

EFFETTI DELL'INOSITOLO SULLA QUALITÀ OVOCITARIA IN PAZIENTI AFFETTE DA SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

Mariagrazia Stracquadanio; Lilliana Ciotta; Isabella Pagano; Antonio Carbonaro;
Marco Palumbo; Ferdinando Gulino

* Dottore Mariagrazia Stracquadanio - Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Sezione di Ginecologia - Ospedale Santo Bambino - Catania (CT), Università degli Studi di Catania

Indirizzo per corrispondenza: Dott.ssa Mariagrazia Stracquadanio

Università degli Studi di Catania

Via San Giuliano 111 D, 97015 Modica (RG) Italia

tel: +39 333 7979357; fax: +39 0932 852647; e-mail: mariagrazia.stracquadanio@gmail.com

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome is the most common cause of chronic anovulation infertility in women in fertile period. The supplementation of inositol, due to its ability to increase insulin sensitivity, improves the oocytes' quality and increase the number of oocytes collected after ovarian stimulation in patients undergoing IVF (In Vitro Fertilization). The aim of our study is to determine the effects of myo-inositol on oocyte's quality on a sample of women with polycystic ovary syndrome. The patients were divided into two groups: patients of Group A intook 2 µg of myo-inositol + 400µg of folic acid 2 times a day, continuously for 3 months, while Group B only 400µg of folic acid. At the end of treatment, the number of follicles of diameter >15 mm, visible at ultrasound during stimulation, and the number of oocytes recovered at the time of pick-ups were found to be significantly greater in the group treated with myo-inositol, so as the average number of embryos transferred and embryo Grade G1. Significantly reduced was the average number of immature oocytes (vesicles germ and degenerated oocytes) too.

Key words: *Inositol; oocyte's quality; Polycystic Ovary Syndrome; Infertility; In Vitro Fertilization*

RIASSUNTO

La Sindrome dell'Ovaio Policistico è la causa più frequente di infertilità da anovulazione cronica nella donna in periodo fertile. La supplementazione d'inositolo, grazie alla sua capacità di aumentare la sensibilità all'insulina, contribuisce a migliorare la qualità ovocitaria e aumentare il numero di ovociti raccolti dopo stimolazione ovarica in pazienti che si sottopongono a procedure di Procreazione Medicalmente Assistita. L'obiettivo del nostro studio è quello di determinare gli effetti del mio-inositolo sulla qualità ovocitaria su un campione di donne con Sindrome dell'Ovaio Policistico. Le pazienti sono state suddivise in due gruppi: al Gruppo A è stata prescritta l'assunzione di 2 µg di mio-inositolo + 400µg di acido folico 2 volte al giorno, in modo continuativo per 3 mesi; al Gruppo B è stata prescritta solo l'assunzione di 400µg di acido folico. Al termine del trattamento, il numero dei follicoli di diametro >15mm, visibili ecograficamente durante la stimolazione, e il numero degli ovociti recuperati al momento del pick-up sono risultati essere significativamente maggiori nel gruppo trattato con mio-inositolo, così come il numero medio di embrioni trasferiti e di grado G1. Significativa anche la riduzione del numero medio degli ovociti immaturi (vescicole germinali e ovociti degenerati).

Parole chiave: *Inositol; qualità ovocitaria; Sindrome dell'Ovaio Policistico; infertilità; Fertilizzazione in vitro*

INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

La Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS) è un complesso disturbo caratterizzato da vari disordini endocrini che hanno la capacità di provocare una condizione caratterizzata da anovulazione e iperandrogenismo.

Questa sindrome così eterogenea è stata riscontrata in circa il 5-10% della popolazione in età riproduttiva ed è ad oggi considerata l'alterazione endocrina più comune durante gli anni della vita riproduttiva.^[1] L'Ovaio policistico è l'espressione di una complessa alterazione funzionale del sistema riprodut-

tivo e non la conseguenza di uno specifico difetto locale ovarico o centrale ipotalamico-ipofisario. Sotto l'aspetto ormonale la micropolicistosi ovarica è caratterizzata da un'umentata produzione di androgeni ed estrogeni e dalla dissociazione tra i tassi plasmatici delle gonadotropine, con LH elevato e FSH normale o basso, con un rapporto LH/FSH che di solito è superiore a 2,5 nelle forme tipiche.

Nel sangue di questi pazienti troviamo valori elevati di testosterone, androstenedione, DHEA, DHEA-S, 17-OHP, estrone, mentre risultano diminuiti i livelli circolanti di SHBG.

Il modesto relativo iperestrogenismo è dovuto all'umentata conversione periferica, soprattutto nel tessuto grasso, di androstenedione ad estrone.

L'SHBG presenta una riduzione di circa il 50% dei suoi livelli per effetto dell'umento del testosterone.^[2-4]

L'eziologia di questa sindrome è ancora oggi sconosciuta, ma è probabilmente multifattoriale, forse dovuta a un'eccessiva produzione di E1, o ad un'alterazione primitiva della regolazione ipotalamica e della steroidogenesi ovarica e/o surrenalica.

La diagnosi di PCOS si basa sul quadro clinico, sul quadro ormonale e sul quadro ecografico. In accordo con le linee elaborate a Rotterdam nel 2003, essa può essere posta solo dopo l'esclusione di altre cause note di iperandrogenismo e amenorrea e quando siano presenti almeno 2 delle 3 seguenti alterazioni:

1. Oligo o anovularietà, con irregolarità del ciclo mestruale
2. Livelli elevati circolanti di androgeni o manifestazioni cliniche di iperandrogenismo
3. Evidenza all'ecografia pelvica transvaginale di micropolicistosi ovarica

Sin dal menarca, o dopo breve periodo, i cicli mostrano irregolarità di ritmo. In numerosi casi essi si distanziano progressivamente l'uno dall'altro sino a sfociare in brevi periodi di amenorrea o in amenorrea permanente. La disfunzione mestruale nelle donne con PCOS si può manifestare in modi diversi: probabilmente la forma più comune è quella della presenza di mestruazioni erratiche da anovulazione.

L'eccesso di androgeni è responsabile dell'irsutismo, della pelle untuosa, dell'acne e, a livello ovarico, dell'ispessimento dell'albuginea. Il grado di irsutismo può essere quantificato con lo schema di Ferriman e Gallwey.

In rari casi si osservano quadri di virilizzazione con aumento delle dimensioni del clitoride, ipertrofia delle masse muscolari, voce profonda, calvizie temporale e aspetto mascolino; tuttavia in presenza di questi segni deve essere sempre esclusa la presenza di una neoplasia

sottostante ovarica o surrenalica secernente androgeni. Contemporaneamente, si può associare un quadro di sovrappeso, sino all'obesità.

La PCOs rappresenta una delle cause endocrine più comuni di sterilità femminile: nel caso si voglia ottenere una gravidanza è necessario indurre un'ovulazione.^[5]

Dei cicli ovulatori si ottengono, solitamente, dopo la correzione del sovrappeso o immediatamente dopo la sospensione degli estrogeno-progestinici. Qualora questo non avvenisse, l'ovulazione deve essere indotta farmacologicamente (associata, di solito, alla somministrazione di metformina).^[6]

Il clomifene è uno dei farmaci che viene normalmente utilizzato a questo scopo: è un estrogeno debole che si comporta anche da antiestrogeno. È probabile che il farmaco interagisca con i recettori estrogenici ipotalamici, spiazzando l'estradiolo endogeno e creando, data la sua attività biologica pressoché assente in questo distretto, una condizione artificiosa di ipoestrogenismo. I centri ipotalamici responsabili della liberazione del GnRH vengono in tal modo stimolati ad una maggior attività. Dopo la somministrazione di clomifene, infatti, la frequenza della secrezione pulsatile di LH e FSH è aumentata, mentre ne rimane invariata l'ampiezza. L'ovulazione nella PCOs viene indotta nell'80% dei casi, mentre la gravidanza si realizza in un 20% dei casi.

Nei casi in cui non c'è stata risposta al trattamento con clomifene e metformina, oppure è stato necessario ricorrere a FIVET/ICSI, l'induzione dell'ovulazione è stata effettuata tramite la somministrazione di gonadotropine.

Le gonadotropine utilizzate sono ottenute dalle urine di donne in post menopausa (menotropine). Ultimamente sono state introdotte gonadotropine ottenute con tecnica biosintetica da DNA ricombinante (follicotropina α e follicotropina β). Lo scopo della terapia con gonadotropine, o per meglio dire con FSH, è agire sui follicoli nell'ultima fase del loro iter maturativo che, in condizioni fisiologiche, è limitata alle prime due settimane del ciclo mestruale nel quale avverrà l'ovulazione.^[5, 7]

L'obiettivo del nostro studio è quello di determinare gli effetti del MIO-INOSITOLO, un fattore vitaminico facente parte del complesso B, sulla qualità ovocitaria su un campione di pazienti, con Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS), affette da anovulazione cronica ed infertilità, sottoposte, per tali motivi, a cicli di Procreazione Medica Assistita (PMA), quali FIVET o ICSI. Studi scientifici hanno dimostrato che il D-chiro-inositolo, grazie alla sua capacità di aumentare la sensibilità all'insulina, ha effetti benefici sull'ovulazione e

sulla produzione di androgeni in donne con sindrome dell'ovaio policistico. La somministrazione di D-chiro-inositolo è stata associata ad una riduzione della concentrazione di testosterone nel siero e ad un aumento della concentrazione dell'SHBG. Simultaneamente alla riduzione della secrezione d'insulina, le donne che hanno assunto D-chiro-inositolo hanno mostrato un ottimo miglioramento della funzione ovarica.^[8]

Evidenze scientifiche hanno dimostrato, inoltre, che la supplementazione di inositolo contribuisce a ridurre i quantitativi di FSH necessari all'ovulazione, migliorare la qualità ovocitaria (riduzione della presenza di vescicole germinali e di oociti degenerati), e aumentare il numero di ovociti raccolti dopo stimolazione ovarica in pazienti che si sottopongono a procedure di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) quali Fivet o Icsi.^[9-12]

Pur non potendolo definire propriamente una vitamina, l'inositolo è ritenuto un fattore vitaminico facente parte del complesso B. Nell'organismo umano è presente nei fosfolipidi ed in grado di stimolare la produzione endogena di lecitina.

Il suo ruolo biologico comprende inoltre una specifica attività di controllo del metabolismo dei grassi e degli zuccheri e delle funzionalità cellulari del sistema nervoso; risulta infine essenziale per la crescita dei capelli e nella prevenzione della calvizie. Studi scientifici hanno evidenziato come i soggetti diabetici eliminino un quantitativo significativamente superiore di inositolo rispetto ai soggetti non diabetici.^[13]

Nei casi di insulino-resistenza o di diabete di tipo II, l'inositolo contribuisce a migliorare il quadro clinico complessivo; in questo contesto l'inositolo può risultare utile per prevenire e correggere i meccanismi fisiopatologici alla base delle alterazioni metaboliche e riproduttive connesse alla sindrome dell'ovaio policistico.^[14-17]

MATERIALI E METODI

Tutte le pazienti sono state arruolate e trattate nel nostro Dipartimento di Scienze Ginecologiche (Ospedale "S. Bambino", Catania), presso gli Ambulatori di Endocrinologia Ginecologica e del Centro di Fisiopatologia della Riproduzione Umana. La fase di arruolamento, durata 12 mesi, ha selezionato un gruppo totale di 34 donne, di età inferiore ai 40 anni, affette da Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS).

La diagnosi di PCOS è stata posta sulla base dei seguenti criteri (Tab. I)

Sono state escluse concomitanti patologie endocrine e metaboliche, quali ipotiroidismo, ipertiroidismo, diabete mellito, tumori androgeno-secerenti, iperplasia surrenalica, Sindrome di Cushing.

In tali pazienti, la ICSI o la FIVET è stata consigliata come procedura da effettuare dopo la valutazione del liquido seminale del partner.

Secondo una tabella di randomizzazione, le pazienti sono state divise in due gruppi (Tab. II). La valutazione della qualità ovocitaria è stata possibile in seguito al pick-up degli ovociti effettuato nel corso di Tecniche di Fecondazione Assistita, a cui le pazienti sono state sottoposte.

La tecnica di fecondazione assistita utilizzata, FIVET o ICSI, prevede numerose fasi (stimolazione ovarica, prelievo ovocitario, valutazione della qualità ovocitaria, fertilizzazione in vitro degli ovociti, coltura embrionale e grading, trasferimento embrionale), ognuna delle quali è di fondamentale importanza per la buona riuscita del trattamento, e che sono state seguite dall'equipe del Centro di Fisiopatologia della Riproduzione dell' "Ospedale Santo Bambino" di Catania, presso l'ambulatorio Fivet e l'annessa sala operatoria.

Il confronto tra il Gruppo A e il Gruppo B è stato eseguito utilizzando:

- il test del χ^2 per i dati di tipo qualitativo (positività del β -HCG);
- il test T di Student per i dati quantitativi distribuiti normalmente (Età, BMI, unità di FSH somministrate, numero di follicoli di diametro >15 mm);

Tab. I: Criteri diagnostici PCOS

- 1) **Oligomenorrea** (sei o meno di sei cicli mestruali/anno)
- 2) **Iperandrogenismo** od iperandrogenemia
- 3) **Aspetto ultrasonografico pelvico caratterizzato da multiple aree anecogene**

Tab. II: Suddivisione in gruppi e protocollo terapeutico delle pazienti arruolate nel nostro studio

GRUPPO A: 16 pazienti a cui è stata prescritta l'assunzione di 2 μ g di mioinositolo + 400 μ g di acido folico 2 volte al giorno per via orale, in modo continuativo per almeno 3 mesi.

GRUPPO B: 18 pazienti-controllo a cui è stata prescritta solo l'assunzione di 400 μ g di acido folico

- il test U per i dati quantitativi non distribuiti normalmente (Giorni di stimolazione, massimo picco di E_2 , ovociti recuperati).

RISULTATI

Durante il periodo di studio, le pazienti sono state suddivise in due gruppi, con modalità randomizzata a doppio cieco, secondo quanto riportato nella tabella II.

Per quanto riguarda l'età media e il BMI, nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i due gruppi, che sono quindi risultati omogenei per tali parametri.

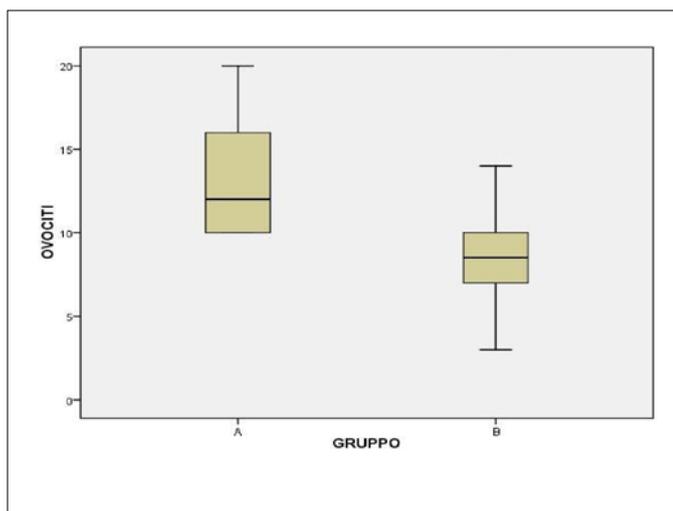
Le unità totali di FSH-r somministrati per la stimolazione sono risultate essere significativamente ridotte nel Gruppo A.

Come riportato in Letteratura, il picco dei livelli di E_2 al momento della somministrazione dell'hCG risulta essere ridotto nel gruppo A, ma il nostro dato non è statisticamente significativo.

Due cicli sono stati cancellati nel gruppo A, mentre nel Gruppo B sono stati sospesi cinque cicli, perché il picco di E_2 era > 4.000 pg/mL (rischio di iperstimolazione).

Il numero dei follicoli di diametro >15 mm, visibili ecograficamente durante la stimolazione, e il numero degli ovociti recuperati al momento del pick-up sono

Grafico I: Ovociti recuperati in seguito a Pick-up ovocitario.



GRUPPO	Mediana	Percentili	
		25°	75°
A	12	10	16
B	8,50	6,25	10,75
P < 0,05			

risultati essere significativamente maggiori nel gruppo trattato con mio-inositolo (Grafico I).

Il numero medio degli ovociti immaturi (vescicole germinali e ovociti degenerati) è stato significativamente ridotto, con tendenza all'aumento della percentuale degli ovociti in fase M2 (Grafico II).

Non è emersa significatività nel numero di ovociti fertilizzati, ma nel gruppo A è risultato essere significativamente elevato il numero medio di embrioni trasferiti, con aumento degli embrioni di Grado 1 rispetto ai gradi minori (Grafico III).

Nel rispetto delle leggi italiane sulla fecondazione assistita, non più di tre embrioni sono stati trasferiti; non è emersa alcuna differenza nel numero di gravidanze biochimiche accertate.

DISCUSSIONE

La Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOS) è uno dei più comuni disordini endocrini che interessano la donna. L'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia sono strettamente inerenti al fenotipo di una grande proporzione di donne con PCOS.

È stato sospettato un difetto nell'azione dell'insulina, probabilmente come conseguenza di un deficit di D-chiro-inositolo (DCI), che è un componente dell'inositolo fosfoglicano.

I farmaci che abbassano i livelli di insulina, in particolar modo differenti isoforme dell'inositolo, rappresentano nuove terapie per ripristinare l'ovulazione spontanea, con un potenziale effetto positivo anche sulla maturazione meiotica degli ovociti.

Queste terapie sembrano influenzare, direttamente, la steroidogenesi, riducendo la produzione di androgeni a livello delle cellule teicali. Infatti, è stato dimostrato che la somministrazione di DCI aumenta l'azione dell'insulina nelle pazienti con PCOS, migliorando così la funzione ovulatoria e riducendo la concentrazione sierica di Testosterone.^[8,18]

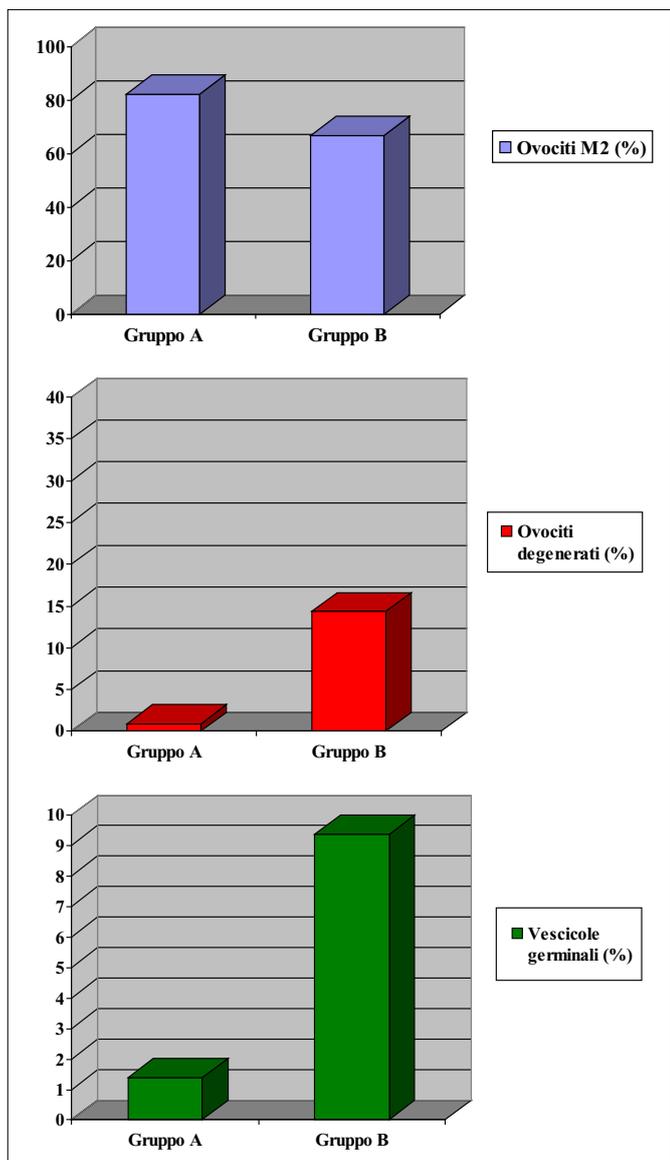
Attualmente non esistono molti dati a disposizione sull'azione e l'effetto del mio-inositolo, un precursore del DCI, in donne anovulatorie in età fertile, né sull'ovulazione spontanea in cicli di stimolazione.

Ad ogni modo, il mio-inositolo è un importante costituente del microambiente follicolare, giocando un ruolo determinante sia nello sviluppo nucleare che citoplasmatico dell'ovocita.

Infatti, nelle tecniche di Fecondazione Assistita, la supplementazione di mio-inositolo è positivamente correlata alla progressione meiotica ovocitaria di vescicole germinali di ratti, migliorando l'oscillazione intracellulare di Calcio.^[19]

Grafico II: Ovociti in fase M2, ovociti degenerati, vescicole germinali.

	GRUPPO A		GRUPPO B		P
	Frequenza ass.	%	Frequenza ass.	%	
Ovociti in fase M2	176	82,24	160	66,87	NS
Ovociti degenerati	2	0,93	23	14,37	,02
Vescicole germinali	3	1,4	15	9,37	,02



Inoltre, nei fluidi follicolari umani, una maggiore concentrazione di Mio-inositolo costituisce un marker degli ovociti di buona qualità.^[20]

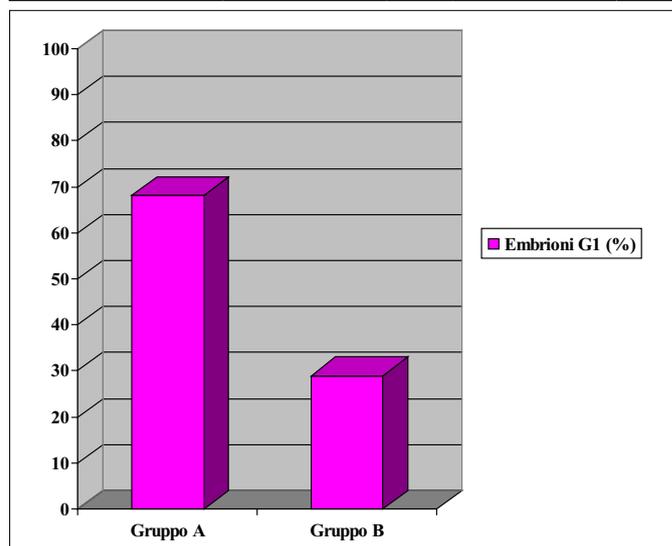
Il nostro lavoro è uno dei pochi trial che rivolge l'attenzione su questa molecola, appartenente al complesso delle vitamine B, e ai suoi effetti su pazienti con PCOS che sono state sottoposte ad induzione dell'ovulazione.

I dati preliminari a nostra disposizione mostrano che, in pazienti con PCOS, il trattamento con mio-inositolo e acido folico, rispetto all'assunzione di solo acido folico, riduce il numero di vescicole germinali

Grafico III: Embrioni di Grado G1

	GRUPPO A		GRUPPO B	
	Frequenza ass.	%	Frequenza ass.	%
Embrioni di Grado G1	30	68,1	9	29

P < 0.01



e di ovociti degenerati al momento del pick-up oocitario, senza compromettere il numero totale degli ovociti recuperati.

Questi risultati sono in linea con quelli riscontrati in altri Studi, suggerendo l'effetto positivo che il mio-inositolo gioca nello sviluppo di ovociti maturi.^[21]

Inoltre, è ben noto che l'induzione dell'ovulazione in pazienti con PCOS costituisce un complesso problema, dovuto all'aumento rischio di sindrome da iperstimolazione.^[22-23]

Quindi, elevati livelli basali sierici di androgeni sono implicati nella produzione di elevati livelli sierici di E2, dato tipico di pazienti con PCOS che vengono sottoposte a induzione dell'ovulazione con gonadotropine esogene.

Poiché il mio-inositolo è il precursore del DCI, può essere allo stesso modo ipotizzata un'azione insulino-sensibilizzante sull'ovaio, con una conseguente azione positiva sul profilo ormonale, particolarmente sulla riduzione del Testosterone basale.^[8,24]

Infatti, nelle pazienti trattate con mio-inositolo e gonadotropine esogene, è stata riscontrata una significativa riduzione dei livelli di E2 al momento della somministrazione dell'hCG, e come conseguenza, possiamo supporre che questo approccio potrebbe essere adottato per ridurre il rischio di iperstimolazione in alcuni pazienti.

In conclusione, queste osservazioni suggeriscono che il mio-inositolo potrebbe essere utile nel trattamento di pazienti con PCOS che vengono sottoposte ad induzione dell'ovulazione, sia per l'attività insulino-sensibilizzante che per il suo ruolo nella maturazione oocitaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Sattar N., Hopkinson Z., Greer I.A.: *Insulin-sensitizing agents in polycystic ovary syndrome. Lancet*, 1998; 351, 305.
2. Cianci S. et al.: *Rivisitando la policistosi ovarica. Aggiornamenti in ostetricia e Ginecologia CIC Edizioni Internazionali*, Roma, 1988.
3. Flamigni C., Venturoli S., Porcu E.: *La sindrome dell'ovaio micropolicistico; Considerazioni cliniche ed eziopatogenetiche. In Genazzani, Volpe: Endocrinologia Ginecologica. Fisiopatologia, Clinica e Strategie Terapeutiche. Monduzzi Ed., Bologna, 1984.*
4. Filicori M., Flamigni C. et al.: *Polycystic Ovary Syndrome: abnormalities and Managements with pulsatile gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-Releasing hormone analogs. Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 1737, 1990.
5. Arosio M., Persani L., Faglia G.: *Sindrome dell'ovaio Policistico; Malattie endocrine dell'ovaio. Malattie del sistema endocrino e del Metabolismo*, G. Faglia – P. Beck-Peccoz, 2006, McGraw-Hill.
6. ACOG Committee on Practice Bulletins. (2003). *ACOG Practice Bulletin: Polycystic Ovary syndrome. International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 80, 335-348.
7. Toscano V. *Sindrome dell'ovaio policistico. Manuale di Terapia delle Malattie Endocrine e Metaboliche*, 2000 Andreani, Tamburano.
8. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, et al. *Ovulatory and metabolic effects of D chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med.* 1999 Apr 29; 340(17):1314-20.
9. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, et al. *Myo-inositol may improve oocyte quality in intracytoplasmic sperm injection cycles. A prospective, controlled, randomized trial. Fertil Steril.* 2009 May;91(5):1750-4. Epub 2008 May 7.
10. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, et al. *Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction. Gynecol Endocrinol.* 2007 Dec;23(12):700-3. Epub 2007 Oct 10.
11. Chiu TT, Rogers MS, Law EL, et al. *Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. Hum Reprod.* 2002 Jun;17(6):1591-6.
12. Gerli S., Capanna F., Porcaro G., et al. *The effect of myo-inositol on ovarian stimulation and in vitro fertilization: a pilot study. Congresso ISGE, Firenze 2008.*
13. Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., et al; *Diabetes Prevention Program Research Group.* (2002). *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. New England, Journal of Medicine*, 346, 343-403.
14. Lowenstein E.J.. *Diagnosis and management of the dermatologic manifestations of the polycystic ovary syndrome. Dermatologic Therapy*, 2006, 19, 210-223.
15. Azziz R., Sanchez L.A., Knochenhauer E.S., et al. *Androgen excess in women: Experience with over 1000 consecutive patients. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, 89, 453-462.
16. American Diabetes Association. (2004). *Position statement: Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care*, 7(Supp. 1), S88-S90.
17. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. (1997). *The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Archives of Internal Medicine*, 157, 2413-2446
18. Baillargeon JP, Diamanti-Kandarakis E, Ostlund RE Jr, et al. *Altered D-chiro-inositol urinary clearance in women with polycystic ovary syndrome. Diabetes Care.* 2006 Feb; 29(2):300-5.
19. Chiu TTY, Rogers MS, Britton Jones CM, et al. *Effect of myo-inositol on the in-vitro maturation and subsequent development of mouse oocytes. Hum Reprod* 2003; 18: 408-16.
20. Chiu TT, Rogers MS, Law EL, et al. *Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. Hum Reprod.* 2002 Jun;17(6):1591-6.
21. Goud PT, Goud AP, Oostveldt PV, et al. *Presence and dynamic redistribution of type I inositol, 1, 4, 5-triphosphate receptor in human oocytes and embryos during in-vitro maturation, fertilization and early cleavage division. Mol Hum Reprod* 1999; 5: 441-51.
22. Tummon I, Gavriloja-Jordan L, Allemand MC, Session D. *Polycystic ovaries and ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review. Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 611-6.
23. Battaglia C, Mancini F, Persico N, et al. *Ultrasound evaluation of PCO, PCOS and OHSS [Review]. Reprod Biomed Online* 2004; 9: 614-9.
24. Iuorno MJ, Jakubowicz DJ, Baillargeon JP, et al. *Effect of D-chiro Inositol in lean women with polycystic ovary syndrome. Endocr Pract* 2002; 8: 417-23