

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NO GENE DA SUBUNIDADE BETA DO
LH EM MULHERES BRASILEIRAS COM E SEM A SÍNDROME DOS
OVÁRIOS POLICÍSTICOS

MARIANI CARLA PRUDENTE BATISTA

Brasília – DF

2011

AUTOR

MARIANI CARLA PRUDENTE BATISTA

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NO GENE DA SUBUNIDADE
BETA DO LH EM MULHERES BRASILEIRAS COM E SEM A
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
Universidade de Brasília/UnB

Brasília – DF
2011

Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.

Mark Twain

Dedico...

Ao Nilvan, meu marido, com amor, admiração e gratidão pela força e presença incansável ao longo dos últimos 18 anos... Por aprendermos a crescer juntos...

À Mayalu, por ter me alegrado com seu sorriso e me fortalecido para continuar lutando por tudo aquilo que me parecia impossível...

À minha amiga-irmã Adri, por nunca ter deixado de acreditar, por me aceitar, por estar do meu lado, sempre, pelo encontro de almas...

À Eliane, pela nova e valiosa amizade, pelas madrugadas juntas, por todo aprendizado, por ficar comigo até o fim...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto, pela oportunidade de realizar esse estudo e de terminar a pós-graduação. Por estar disponível quando resolvi retomar o caminho e por não ter deixado de acreditar no que ainda poderia ser... Pela valiosa orientação e pelo exemplo. Pela disponibilidade, pela alegria, pelo otimismo. Acima de tudo, pelo carinho e amizade.

Aos Profs. Drs. Luiz Augusto Casulari e Lucília Domingues Casulari da Motta, por terem me recebido no ambulatório de ginecologia endócrina do HUB, por terem aberto as portas e dado a mão para que eu chegasse até aqui e por terem seu ofício como paixão.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, por mostrar, carinhosamente, que a alegria de saber que não desistimos no meio do caminho pode ser a maior recompensa.

À amiga Eliane de Fátima Duarte, por compartilhar seus conhecimentos, pelos ensinamentos e pela ajuda no tratamento estatístico dos dados. Também pelo exemplo e coragem de refazer sua vida e reescrever sua história, pela dedicação e envolvimento para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada pela amizade e pelo grande aprendizado que você tem me proporcionado!

Aos Membros da Banca Examinadora, por sua disposição e paciência em analisar este trabalho, e pelas contribuições para sua finalização.

Ao Gustavo Barcelos Barra e às alunas do Farmol, pela leitura dos sequenciamentos.

Aos professores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Dra. Tânia A. S. S. Bachega, da disciplina de Endocrinologia e Prof.

Dr. Gustavo A. R. Maciel, da disciplina de Ginecologia, pelo envio das amostras e dados das pacientes.

À Michele, amiga que iniciou a primeira etapa desse trabalho, pela ajuda, pelo material, pelo carinho, pela coragem e pela torcida.

Aos Profs. Drs. Cór Jésus Fernandes Fontes e Francisco José Dutra Souto, pelo exemplo de integridade e comprometimento, e pela confiança desde o tempo da graduação. Ao Prof. Sérgio Oliveira, por compreender minha alma e por acreditar na minha vocação quando eu não conseguia ver razão, por não me deixar desistir...

Às staffs e preceptoras do HRT nos tempos da residência em endocrinologia, Dras. Maria Aparecida de Assis, Márcia D. Y. Miziara e Maria Stella O. Dias. Agradeço, em especial, às Dras. Lilian Paes Leme e Hermelinda C. Pedrosa, pela amizade, confiança e pelo apoio nos momentos mais difíceis, até os dias de hoje...

À toda equipe de Endocrinologistas do HUB, a quem agradeço em nome da Prof. Dra. Luciana Naves, por permitirem que eu fizesse parte do grupo, pelos ensinamentos, pela oportunidade e confiança, pelo apoio inestimável...

Aos residentes de endocrinologia do HRT, Cejana, Dianna, Gláucia, Marina, Pollyana e Waléria, pelo carinho, motivação, compreensão e pela ajuda nos ambulatórios.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço à minha filha, Mayalu, pela paciência que teve com sua mamãe. Por ter me ensinado a maior dimensão do amor. Por ensinar que eu posso me amar e aceitar, mesmo com todas as minhas falhas, porque podemos ser maravilhosos nas nossas imperfeições. Por me ensinar que o mais importante é tentar, ter curiosidade, entusiasmo, coragem e, sobretudo, sorrir. Por me ensinar que eu sempre estarei aprendendo com você. Gostaria de te dizer que eu posso levar um tempo para aprender, mas sou uma aluna determinada a ir até o fim...

Ao Nilvan, a quem agradeço pelo amor, apoio, compreensão, e especialmente pela paciência nos momentos difíceis. Por cuidar de mim. Obrigado por ser o meu amor e o melhor companheiro de *viagem*. Obrigado por me amar assim...

Aos meus queridos pais Elidê Prudente Batista e Miguel Batista Filho por todo amor, carinho e ensinamentos. Obrigada por terem me proporcionado a educação e os estudos que forneceram meios para que eu chegasse até aqui. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por entenderem minha ausência. Amo muito vocês.

Ao meu amado irmão, Filipe, por ser o maior presente que já recebi dos meus pais.

À tia Edlamar e tio Jonas, pelo apoio nos meus estudos nos tempos de Goiânia, pela “corrida” para Brasília para que eu pudesse mudar o rumo da história, por fazer parte da minha vida de maneira tão importante desde a infância, pelos meus primos-irmãos Karina, Sabrina e Ricardo (*in memorian*).

Ao meu primo Leandro César Prudente (*in memorian*), por ter sido o primeiro a concluir pós-graduação, por todos os méritos, pelo tempo juntos em Sampa, pela vivência do respeito ao diferente e pela certeza da sua torcida...

À Nana, por cuidar da “*secretária*” com tanta dedicação e carinho, sempre, e principalmente enquanto a mamãe trabalhava no computador.

Aos queridos Luíz Guilherme, Bruno e Amanda, por dividirem comigo o precioso tempo de vocês com a Adriana, pela torcida e pelo carinho de sempre.

À Ana Lúcia Dias Piraciaba, por me conduzir no encontro do meu caminho, pelo crescimento e compreensão dos meus sentimentos, pelos *insights* presentes até os dias de hoje.

À minha querida amiga Lila, pela amizade de mais de 20 anos, pela presença constante apesar da distância, pelo "apoio terapêutico", pela cumplicidade nos momentos difíceis, pelo amor incondicional, pelas alegrias e conquistas compartilhadas.

Às minhas amigas do coração, Ana Rachel, Érica C. Garcia, Érika Kameya, Fabi e Patrícia Carvalho, por fazerem parte da minha vida de forma tão especial, por entenderem minha loucura, por aceitarem minha ausência, por estarem ao meu lado, pela torcida...

À minha capacidade, de chorar de felicidade, ao escrever esta parte do trabalho e saber que consegui chegar até aqui...

RESUMO

Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo, de etiologia multifatorial, comum nas mulheres em fase reprodutiva, considerada a principal causa de infertilidade anovulatória, distúrbios menstruais e hiperandrogenismo nessa população. Dados atuais suportam que a SOP pode aumentar o risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares e carcinoma endometrial, enfatizando a necessidade de diagnóstico precoce da síndrome. Embora ainda não completamente elucidados, seus mecanismos moleculares e celulares envolvem anormalidades intrínsecas na esteroidogênese ovariana e adrenal, sugerindo um defeito esteroidogênico primário. Anormalidades neuroendócrinas parecem estar envolvidas na sua etiopatogenia, representadas principalmente pela pulsatilidade excessiva do LH, com aumento na amplitude dos seus pulsos, resultado de um aumento da sensibilidade da hipófise à estimulação GnRH. A base genética da SOP é desconhecida. Reporta-se significativa agregação familiar, entretanto, a determinação do seu modo de herança é difícil, uma vez que a apresentação clínica é muito heterogênea. Vários genes candidatos já foram avaliados com foco, recentemente, naqueles que codificam as enzimas esteroidogênicas na via de biossíntese de andrógenos e os envolvidos na secreção e ação da insulina. Considerando a repercussão funcional de variantes da subunidade beta específica do LH na fisiopatogenia de disfunções reprodutivas, o estudo ampliado da frequência dos polimorfismos do gene *LHB* deve ajudar a esclarecer a heterogeneidade de suas manifestações clínicas, particularmente aquelas relacionadas à hiperandrogenemia. Estudamos assim a prevalência desses polimorfismos em controles (n=85) e casos de SOP (n=130) e sua associação com parâmetros clínicos e laboratoriais da síndrome. Através de seqüenciamento genético detectamos 11 polimorfismos na região codante do *LHB*, sendo 1 deles (233C>A/Thr78Asn) ainda não descrito na literatura. Na análise de associação entre a detecção destes polimorfismos e a presença de SOP, o poder estatístico consequente ao tamanho de nossas amostras não permitiu a observação de associações estatisticamente significativas, mas o nível de associação entre a presença do novo polimorfismo descoberto (233C>A/Thr78Asn) com a presença de SOP revelou um OR= 3,96 (95% IC= 0,43-189,12), sugerindo uma ligação a ser

mais explorada em amostras maiores. A distribuição dos parâmetros clínicos estudados ficaram dentro dos níveis reportados na literatura. Observamos, entretanto, que dois polimorfismos, que segregam em desequilíbrio de ligação, são significativamente mais prevalentes na presença da hiperandrogenemia: rs1800447/rs34349826 (Trp28Arg/Ile35Thr) ($p=0,015$) e outros 2 parecem proteger contra hirsutismo severo embora estas associações não tenham apresentado resultados estatisticamente significativos em nível de $p<0,05$, mas de $p<0,01$: rs6521 (Val38=) ($p=0,094$) e 233C>A ($p=0,063$). Os resultados do nosso estudo corroboram outros recentemente publicados na literatura em que não foi possível demonstrar um papel causal para os polimorfismos conhecidos do gene *LHB* no desenvolvimento da SOP. Revelamos, no entanto, que o novo polimorfismo detectado (233C>A) deve ser objeto de mais investigações.

Palavras-chave: Hormônio luteinizante, subunidade beta; síndrome dos ovários policísticos; hirsutismo; hiperandrogenemia; polimorfismos *LHB*.

ABSTRACT

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a complex endocrine disorder, of multifactorial a etiology, common in women of reproductive age and considered the leading cause of anovulatory infertility, menstrual disorders, and hyperandrogenism in this population. PCOS is also a risk factor for the development of type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, cardiovascular disease, and endometrial carcinoma, which emphasizes the need for early diagnosis of the syndrome. Although not yet fully understood, its molecular and cellular mechanisms involve intrinsic ovarian and adrenal steroidogenesis abnormalities, suggesting these to be a primary defect. It appears that there are also accompanying neuroendocrine abnormalities along the natural history of PCOS, represented mainly by excessive luteinizing hormone (LH) pulsatility, with the amplified pulse amplitude resulting from increased sensitivity of the pituitary gland to GnRH stimulation. The genetic basis of PCOS is still largely unknown despite significant family clustering; determining its mode of inheritance is particularly difficult given the wide variability in clinical presentation. Several candidate genes have been evaluated with focus switching recently to genes that encode steroidogenic enzymes that regulate androgen biosynthesis and those involved in insulin secretion and action. The crucial functional role played by specific LH beta (*LHB*) subunits in various reproductive disorders makes these units natural candidates for elucidating the causal pathway and the many clinical manifestations of PCOS, particularly those related to hyperandrogenemia. The present project is a study of the prevalence of these polymorphisms in 85 controls and 130 PCOS cases and their association with clinical and laboratory parameters of the syndrome. Through genetic sequencing 11 polymorphisms were detected in the coding region of *LHB*, one of them, 233C>A/Thr78Asn, not yet described in the literature. No statistically significant associations were found between polymorphisms and the presence of PCOS, probably due to small sample size and consequent lack of statistical power, however, the level of association between detection of the newly discovered polymorphism (233C>A) and PCOS revealed an OR=3.96 (95% CI = 0.43-189.12), suggesting a possible connection to be further explored in larger samples. The distribution of the clinical parameters studied matched those already reported in the literature. Notable exceptions included two polymorphisms that

secrete in link imbalance and were found to be significantly more prevalent in the presence of hyperandrogenemia: rs1800447/rs34349826 (Trp28Arg/Ile35Thr) ($p=0.015$) and two other which seemed to be protective against severe hirsutism. The latter however, were not found to be statistically significant at the level of $p<0,05$, but instead, at the level of $p<0,01$: rs6521 (Val38=) ($p=0,094$) e 233C>A ($p=0,063$). The results of this study corroborate other recently published in the literature in that it was not possible to demonstrate a causal role for the known *LHB* gene polymorphisms in PCOS. However, a newly detected polymorphism (233C>A) should probably be the object of further investigation.

Keywords: luteinizing hormone, beta subunit; polycystic ovary syndrome; hirsutism; hyperandrogenemia; *LHB* polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos mecanismos regulatórios e contra-regulatórios da secreção de GnRH, FSH e LH 28
- Figura 2.** Diagrama esquemático das subunidades beta do LH e hCG 34
- Figura 3.** Comparação estrutural entre as cadeias beta do LH selvagem (LH- β), LH variante Trp28Arg/Ile35Thr (LH-VAR- β) e hCG (hCG- β) 37
- Figura 4.** Representação esquemática do gene *LHB* 46
- Figura 5.** Sequência codificante do gene da subunidade beta do hormônio luteinizante 57
- Figura 6.** Comparação estrutural entre as cadeias beta do LH selvagem (LH- β), LH variante 233C>A (LH-VAR- β) e hCG (hCG- β) 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metodologia empregada na determinação da concentração plasmática dos hormônios analisados e respectivos valores de referência	43
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase	46
Tabela 3. Parâmetros clínicos analisados em 130 mulheres portadoras da SOP, acompanhadas no HC/FMUSP e no HUB/UnB	51
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e hormonais analisados em 130 mulheres portadoras da SOP, acompanhadas no HC/FMUSP e no HUB/UnB	51
Tabela 5. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto aos parâmetros metabólicos e de hiperandrogenismo	53
Tabela 6. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com a síndrome de ovários policísticos, quanto aos parâmetros clínicos e laboratoriais, conforme o índice de massa corpórea	54
Tabela 7. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto ao hirsutismo, conforme o índice de massa corpórea	55
Tabela 8. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto aos parâmetros laboratoriais, conforme o índice de massa corpórea	55
Tabela 9. Identificação dos polimorfismos no gene <i>LHB</i> , localização e análise do equilíbrio de Hardy-Weinber	58
Tabela 10. Distribuição e análise comparativa da frequência genotípica dos polimorfismos do gene <i>LHB</i> em mulheres com SOP e em controles	59

Tabela 11. Distribuição e análise comparativa da frequência alélica dos polimorfismos do gene <i>LHB</i> em mulheres com SOP e em controles	60
Tabela 12. Associação por razão de chances (<i>odds ratio</i>) entre a detecção de cada polimorfismo estudado e a presença da SOP	61
Tabela 13 Distribuição da frequência genotípica da variante rs1800447/rs34349826 no gene <i>LHB</i> segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP	63
Tabela 14 Distribuição da frequência genotípica da variante 233C>A no gene <i>LHB</i> segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP	63
Tabela 15. Análise comparativa entre a frequência do alelo menor em mulheres com e sem a síndrome de ovários policísticos (casos + controles) e a frequência mundial	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
ADA	Associação Americana de Diabetes (<i>American Diabetes Association</i>)
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
C	Citosina
CLIA	quimioluminescência (<i>chemiluminescent immunoassay</i>)
CRH	hormônio liberador de corticotrofina (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DF	Distrito Federal
Delta-4	delta-4 androstenediona
DM	diabete melito (<i>diabetes mellitus</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
E ₂	Estradiol
EDTA	sal do ácido etilenodiaminotetracético
EFG	escore de Ferriman e Gallwey
FSH	hormônio foliculoestimulante (<i>follicle-stimulating hormone</i>)
G	Guanina
Gaba	ácido gama-aminobutírico
GJ	glicemia de jejum
GJA	glicemia de jejum alterada
Gly	Glicina
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GnRHa	agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
hCG-β	subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
He	genótipo heterozigoto

His	Histidina
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment - insulin resistance</i>
HUB/Unb	Hospital Universitário de Brasília / Universidade de Brasília
HW	equilíbrio de Hardy-Weinberg.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
IFMA	imunofluorimetria (<i>immunofluorimetric assay</i>)
IGFBP-1	proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante à insulina
Ile	Isoleucina
IMC	índice de massa corporal
LH	hormônio luteinizante (<i>luteinizing hormone</i>)
<i>LHB</i>	subunidade beta do hormônio luteinizante ou seu gene
LH-β	subunidade beta do hormônio luteinizante ou seu gene
LH-VAR-β	subunidade beta do hormônio luteinizante variante ou seu gene
LSN	limite superior de normalidade
MAF	freqüência do alelo menor (<i>minor allele frequency</i>)
Met	Metionina
N	Número
N	Asparagina
NH ₂	radical amina
Ob	Obesidade
OH	radical hidroxila
OR	<i>odds ratio</i>
P	Progesterona
<i>p</i>	nível de significância
Pb	pares de bases
PCR	reação de polimerase em cadeia
Pro	Prolina
RI	resistência à insulina
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucléico – mensageiro
SDHEA	sulfato de deidroepiandrosterona
S	bases citosina ou guanina

Ser	Serina
SHBG	globulina ligadora dos hormônios sexuais
SOP	síndrome dos ovários policísticos
SP	São Paulo
T	Timina
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
Thr	treonina
Trp	Triptofano
TSH	hormônio tireoestimulante
TT	testosterona total
TTOG	teste de tolerância oral à glicose
Tyr	Tirosina
Va	genótipo homozigoto variante
Val	Valina
V-LH	variante do gene ou molécula do hormônio luteinizante
vs	Versus
WT	genótipo homozigoto selvagem (<i>wild-type</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau celsius
%	Porcentagem
=	igual a
>	maior que
≥	maior ou igual que
<	menor que
≤	menor ou igual que
±	mais ou menos
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitros
µUI	micro unidades internacionais
µUI/mL	micro unidade internacional por mililitro
®	marca registrada
α	alfa
β	beta
cm	centímetro
dL	decilitro
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
L	litro
m ²	metro quadrado
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mL	mililitro
mM	micromol
ng	nanograma
ng/dL	nanograma por decilitro
ng/mL	nanograma por mililitro
nmol/L	nanomol por litro

U	unidade
UI/mL	unidade internacional por mililitro
UI/L	unidade internacional por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Anormalidades na Esteroidogênese Ovariana e Adrenal	24
1.2 Alterações Neuroendócrinas	25
1.3 Hiperinsulinemia	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Fisiologia das gonadotrofinas no ciclo ovulatório	27
2.2 Secreção das gonadotrofinas na SOP	30
2.3 Subunidade beta do hormônio luteinizante (<i>LHB</i>)	33
3. OBJETIVOS	38
4. MÉTODOS	39
4.1 Sujeitos do Estudo	40
4.2 Avaliação Clínica	41
4.2.1 Parâmetros Clínicos e Antropométricos	41
4.2.2 Parâmetros Bioquímicos e Hormonais	42
4.2.3 Avaliação por Imagem	43
4.2.4 Diagnóstico e Classificação da Obesidade	44
4.2.5 Avaliação da Sensibilidade à Insulina	44
4.3 Estudo Molecular	44
4.3.1 Extração de DNA Genômico de Leucócitos do Sangue Periférico	45
4.3.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	45
4.3.3 Sequenciamento Automático	47
4.3.4 Leitura e Análise das Sequências	47
4.4 Análise Estatística	48
4.5 Aprovação pelo Comitê de Ética	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Caracterização Clínica dos Grupos de Mulheres Portadoras da SOP	50
5.2 Estudo Molecular	56
5.2.1 Prevalência das Variantes do <i>LHB</i>	58
5.3 Associações entre Genótipos e Manifestações Clínicas Relacionadas à Resistência Insulínica e Hiperandrogenismo nas	62

Mulheres com SOP	
5.4 Análise comparativa dos polimorfismos quanto às frequências do alelo menor nas mulheres brasileiras com e sem SOP em relação à frequência mundial	64
6. DISCUSSÃO	66
6.1 Aspectos clínicos da amostra de mulheres com SOP	68
6.2 Estudo molecular	72
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	
A - Tabela A01 - Distribuição da frequência genotípica da variante rs6521 no gene <i>LHB</i> segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP	88
A - Tabela A02 - Distribuição da frequência genotípica da variante rs1056914 no gene <i>LHB</i> segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP	88
A - Tabela A03 - Distribuição da frequência genotípica da variante rs1056917 no gene <i>LHB</i> segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP	89
B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - 091/2007	90
C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - 124/09	91

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo, de etiologia multifatorial, altamente prevalente, que afeta 6-8% das mulheres em fase reprodutiva, constituindo a principal causa de infertilidade anovulatória, distúrbios menstruais e hiperandrogenismo nessa população. Constitui importante fator de risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* (DM) tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* gestacional, hipertensão induzida pela gravidez e carcinoma endometrial (1-3). Isto enfatiza a necessidade de diagnóstico precoce da síndrome e acompanhamento rigoroso das mulheres com SOP.

Trata-se de doença heterogênea, com ampla variabilidade fenotípica, na qual disfunção menstrual, hiperandrogenismo, hiperandrogenemia e ovários policísticos encontram-se fundamentalmente presentes em graus e combinações variados. Nos últimos anos, várias sociedades médicas elaboraram propostas para uniformizar os critérios diagnósticos da síndrome, sem, contudo, terem alcançado um consenso. Assim, diferentes mulheres, cujo diagnóstico da SOP atende a critérios determinados, podem apresentar diferentes características da doença. Neste contexto, o que é universalmente estabelecido é que não há nenhum critério que seja suficiente isoladamente para o diagnóstico clínico da SOP, sendo obrigatória também a exclusão de outras doenças que mimetizam sua apresentação clínica, tais como hiperplasia adrenal congênita não clássica, tumores secretores de androgênios e hiperprolactinemia (4-6).

A fisiopatologia da SOP vem sendo investigada desde sua descrição em 1935 por Stein e Leventhal, os quais observaram a associação entre amenorréia, hirsutismo e obesidade com ovários de aspecto policístico (7). Apesar de décadas de pesquisa, sua etiologia ainda é desconhecida e os mecanismos patogênicos propostos até o momento são complexos e permeados de incógnitas. Anormalidades na esteroidogênese ovariana e adrenal, alterações neuroendócrinas e hiperinsulinemia têm sido os principais fatores etiológicos sugeridos, isoladamente ou em combinação (8).

1.1 ANORMALIDADES NA ESTEROIDOGÊNESE OVARIANA E ADRENAL

Os mecanismos moleculares e celulares subjacentes ao excesso de produção de andrógenos ovarianos associados à SOP ainda não são completamente conhecidos. Um papel para as anormalidades intrínsecas na esteroidogênese ovariana nesse processo é suportado por estudos *in vitro*, que demonstraram aumento da produção de andrógenos pelas células da teca em mulheres com SOP (9). Além disso, Gilling-Smith *et al* relataram que mulheres com SOP apresentam resposta anormal da produção de esteróides ovarianos após estimulação com agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH α). Nessas mulheres, mesmo com a supressão das concentrações séricas do hormônio luteinizante (LH) pelo agonista, a produção de androgênios ovarianos foi significativamente maior do que nos controles (10).

Assim, um microambiente ovariano hiperandrogênico seria responsável pela ausência de desenvolvimento completo dos folículos, que raramente atingem diâmetro acima de seis milímetros. A atresia folicular, caracterizada por apoptose das células da granulosa e predomínio de células da teca e fibroblastos, resulta em aumento do estroma ovariano, responsivo ao LH, com consequente hipersecreção de andrógenos, mantendo um ciclo vicioso. Além disso, o folículo atrésico apresenta menor atividade de aromatase, diminuindo a conversão de andrógenos em estrógenos (11).

A ocorrência de hipersecreção de andrógenos adrenais em 20 a 30% das mulheres com SOP, caracterizada por concentrações elevadas de sulfato de deidroepiandrosterona (SDHEA), sugere que haja um defeito esteroidogênico primário, afetando ambas as glândulas secretoras de andrógenos, ovário e supra-renal. Além disso, foram observadas concentrações elevadas de SDHEA em famílias de mulheres com SOP, acometendo parentes de ambos os sexos, corroborando a existência de um componente hereditário para esta característica (12).

1.2 ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS

Anormalidades neuroendócrinas também estão envolvidas na fisiopatologia da SOP. A hipersecreção de LH, tanto basal quanto em resposta à administração do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), é considerada uma anormalidade primária na SOP (10). Acredita-se que os níveis elevados de LH são, em parte devido, a um aumento da sensibilidade da hipófise à estimulação GnRH, que se manifesta por pulsatilidade excessiva de LH, com aumento na amplitude dos pulsos. O LH é o estímulo fisiológico para a síntese de andrógenos pelas células tecais ovarianas, desempenhando assim um papel importante na etiologia da hiperandrogenemia frequentemente encontrada nas pacientes com SOP (13).

1.3 HIPERINSULINEMIA

Evidências sugerem que a hiperinsulinemia também desempenhe papel importante na patogênese da SOP, com ação sinérgica ao LH nas células tecais ovarianas, estimulando a biossíntese androgênica (14). Além disso, o excesso circulante de insulina pode contribuir para a diminuição da produção hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), o que resulta em concentrações mais elevadas de testosterona livre ou biodisponível (15). Corroboram esses achados estudos que demonstraram que tanto a hiperandrogenemia quanto a função ovulatória apresentam melhora com tratamentos que diminuem a insulina plasmática e/ou favorecem a sinalização da insulina (16, 17).

Independentemente da importância relativa de cada um desses três componentes para o desenvolvimento da SOP, desde a sua descrição, tem-se observado significativa agregação familiar das anormalidades que a caracterizam (infertilidade, hiperandrogenismo, ovários policísticos), sugerindo uma base hereditária para essa doença. A determinação do seu modo de herança é difícil, uma vez que a apresentação clínica é muito heterogênea. Esta variabilidade contribui para a complexidade dos estudos genéticos da SOP (12).

Durante a década passada, mais de 70 genes candidatos foram avaliados em busca de um gene (ou genes) que desempenhe um papel causal na SOP, o que ajudaria a desvendar a etiopatogenia da síndrome e, seguramente, proporcionaria maior precisão no seu diagnóstico. No entanto, em função de sua grande heterogeneidade genética e fenotípica, o resultado da maioria desses estudos não foi conclusivo (18). Recentemente, o foco das investigações tem sido os genes que codificam as enzimas esteroidogênicas na via de biossíntese de andrógenos e aqueles envolvidos na secreção e ação da insulina (19).

O gene que codifica a subunidade beta específica do LH seria um candidato potencialmente importante na patogênese da SOP, uma vez que a pulsatilidade dessa gonadotrofina parece estar primariamente alterada na síndrome. Contudo, apesar das alterações funcionais evidenciadas na pulsatilidade do LH, estudos mais recentes de associação ampla do genoma não corroboraram a hipótese de um papel causal de alterações genéticas no LH na etiologia da SOP (20, 21).

Nesse contexto, um estudo piloto com 47 mulheres portadoras de SOP realizado em 2009 por Borba, demonstrou que a média do escore de Ferriman-Gawley foi maior dentre as mulheres com SOP que apresentavam a variante Trp8Arg/Ile15Thr (rs1800447/ rs34349826) com $p < 0,04$, e identificou um novo polimorfismo para o LHB, o qual foi motivo de análise mais detalhada no presente estudo (22).

Assim, com o intuito de ampliar a análise preliminar realizada por Borba em 2009 e a fim de acrescentar informações para o esclarecimento do papel das variantes genéticas do LH na fisiopatogenia e/ou na apresentação clínica da SOP em mulheres brasileiras, foi proposto esse trabalho.

A seguir, apresenta-se o embasamento teórico sobre o papel desempenhado pelas gonadotrofinas, em especial o LH, na fisiopatologia da SOP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA DAS GONADOTROFINAS NO CICLO OVULATÓRIO

Com o início da puberdade os neurônios hipotalâmicos passam a secretar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) de maneira pulsátil no sistema portal hipofisário, que por sua vez estimula a síntese e secreção sincronizada e também pulsátil do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pelos gonadotrofos hipofisários. A periodicidade e amplitude dos pulsos de GnRH e gonadotrofinas são cruciais para a regulação das atividades gonadais e, portanto, de todo o eixo reprodutivo (23).

Cada gonadotrofina é um heterodímero, formado por duas unidades peptídicas denominadas alfa (α) e beta (β), associadas através de ligações não covalentes. As subunidades α humanas do LH, do FSH, do hormônio estimulante da tireóide (TSH) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG) possuem estrutura polipeptídica idêntica. Em contraposição, as subunidades β de cada hormônio possuem uma sequência única de aminoácidos, conferindo atividade específica ao heterodímero α/β . A intermitência dos pulsos de GnRH sobre os gonadotrofos hipofisários determina a transcrição dos genes das subunidades α comum e das subunidades β específicas para o FSH e o LH, a dimerização e glicosilação das subunidades α/β , o acondicionamento do hormônio maduro e a secreção hormonal (24).

A secreção hipotalâmica pulsátil e rítmica de GnRH é mediada por vários fatores neurais (neurotransmissores) e também está sujeita ao controle de retroalimentação negativa (feedback) exercido pelos hormônios ovarianos, peptídeos gonadais e opióides endógenos (figura 1). Elevação do nível de progesterona leva à redução na frequência de pulso GnRH e, por inferência, à redução do LH, levando à biossíntese e pulsatilidade preferenciais de FSH que é observada na fase luteínica tardia, bem como após a administração exógena de doses fisiológicas de progesterona durante a fase folicular (25). O estradiol desempenha importante papel permissivo na supressão da pulsatilidade do GnRH pela progesterona, provavelmente através de *up-regulation* dos receptores de progesterona

hipotalâmicos. Este efeito modulador dos hormônios ovarianos parece ser um regulador primário da frequência de pulsos do GnRH (26, 27).

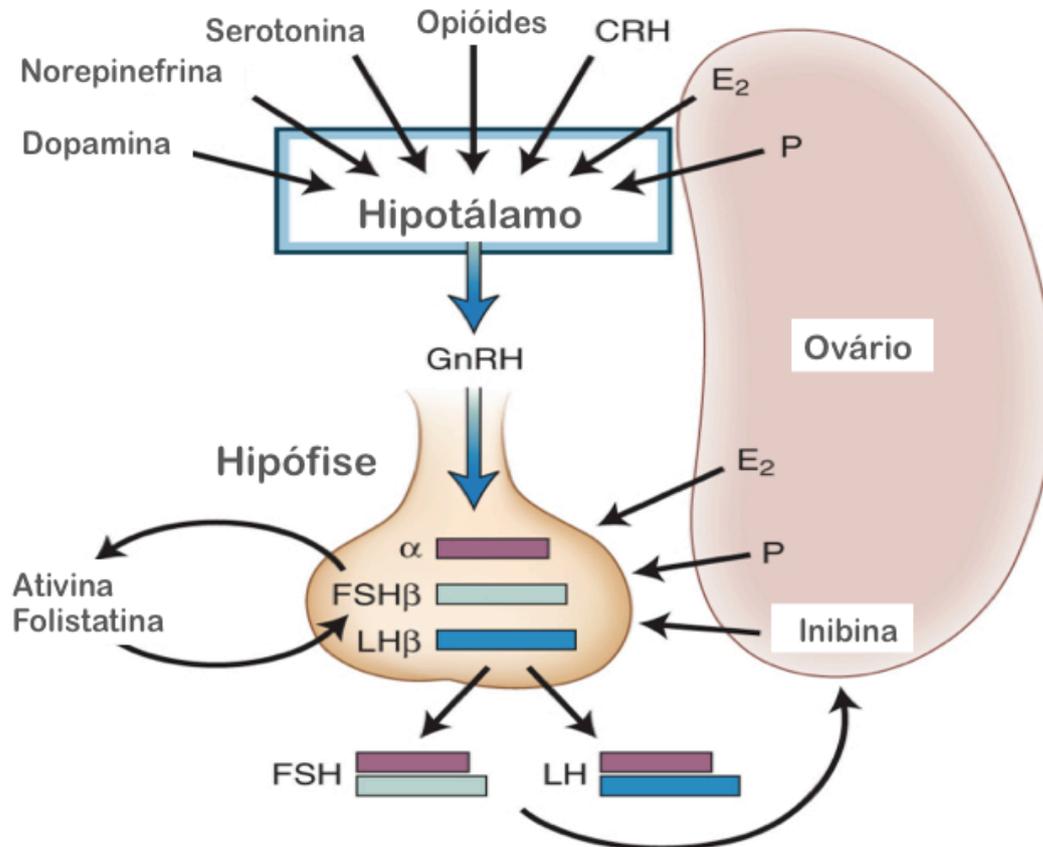


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos regulatórios e contra-regulatórios da secreção de GnRH, FSH e LH. Hormônios localmente sintetizados e sistêmicos, bem como a concentração de neurotransmissores, regulam a secreção hipotalâmica pulsátil de GnRH. O GnRH, por sua vez, juntamente com uma série de hormônios esteróides e peptídeos, regulam a síntese das subunidades β, formação e secreção de FSH e LH. CRH = hormônio liberador de corticotropina, E₂ = estradiol; P = progesterona. (Adaptado de Bulun S, Adashi E. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Williams Textbook of Endocrinology, 2008).

A pulsatilidade do GnRH aumenta gradualmente durante a fase folicular, aparentemente como resultado da perda gradual da influência moderadora de progesterona, alcançando um pico de frequência de, aproximadamente, um pulso por hora na fase folicular tardia (28). Isto leva a um aumento no LH e uma diminuição no FSH durante a última metade da fase folicular. Na fase folicular tardia, a produção de estradiol pelo folículo dominante torna-se suficiente para provocar aumentos acentuados na liberação de LH em resposta aos pulsos rápidos de GnRH, resultando em um feedback positivo, que leva ao aumento de LH meio do ciclo, que

por sua vez provoca a ovulação. Após a ovulação, o corpo lúteo produz estradiol e progesterona, que mais uma vez resultam em diminuição na frequência de pulsos GnRH, em síntese preferencial e liberação de FSH e início da próxima onda de desenvolvimento folicular (29, 30)

As gonadotrofinas agem nos ovários, resultando no aumento da produção de esteróides sexuais e no desenvolvimento das células germinativas (gametogênese). O LH estimula a produção de androstenediona nas células tecais ovarianas, enquanto o FSH regula a produção de estradiol e de inibina B nas células da granulosa, assim como o crescimento folicular. Após a ovulação, o folículo se transforma em um corpo lúteo, que secreta tanto estradiol quanto progesterona, sob controle do FSH e do LH. O LH também estimula as células luteínicas da granulosa do corpo lúteo a secretar inibina A. Enquanto a ativina estimula a produção de FSH, a folistatina suprime essa ação da ativina no gonadotrofo, inibindo seu efeito estimulante sobre a expressão do FSH e deslocando o equilíbrio para a produção de LH. O aumento da expressão da folistatina pituitária, por sua vez, é induzido por pulsos rápidos GnRH (31, 32).

Em resumo, a função reprodutiva feminina, da puberdade à menopausa, é dependente de uma série de interações intrincadas e interdependentes do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. Alterações em qualquer nível do eixo ou de outros sistemas que possam afetar essas unidades reprodutivas, podem resultar, secundariamente, em disfunção ovariana.

2.2 SECREÇÃO DAS GONADOTROFINAS NA SOP

Grande número de pacientes com SOP apresentam anormalidades consistentes na secreção de gonadotrofinas. Esta condição é caracteristicamente representada por elevação nas concentrações séricas de LH, pelo aumento da relação LH/FSH e pela resposta exacerbada do LH ao GnRH exógeno. Essa anormalidade, aparentemente primária na SOP clássica, está associada ao excesso de andrógenos característico da síndrome (33).

Waldstreicher e cols. demonstraram que as mulheres com SOP apresentam uma frequência de pulsos de GnRH praticamente constante, com o ritmo de um pulso por hora, atribuído a uma redução da inibição opióide hipotalâmica devido à ausência crônica de progesterona (34). A pulsação persistente e rápida de GnRH favorece a síntese e secreção de LH sobre a de FSH, com aumento na frequência e amplitude dos pulsos de LH, ajudando a explicar os níveis de elevados de LH e a relação LH:FSH característicos da SOP (35).

Os mecanismos que regulam a frequência de pulsos de GnRH e conseqüentemente a secreção preferencial de LH ou FSH em diferentes condições patológicas, como ocorre na SOP, vêm sendo amplamente investigados. Uma série de estudos têm contribuído com novos conhecimentos, em grande parte ainda preliminares, a esse respeito, e alguns deles serão apresentados a seguir.

Neurotransmissores hipotalâmicos exercem efeito sobre a secreção de GnRH. Sabe-se que as vias dopaminérgica e opióide são inibitórias para os neurônios GnRH, enquanto a via noradrenérgica é estimulante e o ácido gama-aminobutírico (Gaba) parece apresentar efeito misto. Nesse contexto, foi levantada hipótese que na SOP haveria um defeito opióide primário, interferindo diretamente sobre a secreção hipotalâmica de GnRH, sobretudo na fase lútea, impedindo a desaceleração da pulsatilidade do LH (36). Porém, a administração de progesterona exógena em mulheres com SOP diminui a frequência de pulso do GnRH por um processo opióide-dependente, confirmando que a aparente redução da atividade opióide na SOP é decorrente da ausência dos efeitos da progesterona, secundária à anovulação, e não de defeitos primários da ação dos opióides (34). Assim, até o momento, nenhum defeito primário hipotalâmico foi claramente identificado para explicar as anormalidades neuroendócrinas na SOP, levantando a possibilidade de

que as anormalidades neuroendócrinas sejam, na verdade, secundárias a um ambiente hormonal anormal.

Outra teoria, conhecida como “hipótese da estrona”, sugeria que o excesso de androstenediona, convertida periféricamente em estrona, causaria aumento na secreção do LH, que, por sua vez, manteria a secreção excessiva de androstenediona. Esta hipótese foi baseada na presença de nível elevado de estrona na SOP, e pelo efeito estimulante do estrógeno sobre o pico ovulatório de LH, no meio do ciclo. No entanto, estudos subsequentes demonstraram que a administração exógena de estrona não induziu aumento na concentração de LH basal ou estimulado, tanto nos casos de SOP quanto nos controles (37). Além disso, o uso do inibidor de aromatase periférica, testolactona, com objetivo de bloquear a conversão de androstenediona em estrona, também não reduziu a frequência de pulsos do LH (38). Estes dados permitem concluir que a estrona não desempenha papel relevante na patogênese da SOP.

Diversos estudos têm demonstrado que a resistência à insulina (RI) é uma anormalidade metabólica comum em pacientes com SOP, independente do peso corporal, apesar de ser observada em maior grau nos grupos de mulheres obesas com a síndrome, sugerindo que a obesidade e a SOP exerçam efeitos independentes sobre a resistência à insulina (39). Em 2005, DeUgarte et al. demonstraram uma prevalência de resistência à insulina de 64% em mulheres com SOP, usando o HOMA-IR (do inglês “*homeostasis model assessment*”) ajustado para variáveis de raça, idade e índice de massa corporal, e essas pacientes eram mais afetadas clinicamente quando comparadas ao grupo com SOP sem resistência à insulina (40). A hiperinsulinemia resultante da resistência à insulina favorece a hiperandrogenemia por diversos mecanismos. Na hipófise, favorece o aumento da amplitude dos pulsos de LH. Paralelamente, exerce ação sinérgica ao LH na esteroidogênese ovariana, através da fosforilação em serina do citocromo P450c17, estimulando a produção ovariana de andrógenos e inibindo a produção hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e da proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-1), resultando em concentrações mais elevadas de testosterona biodisponível (41).

Foi demonstrado que o tratamento com sensibilizadores de insulina (metformina ou tiazolidinedionas) em mulheres com SOP não só melhora a resistência à insulina, mas também resulta em melhorias na hiperandrogenemia e

função ovulatória (17). Apesar desses achados, a infusão de insulina exógena não alterou a secreção de LH em mulheres com SOP (14). Além disso, o tratamento com tiazolidinedionas ou metformina não diminuiu a frequência de pulso do LH e teve efeitos inconsistentes sobre seu nível sérico, apesar de melhorar significativamente a hiperinsulinemia. As concentrações de LH parecem se correlacionar negativamente com a obesidade, apesar de haver uma correlação claramente positiva entre a adiposidade e as concentrações de insulina (42, 43). Juntos, estes resultados sugerem que a resistência à insulina associada na SOP não resulta, diretamente, em anormalidades neuroendócrinas, apesar de ter uma relação bem estabelecida com a hiperandrogenemia.

Outro mecanismo aventado para justificar as alterações neuroendócrinas da SOP são as baixas concentrações de progesterona associadas com a anovulação ou oligoanovulação crônicas, que são características definidoras da síndrome. Nos ciclos ovulatórios, a progesterona regula a pulsatilidade de GnRH, diminuindo a frequência de pulsos e, conseqüentemente, reduzindo a síntese e secreção de LH. No entanto, esta não parece ser uma explicação suficiente para as anormalidades neuroendócrinas da SOP. Estudos utilizando estradiol e progesterona por sete dias, simulando as concentrações presentes na fase lútea, confirmaram que a sensibilidade hipotalâmica à progesterona, mediada pela supressão da frequência de pulsos do LH, está diminuída em mulheres com SOP, em comparação com controles normais (44). Em contrapartida, o uso da flutamida, um bloqueador do receptor de andrógenos, parece restaurar a sensibilidade à progesterona em mulheres com SOP, sugerindo que a redução da sensibilidade hipotalâmica à progesterona seja secundária à hiperandrogenemia, ao invés de um defeito primário (45).

O hiperandrogenismo, assim como a anovulação crônica, é uma característica definidora da SOP, e sua origem parece ser multifatorial. Independente da etiologia, concentrações elevadas de andrógenos parecem ter importante consequência neuroendócrina, incluindo uma diminuição da sensibilidade hipotalâmica à progesterona, o que explicaria, em parte, a presença de pulsos persistentemente rápidos do GnRH, promovendo elevação de LH com subsequente produção excessiva de andrógenos ovarianos, contribuindo para a disfunção ovulatória (9).

A leptina, proteína transcrita pelo gene da obesidade (*ob*) e secretada pelos adipócitos, está associada com diversos processos fisiológicos, principalmente a regulação da ingestão alimentar e o balanço energético, surgiu recentemente como mais um personagem na etiopatogenia da SOP. Esse hormônio também apresenta variação durante o ciclo menstrual, já tendo sido demonstrada uma atividade sincrônica entre pulsos de LH e de leptina, tanto durante a fase folicular precoce, quanto na fase média-tardia, sugerindo um papel fisiológico direto da leptina na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (46). A interrupção desse efeito poderia desempenhar um papel na irregularidade menstrual observada, frequentemente, em mulheres obesas e desnutridas e poderia oferecer um mecanismo fisiopatológico para a SOP. Além disso, a insulina pode regular a expressão do gene da leptina e seu nível circulante e a hiperinsulinemia sustentada ou resistência à insulina promovem aumento dos níveis de leptina sérica (47). Apesar disso, alguns trabalhos mostraram que as concentrações de leptina em mulheres com SOP podem não diferir significativamente dos controles normais, independente do seu peso corporal. Além disso não há evidência de mutações nos genes da leptina ou do seu receptor em mulheres com SOP (48). Assim sendo, os resultados da relação da leptina com a função reprodutiva na SOP ainda são conflitantes.

A maior amplitude e frequência de pulsos do LH, mediados pelo GnRH, está claramente relacionada com todo o amplo espectro da SOP, porém, a razão para esta vasta gama de alternativas para as anormalidades das gonadotrofinas nessa patologia permanece obscura.

2.3 SUBUNIDADE BETA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (*LHB*)

As gonadotrofinas LH e FSH, juntamente com o hCG e o TSH, pertencem à família de hormônios glicoproteicos, com estrutura heterodimérica, composta por uma subunidade alfa comum e uma subunidade beta específica, associadas por meio de ligações não-covalentes. A subunidade alfa é uma proteína constituída por 92 aminoácidos, idêntica para todos os hormônios glicoproteicos, codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo 6. As subunidades beta do FSH, LH

e hCG humanos contêm 117, 121 e 145 aminoácidos, respectivamente. Os genes que codificam as subunidades beta do LH e do hCG estão localizados no braço longo do cromossomo 19 (19q13.3), e as sequências de aminoácidos dessas duas subunidades apresentam considerável homologia (83%, excluindo a extensão C-terminal não homóloga do hCG) (figura 2)(49).

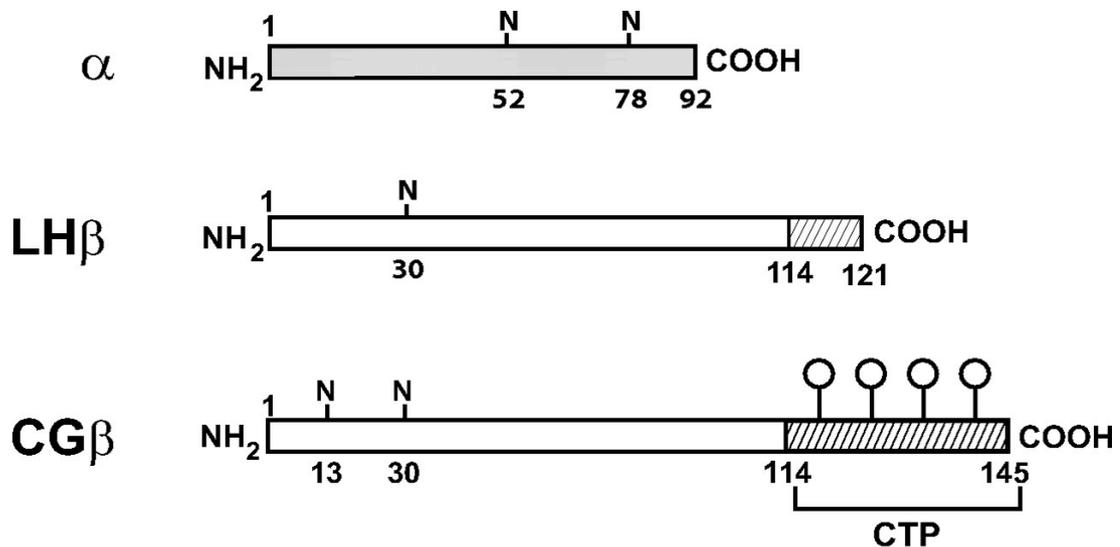


Figura 2. Diagrama esquemático das subunidades beta do LH e hCG. A subunidade α comum, com dois sítios de ligação aos oligossacarídeos (N), subunidade LH β com um sítio de ligação e seu heptapeptídeo COOH hidrofóbico (área hachurada da região 114-121), subunidade hCG β com dois sítios de ligação a oligossacarídeos e sua porção carboxiterminal que permite ligação a quatro outros oligossacarídeos (área hachurada da região 114-145) (Adaptado de Jablonka-Shariff A, Boime I. Mol Endocrinol 2009; 23: 316-323).

A ligação do GnRH ao seu receptor nos gonadotrofos ativa a biossíntese das gonadotrofinas resultando em transcrição dos genes das subunidades do LH e do FSH, tradução dos RNA mensageiros (RNAm), modificações pós-tradução, dobramento e associação das subunidades, empacotamento e secreção dos hormônios maduros (50).

As subunidades beta são ricas em cisteínas (12 pares) e formam seis ligações (pontes) dissulfídicas entre esses resíduos, que conferem a estabilização da estrutura tridimensional dessas proteínas, essencial para garantir a atividade biológica do dímero alfa-beta. Contém ainda moléculas de carboidrato, uma (no LH) ou duas (no hCG e FSH) cadeias de oligossacarídeos ligadas a resíduos de asparagina (*Asn-linked* ou *N-linked*), que têm papel importante para a ação biológica e metabolismo desses hormônios. O fenômeno de glicosilação ocorre após a tradução da proteína, por meio da transferência de complexos de oligossacarídeos

de carga negativa ou neutra para resíduos específicos de asparagina (Asn), serina (Ser) ou treonina (Thr). Existem dois tipos de sítios de glicosilação, um sítio ligado ao radical amina (NH₂) da asparagina denominado N-ligado, e um grupo ligado ao radical hidroxila (OH) da serina e treonina, denominado O-ligado (51).

O conteúdo de carboidratos nas moléculas de gonadotrofinas, especialmente de ácido siálico, possui grande influência sobre sua taxa de depuração, bem como seu tamanho molecular aparente. O conteúdo mais elevado de ácido siálico no FSH, se comparado com o LH, é responsável pela depuração mais lenta do FSH da circulação; o LH apresenta a taxa de metabolização mais rápida, enquanto o hCG, altamente sializado, tem a meia-vida mais longa (50).

Para o LH, o conteúdo total de oligossacarídeos existente em sua molécula é oriundo de três ligações com resíduos de asparagina (duas na subunidade α e uma ligação na subunidade β), o que lhe confere meia-vida de 40-60 minutos. O hCG- β (subunidade beta da gonadotrofina coriônica) e o *LHB* humanos são N-glicosilados no sítio de asparagina-13 e asparagina-30 respectivamente. O hCG, por sua vez, apresenta uma porção carboxi-terminal que possibilita a extensão da O-glicosilação para resíduos de Ser121, Ser127 e Ser138, conferindo uma meia-vida de 5 a 6 horas para essa glicoproteína (52)(figura 2).

Em 1992 Pettersson descreveu, pela primeira vez, uma forma variante comum do LH em uma população de mulheres finlandesas (53). Desde então, variantes do LH têm sido detectadas em diversas populações, saudáveis ou não, com frequência variando de 0-54% (54). Algumas alterações clínicas têm sido descritas relacionadas às formas variantes do LH: maior frequência de distúrbios reprodutivos em mulheres, incluindo infertilidade inexplicada, falência ovariana prematura, um desenvolvimento puberal mais lento em meninos e, em homens idosos, maior prevalência de nível baixo de testosterona com alta concentração de LH (55-58).

Haavisto et al. (1995) demonstraram que o LH variante apresenta meia vida significativamente menor do que LH normal (*wild-type*)(59). Posteriormente foi demonstrado que pacientes portadores de LH variantes tiveram redução significativa da concentração sérica do LH após quinze minutos da injeção do GnRH em relação às pacientes não variantes. Essa redução da meia vida sérica seria explicada por uma sulfatação extra de um carboidrato da molécula do LH variante. Os carboidratos

sulfatados têm a propriedade de serem eliminados mais rapidamente da circulação por apresentarem maior especificidade de ligação a receptores hepáticos (60).

Inicialmente, Suganuma et al. descreveram que mutação em posição Ile15Thr está relacionada a uma glicosilação extra na posição Asn13, modificando a porção COOH-terminal, negativando-a e tornando-a hidrofílica. Como cerca de 30% da excreção do LH é renal, a modificação da carga proteica do LH variante influencia a sua excreção renal e, por consequência, sua meia vida plasmática. Outros estudos *in vivo* confirmaram a reduzida meia vida plasmática desse LH variante, apesar de não haver uma explicação clara para esse fenômeno, se por ligação de glicoproteínas sulfatadas ou se pela glicosilação extra na posição Asn13 (60, 61).

Contrapondo o fato do LH variante apresentar uma meia-vida plasmática menor, foi demonstrada uma maior bioatividade desse LH variante em relação ao selvagem (*wild-type*) por estudos *in vivo* e *in vitro*. A mutação Trp8Arg/Ile15Thr referentes aos dois polimorfismos do *LHB* mais estudados, e presentes em desequilíbrio de ligação, modifica a porção N-terminal do LH tornando-a hidrofílica, portanto com menor meia vida, conforme descrito acima. A modificação estrutural causada pela substituição da isoleucina pela treonina (Ile15Thr) também resulta em uma ligação oligossacarídea na posição Asn13 (figura 3). Essas mudanças conformacionais expõem regiões da molécula da variante do gene *LHB* mais eficientes para o estímulo intracelular pós receptor, conferindo maior biopotência para o *LHB* variante. No caso da mutação do Trp8Arg isso poderia ser explicado pela substituição de um aminoácido idêntico ao hCG β , que apresenta biopotência superior ao LH selvagem (61). Em síntese, a molécula do *LHB* variante Trp8Arg/Ile15Thr parece apresentar uma maior bioatividade, a despeito de uma meia vida menor.

3. OBJETIVOS

GERAL

Documentar a distribuição de variantes na subunidade beta do hormônio luteinizante em mulheres brasileiras com e sem SOP e verificar associações dessas variantes com parâmetros clínicos e laboratoriais da síndrome.

ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas e laboratoriais das mulheres portadoras de SOP, com relação aos parâmetros metabólicos relacionados à resistência insulínica e ao hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial.

- Descrever a prevalência de polimorfismos na região codificante do gene *LHB* (subunidade beta do LH) em uma amostra de mulheres brasileiras com e sem o diagnóstico da SOP, por meio de seqüenciamento genético.

- Verificar associações entre a presença de polimorfismos no gene *LHB* e diferentes manifestações clínicas da SOP, por meio de parâmetros relacionados à resistência insulínica e ao grau de hiperandrogenismo.

- Comparar as prevalências dos polimorfismos identificados no gene *LHB* em mulheres brasileiras com e sem SOP com as prevalências descritas na população mundial.

4. MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo e analítico:

I. Componente transversal (descritivo): caracterização clínica das mulheres com SOP

Nessa etapa, inicialmente foram observados idade, índice de massa corporal e grau de hiperandrogenismo, avaliado pelo escore de Ferriman e Gallwey, de todas as mulheres com SOP incluídas no estudo. Esses dados foram obtidos a partir de anamnese e exame físico direcionados, realizados no momento da avaliação de cada indivíduo para inclusão no estudo.

Para estas pacientes procedeu-se a caracterização do perfil bioquímico e hormonal, no que diz respeito a parâmetros relacionados a resistência insulínica e hiperandrogenemia. Este perfil incluiu a obtenção dos valores de glicemia e insulinemia em jejum e dos dados hormonais (LH, FSH, testosterona total, SDHEA, androstenediona, SHBG) a partir de revisão de seus prontuários médicos. As dosagens hormonais foram realizadas na condição de ausência de uso de contraceptivos hormonais por pelo menos 30 dias.

II. Componente analítico (retrospectivo): estudo do gene *LHB* das mulheres com SOP e sem SOP (grupo controle)

Para o estudo do gene *LHB* (estudo molecular), uma amostra de aproximadamente 5 mL de sangue periférico foi obtida para todas as mulheres com SOP acima descritas.

Em seguida, foram selecionadas mulheres saudáveis, sem SOP, para composição do grupo controle para análise comparativa dos dados obtidos no estudo molecular. Foram obtidas amostras de sangue periférico para estudo do gene *LHB* das mulheres incluídas no grupo controle. A análise comparativa das frequências dos poliformismos identificados no gene *LHB* nas mulheres com SOP e sem SOP foi então realizada com o objetivo de avaliar a associação dos polimorfismos com o risco de apresentar SOP.

4.1 SUJEITOS DO ESTUDO

Foram selecionadas 130 pacientes com SOP, sendo 85 mulheres acompanhadas nos ambulatórios de ginecologia e endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) e 45 mulheres acompanhadas no ambulatório de endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), avaliadas no período de julho de 2007 a julho de 2009. Para o grupo controle, foram selecionadas 96 mulheres, todas residentes no Distrito Federal.

Os critérios de inclusão foram:

1. Controles:

Mulheres adultas com ciclos menstruais regulares e ovulatórios, na ausência de sinais clínicos de hiperandrogenismo e que negavam história familiar de SOP. Para inclusão nesse grupo, os sujeitos foram submetidos à anamnese direcionada e somente foram examinadas quando havia dúvidas sobre a concordância com os critérios de inclusão no estudo, no que diz respeito a sinais clínicos de hiperandrogenismo (acne, hirsutismo, etc).

2. SOP:

Mulheres com idade entre 14 e 42 anos, que receberam o diagnóstico de SOP segundo os critérios definidos pelo consenso de Rotterdam, em 2003, revisto em 2004, que baseia-se na presença de dois dos seguintes critérios:

a) oligo e/ou anovulação (oligomenorréia ou amenorréia, sangramento uterino disfuncional e infertilidade);

b) concentrações elevadas de andrógenos circulantes (hiperandrogenemia) e/ou manifestações clínicas do excesso androgênico (hiperandrogenismo);

c) aspecto policístico dos ovários à ultrassonografia (presença de 12 ou mais folículos, medindo 2 a 9 mm de diâmetro e/ou volume ovariano acima de 10 cm³), na ausência de outras doenças que mimetizem esse fenótipo (hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita forma não clássica, síndrome de Cushing, neoplasias secretoras de andrógenos, hipotireoidismo)(5).

Para realização dos exames laboratoriais, foi solicitado que essas mulheres suspendessem o uso de contraceptivos hormonais por, no mínimo, 30 dias.

Os critérios de exclusão para o grupo com SOP foram:

- a. Uso de medicamentos, tais como andrógenos, corticosteroides, ciclosporina e ácido valpróico nos 30 dias que antecediam as dosagens hormonais;
- b. Presença de hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita forma não clássica, síndrome de Cushing, neoplasias secretoras de andrógenos, hipotireoidismo e e neoplasia adrenal ou ovariana virilizante. Essas condições foram excluídas por meio de dados de anamnese, exame físico e, quando indicado, dosagens hormonais, que deveriam ser normais para o método utilizado (Prolactina e TSH, em todos os casos, e 17OH-Progesterona após estímulo com cortrosina, nos casos em que havia sinais clínicos de hiperandrogenismo severo ou resposta insuficiente ou incompleta ao tratamento clínico);
- c. Mulheres cuja menarca ocorreu há menos de dois anos;
- d. Mulheres acima de 45 anos de idade à primeira avaliação.

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

4.2.1 Parâmetros Clínicos e Antropométricos

Após a confirmação do diagnóstico de SOP, as mulheres selecionadas foram submetidas a anamnese direcionada, incluindo detalhes de histórico menstrual, idade da menarca e histórico gestacional, no momento da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e da coleta da amostra de sangue para estudo genético.

As manifestações clínicas de excesso de andrógenos foram avaliadas pela presença de hirsutismo, definido pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey com escore ≥ 8 (62). As pacientes foram divididas em três grupos de acordo com o índice de Ferriman-Gallwey: não hirsutas, índice inferior a 8; hirsutismo leve, índice de 8 a 14; e hirsutismo grave, índice maior do que 15(63). A determinação desse índice foi realizada, sempre pelo mesmo examinador, sendo um em Brasília e um em São Paulo.

As medidas de peso corporal e altura foram aferidas com as pacientes vestidas com suas roupas habituais, utilizando-se balanças antropométricas devidamente calibradas existentes nos respectivos ambulatórios.

4.2.2 Parâmetros Bioquímicos e Hormonais

Os parâmetros bioquímicos e hormonais avaliados foram obtidos retrospectivamente, a partir de revisão dos dados existentes nos prontuários das pacientes do HUB/UnB e do HC/FMUSP, os quais foram encaminhados pelos médicos pesquisadores responsáveis. As determinações desses parâmetros foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HUB/UnB e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 do HC/FMUSP.

Foram avaliadas analisadas as medidas da glicemia de jejum, determinada pelo método de glicose oxidase (valor de referência: 70 a 100 mg/dL) e a concentração plasmática de insulina, determinada pelo método de quimioluminescência (valor de referência: $\leq 29,1$ μ UI/mL).

Foram analisadas ainda as concentrações de LH, FSH, Testosterona total (TT), SDHEA e androstenediona (delta 4-androstenediona). Os métodos utilizados para determinação dessas concentrações diferiram entre os dois serviços (HC/FMUSP-SP e HUB/UnB-DF), como apresentado na tabela 1. Por esse motivo, para fins de análise ao longo de todo o estudo, as mulheres foram divididas em dois grupos, conforme o serviço em que foram avaliadas, assim definidos:

- Grupo SOP-1: mulheres com SOP procedentes do HC/FMUSP-SP
- Grupo SOP-2: mulheres com SOP procedentes do HUB/UnB-DF

Tabela 1. Metodologia empregada na determinação da concentração plasmática dos hormônios analisados e respectivos valores de referência

Hormônio	Método	Laboratório 1 ^a		Laboratório 2 ^b	
			VR ^c	Método	VR ^c
LH	IFMA		2,2 a 6,8 UI/L	CLIA	1-18 mUI/mL
TT	IFMA		≤ 98 ng/dL	CLIA	< 80 ng/dL
SDHEA	CLIA	0 a 14 anos	33,9 a 280 mcg/dL	CLIA	34-430 mcg/dL
		15 a 19 anos	65,1 a 368 mcg/dL		
		20 a 24 anos	148 a 407 mcg/dL		
		25 a 34 anos	98,8 a 340 mcg/dL		
		35 a 44 anos	60,9 a 337 mcg/dL		
Delta-4	CLIA	14 a 16 anos	≤ 4,4 ng/mL	CLIA	0,8-4,4 ng/mL
		17 a 18 anos	≤ 4,9 ng/mL		
		19 a 20 anos	≤ 4,3 ng/mL		
		21 a 30 anos	≤ 2,8 ng/mL		
		31 a 44 anos	≤ 2,9 ng/mL		
SHBG	IFMA		22 a 130 nmol/L	CLIA	18-114 nmol/L

^a Laboratório 1, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 do HC/FMUSP.

^b Laboratório 2, Laboratório de Análises Clínicas do HUB/UnB e Laboratório de Análises Clínicas Sabin (cortesia do Núcleo de Apoio à Pesquisa).

^c Valores de referência.

LH hormônio luteinizante; TT, testosterona total; SDHEA, sulfato de dehidroepiandrosterona; Delta-4, delta-4 androstenediona; SHBG, globulina ligadora de esteróides sexuais; IFMA (*immunofluorimetric assay*), imunofluorimetria; CLIA (*chemiluminescent immunoassay*), quimioluminescência.

4.2.3 Avaliação por Imagem

A morfologia dos ovários foi avaliada por ecografia pélvica transvaginal ou abdominal, e definida conforme as diretrizes do consenso de Rotterdam, 2004. Os exames foram realizados em diferentes equipamentos e por examinadores diversos, e os dados foram obtidos retrospectivamente, por meio de revisão dos prontuários.

4.2.4 Diagnóstico e Classificação da Obesidade

A obesidade foi classificada a partir do índice de massa corporal (IMC), obtido pela razão entre o peso em quilos e o quadrado da altura em metros, e que permite a seguinte classificação, conforme as diretrizes propostas pelo “*National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute*” em 1998:

- < 18,5 kg/m²: baixo peso;
- De 18,5 a 24,9 kg/m²: normal;
- De 25,0 a 29,9 kg/m²: sobrepeso;
- De 30,0 a 34,9 kg/m²: obesidade grau I;
- De 35,0 a 39,9 kg/m²: obesidade grau II;
- Acima de 40,0 kg/m²: obesidade grau III.

4.2.4 Avaliação da Sensibilidade à Insulina:

Foi avaliada através:

- a) do HOMA-IR (do inglês “*homeostasis model assessment*”), calculado da seguinte forma:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\left[\frac{\text{Glicemia (mg/dL)}}{18} \right] \times \text{Insulina (\mu UI/mL)}}{22,5}$$

- b) valores de HOMA-IR abaixo de 2,7 foram considerados normais (64).

4.3 ESTUDO MOLECULAR

As amostras de sangue para estudo genético foram colhidas no momento da avaliação da paciente para inclusão no estudo.

4.3.1 Extração de DNA Genômico de Leucócitos do Sangue Periférico

A análise de DNA foi realizada pela extração de DNA de leucócitos de sangue periférico pelo método CHELEX-100[®] (65). O método foi aplicado como se descreve: 5 mL de sangue venoso foram colhidos em tubos com ácido etileno diaminotetracético (EDTA). Para extração do DNA, 1 mL de água Milli-Q foi misturada a 50 µL de sangue total e em seguida a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 8.000 rotações por minuto. Após descarte do sobrenadante, foi acrescido 1 mL de água Milli-Q a cada tubo e a centrifugação foi repetida. Novamente foi descartado o sobrenadante, adicionava-se 200 µL da suspensão CHELEX-100[®] 5%, homogeneizando. As amostras foram então submetidas ao vórtex por cerca de 10 segundos. Em sequência, incubadas a 56°C, por 30 minutos e a 100°C, por 8 minutos. Após centrifugação, as amostras foram armazenadas à -20°C para posterior utilização.

4.3.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene *LHB*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos(66), aqui representados por LH23F e LH23R (tabela 1). Esses iniciadores se anelam no íntron 1 e na região 3' não traduzida do gene, respectivamente, e portanto, amplificam um fragmento contendo o éxon 2, íntron 2 e éxon 3, que inclui toda a sequência codificante da proteína madura (figura 4). A extremidade 3' do oligonucleotídeo LH23R contém nucleotídeos que são complementares exclusivamente ao gene *LHB*, possibilitando assim sua amplificação específica a despeito dos altamente homólogos genes e pseudogenes da subunidade beta do hCG.

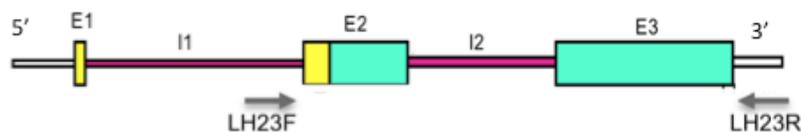


Figura 4. Representação esquemática do gene *LHB*, mostrando os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados na PCR (LH23F e LH23R). As regiões que codificam o peptídeo sinal aparecem em amarelo e as que codificam a proteína madura, em verde. E: exon; I: intron.

Na reação de amplificação foram utilizados 5 µL de DNA genômico, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas®), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA), em condições previamente descritas: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 40 s a 65°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão)(66).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase

Nome	Orientação	Sequência (5'>3')	Região de anelamento	Tamanho do Produto
LH23F	<i>sense</i>	TCTTTGTGGGTGGTGTACCACGC	Intron 1	806 pb ^a
LH23R	<i>antisense</i>	<u>TGGAGCCCTGACACCCCGATCCTCC</u>	3' não traduzida	

^apb = pares de base.

Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse (806 pares de base), os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

4.3.3 Sequenciamento Automático

Os produtos da amplificação foram purificados por meio enzimático (sistema “EXO-SAP”). Num volume de 10 µL do produto de PCR foram acrescentados 1 U de exonuclease I (Biolabs®) e 1 U de *shrimp alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão - Promega®). Em seguida, o produto foi incubado a 37°C, por 30 minutos, e depois a 80°C, por 20 minutos.

Aos produtos de PCR purificados foram acrescentados 50 ng do oligonucleotídeo de interesse (*sense* ou *antisense*), a depender da direção desejada para a reação de sequenciamento. Para todos os produtos de PCR obtidos correspondentes à amplificação do gene *LHB* de todos os indivíduos incluídos no estudo, foram realizadas duas reações de sequenciamento, sendo uma com o oligonucleotídeo *sense* (direção 5'→3') e outra com o oligonucleotídeo *antisense* (direção 3'→5').

Após a purificação, o material foi enviado para realização do sequenciamento automático propriamente dito, em empresa especializada (Macrogen - Coréia do Sul - www.macrogen.com). Os resultados obtidos foram disponibilizados *online*, em formato de eletroferograma.

4.3.4 Leitura e Análise das Sequências

A análise, alinhamentos e comparações entre as seqüências (seqüência de referência e eletroferogramas das seqüências obtidas, em ambas as direções) foram realizadas com o auxílio de *software* especializado: *sequencher* (*Gene Codes Corporation* versão Demo 4.10.1 – 2011, Ann Arbor, MI) As seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência referência disponível na base de dados PubMed (NCBI Reference Sequence: NG_011464.1)(67). A leitura de todos os eletroferogramas foi realizada por dois pesquisadores, de maneira independente e os resultados de cada leitura foram comparados. Os resultados conflitantes ou duvidosos foram reavaliados por ambos e somente considerados para análise

quando houve consistência entre as duas leituras dos eletroferogramas, em ambas as direções.

Definiu-se então o genótipo das mulheres estudadas (genotipagem) para o gene *LHB* e as frequências alélicas e prevalência dos polimorfismos identificados.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados e editados em planilha eletrônica do programa (Microsoft Office Excel 2007) e posteriormente exportados para formato compatível com o uso pelo programa para análises estatísticas STATA (*Stata Statistical Software: Release 8*). Utilizou-se este programa para o cálculo de todas frequências e distribuições das variáveis de interesse, medidas de tendência central e sua variabilidade, associações entre variáveis e testes de significância estatística. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para a avaliação de correlação da distribuição de proporções de variáveis categóricas entre grupos de interesse, tendo-se escolhido o teste exato de Fisher em todas as avaliações de nível de significância, estabelecido como valor de $p < 0.05$. Para a comparação entre a distribuição de variáveis contínuas e os grupos ou subgrupos de interesse, calculou-se médias e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

A inspeção preliminar dos dados revelou diferenças importantes no perfil das mulheres que constituíram o grupo de casos em relação a sua origem (São Paulo vs Brasília), tendo-se optado então por uma estratégia de análise conservadora, mantendo-se todas as estatísticas descritivas do estudo em separado para os dois grupos.

Dentro das análises do componente transversal ou descritivo, foram calculadas médias e respectivos intervalos de confiança de 95% para descrição dos grupos estudados, isto é, a comparação entre as tendências para todos parâmetros clínicos e bioquímicos para todas as variáveis contínuas, segundo preconiza Brandstätter (68). Utilizou-se valores de corte baseados nos limites de normalidade conforme descritos nas sessões anteriores dentro deste capítulo para uma verificação mais detalhada das diferenças entre grupos de mulheres com SOP. A

seguir, os grupos de pacientes foram estratificados segundo duas categorias de IMC e as análises refeitas dentro destes extratos.

No modelo analítico de tipo caso-controle tomou-se como variável de exposição a presença de cada um dos 11 polimorfismos detectados na população estudada. Inicialmente, submeteu-se as prevalências encontradas para cada mutação foram submetidas ao teste de significância de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg conforme recomendado por Ryckman & Williams(69). O nível de associação pontual entre estas exposições e a ocorrência de SOP foi representado pelo cálculo das razões de chance (*odds ratios*); para a estimativa de seus respectivos intervalos de confiança de 95% utilizou-se o método exato.

Testes da comparabilidade das distribuições, entre casos e controles, de frequências genóticas e alélicas e frequências dos alelos menores, para cada polimorfismo, foram realizados utilizando-se o nível de significância de $p < 0,05$ onde o valor de p foi calculado através do teste exato de Fisher. O mesmo procedimento foi utilizado para o teste de comparabilidade das frequências genóticas de cada variante (*versus* o tipo selvagem ou *wild type*) entre casos e controles e os parâmetros clínicos elegidos para análise, isto é, hirsutismo, prevalência de obesidade, resistência insulínica e hiperandrogenemia.

4.5 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB) em duas etapas: a primeira em 2007 (registro de projeto 091/2007 – Anexo A) e a segunda em 2009 (registro de projeto 124/09 – Anexo B).

Todos os participantes (controles e paciente com SOP) deram seu consentimento por escrito para sua realização, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5. RESULTADOS

Das 130 pacientes com SOP incluídas no estudo, 85 eram acompanhadas nos ambulatórios de ginecologia e endocrinologia do HC/FMUSP e 45 acompanhadas no ambulatório de endocrinologia do HUB/UnB.

Como descrito, para fins de análise, os grupos foram caracterizados como:

- Mulheres com SOP procedentes do HC/FMUSP-SP (SOP-1) (n=85);
- Mulheres com SOP procedentes da HU/UnB-DF (SOP-2) (n=45);
- Controles (Controles) (n=96).

Apresentam-se inicialmente os dados clínicos, bioquímicos e hormonais de todas as mulheres com SOP incluídas no estudo, bem como a análise comparativa entre os dois grupos (SOP-1 e SOP-2).

Seguem-se os dados obtidos na etapa do estudo molecular do gene *LHB* das mulheres com SOP e sem SOP, que consiste na descrição e análise estatística dos polimorfismos identificados.

Por fim, estão apresentados os resultados das associações verificadas entre a presença de polimorfismos no gene *LHB* e parâmetros clínicos e laboratoriais da SOP, especificamente relacionados às manifestações e ao grau de hiperandrogenismo nas mulheres afetadas pela síndrome.

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS DE MULHERES PORTADORAS DE SOP

Os principais parâmetros clínicos avaliados nas mulheres portadoras de SOP de ambos os grupos (SOP-1 e SOP-2) encontram-se apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros clínicos analisados em 130 mulheres portadoras da SOP, acompanhadas no HC/FMUSP e no HUB/UnB

Parâmetro	SOP-1 (n=85)		SOP-2 (n=45)	
	Média	IC 95% ^a	Média	IC 95% ^a
Idade (anos)	25,7	24,6 - 26,9	28,1	26,1 - 30,1
IMC ^b (kg/m ²)	28,9	27,4 - 30,3	28,4	26,4 - 30,4
EFG ^c	12,6	11,2 - 14,0	10,2	7,7 - 12,7

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB.

^aIC: intervalo de confiança de 95%.

^bIMC: índice de massa corpórea.

^cEFG: escore de Ferriman e Gallwey.

As médias de idade e IMC dos dois grupos (SOP-1 e SOP-2) foram estatisticamente semelhantes (tabela 3).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias do escore de Ferriman e Gallwey dos dois grupos (tabela 3). Entretanto, a prevalência de hirsutismo, definido por um escore ≥ 8 , foi significativamente diferente, com 82,5% de mulheres hirsutas no grupo SOP-1 e 52,5% no grupo SOP-2 ($p=0,000$). Quatro mulheres no grupo SOP-1 e 5 no grupo SOP-2 não foram incluídas nessa análise por falta de registro desse dado.

Na tabela 4 encontram-se apresentados os valores observados para os parâmetros bioquímicos e hormonais analisados em ambos os grupos de mulheres com SOP.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e hormonais analisados em 130 mulheres portadoras da SOP, acompanhadas no HC/FMUSP e no HUB/UnB

Parâmetro	SOP-1			SOP-2		
	Média	IC 95% ^a	n	Média	IC 95% ^a	n
GJ (mg/dL)	88,7	86,6-90,7	83	90,9	87,0-94,9	44
TT(ng/dL) ^b	105,4	87,7-123,1	84	61,8	48,9-74,8	42
LH (mUI/L)	ND	ND	-	9,3	5,8-12,9	44
SDHEA (mcg/dL)	237,8	210,9-264,7	83	166,1	125,5-206,8	19
Delta-4 (ng/mL)	3,7	3,4-4,1	80	2,8	2,0-3,6	12
SHBG (nmol/L)	36,4	31,8-41,0	75	ND	ND	-

^aIC 95%: intervalo de confiança de 95%.

^bValor de referência para SOP-1: ≤ 98 ng/dL e para SOP-2: < 80 ng/dL.

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB; TT: testosterona total; LH: hormônio luteinizante; SDHEA: sulfato de dehidroepiandrosterona; Delta-4: delta-4 androstenediona; SHBG: globulina ligadora de esteróides sexuais; ND: dados não disponíveis.

As médias da glicemia em jejum foram semelhantes entre os dois grupos (tabela 4).

A média da concentração de TT no grupo SOP-2 situou-se dentro dos valores de referência, com apenas 6 mulheres nesse grupo apresentando testosterona total acima do limite superior de normalidade (LSN). Por outro lado, a média da concentração de TT no grupo SOP-1 foi elevada, isto é, acima do LSN para o método utilizado (tabela 4).

Não foi possível comparar os grupos quanto às médias de LH e SHBG, por falta de dados do LH no grupo SOP-1 (HC/FMUSP-SP) e SHBG no grupo SOP-2 (HUB/UnB-DF). As médias das concentrações de LH e SHBG nos grupos analisados, bem como de SDHEA no grupo SOP-2, ficaram dentro dos respectivos valores de referência.

As concentrações de delta-4 do grupo SOP-2 apresentaram média dentro da normalidade, porém só foram avaliadas em 12 dos 45 casos, por falta do dado nos demais. Duas, dentre essas 12 pacientes, apresentaram níveis de delta-4 acima da normalidade.

No grupo SOP-2, a média das concentrações tanto de SDHEA quanto de delta-4, apresentam limitação de análise *per se*, uma vez que seus valores de referência diferem por grupos etários (tabela 1).

Para a análise comparativa entre os 2 grupos de mulheres com SOP quanto aos parâmetros metabólicos (IMC, glicemia de jejum, resistência insulínica) e relacionados ao hiperandrogenismo foram constituídas categorias para cada variável analisada. Os resultados dessa comparação estão apresentados na tabela 5.

Observou-se que os 2 grupos de mulheres com SOP foram estatisticamente semelhantes no que diz respeito ao IMC, prevalência de glicemia de jejum alterada e resistência insulínica (tabela 5). A maioria das mulheres com SOP estudadas apresentava sobrepeso ou obesidade (66,7%).

Ao contrário, quando foram analisadas as variáveis relacionadas ao hiperandrogenismo, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, tanto quanto à presença e graduação do hirsutismo, quanto pela ocorrência de concentração elevada de testosterona total (tabela 5). Assim, houve predomínio de hiperandrogenismo clínico e laboratorial no grupo SOP-1 em comparação ao grupo SOP-2.

Tabela 5. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto aos parâmetros metabólicos e de hiperandrogenismo

Parâmetros	Categoria	SOP-1		SOP-2		p ^a
		%	n	%	n	
IMC (kg/m ²)	Normal	33,3	28	33,3	15	0,348
	Sobrepeso	27,4	23	22,2	10	
	Ob Grau1	20,2	17	33,3	15	
	Ob Grau 2	13,1	11	4,4	2	
	Ob Grau 3	6,0	5	6,7	3	
GJ (mg/dl)	< 99 (normal)	90,4	75	79,5	35	0,079
	≥100 (alterada)	9,6	8	20,5	9	
RI ^b	Ausente	47,1	40	47,7	21	1,000
	Presente	52,9	45	52,3	23	
TT (ng/dL) ^c	Normal	53,6	45	76,2	32	0,020
	Elevada	46,4	39	23,8	10	
Hirsutismo ^d	Ausente (<8)	14,8	12	47,5	19	0,001
	Leve (8-14)	48,2	39	25,0	10	
	Severo (>14)	37,0	30	27,5	11	
SDHEA (mcg/dL) ^e	Normal	86,6	71	36,8	7	0,000
	Elevada	13,4	11	63,2	12	
Delta-4 (ng/mL) ^e	Normal	37,5	30	81,8	9	0,008
	Elevada	62,5	50	18,2	2	

^ap: valor exato de p calculado pelo teste de Fisher.

^bRI: resistência à insulina, nível definido por HOMA-IR ≥ 2,7.

^cTT: testosterona total; valor de referência para SOP-1: ≤ 98 ng/dL e para SOP-2: < 80 ng/dL.

^dClassificado de acordo com o escore de Ferriman e Gallwey.

^eValores de normalidade definidos conforme faixa etária (vide tabela 1).

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB; IMC: índice de massa corpórea; Ob: obesidade; GJ: glicemia jejum; SDHEA: sulfato de dehidroepiandrosterona; Delta-4: delta-4 androstenediona.

Subsequentemente, as mulheres com SOP oriundas de cada serviço foram categorizadas segundo o IMC, considerando peso normal o IMC < 25 e obesidade o IMC ≥ 25. (Tabelas 6, 7 e 8).

A media do escore de Ferriman e Gallwey foi maior entre as mulheres obesas de ambos os grupos, porém no grupo SOP-1 esse valor foi significativamente superior para as mulheres com obesidade (tabela 6).

Tabela 6. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP, quanto aos parâmetros clínicos e laboratoriais, conforme o índice de massa corpórea

Parâmetros	SOP-1		SOP-2	
	IMC < 25 (n=28) Média (IC 95%) ^a	IMC ≥ 25 (n=56) Média (IC 95%) ^a	IMC < 25 (n=28) Média (IC 95%) ^a	IMC ≥ 25 (n=56) Média (IC 95%) ^a
Idade	24,1 (21,9-26,3)	26,5 (25,1-27,9)	26,4 (22,4-30,4)	29,0 (26,6-31,3)
EFG ^b	9,6 (7,4-11,8)	14,1 (12,5-15,8)	8,5 (4,4-12,6)	11,1 (7,9-14,3)
TT (ng/dL) ^c	120,4 (69,4-171,3)	97,1 (87,8-108,1)	48,8 (34,9-62,7)	68,3 (50,1-86,6)
LH (mUI/L)	ND	ND	14,9 (3,8-26,1)	6,7 (5,3-8,2)
SDHEA (mcg/dL)	247,2 (211,9-282,5)	234,5 (196,9-272,2)	191,9(65,4-318,5)	156,9 (111,1-202,8)
Delta-4 (ng/mL)	3,7 (3,2-4,2)	3,8 (3,3-4,2)	2,4(3,4-8,1)	2,9 (2,0-3,8)
SHBG (nmol/L)	49,5 (39,9-59,0)	29,1 (25,4-32,7)	ND	ND

^aIC 95%: intervalo de confiança de 95%.

^bEFG: escore de Ferriman e Gallwey.

^cValor de referência para SOP-1: ≤ 98 ng/dL e para SOP-2: < 80 ng/dL.

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB; IMC: índice de massa corpórea (kg/m²); TT: testosterona total; LH: hormônio luteinizante; SDHEA: sulfato de dehidroepiandrosterona; Delta-4: delta-4 androstenediona; SHBG: globulina ligadora de esteróides sexuais; ND: dados não disponíveis.

As médias da TT, do SDHEA e da Delta-4 foram semelhantes entre os subgrupos de ambos os grupos.

As médias do LH foram semelhantes entre as mulheres com IMC normal e obesas, no grupo SOP-2. Não foi possível ter acesso às dosagens de LH do grupo SOP-1, como mencionado.

As médias da concentração de SHBG, por sua vez, foram significativamente superiores no subgrupo de mulheres com IMC normal em relação àquelas com obesidade, dentro do grupo SOP-1 (tabela 6). Ainda, como mencionado na sessão sobre métodos, esse dado não foi encontrado nos prontuários das mulheres do grupo SOP-2.

Tabela 7. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto ao hirsutismo, conforme o índice de massa corpórea

Hirsutismo ^a	SOP-1		<i>p</i> ^b	SOP-2		<i>p</i> ^b
	IMC <25 (n=28) %	IMC>25 (n=56) %		IMC<25 (n=15) %	IMC>25 (n=30) %	
Ausente	29,6	7,4	0,021	64,3	38,5	0,328
Leve	48,2	48,2		14,3	30,8	
Grave	22,2	44,4		21,4	30,8	

^aHirsutismo classificado de acordo com Ferriman e Gallwey

^b*p*: valor exato de *p* calculado pelo teste de Fisher.

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB; IMC: índice de massa corpórea (kg/m²).

No grupo SOP-1, houve diferença significativa na proporção de mulheres com hirsutismo, segundo o IMC (tabela 7). Nesse grupo, aproximadamente 1/3 das pacientes magras (IMC < 25 kg/m²) não apresentaram hirsutismo, contra menos de 10% das obesas (7,4%). Em contrapartida, o dobro de mulheres obesas apresentam hirsutismo grave em relação às magras. O hirsutismo leve foi tão prevalente nas magras quanto nas obesas.

No grupo SOP-2 não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de hirsutismo entre os subgrupos de pacientes magras e obesas.

Tabela 8. Análise comparativa entre os grupos de mulheres com SOP quanto aos parâmetros laboratoriais, conforme o índice de massa corpórea

Parâmetros	SOP-1		<i>p</i> ^a	SOP-2		<i>p</i> ^a
	IMC <25 (n=28) %	IMC>25 (n= 56) %		IMC<25 (n=15) %	IMC>25 (n= 30) %	
TT elevada	39,3	50,0	0,487	14,3	28,6	0,451
SDHEA	3,6	18,5	0,088	60,1	64,3	1,00
Delta-4	65,4	62,3	1,000	ND	ND	-
RI	32,1	62,5	0,011	57,1	50,0	0,752

^a*p*: valor exato de *p* calculado pelo teste de Fisher.

SOP-1: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos da FMUSP/SP; SOP-2: grupo de pacientes com síndrome dos ovários policísticos do HUB/UnB; IMC: índice de massa corpórea (kg/m²); TT: testosterona total; SDHEA: sulfato de dehidroepiandrosterona; Delta-4: delta-4 androstenediona; RI: resistência à insulina; ND: dados não disponíveis.

A presença de hiperandrogenemia, definida por testosterona total acima do LSN para cada método, não variou de acordo com a presença de obesidade em ambos os grupos de mulheres com SOP. O mesmo foi observado para SDHEA nos

dois grupos e delta-4 no grupo SOP-1. Devido ao número reduzido de mulheres que apresentavam os dados referentes às dosagens de delta-4 no grupo SOP-2, essa variável não foi considerada para análise (tabela 8).

A prevalência de resistência insulínica foi significativamente maior ($p=0,011$) nas pacientes obesas do grupo SOP-1, contudo, essa diferença não foi observada nas pacientes do grupo SOP-2 (tabela 8).

5.2 ESTUDO MOLECULAR

A estratégia de amplificação do gene *LHB* utilizada nesse estudo permitiu analisar toda a extensão da região codificante da proteína madura, que corresponde à sequência dos exons 2 e 3. O exon 1 não foi amplificado, porém essa região codifica apenas os primeiros 5 aminoácidos do peptídeo sinal, o qual não faz parte da proteína madura. Assim, foram analisados os polimorfismos situados nos exons 2 e 3, os quais estão destacados na figura 5.

Todos os eletroferogramas obtidos no sequenciamento do gene *LHB* dos 226 indivíduos estudados, sendo 130 casos e 96 controles, foram analisados. Entretanto, devido a erros técnicos comuns na etapa automática da reação de sequenciamento, não foi possível a leitura pontual de alguns polimorfismos para alguns indivíduos. Apesar disso, todas as sequências foram mantidas na análise, justificando pequenas diferenças no número de amostras analisadas para cada polimorfismo.

Foram identificadas 11 variantes alélicas em regiões codantes do gene *LHB* humano, dez delas já descritas em banco de dados (<http://browser.1000genomes.org> e/ou www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP), a saber: rs34247911, rs5030775, rs35296413, rs1800447, rs35270001, rs34349826, rs6521, rs1056914, localizadas no exon 2; rs1056917 e rs5030774, no exon 3, conforme descrição na figura 5. O polimorfismo rs1056917 também é descrito nos bancos de dados como rs117969667 ou rs59470182. Nesse trabalho, utilizou-se apenas uma de suas nomenclaturas, a saber: rs1056917.

```

ATGGAGATGCTCCAGgtaagactacagggcccctgggcaccttcacctccttc
cagggccatcactggcatgagaaggggacagaccggtgtgagctgtggaaggaggc
ctctttctggaggggcatgacccccagtaagcttcaggtggggcagttcctgag
ggtggggatctgaaatggtggggcatctcaggtcctctgggctgtgggggtgggc
tctgaaaggcaggtgtccgggtggtgggtcctgaatagggatgccgggaagggt
ctctgggtctttgtgggtggtgtaccacgctgggatgggaaggccaggactcggg
gctgcggtctcagacctgggtgaagcagtgctcctgtcccagGGGCTGCTGCTG
TTGCTGCTGCTGAGCATGGCGGGCATGGGCATCCAGGGAGCCGCTTCGGCCA
TGGTGCCCCCATCAATGCCATCCTGGCTGTGAGAAGGAGGGCTGCCAGTG
TGCATACCGTCAACACCACCATCTGTGCCGGCTACTGCCCCACCATGgtgagc
tgcttggggccaggggacagatgctgccacctcagggccagaccacagaggcag
cgggggaggaagggtggtctgcctctctggcctgctgggttggggaatgggggtgtg
ggaaggcaggaacagagggcttctctgggctcctgagtcagaccctgtggggctc
agcttgggagctcagctgaggcgtggtcctcaggcacatgctcattccccact
cacacggcctccagATGCGCGTGTGTCAGGCGGTCCTGCCGCCCTGCCCTCAGG
TGGTGTGCACCTACCGTGATGTGCGCTTCGAGTCCATCCGGCTCCCTGGCTGCC
CGCGTGGTGTGGACCCCGTGGTCTCCTTCCTTCCCTGTGGCTCTCAGCTGTCGCTGTG
GACCCTGCCGCCGCAGCACCTCTGACTGTGGGGTCCCAAAGACCACCCCTTGA
CCTGTGACCACCCCAACTCTCAGGCCTCCTCTTCTCTAAagaccctccccgc
agccttccaagtccatcccgactcctggagccctgacaccccgatcctcccaca
ataaaggcttctcaatccgca

```

Figura 5. Sequência codificante do gene da subunidade beta do hormônio luteinizante. As sequências dos exons encontram-se destacadas em letras maiúsculas azuis e os introns em letras minúsculas cinzas. As regiões de anelamento dos primers encontram-se sublinhadas. As posições dos polimorfismos identificados nas regiões codificantes encontram-se assinaladas.

Uma nova variante alélica, a qual não foi identificada nos bancos de dados consultados, compreende a substituição de uma citosina (C) por uma adenina (A) no nucleotídeo 233 (233C>A), no éxon 3, levando à troca de um aminoácido treonina (Thr) para uma asparagina (Asn), no resíduo 78 da proteína.

	61	65	70	75	78	80	85	90																						
LHβ	M	M	R	V	L	Q	A	V	L	P	P	L	P	Q	V	V	C	T	Y	R	D	V	R	F	E	S	I	R	L	P
LHβ-VAR	M	T	R	V	L	Q	G	V	L	P	A	L	P	Q	V	V	C	N	Y	R	D	V	R	F	E	S	I	R	L	P
hCGβ	M	T	R	V	L	Q	G	V	L	P	A	L	P	Q	V	V	C	N	Y	R	D	V	R	F	E	S	I	R	L	P

Figura 6. Comparação estrutural entre as cadeias beta do LH selvagem (LH-β), LH variante 233C>A (LH-VAR-β) e hCG (hCG-β).

Na tabela 9 estão listados os onze polimorfismos analisados, com sua localização na sequência referência do gene correspondente à posição do nucleotídeo alterado na sequência codificante do gene (NCBI: NG_011464.1)(67).

Como pode ser observado na mesma tabela, as frequências genotípicas destas variantes estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, nas mulheres com SOP e nos controles.

Tabela 9. Identificação dos polimorfismos no gene *LHB*, localização e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismos ^a	Região do gene	Posição e troca de nucleotídeos ^b	Posição e troca de aminoácidos	HW p^c	
				Controles	Casos
rs34247911	Exon 2	45G>A	Met15Ile	1,000	0,964
rs5030775	Exon 2	52G>A	Thr18Ala	1,000	0,964
rs35296413	Exon 2	81A>T	Pro27=	1,000	1,000
rs1800447	Exon 2	82T>C	Trp28Arg	0,471	0,631
rs35270001	Exon 2	89A>G	His30Arg	1,000	1,000
rs34349826	Exon 2	104T>C	Ile35Thr	0,506	0,638
rs6521	Exon 2	114C>G	Val38=	0,650	0,558
rs1056914	Exon 2	141A>C	Pro44=	0,650	0,670
233C>A*	Exon 3	233C>A	Thr78Asn	0,959	0,820
rs1056917	Exon 3	285T>C	95Gly=	0,644	0,254
rs5030774	Exon 3	364G>A	Gly122Ser	1,000	1,000

^a Nomenclatura dos polimorfismos do gene *LHB* humano conforme base de dados PubMed, com posição de troca dos aminoácidos na proteína (70).

^b Posição de troca do nucleotídeo na sequência codificante, correspondente à sequência do RNA mensageiro (CCDS 12748.1).

^c Valor exato de p , calculado pelo teste de Fisher, para o desvio de frequências genotípicas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW)(69).

* Nova variante, ainda sem referência nas bases de dados relacionadas ao PubMed (NCBI e 1000 genomes)(70, 71).

5.2.1 Prevalência das Variantes do *LHB*

Dentre os onze polimorfismos analisados, apenas oito foram identificados na amostra estudada. Os polimorfismos rs35296413 (Pro27=), rs35270001 (His30Arg) e rs5030774 (Gly122Ser) não foram encontrados em nenhum dos indivíduos analisados, sejam eles casos ou controles.

Os oito polimorfismos identificados na nessa amostra não diferiram significativamente quanto às frequências genotípica e alélica, quando comparadas

as diferenças de distribuição entre casos e controles, conforme descrito nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Distribuição e análise comparativa da frequência genotípica dos polimorfismos do gene *LHB* em mulheres com SOP e em controles

Polimorfismo ^a	Genótipo	Controles		Casos		<i>p</i> ^b
		n	%	n	%	
rs3424791 (Met15Ile)	GG	93	100	124	99,2	1,000
	AA	0	0	0	0	
	GA	0	0	1	0,8	
rs5030775 (Thr18Ala)	GG	93	100	125	99,2	1,000
	AA	0	0	0	0	
	GA	0	0	1	0,8	
rs1800447 (Trp28Arg)	TT	81	86,2	109	86,5	0,910
	CC	0	0	1	0,8	
	TC	13	13,8	16	12,7	
rs34349826 (Ile35Thr)	TT	81	87,1	108	86,4	1,000
	CC	0	0	1	0,8	
	TC	12	12,9	16	12,8	
rs6521 (Val38=)	CC	17	18,3	24	19,5	0,983
	GG	33	35,5	42	34,1	
	CG	43	46,2	57	46,3	
rs1056914 (Pro44=)	AA	17	18,3	20	16,3	0,824
	CC	33	35,5	41	33,3	
	AC	43	46,2	62	50,4	
233C>A (Thr78Asn)	CC	95	99,0	120	96,0	0,237
	AA	0	0	0	0	
	CA	1	1,0	5	4,0	
rs1056917 (95Gly=)	TT	11	11,5	16	13,2	0,927
	CC	45	46,9	57	47,1	
	TC	40	41,7	48	39,7	

^a Nomenclatura dos polimorfismos do gene *LHB* humano conforme base de dados PubMed, com posição de troca dos aminoácidos na proteína (70).

^b Valor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher para o nível de significância da diferença de distribuição da frequência genotípica entre casos e controles, para cada polimorfismo.

Tabela 11. Distribuição e análise comparativa da frequência alélica dos polimorfismos do gene *LHB* em mulheres com SOP e em controles

Polimorfismo ^a	Genótipo	Controles		Casos		p ^b
		N	%	n	%	
rs3424791 (Met15Ile)	Alelo G	186	100	249	99,6	1,000
	Alelo A	0	0	1	0,4	
rs5030775 (Thr18Ala)	Alelo G	186	100	251	99,6	1,000
	Alelo A	0	0	1	0,4	
rs1800447 (Trp28Arg)	Alelo T	175	93,1	234	92,9	1,000
	Alelo C	13	6,9	18	7,1	
rs34349826 (Ile35Thr)	Alelo T	174	93,5	232	92,8	0,849
	Alelo C	12	6,5	18	7,2	
rs6521 (Val38=)	Alelo C	77	41,4	105	42,7	0,844
	Alelo G	109	58,3	141	57,3	
rs1056914 (Pro44=)	Alelo A	77	41,4	102	41,5	1,000
	Alelo C	109	58,6	144	58,5	
233C>A (Thr78Asn)	Alelo C	191	99,5	245	98,0	0,240
	Alelo A	1	0,5	5	2,0	
rs1056917 (95Gly=)	Alelo T	62	32,3	80	33,1	0,918
	Alelo C	130	67,7	162	66,9	

^a Nomenclatura dos polimorfismos do gene *LHB* humano conforme base de dados PubMed, com posição de troca dos aminoácidos na proteína (70).

^b Valor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher para o nível de significância da diferença de distribuição da frequência alélica entre casos e controles, para cada polimorfismo.

A comparação das proporções dos genótipos selvagem e variante pelo teste exato de Fisher entre casos e controles não mostrou diferenças, sugerindo a ausência de associação entre a presença dos polimorfismos estudados e susceptibilidade à SOP (tabela 10). Uma análise mais precisa através da estimativa da razão de chances (*odds ratio*) apontou a tendência a um risco aumentado de doença associado à presença do novo polimorfismo 233C>A (Thr78Asn), embora sem significância estatística (OR = 3,96 - IC95% = 0,43-189,12). Os resultados referentes à análise de associação por meio de razão de chances encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Associação por razão de chances (*odds ratio*) entre a detecção de cada polimorfismo estudado e a presença da SOP

Polimorfismo	Genótipo	Controles (n)	Casos (n)	OR (IC 95%) ^a	
rs34247911 (Met15Ile)	WT	93	124	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	NC	0,0 (0,0-1,0)
	He	0	1		0,0 (0,0-1,0)
rs5030775 (Thr18Ala)	WT	93	125	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	NC	0,0 (0,0-1,0)
	He	0	1		0,0 (0,0-1,0)
rs35296413 (Pro27=)	WT	94	126	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	NC	0,0 (0,0-1,0)
	He	0	0		0,0 (0,0-1,0)
rs1800447 (Trp28Arg)	WT	81	109	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	1	0,97 (0,42-2,31) ^b	NC
	He	13	16		0,91 (0,39-2,19)
rs35270001 (His30Arg)	WT	94	123	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	NC	0,0 (0,0-1,0)
	He	0	0		0,0 (0,0-1,0)
rs34349826 (Ile35Thr)	WT	81	108	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	1	1,06 (0,45-2,58)	NC
	He	12	16		1,0 (0,43-2,45)
rs6521 (Val38=)	WT	17	24	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	33	42	0,92 (0,43-1,94)	0,90 (0,39-2,08)
	He	43	57		0,94 (0,42-2,08)
rs1056914 (Pro44=)	WT	17	20	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	33	41	1,15 (0,53-2,49)	1,06 (0,44-2,51)
	He	43	62		1,23 (0,53-2,78)
233 C>A (Thr78Asn)	WT	95	120	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	3,96 (0,43-189,12)	NC
	He	1	5		3,96(0,43-189,12)
rs1056917 (95Gly=)	WT	11	16	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	45	57	0,85 (0,34-2,07)	0,87 (0,33-2,23)
	He	40	48		0,83 (0,31-2,15)
rs5030774 (Gly122Ser)	WT	96	119	1,00 (ref)	1,00 (ref)
	Va	0	0	NC	0,0 (0,0-1,0)
	He	0	0		0,0 (0,0-1,0)

^a OR: razão de chance e intervalo de confiança de 95%; ref: categoria de referência.

^b Categoria inclui os ambos genótipos mutados (variante homocigoto e heterocigoto).

WT: genótipo homocigoto selvagem (*wild-type*); Va: genótipo homocigoto variante; He: genótipo heterocigoto; NC: não calculável.

5.3 ASSOCIAÇÕES ENTRE GENÓTIPOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS A RESISTÊNCIA INSULÍNICA E HIPERANDROGENISMO NAS MULHERES COM SOP

Com o objetivo de avaliar possível associação entre a presença de cada polimorfismo e variações nas manifestações clínicas relacionadas ao hiperandrogenismo na mulheres com SOP, analisou-se a distribuição das frequências genótípicas segundo diferentes categorias de parâmetros clínicos e laboratoriais. Para tal, foi utilizada a forma de análise genotípica agrupada, na qual os genótipos dos indivíduos são divididos em dois tipos: genótipo homocigoto selvagem (*wild type* - WT) e genótipo variante, que compreende tanto heterocigotos (1 alelo variante) quanto homocigotos para o genótipo variante (2 alelos variantes - VAR). Nessa forma de análise, o genótipo selvagem corresponde ao apresentado na sequência referência do gene descrita no banco de dados.

Essa análise foi realizada para cada um dos polimorfismos que foram identificados nas mulheres com SOP estudadas, isoladamente, exceto dois (rs34247911/Met15Ile e rs5030775/Thr18Ala), em que apenas em um indivíduo foi identificado o genótipo variante, impossibilitando assim o cálculo estatístico.

Para avaliação da influência dos polimorfismos sobre as características clínicas, os polimorfismos rs1800447 e rs34349826 (Trp28Arg e Ile35Thr) foram descritos e analisados conjuntamente, pois se apresentam em desequilíbrio de ligação, ou seja, segregam sempre em conjunto nas populações (20, 61, 66).

As características clínicas das pacientes com e sem as variantes rs1800447/rs34349826 no gene *LHB* estão descritas na tabela 13.

A gravidade do hirsutismo, prevalência de obesidade e de resistência insulínica não variou de forma significativa entre as pacientes portadoras dos polimorfismos rs1800447/rs34349826 (Trp28Arg/Ile35Thr), em relação àquelas que não apresentavam a variante. Entretanto, a presença de hiperandrogenemia, definida por concentrações de testosterona acima do LSN foi significativamente maior no grupo portador destas variantes ($p=0,015$).

Tabela 13. Distribuição da frequência genotípica da variante rs1800447/rs34349826 no gene *LHB* segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP

Parâmetros avaliados ^a	rs1800447 / rs34349826		<i>p</i> ^b
	WT (n=108) %	VAR (n=17) %	
Hirsutismo Leve (EFG \geq 8 e $<$ 15)	40,6	37,5	0,624
Grave (EFG \geq 15)	31,7	43,8	
Hiperandrogenemia	32,7	64,7	0,015
Obesidade (IMC $>$ 25)	65,4	76,5	0,421
Resistência insulínica	49,5	64,7	0,301

^aAs proporções de indivíduos para os quais o parâmetro estava ausente ou dentro da normalidade foram omitidas a fim de simplificar a tabela; a adição dessas categorias para cada parâmetro totaliza 100%. Categorias omitidas: hirsutismo ausente: escore de Ferriman e Gallwey (EFG) $<$ 8; testosterona total dentro do valor de referência para o método; indivíduos com peso normal (IMC $<$ 25); ausência de resistência insulínica de acordo com HOMA-IR.

^bValor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher.

WT (*wild type*): genótipo homocigoto selvagem; VAR: genótipos variantes heterocigotos e homocigotos.

Análise semelhante foi realizada para os polimorfismos rs6521 (Val38=), rs1056914 (Pro44=), rs1056917 (Gly95=), isoladamente. Tratam-se de polimorfismos sinônimos e a análise da distribuição dos genótipos segundo diferentes manifestações clínicas não demonstrou diferenças significativas.

As tabelas referentes aos valores dos coeficientes de correlação de Pearson para as análises desses polimorfismos encontram-se nas tabelas A01 à 03, Anexo A.

Tabela 14. Distribuição da frequência genotípica da variante 233C>A/Thr78Asn no gene *LHB* segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP

Parâmetros avaliados ^a	233C>A/Thr78Asn		<i>p</i> ^b
	WT (n=120) %	VAR (n=5) %	
Hirsutismo Leve (EFG \geq 8 e $<$ 15)	38,4	100,0	0,063
Grave (EFG \geq 15)	33,9	0	
Hiperandrogenemia	39,7	40,0	1,000
Obesidade (IMC $>$ 25)	67,2	80	1,000
Resistência insulínica	52,1	80,0	0,370

^aAs proporções de indivíduos para os quais o parâmetro estava ausente ou dentro da normalidade foram omitidas a fim de simplificar a tabela; a adição dessas categorias para cada parâmetro totaliza 100%. Categorias omitidas: hirsutismo ausente: escore de Ferriman e Gallwey (EFG) $<$ 8; testosterona total dentro do valor de referência para o método; indivíduos com peso normal (IMC $<$ 25); ausência de resistência insulínica de acordo com HOMA-IR.

^bValor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher.

WT (*wild type*): genótipo homocigoto selvagem; VAR: genótipos variantes heterocigotos e homocigotos.

Em relação à nova variante alélica descrita, polimorfismo 233C>A/Thr78Asn, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na proporção das diferentes manifestações clínicas da SOP analisadas entre os genótipos (tabela 14). Entretanto, verificou-se que nenhum dos 5 casos que apresentavam essa variante tinham hirsutismo severo, definido pelo EFG ≥ 15 , enquanto 33,9% das portadoras do genótipo selvagem apresentavam essa manifestação ($p=0,063$).

5.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS POLIMORFISMOS QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DO ALELO MENOR NAS MULHERES BRASILEIRAS COM E SEM SOP EM RELAÇÃO À FREQUÊNCIA MUNDIAL

Para a análise comparativa das prevalências de polimorfismos no *LHB* encontradas na população estudada e em outras populações já descritas, foi utilizada a frequência do alelo menor (MAF: *minor allele frequency*). Esse conceito refere-se à frequência na qual o alelo menos comum para cada polimorfismo ocorre em uma determinada população e tem sido amplamente empregado em estudos de análise e associação ampla do genoma. Foram comparados os dados obtidos na presente casuística com os dados da frequência mundial do alelo menor (MAF) descrita no banco de dados do PubMed, para os polimorfismos em que este dado estava disponível (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)(70). Os resultados dessa análise, bem como a MAF de referência para os respectivos polimorfismos, estão descritos na tabela 15.

Tabela 15. Análise comparativa entre a frequência do alelo menor em mulheres com e sem a síndrome de ovários policísticos (casos + controles) e a frequência mundial*

Polimorfismo ^a	Alelos	Casos e	Casos e	Alelo Menor	Prevalência	<i>p</i> ^d
	WT/VAR ^b	Cotroles n	Cotroles %		MAF ^c %	
rs34247911 (Met15Ile)	G	435	99,8	A	0,46	0,498
	A	1	0,2			
rs1800447 (Trp28Arg)	T	409	93,0	C	6,95	0,943
	C	31	7,0			
rs34349826 (Ile35Thr)	T	406	93,1	C	6,86	0,987
	C	30	6,9			
rs6521 (Val38=)	C	182	42,1	C	49,4	0,006
	G	250	57,9			
rs1056914 (Pro44=)	A	179	41,4	A	49,4	0,002
	C	253	58,6			
rs1056917 (95Gly=)	T	142	32,7	T	42,5	0,000
	C	292	67,3			

^a Nomenclatura dos polimorfismos do gene *LHB* humano conforme base de dados PubMed, com posição de troca dos aminoácidos na proteína (69).

^b Alelos selvagens (WT) e variantes (VAR), respectivamente, para cada polimorfismo.

^c Frequência mundial do alelo menor (MAF) descrita no banco de dados PubMed (70).

**Valor exato de *p* para o nível de significância estatística quanto às diferenças da prevalência do alelo menor entre as amostras de casos e controles em relação à prevalência mundial.

A prevalência do alelo menor diferiu significativamente em relação à frequência descrita no PubMed, para três polimorfismos sinônimos (rs6521/Val38=, rs1056914/Pro44= e rs1056917/95Gly=) dentre os seis polimorfismos estudados, cuja informação sobre a MAF constava nesse banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)(70).

As prevalências do alelo menor (MAF) para os polimorfismos rs5030775 (Thr18Ala), rs35296413 (Pro27=), rs35270001 (His30Arg) e rs5030774(Gly122Ser) não estavam descritas nos bancos de dados do PubMed ou 1000Genomes consultados até novembro de 2011 (70, 71).

6. DISCUSSÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) continua sendo considerada um distúrbio complexo e heterogêneo de etiologia desconhecida, mesmo após décadas de estudo desde sua descrição original (7). O agrupamento familiar dos casos, uma maior concordância em gêmeos monozigóticos em comparação de gêmeos heterozigóticos e a herdabilidade de características endócrinas e metabólicas da SOP fornecem uma base sólida para a investigação sobre o envolvimento de fatores genéticos na sua etiologia (72-74). No entanto, até o momento, a base genética da síndrome permanece controversa (18). Um problema potencial na determinação do seu modo de herança é a heterogeneidade fenotípica e a ausência de critérios diagnósticos universalmente aceitos, fazendo com que os resultados dos estudos realizados nesse sentido sejam, muitas vezes, ambíguos ou não reproduzíveis.

Vários genes envolvidos na reprodução, na obesidade e regulação de energia, genes que afetam a secreção ou ação da insulina e aqueles que codificam as enzimas esteroidogênicas na via de biossíntese de andrógenos têm sido testados como genes candidatos (75).

Anormalidades neuroendócrinas foram associadas à ocorrência de SOP e são representadas principalmente pelo aumento na amplitude dos pulsos de LH, resultado de um aumento da sensibilidade da hipófise à estimulação pelo GnRH. Esses fatores aliados à relevante ação dessa gonadotrofina no estímulo à esteroidogênese ovariana justificam o estudo dos polimorfismos de sua subunidade beta específica no contexto da SOP (13).

Desde a primeira descrição, em 1992, de uma forma variante do *LHB* em uma população de mulheres finlandesas, achado prontamente replicado em diversas partes do mundo, a atenção tem-se voltado principalmente para as seguintes questões: quais alterações clínicas estariam relacionadas à presença das variantes, qual o mecanismo através do qual polimorfismos genéticos aumentam o risco para essas alterações e como utilizar essa informação para gerar melhores instrumentos de predição do risco (53).

Estudos *in vitro* demonstraram que a variante Trp8Arg/Ile15Thr, também representada por Trp28Arg/Ile35Thr (rs1800447e rs3434986), é mais ativa que a forma selvagem do LH (WT-LH), com efeito máximo cerca de 20% maior. Em

contraste, essa mesma variante apresentou uma menor meia-vida na circulação quando comparada ao WT-LH (26 vs 48 min). Essas características conferem à variante Trp8Arg/Ile15Thr uma maior afinidade ou bioatividade junto ao receptor, porém, com duração de ação mais curta (59).

Ainda não está claro se algum fenótipo específico está relacionado à presença de variantes do LH. É possível que polimorfismos para o alelo variante, em hetero ou homozigose, possam originar diferentes fenótipos. Presumido que a V-LH Trp8Arg/Ile15Thr represente uma forma potente, mas de curta duração de LH, e WT-LH uma forma menos potente, mas de longa duração, uma combinação de ambas as formas, como ocorre em heterozigotos, poderia levar a um perfil de ação modificado do LH, em relação a qualquer das formas em homozigose. Essas diferenças qualitativas entre as ações de WT-LH e V-LH fornecem evidências dos possíveis efeitos fenotípicos das variantes do LH. Se a diferença entre as duas formas de hormônio fosse apenas quantitativa, poderia ser totalmente compensada por alterações na regulação do feedback da secreção de LH (49). Vários distúrbios da função hipófise-gonadal têm sido descritas relacionadas às variantes do LH (55-58, 76).

Com base nestas informações sugestivas de uma possível repercussão funcional de variantes da subunidade beta específica do LH na fisiopatogenia de disfunções reprodutivas, esse estudo buscou identificar inicialmente a prevalência de variantes na subunidade beta do LH em um grupo de mulheres brasileiras portadoras de SOP e em um grupo de mulheres controle. Numa segunda etapa, partindo da hipótese de alterações na bioatividade de variantes do LH em relação ao WT-LH e considerando a ampla heterogeneidade clínica da SOP, buscou-se verificar se a presença dessas variantes poderia influenciar a intensidade e o padrão de manifestações clínicas da SOP, por meio da análise das associações dessas variantes com parâmetros clínicos e laboratoriais da síndrome, especificamente aqueles relacionados à resistência insulínica e ao hiperandrogenismo.

A presente casuística consistiu de 130 pacientes com SOP, sendo 85 acompanhadas nos ambulatórios de ginecologia e endocrinologia do HC/FMUSP e 45 acompanhadas no ambulatório de endocrinologia do HUB/UnB, além de 96 controles do sexo feminino.

Uma vez que no presente estudo um dos principais objetivos foi associar os polimorfismos do gene *LHB* com os parâmetros clínicos e laboratoriais da SOP, a

caracterização clínica detalhada e minuciosa dos indivíduos foi fundamental. Assim, pelo fato de que a amostra foi constituída por indivíduos provenientes de dois serviços diferentes e para assegurar a fidedignidade das análises descritivas e comparativas possíveis, inicialmente a avaliação foi realizada em separado, de acordo com a procedência dos casos (grupos SOP-1 e SOP-2). Todos os casos, entretanto, tiveram o diagnóstico baseado nos mesmos critérios, definidos no consenso de Rotterdam, em 2003, revisto em 2004 (5).

6.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA AMOSTRA DE MULHERES COM SOP

A média de idade não diferiu entre os dois grupos, variando de 14 a 42 anos. Os grupos também foram estatisticamente semelhantes no que diz respeito ao IMC, cujo intervalo variou de 16,2 a 44,9 kg/m², com média de 28,7 kg/m². Observou-se que a prevalência de sobrepeso ou obesidade, definida por IMC igual ou superior a 25 kg/m², foi de 66,7% entre as mulheres com SOP, corroborando dados da literatura, que reportam uma prevalência de obesidade na SOP de 16% a 80%, de acordo com a população estudada (77). Esta prevalência é maior do que a observada na população geral do sexo feminino em nosso meio. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) sobre o período de 2008-2009, a prevalência de sobrepeso e obesidade em mulheres da população geral com idades superiores a 20 anos foi de 16,9% no nosso país (78).

As manifestações clínicas de hiperandrogenismo na mulher incluem, mais comumente, hirsutismo, acne e alopecia androgênica (79). Uma das limitações do presente estudo foi que a presença de hiperandrogenismo foi definida apenas por meio do escore semi-quantitativo de Ferriman e Gallwey (escore ≥ 8), enquanto não foram analisadas a ocorrência de acne, alopecia ou outras manifestações hiperandrogênicas. Optou-se por restringir a análise ao EFG, uma vez que este era o único parâmetro de hiperandrogenismo clinicamente definido que estava disponível para ambos os grupos de mulheres com SOP.

As médias do escore de Ferriman e Gallwey (EFG) dos dois grupos foi semelhante, entretanto, a prevalência de hirsutismo foi significativamente diferente, com 82,5% de mulheres hirsutas no grupo SOP-1 e 52,5% no grupo SOP-2

($p=0,000$). O diagnóstico de hirsutismo utilizando esse critério é passível de críticas, por tratar-se de um índice subjetivo, examinador dependente, sujeito ao tempo de depilação da paciente, o qual não foi uniformizado e definido nos critérios de inclusão. Além disso, esse escore não diferencia a importância relativa do acometimento de diferentes áreas corporais analisadas e não considera a velocidade de crescimento dos pêlos corporais (80). No presente estudo, é necessário considerar que a avaliação do EFG, embora uniformizada dentro de cada grupo, foi realizada por dois examinadores diferentes, sendo um em São Paulo (grupo SOP-1) e outro em Brasília (grupo SOP-2), o que poderia justificar em grande parte as diferenças encontradas entre os respectivos grupos.

Quanto aos parâmetros laboratoriais, diferenças inerentes à metodologia empregada para as determinações hormonais, bem como à disponibilidade de exames entre os dois grupos constituíram as principais dificuldades à análise. Como relatado, não foi possível obter, retrospectivamente, algumas dosagens para determinados parâmetros. Dessa forma, a maioria das medidas de concentrações hormonais médias apresenta valor meramente descritivo, enquanto variáveis contínuas, não tendo sido possível realizar análises comparativas quantitativas ou associativas, limitando assim as inferências quanto à influência de variantes no LH sobre as manifestações laboratoriais da SOP.

Entretanto, a fim de possibilitar a comparação entre os dois grupos das manifestações laboratoriais relacionadas à hiperandrogenemia, essas variáveis foram categorizadas em normais (dentro dos valores de referência para o método utilizado) e acima do limite superior de normalidade (LSN).

A hiperandrogenemia foi definida pela elevação da dosagem de testosterona total (TT) acima do valor de referência para o método. Esse dado esteve disponível para a quase totalidade dos casos em ambos os grupos, permitindo comparação entre os mesmos. A concentração sérica média da TT foi acima do LSN para o método no grupo SOP-1, com valor médio normal para o grupo SOP-2 (tabela 4).

A análise da concentração de TT categorizada para os dois grupos em normal e elevada, conforme respectivos valores de referência, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, com maior proporção de pacientes com TT elevada no grupo SOP-1 ($p=0,020$). Conforme discutido, esse grupo também apresentou maior proporção de mulheres hirsutas (82,5% vs 52,5% no grupo SOP-2). Além disso, verificou-se diferença entre os grupos em relação à

intensidade do hirsutismo (leve ou severo; tabela 5). Esses dados, em conjunto, evidenciaram as diferenças entre as manifestações clínicas e laboratoriais do hiperandrogenismo entre os dois grupos, corroborando a conceito de heterogeneidade clínica na amostra, comum em estudos de populações com SOP.

A análise comparativa dos parâmetros de hiperandrogenismo segundo o IMC normal ou aumentado, isto é, agrupando mulheres com sobrepeso e obesas entre os grupos SOP-1 e SOP-2 foi realizada com o intuito de explorar possível associação entre esses dois parâmetros. No presente estudo, não foram observadas diferenças entre as médias de TT ou na proporção de mulheres com TT elevada entre as mulheres com IMC normal ou obesas. Já a média do score de Ferriman e Gallwey foi maior entre as mulheres obesas de ambos os grupos, porém no grupo SOP-1 esse valor foi significativamente superior para as mulheres com obesidade (tabela 6). Vale destacar ainda que no grupo SOP-1, mesmo as mulheres com peso normal tiveram a média de concentração plasmática de TT acima do LSN, confirmando a tendência para um maior grau de hiperandrogenismo nesse grupo.

A concentração sérica do LH estava disponível apenas para o grupo SOP-2, em 44 casos, com valor médio dentro dos limites esperados para fase folicular (tabela 6). É descrito que cerca de 40% das mulheres com SOP têm hipersecreção de LH (49). Na amostra em questão a prevalência de elevação da dosagem de LH foi de apenas 18,1% (8 em 44 casos), porém, o número reduzido de casos analisados prejudicou a interpretação desse resultado.

A dosagem de SHBG esteve disponível em 75 pacientes do grupo SOP-1 e sua concentração média situou-se dentro do valor de referência (tabela 4). Por outro lado, verificou-se que as concentrações de SHBG foram significativamente superiores no subgrupo de mulheres com IMC normal em relação àquelas com obesidade (tabela 6). Esse mesmo subgrupo de mulheres com IMC elevado no grupo SOP-1 apresentou uma prevalência significativamente superior de resistência à insulina (tabela 8). Tal resultado está de acordo com o achado de concentrações menores de SHBG nas mulheres obesas com SOP, uma vez que o excesso circulante de insulina parece contribuir para a diminuição da produção hepática de SHBG, resultando em concentrações mais elevadas de testosterona livre ou biodisponível (15). Estudos demonstram ainda que mulheres com SOP e hiperinsulinemia e/ou resistência insulínica apresentam melhora tanto da hiperandrogenemia quanto da função ovulatória quando tratadas com

sensibilizadores de insulina (16, 17).

A prevalência de distúrbios do metabolismo da glicose (intolerância à glicose e DM tipo 2) na SOP é maior do que a observada na população geral para a mesma faixa etária (81). No presente estudo, as médias das glicemias de jejum não diferiram entre os grupos, com valor médio de 89,4 mg/dL nos casos, variando de 68 a 125 mg/dL (tabela 4).

No que diz respeito à prevalência de glicemia de jejum alterada (GJA), os dois grupos também não diferiram estatisticamente, provavelmente em virtude do tamanho das amostras, uma vez que a prevalência de GJA foi de 9,6% no grupo SOP-1 e 20,5% no grupo SOP-2 ($p=0,079$), não havendo nenhum paciente com glicemia de jejum ≥ 126 , que poderia sugerir o diagnóstico de DM tipo 2 (tabela 5). Estes dados estão baseados nos valores de glicemia obtidos em jejum, definidos de acordo com os critérios atuais da *American Diabetes Association* (ADA) (82).

A prevalência de DM tipo 2 na presente amostra provavelmente foi subestimada pela ausência do teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Os níveis de glicose de jejum são, sabidamente, preditores pobres para o DM tipo 2 em pacientes com SOP. Um estudo realizado por Legro et al. que descreveu a prevalência para as alterações no metabolismo da glicose em mulheres com SOP nos Estados Unidos encontrou valores de 31,1% para intolerância à glicose e 7,5% para DM tipo 2. No entanto, esse trabalho reportou que poucas mulheres com intolerância à glicose tinham valores de glicemia de jejum alterados. Usando os critérios da ADA, apenas 3,2% das mulheres com SOP teriam sido classificadas como tendo diabetes apenas pela glicemia de jejum, enquanto que 7,5% tiveram esse diagnóstico após realização do teste oral, mostrando uma diferença de 4,3% na sua prevalência (81).

Em 1980, Burghen et al., sugeriram pela primeira vez a presença de RI em pacientes com SOP, através de um estudo controlado, no qual as portadoras da síndrome apresentaram maior resposta de insulina após sobrecarga de glicose quando comparadas ao grupo controle (83).

A prevalência de RI na SOP tem sido descrita em até 50% das pacientes, independente da presença de obesidade, havendo evidências que ela se faz tanto no nível periférico quanto no hepático (84). O método considerado padrão ouro para sua avaliação é o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Como este estudo foi realizado de maneira retrospectiva, o dado disponível para avaliação da RI foi o

cálculo do HOMA-IR.

Quando avaliados quanto à prevalência de resistência insulínica (RI), definida por um HOMA-IR $\geq 2,7$, os dois grupos de mulheres com SOP foram estatisticamente semelhantes e mostraram prevalências de RI similares à descrita na literatura, a saber: 52,9% para o grupo SOP-1 e 52,3% para o grupo SOP-2. Quando as pacientes foram subdivididas conforme IMC em subgrupos com peso normal (IMC < 25 kg/m²) e alterado (IMC ≥ 25 kg/m²), a prevalência de resistência insulínica foi significativamente maior nas pacientes obesas do grupo SOP-1 (p=0,011). Esse achado reitera o fato de o parâmetro de RI utilizado no estudo (HOMA-IR) foi influenciado pela presença de obesidade, nesse grupo de indivíduos. Entretanto, o mesmo não se reproduziu nas pacientes do grupo SOP-2 (p=0,752), apesar da distribuição semelhante dos grupos quanto ao IMC. Apesar da RI na SOP ocorrer independentemente do IMC, há evidências de que a obesidade amplifica a RI na síndrome (85).

6.2 ESTUDO MOLECULAR

Desde sua primeira descrição por Petterson et al. em 1992, a frequência mundial da variante Trp8Arg/Ile15Thr do *LHB* (V-LH) tem sido extensivamente estudada em diferentes grupos étnicos (20, 54, 56, 86). Neste trabalho, a análise da região codificante do *LHB*, que corresponde à sequência dos exons 2 e 3, permitiu a identificação de onze polimorfismos, sendo um deles ainda não descrito em bancos de dados (PubMed e/ou 1000genomes) (70, 71).

Os alelos selvagem (WT-LH) e V-LH apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as variantes analisadas, assim como demonstrado por todos os grupos já estudados quanto ao *LHB*, com um número representativo de casos (49, 69).

Dentre os onze polimorfismos, apenas oito estavam presentes nessa amostra. Os polimorfismos rs35296413 (Pro27=), rs35270001 (His30Arg) e rs5030774 (Gly122Ser) não foram encontrados na população estudada. Os resultados da comparação das distribuições das frequências genotípica e alélica entre casos e controles, bem como a análise da associação da presença das variantes com a

ocorrência de SOP (tabelas 10, 11 e 12) mostram que não houve associação entre a presença dos polimorfismos e a ocorrência de SOP. Isso corrobora a hipótese atualmente aceita na literatura, da ausência de um papel causal do *LHB* na etiologia da SOP (20, 21). A análise das frequências nos casos e nos controles apresentadas nesse estudo corroboram esse conceito e tem importância por acrescentar informações de uma casuística brasileira de mulheres com e sem SOP, até o momento ainda não descrita na literatura.

A despeito disso, destacamos que a presença do novo polimorfismo descrito (233C>A/Thr78Asn) revelou um OR=3,96 para a associação entre presença do polimorfismo e a presença da SOP, com amplo intervalo de confiança (95% IC= 0,43-189,12) (tabela 14). Esse polimorfismo esteve presente em um dos 95 controles e em 5 dos 130 casos, somente em heterozigose. Provavelmente a análise de sua prevalência em uma amostra maior diminuiria o intervalo de confiança, conferindo maior poder de julgamento para o seu papel na suscetibilidade à SOP.

As análises das associações entre a presença das variantes nos grupos de mulheres com SOP e os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados à RI e ao hiperandrogenismo na SOP foram realizadas para seis dos oito polimorfismos identificados no estudo.

Os polimorfismos rs34247911 (Met15Ile) e rs5030775 (Thr18Ala) tiveram apenas uma representante cada, distintas, ambas em heterozigose, portanto, impossibilitando a análise de associações com as manifestações clínicas da SOP, dada a sua raridade.

Para avaliação da influência das variantes alélicas sobre as manifestações clínicas relacionadas à RI e ao hiperandrogenismo na SOP, os polimorfismos rs1800447 (Trp8Arg) e rs34349826 (Ile15Thr) foram analisados em conjunto, uma vez que se apresentam em desequilíbrio de ligação. São os polimorfismos mais estudados do *LHB*, inclusive *in vitro*, considerados potencialmente patogênicos, conforme descrição na base de dados PubMed (20,60,65). Estes polimorfismos também são descritos na literatura como Trp28Arg/Ile35Thr, ou seja, em uma posição na proteína com 20 aminoácidos a mais, tal qual descrito no presente estudo. Essa diferença equivale ao peptídeo sinal, que é transcrito, traduzido e posteriormente clivado, não fazendo parte da proteína *LHB* madura (49). Neste trabalho utilizou-se a contagem de nucleotídeos e aminoácidos conforme a sequência referência mais atual, correspondente à sequência codificante do gene:

CCDS 12748.1 (67). Essa sequência inclui o peptídeo sinal, assim como a sequência correspondente da proteína *LHB*, equivalente à proteína precursora.

Para a análise da associação dos polimorfismos rs1800447 (Trp28Arg) e rs34349826 (Ile35Thr) com as manifestações clínicas da SOP, foram incluídas 125 mulheres com SOP, com dados de sequenciamento válidos. A presença de hiperandrogenemia, definida por níveis de testosterona total acima do LSN foi significativamente maior no grupo portador destas variantes ($p=0,015$) (tabela 13).

A maior prevalência de hiperandrogenemia nos portadores desses polimorfismos pode ser justificada pelos estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram uma maior bioatividade desse LH variante em relação ao selvagem (WT), a despeito de uma meia vida menor (61). Estes dois polimorfismos, juntamente com o rs5030774 (Gly122Ser), para o qual não tivemos nenhuma variante detectada tanto em casos como em controles, estão descritos na base de dados do PubMed como potencialmente patogênicos (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) (70).

Para a análise da associação do polimorfismo 233C>A/Thr78Asn com as manifestações clínicas da SOP, foram incluídas 125 mulheres com SOP, com dados de sequenciamento válidos. É possível especular sobre um efeito protetor do mesmo para o hirsutismo severo, uma vez que todas as 5 pacientes portadoras da variante em heterozigose apresentaram hirsutismo leve, e, embora essa associação não tenha revelado resultado estatisticamente significativo em nível de $p<0,05$, o valor de p foi de 0,063, sugerindo uma possível associação no estudo de uma amostra maior. O estudo de homozigotos para essa variante também poderia contribuir para esclarecer esse dado. Supondo que haja um efeito protetor na presença do polimorfismo, é possível elocubrar que esteja relacionado à troca de uma treonina por uma asparagina nessa variante, tornando-a mais semelhante ao hCG em comparação com o LH selvagem (figura 6). Além de estudos com maiores casuísticas, a realização de estudos *in vitro* também poderiam contribuir para elucidar um possível efeito biológico da presença dessa nova variante sobre a produção androgênica e, conseqüentemente, o hirsutismo. Para os demais parâmetros não foram observadas associações dignas de nota (tabela 14).

Os polimorfismos sinônimos tendem a ser assumidos como neutros, uma vez a troca do alelo gera um códon que codifica o mesmo aminoácido naquela posição da proteína. Entretanto, a análise desses polimorfismos é relevante, uma vez que eles nem sempre podem ser considerados neutros, pois determinados códon são

traduzidos de forma mais eficiente (mais rápido e/ou com mais precisão) do que outros. Outra razão pela qual as mudanças em sinônimo nem sempre são silenciosas é o fato de que as seqüências codantes localizadas próximas ao intron funcionam como sinais de *splicing* para o RNA. Quando o sinal de *splicing* é destruído por uma mutação em sinônimo, o exon não aparece na proteína final, resultando em uma proteína truncada (87).

Os outros 3 polimorfismos avaliados quanto à influência sobre parâmetros da SOP são sinônimos (rs6521/Val38=, rs1056914/Pro44=, rs1056917/95Gly=) e não influenciaram os parâmetros clínicos de forma significativa, apesar de sua elevada prevalência (tabelas A01-03, Anexo A). A frequência do alelo menor (MAF) para esses polimorfismos no presente estudo diferiu significativamente das prevalências globais na população mundial descritas no PubMed. Apesar disso, não foi observada repercussão clínica relacionada a essas formas variantes. Nessa análise, chamou a atenção a associação da variante rs6521 (Val38=) com uma suposta proteção contra hirsutismo, embora sem resultado significativamente estatístico ($p=0,094$).

A fim de comparar a prevalência dos polimorfismos na amostra com dados referentes à população mundial, foi calculada a frequência do alelo menor para as seis variantes que tinham esse dado disponível no PubMed. A frequência mundial do alelo menor (MAF) refere-se a frequência na qual o alelo menos comum ocorre em uma determinada população para cada polimorfismo e este conceito tem sido amplamente empregado em estudos de associação ampla para características complexas no genoma. As frequências de alelo menor $< 5\%$ tendem a ser excluídas, pois exigem grande poder estatístico para produzir declarações significativas (88).

Como as frequências genóticas e alélicas avaliadas não diferiram entre os grupos (SOP e controles) e levando em consideração que os dados para MAF disponíveis no PubMed são populacionais, a frequência do menor alelo foi avaliada nesta população somando casos e controles (tabela 15).

O polimorfismo rs34247911 (Met15Ile) apresentou MAF semelhante à relatada na população mundial, porém esse dado é limitado pela baixa prevalência descrita para este alelo (0,46%). Todos os outros polimorfismos avaliados apresentam uma MAF $> 5\%$ para a população.

As variantes que segregam em conjunto: rs1800447 (Trp8Arg) e rs34349826 (Ile15Thr) apresentaram frequências extremamente semelhantes entre si, as quais também foram semelhantes à MAF relatada para a população (tabela 15).

As três variantes sinônimas apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à MAF da população mundial, o que pode ser atribuído ao pequeno tamanho amostral, ou ainda à grande heterogeneidade genética da nossa população, secundária à miscigenação. Um estudo da prevalência dessas variantes em outra amostra de mulheres brasileiras poderia esclarecer esse dado.

7. CONCLUSÕES

- A distribuição dos parâmetros clínicos e laboratoriais relacionadas à resistência insulínica e ao hiperandrogenismo nas mulheres portadoras da SOP estudadas foi semelhante àquela reportada na literatura.

- As frequências alélicas e genóticas para onze polimorfismos na região codificante do gene *LHB* (subunidade beta do LH) em uma amostra de mulheres brasileiras com e sem a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) foram descritas. Os polimorfismos analisados no gene *LHB* não foram relacionados à susceptibilidade para a SOP na presente amostra de mulheres brasileiras, corroborando os achados disponíveis na literatura.

- Descreve-se uma nova variante alélica na posição 233, no éxon 3, (233C>A), de ocorrência rara (frequência alélica 2,04%), presente em heterozigose em cinco mulheres com SOP da amostra estudada. Observou-se tendência a um risco aumentado de doença associado à presença do novo polimorfismo 233C>A (Thr78Asn), embora sem significância estatística (OR = 3,96 - IC95% = 0,43-189,12). A análise de sua prevalência em maior número de casos poderia conferir maior poder de julgamento para o seu eventual papel na suscetibilidade à SOP. Essa variante parece conferir possível efeito protetor quanto ao hirsutismo grave nas mulheres com SOP.

- A prevalência de hiperandrogenemia, definida por concentrações elevadas de testosterona local, foi significativamente maior nas mulheres com SOP portadoras dos polimorfismos rs1800447 e rs34349826 (Trp8Arg/Ile15Thr), em relação àquelas com genótipo selvagem para esses polimorfismos. Os demais polimorfismos estudados não influenciaram os parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados à resistência insulínica e o hiperandrogenismo na SOP.

- A frequência do alelo menor (MAF), utilizada para comparação da prevalência de polimorfismos entre populações, foi semelhante à descrita na base de dados PubMed para os três polimorfismos não-sinônimos identificados na região codificante do *LHB* (rs34247911/Met15Ile, rs1800447/Trp28Arg e

rs34349826/Ile35Thr), porém diferiu significativamente para os polimorfismos sinônimos (rs6521/Val38=, rs1056914/Pro44= e rs1056917/95Gly=), o que pode estar relacionado à heterogeneidade genética da população brasileira.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2745-9. Epub 2004/06/08.
2. Alexander CJ, Tangchitnob EP, Lepor NE. Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(4):232-9. Epub 2010/01/30.
3. Lobo RA, Carmina E. The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med.* 2000;132(12):989-93. Epub 2000/06/17.
4. Schroeder BM. ACOG releases guidelines on diagnosis and management of polycystic ovary syndrome. *Am Fam Physician.* 2003;67(7):1619-20, 22. Epub 2003/05/02.
5. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19(1):41-7. Epub 2003/12/23.
6. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 2009;91(2):456-88. Epub 2008/10/28.
7. Stein I, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-91.
8. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1995;333(13):853-61. Epub 1995/09/28.
9. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol.* 1999;13(6):946-57. Epub 1999/06/24.
10. Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology.* 1997;47(1):93-9. Epub 1997/07/01.
11. Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163(1-2):49-52. Epub 2000/08/30.

12. Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Fox J, Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(25):14956-60. Epub 1998/12/09.
13. Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, Hall JE. Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(7):2343-9. Epub 1998/07/14.
14. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine reviews*. 1999;20(4):535-82. Epub 1999/08/24.
15. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1991;72(1):83-9. Epub 1991/01/01.
16. Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J, Sattar N. Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2003;361(9372):1894-901. Epub 2003/06/06.
17. Baillargeon JP, Jakubowicz DJ, Luorno MJ, Jakubowicz S, Nestler JE. Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertil Steril*. 2004;82(4):893-902. Epub 2004/10/16.
18. Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(2):103-11. Epub 2007/01/24.
19. Segars JH, DeCherney AH. Is there a genetic basis for polycystic ovary syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2058-60. Epub 2010/05/07.
20. Elter K, Erel CT, Cine N, Ozbek U, Hacıhanefioglu B, Ertunçalp E. Role of the mutations Trp8 => Arg and Ile15 => Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1999;71(3):425-30. Epub 1999/03/05.
21. Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia*. 2009;13(4):216-23. Epub 2009/12/17.

22. Borba MDR. Análise da Frequência de polimorfismos no gene LHB e parâmetros clínicos em portadoras de Síndrome de Ovários Policísticos. Brasília (DF): Universidade de Brasília (UnB); 2009.
23. Gross KM, Matsumoto AM, Bremner WJ. Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by luteinizing hormone-releasing hormone pulse frequency in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(4):675-80. Epub 1987/04/01.
24. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology.* 1991;128(1):509-17. Epub 1991/01/01.
25. Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ. Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(2):378-83. Epub 1984/02/01.
26. Goodman RL, Bittman EL, Foster DL, Karsch FJ. The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology.* 1981;109(5):1414-7. Epub 1981/11/01.
27. Nippoldt TB, Reame NE, Kelch RP, Marshall JC. The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69(1):67-76. Epub 1989/07/01.
28. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF, Jr. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62(6):1136-44. Epub 1986/06/01.
29. McCartney CR, Gingrich MB, Hu Y, Evans WS, Marshall JC. Hypothalamic regulation of cyclic ovulation: evidence that the increase in gonadotropin-releasing hormone pulse frequency during the follicular phase reflects the gradual loss of the restraining effects of progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2194-200. Epub 2002/05/08.
30. Adams JM, Taylor AE, Schoenfeld DA, Crowley WF, Jr., Hall JE. The midcycle gonadotropin surge in normal women occurs in the face of an unchanging gonadotropin-releasing hormone pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(3):858-64. Epub 1994/09/01.

31. Kirk SE, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology*. 1994;135(3):876-80. Epub 1994/09/01.
32. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril*. 2001;76(5):943-9. Epub 2001/11/13.
33. Marshall JC, Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(2):295-324. Epub 1999/06/03.
34. Berga SL, Yen SS. Opioidergic regulation of LH pulsatility in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1989;30(2):177-84. Epub 1989/02/01.
35. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF, Jr. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(1):165-72. Epub 1988/01/01.
36. Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):351-61. Epub 2006/05/04.
37. Chang RJ, Mandel FP, Lu JK, Judd HL. Enhanced disparity of gonadotropin secretion by estrone in women with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(3):490-4. Epub 1982/03/01.
38. Dunaif A, Longcope C, Canick J, Badger T, Crowley WF, Jr. The effects of the aromatase inhibitor delta 1-testolactone on gonadotropin release and steroid metabolism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60(4):773-80. Epub 1985/04/01.
39. Dunaif A, Graf M. Insulin administration alters gonadal steroid metabolism independent of changes in gonadotropin secretion in insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest*. 1989;83(1):23-9. Epub 1989/01/01.
40. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril*. 2005;83(5):1454-60. Epub 2005/05/04.
41. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjo T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril*. 1993;59(2):323-31. Epub 1993/02/01.

42. Eagleson CA, Bellows AB, Hu K, Gingrich MB, Marshall JC. Obese patients with polycystic ovary syndrome: evidence that metformin does not restore sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by ovarian steroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5158-62. Epub 2003/11/07.
43. Mehta RV, Patel KS, Coffler MS, Dahan MH, Yoo RY, Archer JS, et al. Luteinizing hormone secretion is not influenced by insulin infusion in women with polycystic ovary syndrome despite improved insulin sensitivity during pioglitazone treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2136-41. Epub 2005/01/13.
44. Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):582-90. Epub 1998/02/19.
45. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, et al. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(11):4047-52. Epub 2000/11/30.
46. Sir-Petermann T, Piwonka V, Perez F, Maliqueo M, Recabarren SE, Wildt L. Are circulating leptin and luteinizing hormone synchronized in patients with polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod.* 1999;14(6):1435-9. Epub 1999/06/08.
47. Nacul A, Comim F, Spritzer PM. Aspectos neuroendócrinos na síndrome dos ovários policísticos. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2003;47(4):432-39.
48. Oksanen L, Tiitinen A, Kaprio J, Koistinen HA, Karonen S, Kontula K. No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(10):873-6. Epub 2000/09/28.
49. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.* 2000;21(5):551-83. Epub 2000/10/21.
50. Bulun S, Adashi E. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Larsen P, Kronenberg HM, Melmed S, and Polonsky, KS, editor. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Saunders; 2008. p. 587-648.
51. Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 1988;263(1):36-44. Epub 1988/01/05.

52. Henke A, Gromoll J. New insights into the evolution of chorionic gonadotrophin. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;291(1-2):11-9. Epub 2008/07/05.
53. Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1992;74(1):164-71. Epub 1992/01/01.
54. Nilsson C, Pettersson K, Millar RP, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi IT. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril.* 1997;67(6):998-1004. Epub 1997/06/01.
55. Takahashi K, Kurioka H, Ozaki T, Kanasaki H, Kohsaka M, Miyazaki K, et al. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. *Hum Reprod.* 1998;13(12):3338-44. Epub 1999/01/14.
56. Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, Miyazaki K. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 1999;71(1):96-101. Epub 1999/02/06.
57. Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R, Siimes MA, Hagenas L, Nilsson C, et al. The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3278-82. Epub 1996/09/01.
58. van den Beld A, Huhtaniemi IT, Pettersson KS, Pols HA, Grobbee DE, de Jong FH, et al. Luteinizing hormone and different genetic variants, as indicators of frailty in healthy elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(4):1334-9. Epub 1999/04/13.
59. Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamaki A, Huhtaniemi I. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(4):1257-63. Epub 1995/04/01.
60. Takahashi K, Kurioka H, Ozaki T, Kanasaki H, Miyazaki K, Karino K. Pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in women with variant luteinizing hormone. *Eur J Endocrinol.* 2000;143(3):375-81. Epub 2000/10/07.
61. Suganuma N, Furui K, Kikkawa F, Tomoda Y, Furuhashi M. Effects of the mutations (Trp8 --> Arg and Ile15 --> Thr) in human luteinizing hormone (LH) beta-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 1996;137(3):831-8. Epub 1996/03/01.

62. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;21:1440-7. Epub 1961/11/01.
63. Martin KA, Chang RJ, Ehrmann DA, Ibanez L, Lobo RA, Rosenfield RL, et al. Evaluation and treatment of hirsutism in premenopausal women: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1105-20. Epub 2008/02/07.
64. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;72(2):219-20. Epub 2005/11/29.
65. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10(4):506-13. Epub 1991/04/01.
66. Shiraishi K, Naito K. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the beta subunit of luteinizing hormone. *Endocr J.* 2003;50(6):733-7. Epub 2004/01/08.
67. PubMed - US National Library of Medicine/National Institutes of Health. LHB Homo Sapiens Gene Sequence. in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3972>. [10.nov.2011].
68. Brandstätter E. Confidence intervals as an alternative to significance tests. *Methods of Psychological Research Online* 1999, Vol4, No2 [Internet]. 1999 02/11/2011; 4(2):[33-46 pp.].
69. Ryckman K, Williams SM. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. *Curr Protoc Hum Genet.* 2008;Chapter 1:Unit 1 18. Epub 2008/04/23.
70. PubMed - US National Library of Medicine/National Institutes of Health. DbSNP Short Genetic Variations. in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> [10.nov.2011].
71. 1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Gene: LHB (g=ENSG00000104826). in: <http://browser.1000genomes.org>. [10.nov.2011].
72. Lunde O, Magnus P, Sandvik L, Hoglo S. Familial clustering in the polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 1989;28(1):23-30. Epub 1989/01/01.

73. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2100-4. Epub 2005/10/13.
74. Franks S, Webber LJ, Goh M, Valentine A, White DM, Conway GS, et al. Ovarian morphology is a marker of heritable biochemical traits in sisters with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3396-402. Epub 2008/06/19.
75. Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2002;147(6):717-25. Epub 2002/11/30.
76. Sukanuma N, Furui K, Furuhashi M, Asada Y, Kikkawa F, Tomoda Y. Screening of the mutations in luteinizing hormone beta-subunit in patients with menstrual disorders. *Fertil Steril.* 1995;63(5):989-95. Epub 1995/05/01.
77. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800. Epub 1997/12/31.
78. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares – POF 2008/2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. [citado em 27 ago 2010]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1 [16.11.2011].
79. Marcondes JAMH, S.A.Y.; Bachega, T.A.S.S. Hirsutismo e Síndrome dos Ovários Policísticos. In: Saad MJA, editor. *Endocrinologia*. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 635-82.
80. Barth JH, Yasmin E, Balen AH. The diagnosis of polycystic ovary syndrome: the criteria are insufficiently robust for clinical research. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(6):811-5. Epub 2007/09/01.
81. Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(1):165-9. Epub 1999/01/27.
82. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 1:S11-61. Epub 2011/01/14.

83. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50(1):113-6. Epub 1980/01/01.
84. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989;38(9):1165-74. Epub 1989/09/01.
85. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, McHugh-Pemu KP, Zborowski JV, Remsberg KE, et al. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):2414-21. Epub 2000/11/14.
86. Ramanujam L, Liao WX, Roy AC, Ng SC, Ratnam SS. Molecular variants of luteinizing hormone in three populations of Southeast Asia. *Hum Hered.* 1998;48(4):232-4. Epub 1998/08/07.
87. Bustamante CD, Fledel-Alon A, Williamson S, Nielsen R, Hubisz MT, Glanowski S, et al. Natural selection on protein-coding genes in the human genome. *Nature.* 2005;437(7062):1153-7. Epub 2005/10/21.
88. Panagiotou OA, Evangelou E, Ioannidis JP. Genome-wide significant associations for variants with minor allele frequency of 5% or less--an overview: A HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2010;172(8):869-89. Epub 2010/09/30.

ANEXO A

Tabela A01. Distribuição da frequência genotípica da variante rs6521 no gene *LHB* segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP

Parâmetros avaliados ^a	rs6521		<i>p</i> ^b
	WT (n=109) %	VAR (n=17) %	
Hirsutismo Leve (EFG ≥ 8 e < 15)	54,6	37,2	0,094
Severo (EFG ≥ 15)	36,4	31,9	
Hiperandrogenemia	26,1	40,6	0,237
Obesidade (IMC ≥ 25)	62,5	67,4	0,639
Resistência insulínica	45,8	53,1	0,650

^aAs proporções de indivíduos para os quais o parâmetro estava ausente ou dentro da normalidade foram omitidas a fim de simplificar a tabela; a adição dessas categorias para cada parâmetro totaliza 100%. Categorias omitidas: hirsutismo ausente: escore de Ferriman e Gallwey (EFG) < 8 ; testosterona total dentro do valor de referência para o método; indivíduos com peso normal (IMC < 25); ausência de resistência insulínica de acordo com HOMA-IR.

^bValor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher.

WT (*wild type*): genótipo homocigoto selvagem; VAR: genótipos variantes heterocigotos e homocigotos.

Tabela A02. Distribuição da frequência genotípica da variante rs1056914 no gene *LHB* segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP

Parâmetros avaliados ^a	rs1056914		<i>p</i> ^b
	WT (n=120) %	VAR (n=5) %	
Hirsutismo Leve (EFG ≥ 8 e < 15)	44,4	39,8	0,268
Severo (EFG ≥ 15)	44,4	31,6	
Hiperandrogenemia	40,0	37,4	0,807
Obesidade (IMC ≥ 25)	75,0	65,7	0,603
Resistência insulínica	45,0	53,9	0,476

^aAs proporções de indivíduos para os quais o parâmetro estava ausente ou dentro da normalidade foram omitidas a fim de simplificar a tabela; a adição dessas categorias para cada parâmetro totaliza 100%. Categorias omitidas: hirsutismo ausente: escore de Ferriman e Gallwey (EFG) < 8 ; testosterona total dentro do valor de referência para o método; indivíduos com peso normal (IMC < 25); ausência de resistência insulínica de acordo com HOMA-IR.

^bValor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher.

WT (*wild type*): genótipo homocigoto selvagem; VAR: genótipos variantes heterocigotos e homocigotos.

Tabela A03. Distribuição da frequência genotípica da variante rs1056917 no gene *LHB* segundo a presença de diferentes manifestações clínicas da SOP

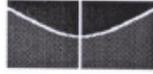
Parâmetros avaliados ^a	rs1056917		<i>p</i> ^b
	WT (n=109) %	VAR (n=17) %	
Hirsutismo Leve (EFG \geq 8 e $<$ 15)	50	39,8	0,225
Severo (EFG \geq 15)	42,9	31,6	
Hiperandrogenemia	40,0	37,4	0,807
Obesidade (IMC \geq 25)	25,0	42,6	0,273
Resistência insulínica	43,8	52,9	0,595

^a As proporções de indivíduos para os quais o parâmetro estava ausente ou dentro da normalidade foram omitidas a fim de simplificar a tabela; a adição dessas categorias para cada parâmetro totaliza 100%. Categorias omitidas: hirsutismo ausente: escore de Ferriman e Gallwey (EFG) $<$ 8; testosterona total dentro do valor de referência para o método; indivíduos com peso normal (IMC $<$ 25); ausência de resistência insulínica de acordo com HOMA-IR.

^b Valor exato de *p*, calculado pelo teste de Fisher.

WT (*wild type*): genótipo homocigoto selvagem; VAR: genótipos variantes heterocigotos e homocigotos.

ANEXO B



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa –CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 091/2007

Título do Projeto: “Análise da frequência e da repercussão da variante alélica da subunidade beta do hormônio luteinizante em indivíduos com Síndrome de Ovários Policísticos”.

Pesquisadora Responsável: Michele Delarmelina Reis Borba

Data de Entrada: 22/08/2007.

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 091/2007 com o título: “Análise da frequência e da repercussão da variante alélica da subunidade beta do hormônio luteinizante em indivíduos com Síndrome de Ovários Policísticos”. Analisado na 8ª Reunião, realizada no dia 11 de setembro de 2007.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 10 de dezembro de 2007.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro
Faculdade de Ciências da Saúde
Cep: 70.910-900

ANEXO C



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **124/09**

Título do Projeto: “Análise da frequência da variante C1430A do gene LBH e sua associação com parâmetros clínicos em mulheres com e sem a síndrome dos ovários policísticos”.

Pesquisador Responsável: Francisco de Assis Rocha Neves

Data de Entrada: 23/10/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **124/09** com o título: “Análise da frequência da variante C1430A do gene LBH e sua associação com parâmetros clínicos em mulheres com e sem a síndrome dos ovários policísticos”, analisado na 10ª Reunião Ordinária, realizada no dia 10 de novembro de 2009.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 17 de dezembro de 2009.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB