me retirar do estudo quando assim desejar, sem prejuízo qualquer do tratamento de minha doença.

Paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Nome do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
28/02/2012
M. H. G. G. G.