

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

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE LHB E
PARÂMETROS CLÍNICOS EM PORTADORAS DE SÍNDROME DE
OVÁRIOS POLICÍSTICOS

MICHELE DELARMELINA REIS BORBA

Brasília - DF

2009

AUTOR

Michele Delarmelina Reis Borba

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE LHB E
PARÂMETROS CLÍNICOS EM PORTADORAS DE SÍNDROME DE
OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Dissertação de conclusão de curso de
Mestrado como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde pela Universidade de Brasília – UnB

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta
Coorientadora: Dra Adriana Lofrano Alves Porto
Universidade de Brasília – UnB

BRASÍLIA – DF, 2009

Borba, Michele Delarmelina Reis.

Análise da Frequência de Polimorfismos no Gene LHB e Parâmetros Clínicos em portadoras de Síndrome de Ovários Policísticos.

Brasília (DF), 2009. 112 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília (DF)

1. Hormônio luteinizante, subunidade beta. 2. Síndrome dos Ovários Policísticos. 3. Hirsutismo. 4. Síndrome metabólica.

DEDICATÓRIA

Àquele que é a luz da minha vida,

Àquele que é minha razão e minha paz,

Porque amar é se doar a cada dia,

Amar é buscar a paz do próximo

E se ver no outro,

É sentimento sublime,

Pois “Amar é mudar a alma de casa*”.

*Mario Quintana (Carreto, Apontamentos de História Sobrenatural, 1976)

À minha metade maior.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pelo amor incondicional.

Ao meu orientador pela oportunidade de realizar esse trabalho, por sua integridade e confiança.

À Dra Adriana Lofrano que tanto me ensina a viver, trabalhar e crescer! Por dividir angústias e alegrias, e por ser muito mais que coorientadora... Meu muito obrigada, sempre!

Agradeço a Gustavo Barra pela paciência e pela ajuda fundamental na leitura e análise genéticas.

Aos funcionários do laboratório de emergências do Hospital Universitário de Brasília, pela presteza em ajudar na centrifugação das amostras sanguíneas.

Aos pacientes que participaram deste trabalho.

Aos meus sogros e cunhados pelo apoio e carinho de sempre!

Àqueles amigos que acompanharam cada etapa deste trabalho (ordem alfabética): Ana Rachel Batista, Érica Garcia, Giovana Lucena, Mariani Carla Batista, Verusa Alves.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS	21
1.2 HORMÔNIO LUTEINIZANTE	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MÉTODOS	28
3.1 SUJEITOS DO ESTUDO	28
3.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	28
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	29
3.2.1 ANAMNESE, EXAME FÍSICO E ANTROPOMETRIA	29
3.2.2 EXAMES LABORATORIAIS	30
3.2.3 EXAMES DE IMAGEM	31
3.2.4 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE, SÍNDROME METABÓLICA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA	31
3.3 ANÁLISE MOLECULAR	32
3.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	32
3.3.2 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA - PCR	32

3.3.3 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO	34
3.3.4 LEITURA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	34
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3.5 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	36
4. RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	37
4.1.1 CRITÉRIOS PARA A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS	37
4.1.2 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	38
4.1.3 AVALIAÇÃO HORMONAL	40
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	41
4.2.1 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÉXON 2 DO GENE <i>LHB</i>	42
4.2.2 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÍNTRON 2 DO GENE <i>LHB</i>	43
4.2.3 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÉXON 3 DO GENE <i>LHB</i>	43
4.2.4 PERFIS DE GENÓTIPOS	46
4.3 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS NO GENE <i>LHB</i> E PARÂMETROS CLÍNICOS	47
4.3.1 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1800447 e rs34349826	48
4.3.1.1 GENÓTIPOS DE rs1800447 / rs34349826 <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DE SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS	48
4.3.1.2 GENÓTIPOS DE rs1800447 / rs34349826 <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	50
4.3.2 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs6521	52
4.3.2.1 GENÓTIPOS DE rs6521 <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS	52
4.3.2.2 GENÓTIPOS DE rs6521 <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	53
4.3.3 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1056914	54
4.3.3.1 GENÓTIPOS DE rs1056914 <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS	54
4.3.3.2 GENÓTIPOS DE rs1056914 <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	55
4.3.4 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687	56

4.3.4.1 GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687 <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS	56
4.3.4.2 GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687 <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	58
4.3.5 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE C1430A	58
4.3.5.1 GENÓTIPOS DE C1430A <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS C1430A	58
4.3.5.2 GENÓTIPOS DE C1430A <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	59
4.3.6 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1056917	60
4.3.6.1 GENÓTIPOS DE rs1056917 <i>VERSUS</i> CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS	60
4.3.6.2 GENÓTIPOS DE rs1056917 <i>VERSUS</i> PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA	61
4.4 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NO GENE <i>LHB</i> E PARÂMETROS CLÍNICOS	62
4.4.1 ANÁLISE MÚLTIPLA DOS PERFIS DE GENÓTIPOS E PARÂMETROS CLÍNICOS	62
4.4.2 ANÁLISE MÚLTIPLA DOS HAPLÓTIPOS E PARÂMETROS CLÍNICOS	65
5. DISCUSSÃO	68
5.1 FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>LHB</i>	68
5.2 rs1800447 / rs34349826 E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE	70
5.3 rs1800447 / rs34349826 E SÍNDROME METABÓLICA	72
5.4 POLIMORFISMOS DO GENE <i>LHB</i> E PARÂMETROS DA SOP – HIPERANDROGENISMO, HIRSUTISMO E RESISTÊNCIA INSULÍNICA	73
5.5 POLIMORFISMOS DO GENE <i>LHB</i> E FERTILIDADE	77
5.6 VARIANTE DO GENE <i>LHB</i> C1430A	79
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS	82
8. ANEXOS	89

8.1 ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	90
8.2 ANEXO 2 – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES	92
8.3 ANEXO 3 - ÍNDICE SEMI-QUANTITATIVO MODIFICADO DE FERRIMAN-GALLWEY UTILIZADO PARA AS AVALIAÇÕES DAS 50 MULHERES PORTADORAS DE SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS	94
8.4 ANEXO 4 - TABELAS DE CARACTERÍSTICAS DIVERSAS DAS 50 PACIENTES CASO A CASO	96
8.5 ANEXO 5 - TABELAS DE DIVERSAS VARIÁVEIS ANALISADAS E SUAS DISTRIBUIÇÕES DE ACORDO COM OS DIVERSOS GENÓTIPOS DE CADA POLIMORFISMO AVALIADO	101
8.6 ANEXO 6 - TABELAS DE DISTRIBUIÇÕES DE VARIÁVEIS DISTINTAS DE ACORDO COM PERFIS DE GENÓTIPOS	109
8.7 ANEXO 7 DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Desenho esquemático dos polimorfismos identificados e suas localizações na estrutura do gene *LHB* 42
- Figura 2 Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos rs1800447 e rs34349826 50
- Figura 3 Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos do rs1056914. 55
- Figura 4 Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos rs2387588 / rs4287687. 57
- Figura 5 Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos do rs1056917. 61
- Figura 6 Distribuição do número de mulheres para os diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey de acordo com cada perfil genotípico. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia	33
Tabela 2	Características da amostra de 50 pacientes quanto à frequência de critérios diagnósticos para a síndrome de ovários policísticos, segundo o consenso de Rotterdam, 2003	37
Tabela 3	Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionadas à síndrome metabólica na amostra de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos	39
Tabela 4	Perfil hormonal da amostra de mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos	40
Tabela 5	Características dos polimorfismos do gene <i>LHB</i> e frequência de genótipos identificados na amostra de mulheres com Síndrome dos ovários policísticos.	45
Tabela 6	Frequência alélica de polimorfismos no gene <i>LHB</i> na amostra de mulheres com síndrome de ovários policísticos	45
Tabela 7	Distribuição de grupos genotípicos das 50 mulheres estudadas com síndrome dos ovários policísticos	46
Tabela 8	Estimativa da frequência de haplótipos das 50 mulheres avaliadas com síndrome dos ovários policísticos	47
Tabela 9	Graus de hirsutismo definidos pelo índice de Ferriman-Gallwey segundo o genótipo para rs1800447 e rs34349826	48
Tabela 10	Concentrações hormonais segundo o genótipo para rs1800447 e rs34349826	49
Tabela 11	Frequência de Síndrome Metabólica segundo o genótipo para rs1800447 / rs34349826	51
Tabela 12	Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para rs1800447 / rs34349826 de 46 mulheres com síndrome de ovários policísticos	51

Tabela 13	Distribuição dos diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey segundo o genótipo para o rs6521	53
Tabela 14	Distribuição das médias de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey de acordo com os grupos genotípicos encontrados nas 50 mulheres com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos	63
Tabela 15	Distribuição dos diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey	63
Tabela 16	Relação entre haplótipos e o valor do índice de hirsutismo de Ferriman-Gallwey de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos	65
Tabela 17	Relação entre haplótipos e a graduação de hirsutismo pelo índice de Ferriman-Gallwey de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos	66
Tabela 18	Relação entre haplótipos e a concentração sérica de testosterona total de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos	67
Tabela 19	Distribuição das frequências dos alelos dos polimorfismos do gene <i>LHB</i> das 50 mulheres estudadas com síndrome dos ovários policísticos, e as frequências alélicas para esses polimorfismos encontradas no <i>pubmed</i> , descritas para as populações em geral	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
ANOVA	“ <i>analysis of variance</i> ”, análise de variância
Arg	arginina
Asn ou N	asparagina
C	citosina
Del	deleção
DF	Distrito Federal
dl	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo
DP	desvio padrão
EDTA	sal do ácido etilenodiaminotetracético
FOP	falência ovariana prematura
FSH	hormônio folículo estimulante
G	guanina
Gln	glutamina
Gly	glicina
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
HDL	lipoproteína de alta densidade

hCG	gonadotrofina coriônica humana
He	genótipo heterozigoto
His	histidina
HOMA-IR	<i>“homeostasis model assesment – insulin resistance”</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP-1	proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante à insulina
Ile	isoleucina
IMC	índice de massa corporal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
kg	quilograma
l	litro
LH	hormônio luteinizante
<i>LHB</i>	cadeia beta do gene do hormônio luteinizante
M	bases adenina ou citosina
m ²	metro quadrado
Met	metionina
mg	miligramas
μmol	micromol
μUI	micro unidades internacionais

ml	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
ng	nanograma
NH ₂	radical hidroxila
OH	radical hidroxila
OR	<i>odds ratio</i>
PCR	reação de polimerase em cadeia
pg	picograma
PRL	prolactina
Pro	prolina
RNAm	ácido ribonucléico do tipo mensageiro
S	bases citosina ou guanina
Ser	serina
SHBG	globulina ligadora dos hormônios sexuais
SM	síndrome metabólica
SOP	síndrome dos ovários policísticos
SPSS	"Statistical Package for the Social Sciences"
T	timina
Thr	treonina
Trp	triptofano
Tt	testosterona total

U	unidade
TSH	hormônio tireoestimulante
Va	genótipo homocigoto variante
Val	valina
vLH	variante do gene ou molécula do hormônio luteinizante
Wt	genótipo homocigoto selvagem (<i>wild type</i>)
Y	bases timina ou citosina

RESUMO

Introdução: A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma endocrinopatia caracterizada por anovulação crônica, não contínua, e excesso de andrógenos, que se manifestam por oligomenorréia ou amenorréia, hirsutismo, acne e alopecia androgênica. A fisiopatogenia e as manifestações clínicas da doença também se relacionam à síndrome metabólica (SM). Existem várias teorias com o objetivo de elucidar o mecanismo etiopatogênico da SOP. Evidências mais recentes a respeito da fisiopatogenia da SOP têm revelado influência de variantes genéticas do LH. Um estudo da frequência de polimorfismos do gene *LHB* (subunidade beta do LH) poderia contribuir para a elucidação da fisiopatogenia da doença, bem como a influência sobre a apresentação clínica da mesma e da SM.

Objetivos: Verificar a frequência de polimorfismos no gene *LHB* em mulheres acometidas pela SOP. Em seguida, analisar a associação entre os polimorfismos identificados com os parâmetros clínicos da SOP e síndrome metabólica (SM).

Métodos: Em estudo tipo transversal, foram avaliadas 50 mulheres com diagnóstico de SOP pelos critérios de Rotterdam. Exames físico e laboratorial definiram a apresentação clínica da SOP e da SM. A análise dos polimorfismos do gene *LHB* foi realizada por meio de seqüenciamento genético. Em seguida, analisadas as relações dos polimorfismos, perfis de genótipos e haplótipos identificados com caracteres da SOP e SM.

Resultados: Os diferentes valores encontrados para a média do índice de Ferriman-Gallwey foram significativos na presença dos alelos variantes dos polimorfismos rs1800447 / rs34349826 ($p = 0,001$), rs1056914 ($p = 0,01$), rs2387588 / rs427687 ($p = 0,04$) e rs1056917 ($p = 0,02$) e para os haplótipos TTCATACT e CCGAC-CC (OR: 4,2 e 19,1, respectivamente). Em relação aos critérios clínicos de SOP, houve maior graduação de hirsutismo na presença do alelo variante C para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 ($p = 0,04$) e para o haplótipo TTCATACT (OR: 0,4). O hiperandrogenismo, avaliado pela concentração sérica de testosterona, apresentou OR de 45,5, 2,1 e 19,1 para os haplótipos CCGAC-CC, TTGATACT e TTGCTACC, respectivamente. Entretanto, para os haplótipos TTCCC-CC, TTCATACT e TTCATAAT encontrado resultado oposto (OR: -6,6; -22,5; -22,6, nessa ordem). Identificada uma mutação na base 1430 do éxon 3, com a troca de uma citosina por uma adenina não

descrita na literatura, que não se mostrou influente sobre as variáveis de SOP. Não foram significativos os resultados encontrados para os parâmetros de SM.

Conclusões: A frequência encontrada dos polimorfismos do gene *LHB* analisados em 50 mulheres brasileiras portadoras da síndrome dos ovários policísticos foi semelhante à descrita na literatura. O polimorfismo rs1800447 / rs34349826 apresentou associação com uma maior graduação do hirsutismo segundo o índice de Ferriman-Gallwey. Resultado semelhante para o haplótipo TTCATACT. A respeito do hiperandrogenismo laboratorial, a concentração sérica da testosterona foi maior para os haplótipos CCGAC-CC, TTGATACT e TTGCTACC. Entretanto, os haplótipos TTCCC-CC, TTCATACC e TTCATAAT, foram indicativos de proteção para o hiperandrogenismo. Não foram estatisticamente significativos os achados para os critérios clínicos da SM.

Palavras-chave: hormônio luteinizante, subunidade beta; síndrome dos ovários policísticos; hirsutismo; síndrome metabólica.

ABSTRACT

Introduction: The polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrinopathy characterized by chronic, discontinuous anovulation and excess of androgens, which leads to oligo or amenorrhea, hirsutism, acne and androgenic alopecia. There are many theories to explain the pathogenesis of the PCOS, and it is also related to the metabolic syndrome. Recent findings have pointed to the influence of molecular variants of the LH at the origins of PCOS.

Objective: To assess the rate of polymorphisms in the LHB (beta-subunit luteinizing hormone) gene in women with PCOS and to analyze the association between such polymorphisms and clinical features of PCOS and metabolic syndrome (MS).

Methods: Transversal study. Fifty women previously diagnosed with PCOS by Rotterdam criteria were evaluated. Physical and laboratory exams defined the different PCOS and MS clinical presentations. Genetic sequencing of the LHB gene was performed in order to assess the occurrence of polymorphisms. The possible relations between single polymorphisms, genetic profile and haplotypes to the PCOS and MS clinical presentation were then analyzed.

Results: The Ferriman Gallwey index revealed statistically different means between polymorphisms rs1800447 / rs34349826 ($p = 0,001$), rs1056914 ($p = 0,01$), rs2387588 / rs427687 ($p = 0,04$) and rs1056917 ($p = 0,02$) and the haplotypes TTCATACT e CCGAC-CC (odds ratio: 4,2 e 19,1 respectively). As to the clinical criteria for PCOS, there was a higher grade of hirsutism when occurring the allelic variant C with the rs1800447 / rs34349826 polymorphisms ($p = 0,04$) and also with the haplotype TTCATACT (OR: 0,4). Laboratorial hyperandrogenism, evaluated by testosterone serum concentration, showed that the haplotypes CCGAC-CC, TTGATACT and TTGCTACC had a positive odds ratio (45,5, 2,1 and 39,1, respectively), and the opposite occurred with TTCCC-CC, TTCATACT and TTCATAAT (odds ratio: -6,6; -22,5; -22,6, in that order). One new mutation, not previously reported, at base 1430, exon 3, by exchanging a cytosine for an adenine, was found, but it presented with no influence at the PCOS and MS variables.

Conclusion: The frequency found for polymorphisms at the *LHB* gene in 50 Brazilian women with PCOS was similar to that described at the literature. The rs1800447 / rs34349826 polymorphism presented was associated with higher hirsutism grade by the Ferriman-Gallwey index. Similar results were found for the genetic profiles and also the haplotype TTCATACT. As for laboratorial hyperandrogenism, higher serum testosterone concentration was present

with the haplotypes CCGAC-CC, TTGATACT and TTGCTACC. However, a protective effect was found for the haplotypes TTCCC-CC, TTCATACC and TTCATAAT. The findings regarding the MS criteria revealed not to be significant.

Keywords: luteinizing hormone, beta-subunit; polycystic ovary syndrome; hirsutism; metabolic syndrome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Em 1935, Stein e Leventhal relataram a associação de ovários aumentados e policísticos com amenorréia, hirsutismo e obesidade. A morfologia descoberta nessas pacientes com túnica albugínea espessa, hiperplasia de estroma e células da teca, pequenos folículos sub-capsulares, associada a clínica, sugeriu presença de anovulação e hiperandrogenismo de origem ovariana. Em 1937, Broster notou hiperplasia adrenal e ovariana durante cirurgia sugerindo ligação entre a adrenal e o desenvolvimento de síndrome de ovários policísticos (SOP). A SOP é a endocrinopatia mais comum na idade fértil, acometendo de 5 a 10% das mulheres (VILAR *et al.*, 2006). Ao longo desses anos muitos autores tentam esclarecer a fisiopatologia da SOP e o papel do ovário, adrenal e da resistência insulínica como iniciadores do quadro. Estudos recentes têm demonstrado influência do hormônio luteinizante (LH) variante na SOP.

A SOP caracteriza-se por anovulação crônica, não contínua, e excesso de andrógenos, os quais clinicamente se manifestam por oligomenorréia ou amenorréia, hirsutismo, acne e alopecia androgênica (VILAR *et al.*, 2006).

Compondo a SOP, evidências indicam excesso androgênico intraovariano responsável pelo impedimento do desenvolvimento dos folículos ovarianos, que raramente atingem diâmetro acima de seis milímetros. A atresia folicular seria causa e consequência deste excesso de andrógenos. O folículo atrésico apresenta baixa atividade de aromatase, reduzindo a conversão de andrógenos em estrógenos. A atresia folicular é caracterizada por apoptose das células da granulosa com reposição por células da teca e fibroblastos, resultando em aumento de estroma ovariano, responsivo ao LH, com consequente hipersecreção de andrógenos. Existem variadas teorias com o objetivo de elucidar o mecanismo etiopatogênico da SOP.

-Teoria da deficiência enzimática:

O aumento de concentração intraovariana de andrógenos pode ser resultante do comprometimento da síntese de estradiol por deficiência enzimática. Há relatos de deficiência de 3 β hidroxiesteróide desidrogenase e da 17cetoesteróide redutase comprometendo a esteroidogênese ovariana (ROSENFELD *et al.*, 1980). Em alguns casos, deficiência da atividade da aromatase, cuja atividade normaliza-se diante da administração de FSH a mulheres com a síndrome, conforme demonstrado por Erickson *et al.*, 1979.

-Teoria da estrona:

Hipótese de que a síntese de androstenediona, em parte pela adrenal, posteriormente convertida periféricamente a estrona iniciariam a síndrome. Essa estrona acarretaria aumento de secreção de LH, que iniciaria ou manteria a excessiva secreção de androstenediona ovariana. Em 1970, Yen *et al.*, administrando acetato de clomifeno – antiestrógeno - a pacientes portadoras da síndrome, conseguiu induzir desenvolvimento folicular e ovulação por permitir a liberação do FSH favoravelmente a esta hipótese. Porém a administração de estrona não induz aumento de secreção de LH.

-Teoria da alteração da secreção de andrógenos:

Elevação da concentração de andrógenos intraovarianos, que promoveria atresia folicular, e, via sistêmica, alterações pilosebáceas da síndrome. Hipótese devido à alteração da esteroidogênese, observada ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) exógeno sobre o eixo hipotálamo hipofisário. Mulheres normais apresentaram aumento da concentração de estradiol e gonadotrofinas apenas. Em mulheres com síndrome dos ovários policísticos, houve também aumento de estrona e precursores do estradiol, principalmente a androstenediona (BARNES *et al.*, 1989).

-Teoria da resistência insulínica:

A partir de estudos realizados com *clamp* euglicêmico em pacientes portadoras de síndrome dos ovários policísticos, foi demonstrada resistência insulínica, independente do índice de massa corporal quando comparado a mulheres normais, sendo a presença de obesidade um fator aditivo na redução da sensibilidade à insulina (DUNAIF *et al.*, 1989). Para esclarecimento da patogênese, foi seqüenciado o gene do receptor de insulina, não sendo demonstradas anormalidades. Estudos indicam que em muitas mulheres com a síndrome, o mecanismo responsável seria pós receptor de insulina. Recebendo estímulo extrínseco, principalmente pelo fator de necrose tumoral, haveria a fosforilação em serina da subunidade β do receptor. Tal ativação seria responsável por inibir o sistema tirosina quinase gerando, por consequência, resistência insulínica (SORBARA *et al.*, 1994).

A hiperinsulinemia provocada pela resistência pode aumentar a concentração de andrógenos, aumentando a produção ovariana indiretamente, por ação hipofisária elevando as amplitudes do LH, ou diretamente, atuando em sinergia com o LH sobre a esteroidogênese ovariana, por fosforilação em serina do citocromo P450c17, ou independente de aumento de produção, pela inibição da síntese hepática de globulina ligadora dos hormônios sexuais

(SHBG) e da proteína ligadora 1 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-1) (BERGH *et al.*, 1999).

-Teoria da disfunção neuroendócrina:

Em 1976, Rebar *et al.* estudaram um grupo de pacientes com SOP. Ao estudo da pulsatilidade do LH, evidenciaram aumento da amplitude desses pulsos, não demonstrada em relação ao FSH. Observada a manutenção do *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-ovários ao ocorrer inibição do LH sob efeito de estrógeno exógeno; assim como preservado o efeito de *feedback* positivo ao estímulo com clomifeno. Por fim, foi demonstrada resposta exagerada de secreção do LH ao estímulo agudo com GnRH. Esse padrão de secreção ainda não foi definido se primária central ou devido à modulação hipotálamo-hipofisária pelos hormônios gonadais. Essa maior sensibilidade do LH ao GnRH pode ajudar a explicar o hiperestrogenismo encontrado nestas pacientes, descrito em estudos anteriores. No entanto, esse hiperestrogenismo poderia também ser resultante da produção proveniente da conversão periférica de andrógenos. Em 2001, Hill *et al.*, avaliaram o impacto da presença da variante do LH sobre os hormônios sexuais. Observaram significativa maior concentração de testosterona sérica em mulheres em idade pós menopausa. Foi especulado se a variante LH, por sua maior bioatividade estaria envolvida com maior hiperplasia estromal ovariana nessa faixa etária.

Em 2000, Takahashi *et al.*, estudando um grupo de 40 mulheres saudáveis, identificaram três mulheres homozigotas para o LH variante Trp⁸-Arg⁸/Ile¹⁵-Thr¹⁵, dezessete mulheres heterozigotas e vinte mulheres LH selvagem. Foram analisadas as respostas do LH variante ao estímulo com GnRH nesse grupo de mulheres saudáveis. As mulheres variantes do LH apresentaram resposta ao GnRH com elevação de LH aos 15 minutos de estímulo, superior e estatisticamente significativa em relação às mulheres não variantes. A maior resposta da pulsatilidade relatada havia sido descrita anteriormente por Haavisto *et al.* (1995) e confirmada por Nilsson *et al.* (2001). Esse padrão de resposta foi semelhante à observada em estudos anteriores com mulheres portadoras de SOP (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

1.2 HORMÔNIO LUTEINIZANTE

O desenvolvimento normal e a função reprodutiva são dependentes de uma complexa interação hormonal. Os hormônios hipofisários, LH e hormônio folículo estimulante (FSH), estão envolvidos de forma essencial na regulação da função gonadal em mamíferos. Ambos são constituintes da família dos hormônios glicoproteicos, juntamente com a gonadotrofina

coriônica humana (hCG) e o hormônio tireoestimulante (TSH). Todos estes hormônios têm uma estrutura heterodimérica, consistindo em uma ligação não covalente entre uma subunidade alfa, comum a todos dessa família, e uma subunidade beta diferenciada, que confere especificidade biológica para o receptor hormônio específico no órgão alvo. A subunidade alfa é codificada por um gene localizado no cromossomo 6q 21.1-23. A subunidade beta codificada por gene localizado no cromossomo 19q 13.32 (MELMED e KLEINBERG, 2003).

Apesar da subunidade β conferir especificidade aos hormônios glicoprotéicos, existe grande homologia estrutural entre as mesmas, principalmente entre o LH e o CG humanos. Apesar do alto grau de homologia (83%), suas regiões promotoras são divergentes e suas regiões 5' não traduzidas são distintas (LIAO *et al.*, 2002; BERGER *et al.*, 2005).

Em humanos, após a tradução da proteína, ocorre o fenômeno de glicosilação. Essa decorre 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 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 (GREEN e BAENZIGER, 1988; BERGER *et al.*, 2005).

Para o LH, os oligossacarídeos existentes em suas moléculas são oriundos de três ligações com a asparagina (duas na subunidade α e uma ligação na subunidade β). Os CG e LH humanos são N-glicosilados no sítio de asparagina-13 e asparagina-30 respectivamente. Em adição, a porção carboxi terminal do hCG possibilita a extensão da O-glicosilação para resíduos de Ser121, Ser127 e Ser138. Essa glicosilação prolonga a meia vida do hCG para 5 a 6 horas, quando comparada a do LH, de 40 a 60 minutos. Além disso, a distribuição da glicosilação define diferenças na biossíntese, modulação e secreção hormonal glicoprotéica (GREEN e BAENZIGER, 1988; BERGER *et al.*, 2005; HENKE e GROMOLL, 2008).

Suganuma *et al.* (1996) estudaram os efeitos da mutação Trp⁸-Arg⁸/Ile¹⁵-Thr¹⁵ do LH em sua bioatividade *in vitro* e *in vivo*. Construíram um gene *LHB* (subunidade beta do LH) contendo nucleotídeos mutados, em separado (posição 8; posição 15) e com ambos os sítios mutados (posição 8 e 15). A análise *in vivo* foi realizada em células de ovário de ratas. Não foram observadas modificações na ligação do variante ao seu receptor; demonstrada pela alta capacidade de induzir produção de progesterona *in vitro*.

Segundo Suganuma *et al.* (1996), a mutação Trp⁸-Arg⁸/Ile¹⁵-Thr¹⁵ modifica a porção N-terminal do LH tornando-a hidrofílica, resultando em alteração conformacional do *LHB*. Acrescido da modificação estrutural causada pela substituição da isoleucina pela treonina (Ile¹⁵-Thr¹⁵) que resulta em uma ligação oligossacarídea na posição Asn¹³. Essas mudanças conformacionais podem expor regiões da molécula da variante do gene *LHB* mais eficientes para o estímulo intracelular pós receptor. A maior biopotência da variante *LHB* pode ser explicada pelo fato de que a mutação do Trp⁸ – Arg⁸ resulta na substituição de aminoácido idêntico ao hCGβ. Esse último apresenta biopotência superior ao LH nativo.

Em contraste, Takahashi *et al.* (2000) observaram que a variante do LH apresentava meia vida sérica menor que a do LH selvagem. As pacientes LH variantes tiveram redução significativa da concentração sérica do LH após quinze minutos da injeção do GnRH em relação às pacientes não variantes. Haavisto *et al.* (1995) já haviam relatado menor meia vida sérica do LH variante, aplicando em ratos alíquotas de sangue de humanos variantes pós estímulo com GnRH. A meia vida do variante foi significativamente menor do que o do controle (em ratas: 44,5±0,5 minutos *versus* 53,3±2,9 minutos; em ratos: 25,5±3,8 minutos *versus* 48,3±2,7 minutos; p<0,01, respectivamente).

Segundo Takahashi *et al.* (2000) essa redução da meia vida sérica poderia ser 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. No entanto, Suganuma *et al.* (1996) acreditavam não haver diferenciação de meia vida sérica entre o variante e o LH selvagem. Observaram que a porção carboxi terminal do LH variante não se modifica quando comparada ao mesmo segmento do hCGβ. Essa porção carboxi terminal do hCGβ é envolvida no mecanismo responsável por prolongar sua meia vida plasmática. Porém, confirmaram nos estudos *in vivo* a reduzida meia vida plasmática.

Não existem claras explicações para a redução da meia vida sérica do LH variante. Por ligação de glicoproteínas sulfatadas, se pela glicosilação extra em posição Asn¹³. Suganuma *et al.* afirmam que essa glicosilação extra Asn¹³ está relacionada à mutação em posição Ile¹⁵-Thr¹⁵, 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 variante influencia a sua excreção renal e por consequência sua meia vida plasmática.

Evidências a respeito da fisiopatogenia da SOP comprovam o envolvimento do LH e de entidades clínicas relacionadas à síndrome metabólica, como a resistência insulínica. Um estudo da frequência de polimorfismos do gene LH, como a variante Trp⁸-Arg⁸/Ile¹⁵-Thr¹⁵, em pacientes com SOP poderia acrescentar dados a respeito da fisiopatogenia da doença, bem como a influência da presença de polimorfismos dos gene *LHB* e de parâmetros clínicos de síndrome metabólica sobre a apresentação clínica da mesma, e talvez permitir avaliação relacionada ao risco ou proteção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a frequência de polimorfismos no gene *LHB* (subunidade beta do LH) em mulheres acometidas pela síndrome dos ovários policísticos (SOP), por meio de seqüenciamento genético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectados os polimorfismos, analisar suas associações clínicas:

- Correlacionar a presença de polimorfismos com diferentes parâmetros clínicos da SOP.
- Correlacionar a presença de polimorfismos com diferentes graus de hiperandrogenismo na SOP
- Correlacionar a presença de polimorfismos com a síndrome metabólica e seus critérios clínicos

3 MÉTODOS

3.1 SUJEITOS DO ESTUDO

A população estudada consistiu de 54 mulheres acompanhadas nos ambulatórios de endocrinologia e ginecologia do Hospital Universitário de Brasília, avaliadas no período de julho de 2007 a julho de 2008.

3.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas pacientes acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília, com idade entre 14 e 45 anos, que receberam o diagnóstico de SOP segundo os critérios definidos pelo consenso de Rotterdam, em 2003. De acordo com esse consenso, a presença de pelo menos dois dos seguintes parâmetros confirma o diagnóstico de SOP: 1-oligomenorréia e/ou anovulação, 2-hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial e 3-ovários policísticos à ecografia, esse definido pelo achado de número maior ou igual a 12 folículos em cada ovário medindo de 2 a 9 mm de diâmetro ou por aumento ovariano bilateral acima de 9 ml (*The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2004*).

3.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas outras causas de hiperandrogenismo ou irregularidade menstrual que simulam o quadro clínico de SOP, tais como hiperprolactinemia, hipotireoidismo primário, falência ovariana prematura, e o uso de drogas como contraceptivos hormonais orais, andrógenos, ciclosporina e ácido valproico por 30 dias que antecederiam as dosagens hormonais. Foram excluídas ainda mulheres que não obtiveram suficientes características diagnósticas clínicas ou bioquímicas, assim como mulheres cuja menarca ocorreu há menos de dois anos antecedentes ou mulheres acima de 45 anos de idade à primeira avaliação.

3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

3.2.1 ANAMNESE, EXAME FÍSICO E ANTROPOMETRIA

As pacientes foram entrevistadas quanto a detalhes de histórico menstrual, idade da menarca e histórico gestacional.

Foi verificada história de amenorréia ou oligomenorréia. A oligomenorréia foi definida como a presença de menos de nove ciclos menstruais durante doze meses do ano ou ciclos menstruais com intervalos superiores a 45 dias em um ano. A amenorréia foi definida como ausência de menstruação por período maior ou igual a 90 dias consecutivos.

As manifestações clínicas de excesso de andrógenos foram avaliadas pela presença de hirsutismo e/ou acne e/ou alopecia de caracterização androgênica. O hirsutismo foi definido pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey, representado por índice maior ou igual a oito (FERRIMAN & GALLWEY, 1961; KORAY *et al.*, 1999; AMATO *et al.*, 2006; COSAR *et al.*, 2008). As pacientes foram divididas em três grupos de acordo com o índice de Ferriman-Gallwey: não hirsutas, índice menor do que 8; hirsutismo leve, índice de 8 a 14; e hirsutismo grave, índice maior do que 15 (MARTIN *et al.*, 2008).

A acne foi definida pela presença, sem quantificação numérica, de formações acneicas persistentes ou recorrentes apesar de tratamento dermatológico.

Foram verificadas as medidas de:

- a) Peso corporal, em quilogramas, com vestes habitualmente utilizadas pela paciente, utilizando balança antropométrica analógica Filizola 3134, aferida pelo INMETRO com o número 010147949-4;
- b) Altura, em centímetros, utilizando balança antropométrica analógica Filizola 3134, aferida pelo INMETRO com o número 010147949-4;
- c) Pressão arterial, na posição sentada, no braço esquerdo estendido na altura do precórdio, utilizando estetoscópio Littmann Classic II SE e esfigmomanômetro Heine Germany, modelo gamma G5. Aferido pelo INMETRO com o nº 0.109.010-0, validade até 2009. Foi considerada hipertensa a paciente com

valores iguais ou superiores a 130/85 mmHg; (Federação Internacional de Diabetes (IDF) em abril de 2005)

- d) Circunferência abdominal, em centímetros, aferida por fita métrica em ponto abdominal médio entre os bordos superiores das espinhas ilíacas ântero-superiores e bordos inferiores dos rebordos costais.

3.2.2 EXAMES LABORATORIAIS

As amostras de sangue para estudo genético foram colhidas no momento da avaliação da paciente. As amostras de sangue para as demais avaliações laboratoriais foram colhidas estando as pacientes em jejum de 12 horas. Os exames laboratoriais foram realizados para a avaliação bioquímica e do perfil hormonal de cada paciente no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília e no Laboratório de Análises Clínicas Sabin (cortesia do Núcleo de Apoio à Pesquisa).

Verificaram-se as medidas das concentrações séricas de:

- a) Glicemia de jejum: método de glicose oxidase; valores de referência de 70 a 100 mg/dl;
- b) Insulina: método de quimioluminescência; valores de referência abaixo de 29,1 μ UI/ml;
- c) Triglicerídeos: colorimétrico enzimático; valor de referência de até 150 mg/dl;
- d) Lipoproteína de alta densidade (HDL): método colorimétrico enzimático; valores de referência acima de 40 mg/dl em homens e acima de 50 mg/dl em mulheres;
- e) Prolactina: método de quimioluminescência (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*); valores de referência em mulheres de 0,33 a 27,3 ng/ml;
- f) Hormônio tireoestimulante (TSH): método de quimioluminescência (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*); valores de referência de 0,35 a 5,5 μ UI/ml;
- g) Hormônio folículo estimulante (FSH): método de quimioluminescência (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*); valores de referência: fase folicular de 4 a 13 mUI/ml, metade do ciclo menstrual de 5 a 22 mUI/ml e fase luteínica de 2 a 13 mUI/ml.
- h) Hormônio luteinizante (LH): método de quimioluminescência (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*); valores de referência: fase folicular de 1 a 18 mUI/ml, metade do ciclo menstrual de 24 a 105 mUI/ml e fase luteínica de 0,4 a 20 mUI/ml.

- i) Testosterona total (Tt): método de quimioluminescência (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*); valores de referência para mulheres: abaixo de 100 ng/dl.
- j) Relação LH/FSH: considerada elevada quando maior ou igual a três.

3.2.3 EXAMES DE IMAGEM

A morfologia de ovários policísticos foi avaliada por ecografia pélvica transvaginal ou abdominal, e definida conforme as diretrizes do consenso de Rotterdam, 2003. Os exames foram realizados em diferentes aparelhos e por examinadores diversos.

3.2.4 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE, SÍNDROME METABÓLICA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA

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.

A ocorrência de síndrome metabólica foi definida conforme os critérios propostos pela Federação Internacional de Diabetes (IDF), em abril de 2005, que estabelecem o diagnóstico a partir da presença de obesidade abdominal, definida como cintura maior que 80 centímetros em mulheres na população brasileira, e dois ou mais dos seguintes critérios:

- Triglicerídeos \geq 150 mg/dl;
- HDL - colesterol < 40mg/dl em homens e < 50 mg/dl em mulheres;
- Pressão arterial sistólica \geq 130 e/ou diastólica \geq 85 mmHg;
- Glicemia de jejum > 100 mg/dl.

O grau de resistência insulínica foi avaliado segundo o índice HOMA-IR (do inglês “*homeostasis model assessment*”) calculado pela fórmula:

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

Os valores de HOMA-IR abaixo de 2,7 foram considerados normais (Geloneze *et al.*, 2006).

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

3.3.1 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[®] (WALSH *et al.*, 1991). 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 milliQ 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 milliQ 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.

3.3.2 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 (SHIRAISHI e NAITO, 2003), 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. 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. 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) (SHIRAIISHI e NAITO, 2003).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia

Nome	Orientação	Seqüência (5'>3')	Posição no <i>LHB</i>	Tamanho do fragmento
LH23F	<i>Sense</i>	GGGAATTCTCTTTGTGGGTGGTGTACCACGC	íntron 1	806 pb
LH23R	<i>Antisense</i>	GGAGGATCCGGGTGTCAGGGCTCCA	3' não-traduzida	

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% e/ou acrilamida 5%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

3.3.3 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*) e em seguida o material foi enviado para o serviço de seqüenciamento da Universidade Católica de Brasília.

3.3.4 LEITURA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A análise, alinhamentos e comparações entre as seqüências (seqüência de referência e seqüências obtidas) foram realizadas com o auxílio de *software* especializado: *sequencher* (*Gene Codes Corporation* versão Demo 4.8 – 2007, Ann Arbor, MI). Através da leitura realizada no *sequencher*, foram verificados todos os pontos de polimorfismos do éxon 2, íntron 2 e éxon 3 do *LHB*, descritos no pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?showRare=on&chooseRs=all&locusId=3972&mrna=Nm_000894.2&ctg=NT_011109.15&prot=NP_000885.1&orien=reverse&refresh=refresh).

Concluída a leitura das seqüências, definiu-se o genótipo dos indivíduos estudados (genotipagem) e as freqüências alélicas dos polimorfismos identificados. Com a utilização do programa *BioStat* (disponível em <http://bioinfo.iconcologia.net>), foi possível identificar a composição dos haplótipos dos 50 pacientes do estudo.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises e tabelas descritivas foram construídas a partir da exposição simples dos valores de cada dado antropométrico e hormonal relevante. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

As análises de relação entre as variáveis analisadas foram realizadas com os testes de *Qui-Quadrado*, teste exato de Fisher, teste de ANOVA e teste t de Student.

Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Os intervalos de confiança foram calculados com base (α) nesse nível de significância.

O processamento dos dados e análises estatísticas foi realizado nos programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, Washington) e Statistical Package for the Social Sciences – SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). A redação final foi realizada no programa Microsoft Office Word 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, Washington).

3.5 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto em estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, conforme documento com registro de número 091/2007.

O termo de consentimento informado (anexo 1) foi assinado, por todas as pacientes, previamente à avaliação física e hormonal. Em caso de paciente menor de idade, o termo de consentimento foi assinado pelo responsável legal.

4 RESULTADOS

No período de julho de 2007 a julho de 2008 foram avaliadas 54 mulheres, portadoras de SOP. Desse grupo, foram excluídas inicialmente quatro pacientes: uma paciente (caso 6) por apresentar dados clínicos insuficientes, duas pacientes (casos 8 e 26) por hiperprolactinemia e uma paciente (caso 10), por ter síndrome de Cushing.

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

4.1.1 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Foram selecionadas 50 mulheres que cumpriam os critérios de Rotterdam para diagnóstico de SOP, cujas características clínicas estão resumidas na tabela 2 e descritas adiante.

Tabela 2 - Características da amostra de 50 pacientes quanto à frequência de critérios diagnósticos para a síndrome de ovários policísticos, segundo o consenso de Rotterdam, 2003

Critério diagnóstico de SOP	<i>n</i>	<i>Presente</i>	%
Oligomenorréia/amenorréia	50	48	96
Hiperandrogenismo clínico*	50	37	74
Hiperandrogenismo laboratorial†	45	6	13,3
Ovários policísticos à ecografia	50	44	88

* Definido pelo índice de hirsutismo modificado de Ferriman-Gallwey > 8 e/ou acne (definida pela presença de formações acneicas persistentes ou recorrentes apesar de tratamento dermatológico) e/ou alopecia de caracterização androgênica.

† Determinado pela presença de concentração sérica elevada de testosterona total (>100 ng/dl).

Quarenta e oito apresentavam ciclos menstruais irregulares (oligomenorréia ou amenorréia) e duas pacientes apresentavam ciclos menstruais regulares. As manifestações clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo estavam presentes em 37 pacientes e ausentes em 13 pacientes.

A principal manifestação clínica para a definição de hiperandrogenismo foi o grau de hirsutismo definido pelo índice de Ferriman-Gallwey. Para fins de análise e correlação com os resultados do estudo molecular, os sujeitos do estudo foram divididos de acordo com a graduação de hirsutismo com base nesse índice. Foram constituídos três grupos, como se segue (Figura 2):

- Grupo 1: 26 mulheres não hirsutas, representando 52% da amostra;
- Grupo 2: 12 mulheres hirsutas grau leve, representando 24% da amostra;
- Grupo 3: 12 mulheres hirsutas grau grave, representando 24% da amostra.

O valor médio do índice de Ferriman-Gallwey foi de $9,4 \pm 7,9$ e variou de 0 a 32.

Também foram verificadas as presenças de acne e/ou alopecia. Acne foi encontrada em 28 pacientes (56% da amostra), sendo a alopecia observada em quatro pacientes (7,4% da amostra). Observa-se que 13 pacientes foram caracterizadas como hiperandrogênicas apenas pela presença de acne, o mesmo não ocorrendo em relação à avaliação da alopecia.

Quanto às manifestações laboratoriais de hiperandrogenismo, 45 pacientes tiveram as concentrações séricas de testosterona total avaliadas, com valores médios de $62,1 \pm 42,7$ ng/dl. Dentre essas 13,3% (seis pacientes) da amostra tinham concentrações elevadas, enquanto 86,7% (39 pacientes) tinham concentração dentro da normalidade.

Em relação à presença de imagem de ovários micropolicísticos à ecografia pélvica, 44 pacientes (88%) tinham imagem correspondente e em seis pacientes (12%) não foi observada imagem ecográfica de ovários policísticos.

4.1.2 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Na tabela 3 estão apresentadas as características da amostra estudada, no que diz respeito aos parâmetros antropométricos e clínicos, sendo esses relacionados à síndrome metabólica.

As pacientes tinham idade média de $27,7 \pm 6,7$ anos. Foram classificadas de acordo com o valor de IMC:

- baixo peso: três pacientes (6%);
- peso normal: 15 pacientes (30%);
- sobrepeso: 12 pacientes (24%);
- obesidade grau 1: 14 pacientes (14%);
- obesidade grau 2: 4 pacientes (8%);
- obesidade grau 3: 2 pacientes (4%).

Essa classificação demonstrou que 36% (n=18) apresentavam peso normal ou baixo peso, enquanto 64% (n=32) apresentavam obesidade ou sobrepeso. Da mesma maneira, a medida da circunferência abdominal revelou a presença de obesidade centrípeta em 70% (n=35) das pacientes com cintura maior do que 80 cm.

Foi identificada hipertensão arterial em 12% (n=6) das pacientes.

Tabela 3. Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionadas à síndrome metabólica na amostra de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos

	<i>n</i>	Valores			
		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Idade (anos)	50	14	42	27,7	$\pm 6,7$
Índice de massa corporal (kg/m ²)	50	16,2	43,6	28	$\pm 6,8$
Circunferência abdominal (cm)	50	61	127	89,5	$\pm 16,5$
Pressão arterial sistólica (mmHg)	50	90	150	113,1	± 12
Pressão arterial diastólica (mmHg)	50	60	110	74,4	$\pm 10,2$
Glicemia (mg/dl)	49	71	122	90,3	$\pm 12,5$
Triglicerídeos (mg/dl)	40	37	373	112,8	$\pm 73,3$
HDL (mg/dl)	49	24	85	49,9	$\pm 13,8$
Homa-RI	49	0,35	13,5	3,8	$\pm 3,3$

DP, Desvio – padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, “*Homeostasis model assessment*”.

A maioria (n=40) tinha glicemia de jejum normal, sendo que nove pacientes tinham glicemias acima de 100 mg/dl e abaixo de 126 mg/dl. Portanto, a glicemia sérica foi elevada em 18,4% das pacientes avaliadas.

Hipertrigliceridemia foi observada em 17,1% das pacientes (n=7). A redução do HDL-colesterol em 61,5% das pacientes avaliadas (n=24). Em relação à resistência insulínica, avaliada pelo índice de Homa-RI, esta foi encontrada em 53,1% (n=26) das 49 pacientes avaliadas. Estão apresentados os resultados dos valores obtidos na Tabela 3.

Com base nesses parâmetros, o diagnóstico de síndrome metabólica foi firmado em 15% dos casos (n=15).

4.1.3 AVALIAÇÃO HORMONAL

Os resultados das dosagens hormonais estão apresentados na Tabela 4. Como mostrado anteriormente na descrição dos resultados dos critérios diagnósticos para SOP, os valores de testosterona total foram normais em 39 pacientes (86,7%), com média de 62,1±42,7ng/dl. A relação LH/FSH foi normal na maioria das pacientes, exceto em três pacientes. A PRL e o TSH foram normais em todas as pacientes.

Tabela 4. Perfil hormonal da amostra de mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos

	<i>n</i>	Valores			
		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
Testosterona Total (ng/dl)	45	13	191	62,1	±42,7
LH (mUI/ml)	49	2	78	9,1	±11,2
FSH (mUI/ml)	49	1	14	5,7	±2,4
LH/FSH	49	0,3	6,7	1,5	±1,2
Prolactina (ng/ml)	48	3,6	28,1	12	±6,6
TSH (μUI/ml)	41	0,5	13,9	2,5	±2

DP, Desvio Padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; TSH, hormônio tireoestimulante.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

Foram analisados os seqüenciamentos de 50 pacientes. Entretanto, devido a erros técnicos que são comuns na etapa automática das reações de seqüenciamento, não foi possível a leitura pontual de alguns polimorfismos no seqüenciamento para os seguintes casos:

-Éxon 2: amostras 25, 31, 37 e 45;

-Íntron 2: amostras 25, 32 e 37;

-Éxon 3: amostras 33, 41 e 43.

Nesses casos, as sequências foram mantidas na análise, justificando pequenas diferenças no número de amostras analisadas para cada polimorfismo, o que, como será apresentado, não compromete sua interpretação.

Os resultados da genotipagem para os 12 polimorfismos previamente descritos nos bancos de dados, denominados rs34247911, rs35296413, rs1800447, rs3527001, rs34349826, rs6521, rs1056914, rs2387588, rs4287687, rs5030773, rs1056917 e rs5030774, bem como para a variante C1430A, estão descritos a seguir e resumidos nas tabelas 5 e 6. Dos 12 polimorfismos analisados, foram então identificados em nossas pacientes sete polimorfismos e uma variante do gene *LHB*, conforme demonstrado na figura 1.

Os polimorfismos rs1800447 e rs34349826 foram descritos e analisados conjuntamente, pois se apresentam em desequilíbrio de ligação.

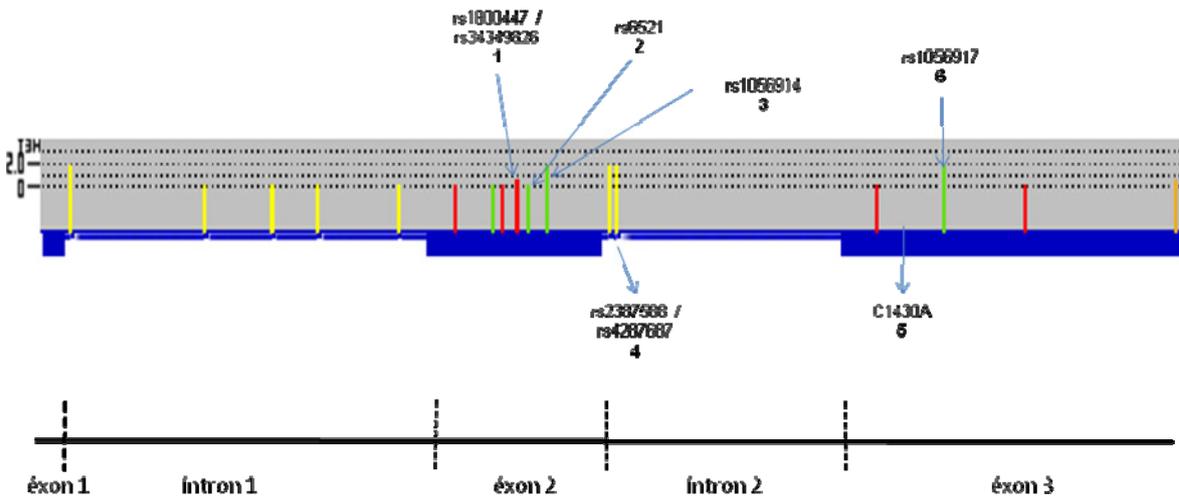


Figura 1. Desenho esquemático dos polimorfismos identificados e suas localizações na estrutura do gene *LHB*

4.2.1 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÉXON 2 DO GENE *LHB*

-rs34247911:

Foram analisados seqüenciamentos de 46 pacientes e todas as amostras apresentaram genótipo homocigoto selvagem (GG) na análise realizada.

-rs35296413:

Foram analisados seqüenciamentos de 46 pacientes e todas as amostras apresentaram genótipo homocigoto selvagem (AA) na análise realizada.

-rs1800447 e rs34349826 (variante LH Trp⁸-Arg⁸/Ile¹⁵-Thr¹⁵)

Analisados seqüenciamentos de 46 pacientes. O genótipo homocigoto selvagem equivale a TT/TT. Foram identificados 42 pacientes TT/TT e quatro pacientes heterocigotos (TC/TC).

-rs3527001:

Analisados seqüenciamentos de 46 pacientes. Todos os pacientes apresentaram genótipo homocigoto selvagem (AA) na análise realizada.

-rs6521:

Analisados seqüenciamentos de 45 pacientes. Foram encontrados 10 pacientes com genótipo homozigoto selvagem (CC), 17 com genótipo heterozigoto (genótipo CG), e 18 homozigotos variantes (genótipo GG).

-rs1056914:

Foram analisados sequenciamentos de 45 pacientes. Foram encontrados oito pacientes com genótipo homozigoto selvagem (AA), 22 heterozigotos (genótipo AC), e 15 homozigotos variantes (genótipo CC).

4.2.2 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÍNTRON 2 DO GENE *LHB***-rs2387588:**

Foram analisados seqüenciamentos genéticos de 47 pacientes. Foram encontrados oito pacientes com genótipo homozigoto selvagem (genótipo TT), 22 com genótipo heterozigoto (genótipo TC), e 17 pacientes homozigotos variantes (genótipo CC).

-rs4287687:

Foram analisados seqüenciamentos genéticos de 47 pacientes. Foram encontrados oito pacientes com genótipo homozigoto selvagem (genótipo AA), 22 pacientes heterozigotos (genótipo ADeI), e 17 homozigotos variantes (genótipo Del Del).

4.2.3 POLIMORFISMOS SITUADOS NO ÉXON 3 DO GENE *LHB***-rs5030773:**

Das 47 amostras de seqüenciamento analisadas, todos os pacientes apresentaram genótipo homozigoto selvagem (genótipo AA).

-Variante LH C1430A:

Do total de 47 amostras de seqüenciamento viáveis, foram identificados três indivíduos heterozigotos para uma mutação pontual no códon 78 do gene *LHB* (contagem dos aminoácidos realizada a partir da primeira metionina do éxon1), na qual um resíduo C foi substituído por um A (AAC/AAA) provocando a troca de uma treonina por uma asparagina no códon 78 (T78N). Essa mutação não constava nos bancos de dados *pubmed* e *hapmap* e foi então denominada de acordo com a substituição de bases e sua posição na região codificante do gene (base 1430). Os demais 44 indivíduos foram homozigotos para o genótipo selvagem (CC), não sendo detectado nenhum homozigoto para essa variação (genótipo AA) na amostra avaliada.

-rs1056917:

Foram analisados sequenciamentos de 47 pacientes. Encontrados 20 pacientes com genótipo homozigoto selvagem (genótipo CC), 19 heterozigotos (genótipo CT), e oito homozigotos variantes (genótipo TT).

-rs5030774:

Foram analisados sequenciamentos de 47 pacientes. Todas as amostras analisadas apresentaram genótipo homozigoto selvagem (genótipo GG/GG).

Tabela 5. Características dos polimorfismos do gene *LHB* e frequência de genótipos identificados na amostra de mulheres com Síndrome dos ovários policísticos

Nomenclatura do polimorfismo	Localização	Mutação		Genótipos						
		Alelos	Aminoácido	n	wt/wt	n	wt/v	n	v/v	n total
rs34247911	éxon 2	G	Met / Ile	46	100%	-	-	-	-	46
rs35296413	éxon 2	A	Pro / Pro	46	100%	-	-	-	-	46
rs1800447	éxon 2	T/C	Trp / Arg	42	91,3%	4	8,7%	-	-	46
rs34349826	éxon 2	T/C	Ile / Thr	42	91,3%	4	8,7%	-	-	46
rs3527001	éxon 2	A	His / Arg	46	100%	-	-	-	-	46
rs6521	éxon 2	C/G	Val / Val	10	22,2%	17	37,8%	18	40%	45
rs1056914	éxon 2	A/C	Pro / Pro	8	17,8%	22	48,9%	15	33,3%	45
rs2387588	íntron 2	T/C	-	8	17%	22	46,8%	17	36,2%	47
rs4287687	íntron 2	A/-	-	8	17%	22	46,8%	17	36,2%	47
rs5030773	éxon 3	G/A	Gln / Arg	47	100%	-	-	-	-	47
C1430A	éxon 3	C/A	Thr / Asn	44	93,6%	3	6,4%	-	-	47
rs1056917	éxon 3	C/T	Gly / Ser	20	42,6%	19	40,4%	8	17%	47
rs5030774	éxon 3	G/A	Gln / Arg	47	100%	-	-	-	-	47

Com base nesses resultados, a frequência alélica para cada polimorfismo foi determinada e está apresentada na tabela 6.

Tabela 6. Frequência alélica de polimorfismos no gene *LHB* na amostra de mulheres com síndrome de ovários policísticos

Polimorfismo	Localização	Alelos (%)			
rs34247911	éxon 2	wild type	G (100%)	variante	-
rs35296413	éxon 2	wild type	A (100%)	variante	-
rs1800447	éxon 2	wild type	T (95,4%)	variante	C (4,5%)
rs34349826	éxon 2	wild type	T (95,4%)	variante	C (4,5%)
rs3527001	éxon 2	wild type	A (100%)	variante	-
rs6521	éxon 2	wild type	C (59%)	variante	G (41%)
rs1056914	éxon 2	wild type	A (42,2%)	variante	C (41%)
rs2387588	íntron 2	wild type	T (40,4%)	variante	C (59,6%)
rs4287687	íntron 2	wild type	A (40,4%)	variante	- (59,6%)
rs5030773	éxon 3	wild type	A (100%)	variante	-
C1430A	éxon 3	wild type	C (96,8%)	variante	A (3,2%)
rs1056917	éxon 3	wild type	C (62,8%)	variante	T (37,2%)
rs5030774	éxon 3	wild type	G (100%)	variante	-

4.3 PERFIS DE GENÓTIPOS

Com base nas variações alélicas identificadas no gene *LHB* para cada sujeito do estudo, foram compostas combinações de polimorfismos que formaram diferentes grupos de genótipos conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7. Distribuição de grupos genotípicos das 50 mulheres estudadas com síndrome dos ovários policísticos

Perfil genético	<i>n</i>	Frequência (%)
TTCATACT	7	14,9
TTCATAMT	1	2,1
TTCMYA-C	3	6,4
TTGCC--C	14	29,8
TTGCYA-C	1	2,1
TTGMYA-C	1	2,1
TTSMYA-C	16	34,0
YYGMC--C	3	6,4
YYSAYA-M	1	2,1

M, alelos A ou C; Y, alelos C ou T; S, alelos C ou G.

Em sequência, foi realizada a composição de 10 haplótipos a partir do perfil genotípico das 50 pacientes em estudo, conforme descrito na tabela 8.

Tabela 8. Estimativa da frequência de haplótipos das 50 mulheres avaliadas com síndrome dos ovários policísticos

	Exon 2				Íntron 2		Exon 3		Frequência (%)
	rs1800447	rs4349826	rs6521	rs1056914	rs2387588	rs427687	C1430A	rs1056917	
1	T	T	G	C	C	-	C	C	52,1
2	T	T	C	A	T	A	C	T	32,5
3	C	C	G	A	C	-	C	C	3,5
4	T	T	C	C	C	-	C	C	3,43
5	T	T	C	A	T	A	C	C	3,24
6	T	T	C	A	T	A	A	T	2,31
7	T	T	G	A	T	A	C	T	1,13
8	T	T	G	C	T	A	C	C	1,07
9	C	C	G	A	C	-	A	C	0,75
10	T	T	G	C	C	-	A	C	<0,1

4.3 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS NO GENE *LHB* E PARÂMETROS CLÍNICOS

Nessa etapa da análise, procurou-se verificar possíveis associações entre as variantes alélicas de cada polimorfismo com os parâmetros clínicos avaliados. Todos os polimorfismos foram analisados isoladamente, exceto os rs1800447 e rs34349826, e rs2387588 e rs4287687, que foram analisados em conjunto, já que se apresentam em desequilíbrio de ligação.

4.3.1 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1800447 e rs34349826

4.3.1.1 GENÓTIPOS DE rs1800447 / rs34349826 *VERSUS* CRITÉRIOS DE SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Com exceção de duas pacientes com genótipo TT/TT, todas as demais pacientes apresentavam ciclos menstruais irregulares ($p = 1,0$; teste exato de Fisher).

Manifestações clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo estiveram presentes nas quatro (8,7% da amostra analisada para este polimorfismo) pacientes heterozigotas (TC/TC), e em 32 (69,6% da amostra) das 42 homozigotas TT/TT ($p = 0,56$). O índice de Ferriman-Gallwey possibilitou dividir os pacientes em três grupos descritos anteriormente. Observou-se, para o genótipo homozigoto TT/TT, 22 (48%) indivíduos não apresentavam hirsutismo, 11 (24%) apresentavam hirsutismo leve e nove (20%), hirsutismo grave. Para o genótipo heterozigoto TC/TC, uma paciente (2%) apresentava hirsutismo leve e três (6%), hirsutismo grave ($p = 0,04$; teste de qui-Quadrado) (tabela 9). O *odds ratio* atribuído ao genótipo TC/TC e a presença de hirsutismo foi de 1,0 (Intervalo de confiança de 0,2-1,8). A média do índice de Ferriman foi de 9 ± 7 para o genótipo TT/TT, e 22 ± 4 para genótipo TC/TC ($p = 0,001$; teste t de Student). O *odds ratio* atribuído ao genótipo TC/TC e hirsutismo grave (maior graduação do índice de Ferriman-Gallwey) foi de 13,0 (intervalo de confiança 5,7-20,3).

Tabela 9. Graus de hirsutismo definidos pelo índice de Ferriman-Gallwey segundo o genótipo para rs1800447 e rs34349826

rs1800447 e rs34349826	Não Hirsuta (%)	Hirsutismo Leve (%)	Hirsutismo Grave (%)	Total
TT/TT (homozigoto selvagem)	22 (52,4)	11(26,2)	9(19,6)	42
TC/TC (heterozigoto)	0	1(25)	3(75)	4
Total	22(48)	12(26)	12(26)	46

$p = 0,04$ (Teste de *qui-Quadrado*), genótipos homozigoto *versus* heterozigoto

A concentração sérica de testosterona total média foi de 61 ± 41 ng/dl no grupo com genótipo TT/TT, enquanto para o genótipo TC/TC a média foi de 93 ± 69 ng/dl. A concentração sérica foi elevada em apenas uma paciente com genótipo TC/TC, e em cinco pacientes com genótipo TT/TT ($p = 0,48$; teste exato de Fisher) (tabela 10).

Finalmente, foi avaliado o critério de imagem compatível com SOP, na apresentação de ovários micropolicísticos à ecografia pélvica. O mesmo estava ausente em quatro pacientes com genótipo TT/TT e em duas pacientes com genótipo TC/TC ($p = 0,07$; teste exato de Fisher).

Na figura 2 estão apresentados os valores médios do índice de Ferriman-Gallwey e as avaliações das concentrações séricas hormonais nos grupos TT/TT e TC/TC. Os valores médios obtidos pelo índice de Ferriman-Gallwey foram maiores na presença do alelo C ($p = 0,001$; teste t de Student), sendo média de 9 ± 7 para o genótipo homozigoto selvagem (TT/TT) e de 22 ± 4 para os genótipos heterozigotos (TC/TC). Os níveis de LH e FSH foram semelhantes em ambos os grupos ($p = 1,0$; teste t de Student). A relação LH/FSH apresentou-se elevada apenas em três pacientes TT/TT ($p = 1$; teste exato de Fisher) (tabela 10).

Tabela 10. Concentrações hormonais segundo o genótipo para rs1800447 e rs34349826*

	TT/TT (homozigoto selvagem)			TC/TC (heterozigoto)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona total (ng/dl)	42	61	± 41	4	93	± 69	0,16 [†]
LH (mUI/ml)	42	10	± 12	4	5	± 3	0,41 [†]
FSH (mUI/ml)	42	6	± 3	4	5	± 2	0,76 [†]
LH/FSH	42	1,6	$\pm 1,3$	4	0,9	$\pm 0,4$	0,30 [†]

DP, desvio padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio foliculo estimulante (mUI/ml). * Não foram identificados indivíduos com genótipo CC/CC na amostra estudada; [†] Teste t de Student.

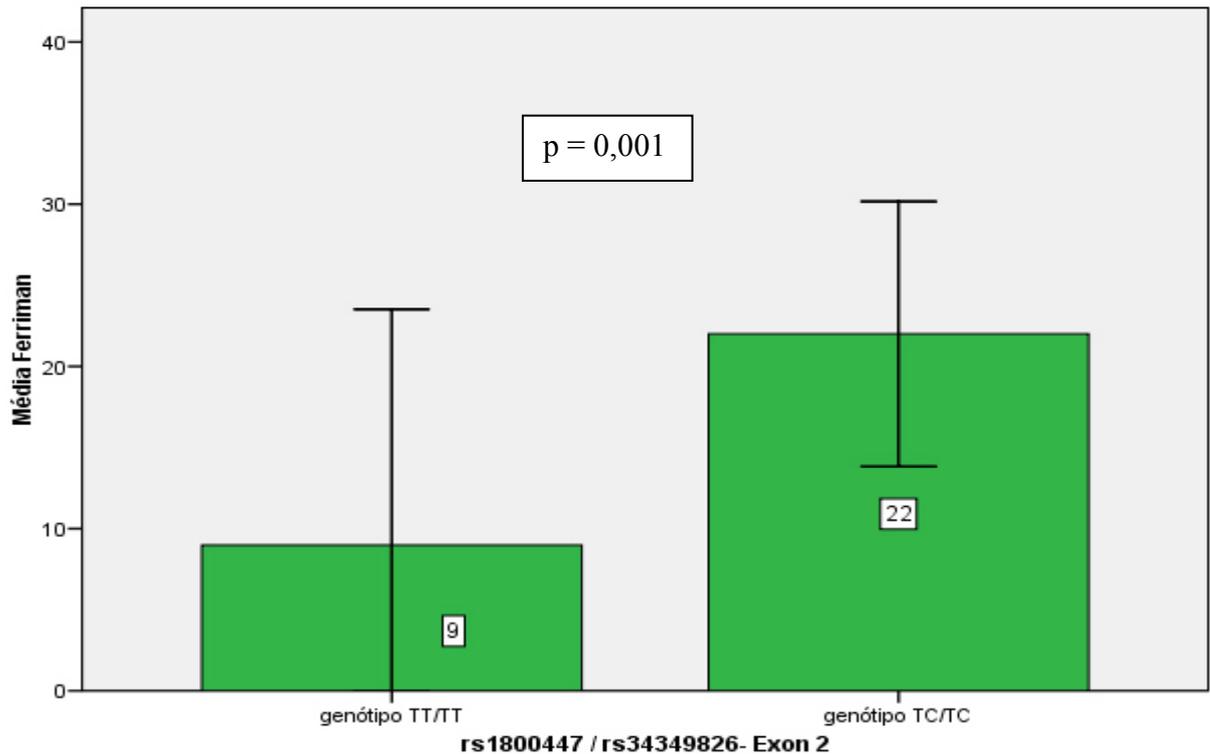


Figura 2. Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos rs1800447 e rs34349826

-4.3.1.2 GENÓTIPOS DE rs1800447 / rs34349826 *VERSUS* PARÂMETROS CLINICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Entre os 42 pacientes com genótipo TT/TT, a média de idade foi de 28 ± 7 anos o que não diferiu da média de idade (23 ± 5 anos) dos quatro pacientes com genótipo TC/TC ($p = 0,10$; Teste t de Student).

Entre os 46 pacientes cujo sequenciamento foi analisado, a caracterização de síndrome metabólica pode ser concluída em 11 indivíduos com genótipo TT/TT e em três indivíduos TC/TC ($p = 0,07$; teste exato de Fisher) (tabela 11).

Tabela 11. Frequência de Síndrome Metabólica segundo o genótipo para rs1800447 / rs34349826

rs1800447 / rs34349826	Síndrome metabólica		Total
	Não	Sim	
TT/TT (homozigoto selvagem)	31	11	42
TC/TC (heterozigoto)	1	3	4

p = 0,08 (teste exato de Fisher); genótipos homozigoto *versus* heterozigoto

Em relação à média da circunferência abdominal, foram observados maiores valores na presença da variante alélica C de forma estatisticamente significativa (p = 0,03; Teste t de Student) (tabela 12). No entanto, quando avaliada a presença da obesidade centrípeta, a mesma não foi mais freqüente no genótipo heterozigoto (TC/TC) em comparação ao genótipo homozigoto (TT/TT), com p = 0,29 (Teste exato de Fisher). O mesmo observado para a média do HDL e a presença da redução do HDL e o genótipo heterozigoto (TC/TC) com p = 0,08 e p = 0,13, respectivamente (teste t de Student e teste exato de Fisher, nessa ordem) (tabela 12).

Tabela 12. Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para rs1800447 / rs34349826 de 46 mulheres com síndrome de ovários policísticos

	TT/TT (homozigoto selvagem)			TC/TC (heterozigoto)*			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	42	28	±7	4	23	±5	0,10†
Índice de massa corporal (kg/m ²)	42	27,6	±6,9	4	32,7	±6,7	0,16†
Circunferência abdominal (cm)	42	88	±16	4	106†	±14	0,03†
Pressão arterial sistólica (mmHg)	42	112	±11	4	120	±22	0,23†
Pressão arterial diastólica (mmHg)	42	74	±11	4	75	±6	0,87†
Glicemia (mg/dl)	42	89	±12	4	98	±13	0,18†
Triglicerídeos (mg/dl)	42	110	±73	4	136	±50	0,49†
HDL (mg/dl)	42	53	±13	4	33‡	±9	0,08†
Homa RI	41	3,4	±3,0	4	6,5	±4,8	0,69†

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade (mg/dl); Homa-RI, “Homeostasis model assessment”- resistência insulínica; * Não foram identificados indivíduos com genótipo CC/CC na amostra estudada; † Teste t de Student.

Apesar de ter sido identificado maior valor de circunferência abdominal na presença da variante alélica C, para o IMC, o mesmo não foi observado ($p = 0,28$; teste de Fisher). Para fins de análise, dividiu-se o IMC em duas categorias: obesidade incluindo o sobrepeso e ausência de obesidade ou sobrepeso. O grupo com genótipo homozigoto selvagem (TT/TT) era composto de maioria obesa, com 34,8% não obesos. No grupo de genótipo heterozigoto (TC/TC), todos os indivíduos eram obesos.

Em relação ao perfil lipídico, observou-se hipertrigliceridemia em apenas uma paciente heterozigota TC/TC ($p = 0,52$; teste qui-Quadrado). No entanto, a redução do HDL foi observada em todas as quatro pacientes com esse genótipo ($p = 0,13$; teste qui-Quadrado). Em referência ao genótipo TT/TT, 17 pacientes apresentaram HDL - colesterol diminuído e 14 pacientes não apresentaram.

Quanto aos valores de pressão arterial, apenas uma das quatro pacientes heterozigotas TC/TC era hipertensa ($p = 0,44$; teste qui-Quadrado). Dos 42 indivíduos com genótipo selvagem TT/TT, 37 eram normotensos. Para o genótipo TC/TC, resultado semelhante foi encontrado para a glicemia sérica. Dos quatro indivíduos heterozigotos TC/TC, apenas um apresentou alteração da glicemia ($p = 0,55$; teste qui-Quadrado), enquanto para os portadores de genótipo TT/TT, 34 apresentaram glicemia normal e sete pacientes com alteração glicêmica.

Utilizou-se o índice de Homa – RI para avaliação da presença de resistência insulínica. Dos 46 analisados, 19 pacientes com genótipo TT e as quatro pacientes heterozigotas TC/TC apresentaram Homa – RI maior que 2,7. No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo ($p = 0,10$; teste do qui-Quadrado).

-4.3.2 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs6521

-4.3.2.1 GENÓTIPOS DE rs6521 *VERSUS* CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Não houve diferença significativa na distribuição de nenhum dos parâmetros clínicos para diagnóstico de SOP entre os diferentes genótipos, conforme apresentado nas tabelas 1 e 2

(anexo 5). A distribuição do grau de hirsutismo definido pelo índice de Ferriman-Gallwey de acordo com o genótipo para o rs6521 também não mostrou diferença estatística, como apresentado na tabela 13. Aperfeiçoando a análise, a presença do genótipo variante em caráter recessivo apresentou *odds ratio* de 6,2 e 0,6 para o índice de Ferriman-Gallwey e o grau de hirsutismo, com intervalos de confiança de 1,08-11,4 e 0,08-1,1, respectivamente.

Tabela 13. Distribuição dos diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey segundo o genótipo para o rs6521

rs6521	<i>Hirsutismo segundo índice de Ferriman – Gallwey*</i>			<i>Total</i>
	<i>Não hirsuta</i>	<i>Hirsutismo Leve</i>	<i>Hirsutismo Grave</i>	
CC (homozigoto selvagem)	2	4	4	10
CG (heterozigoto)	9	5	3	17
GG (homozigoto variante)	10	3	5	18
Total	21	12	12	45

*p=0,33 (teste de qui-Quadrado), comparados os genótipos homozigoto selvagem (CC) *versus* heterozigoto (CG) *versus* homozigoto variante (GG)

4.3.2.2 GENÓTIPOS DE rs6521 *VERSUS* PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Foram avaliados 45 pacientes, sendo 22,2 (n=10) com genótipo CC; 37,8% genótipo CG (n=17) e 40% genótipo GG (n=18).

Os resultados da avaliação antropométrica e dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica estão apresentados na tabela 3 (anexo 5).

As médias de idade das pacientes não foram diferentes entre os três grupos avaliados.

Em relação aos critérios diagnósticos de Síndrome Metabólica, observou-se que o grupo rs6521 CC teve três integrantes com a síndrome, enquanto o grupo rs6521 CG com cinco integrantes e o grupo rs6521 GG, seis pacientes que preencheram os critérios para síndrome metabólica (p = 0,97; teste de qui-Quadrado).

Não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica entre os três grupos genótipos encontrados para o rs6521 (tabela 3 – anexo 5).

4.3.3 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1056914

4.3.3.1 GENÓTIPOS DE rs1056914 VERSUS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

As 45 pacientes avaliadas para o rs1056914 foram divididas em três grupos de genótipos: homozigoto para o alelo selvagem (genótipo AA), heterozigoto (genótipo AC) e homozigoto para a variante alélica (genótipo CC).

Apenas uma paciente do grupo rs1056914 AA e uma do grupo rs1056914 AC apresentavam ciclos menstruais regulares ($p = 0,45$; teste de qui-Quadrado); todas as demais tinham irregularidade menstrual.

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial entre os três grupos de genótipos ($p=0,31$; teste de qui-Quadrado), nem na distribuição das pacientes com diferentes graus de hirsutismo segundo o genótipo ($p=0,06$; teste de qui-Quadrado) (tabela 4 – anexo 5). No entanto, quando comparada a presença do alelo C e os valores médios do índice de Ferriman-Gallwey observados ($p = 0,01$; teste de ANOVA), observados valores médios de 16 ± 9 para o genótipo homozigoto selvagem (AA), 10 ± 8 para o genótipo heterozigoto (AC) e 6 ± 4 para o genótipo homozigoto variante (CC) (figura 3). Aperfeiçoando a análise, em relação à presença do genótipo variante em caráter de codominância, encontrado um *odds ratio* de 9,64 (intervalo de confiança de 3,4-15,8) e para o genótipo variante em caráter recessivo, um *odds ratio* de 7,28 (intervalo de confiança de 1,7-12,7) para o índice de Ferriman-Gallwey.

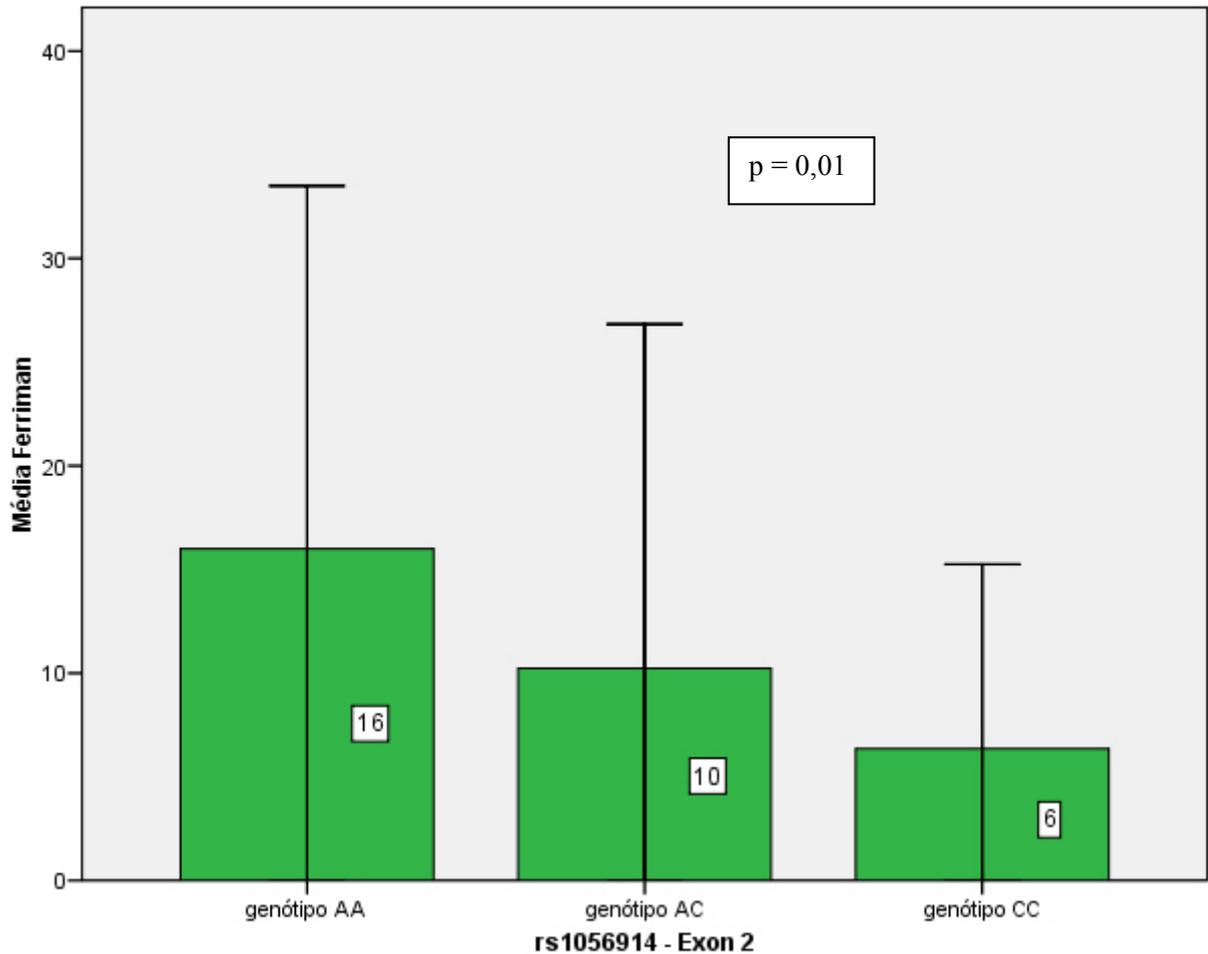


Figura 3. Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos do rs1056914

4.3.3.2 GENÓTIPOS DE rs1056914 *VERSUS* PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Foram avaliados 45 pacientes quanto à presença da variante do LH rs1056914. Encontrados 17,8% (n=7) da amostra genótipo homocigoto selvagem (rs1056914 AA), 48,9% (n=22) genótipo heterocigoto (rs1056914 AC) e 31,9% (n=15) genótipo homocigoto variante (rs1056914 CC).

Os resultados da avaliação antropométrica e dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica estão apresentados na tabela 5 (anexo 5).

As médias de idade das pacientes não foram diferentes entre os três grupos avaliados ($p = 0,93$; teste de ANOVA).

Em relação aos critérios diagnósticos de Síndrome Metabólica, observou-se que o grupo rs1056914 AA teve dois integrantes com a síndrome, enquanto o grupo rs1056914 AC com oito integrantes e o grupo rs1056914 CC, quatro pacientes que preencheram os critérios para síndrome metabólica ($p = 0,96$; teste de qui-Quadrado).

Não houve diferenças significativas na distribuição dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica entre os três grupos de genótipos encontrados para o rs1056914 (Tabela 5 – anexo 5).

4.3.4 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687

4.3.4.1 GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687 VERSUS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

Foram avaliadas 47 pacientes quanto à presença de critérios diagnósticos de SOP segundo o consenso de Rotterdam, para os rs2387588 / rs4287687. As pacientes foram divididas em três grupos de genótipos: homozigoto para o alelo selvagem (rs2387588 TT e rs4287687 AA), heterozigoto (rs2387588 TC e rs4287687 ADel – sendo Del representado por -) e homozigoto para a variante alélica (rs2387588 CC e rs4287687 --).

A maioria dos pacientes apresentou ciclos menstruais irregulares, sendo que apenas uma paciente com genótipo homozigoto para os alelos selvagens (TT/AA) e um integrante do grupo heterozigoto (TC/A-) apresentaram regularidade menstrual ($p = 0,35$; teste de qui-Quadrado).

Os valores médios encontrados para o índice de Ferriman-Gallwey foram diferentes na presença dos alelos variantes (C e -), sendo a média de 16 ± 9 para o genótipo homozigoto selvagem (TT/AA), média de 8 ± 7 para o genótipo heterozigoto (TC/A-), sendo média 10 ± 8 para os homozigotos variantes, com $p = 0,04$ (teste de ANOVA) (Figura 4). Com o aperfeiçoamento da análise, observado um *odds ratio* de 7,2 para a presença do genótipo variante em caráter recessivo (intervalo de confiança de 1,5-12,9). Ainda para fins de melhoria

da análise, encontrado um *odds ratio* de -26,5 em relação para o genótipo variante em superdominância e a concentração sérica média de testosterona (intervalo de confiança de -52,2 a -0,8). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial entre os três grupos de genótipos ($p=0,55$; teste de qui-Quadrado), nem na distribuição das pacientes com diferentes graus de hirsutismo segundo o genótipo ($p=0,20$; teste de qui-Quadrado).

Não foram encontradas relação entre os genótipos variantes do polimorfismo do *LHB* e as concentrações hormonais analisadas relacionadas à SOP (tabela 6 – anexo 5).

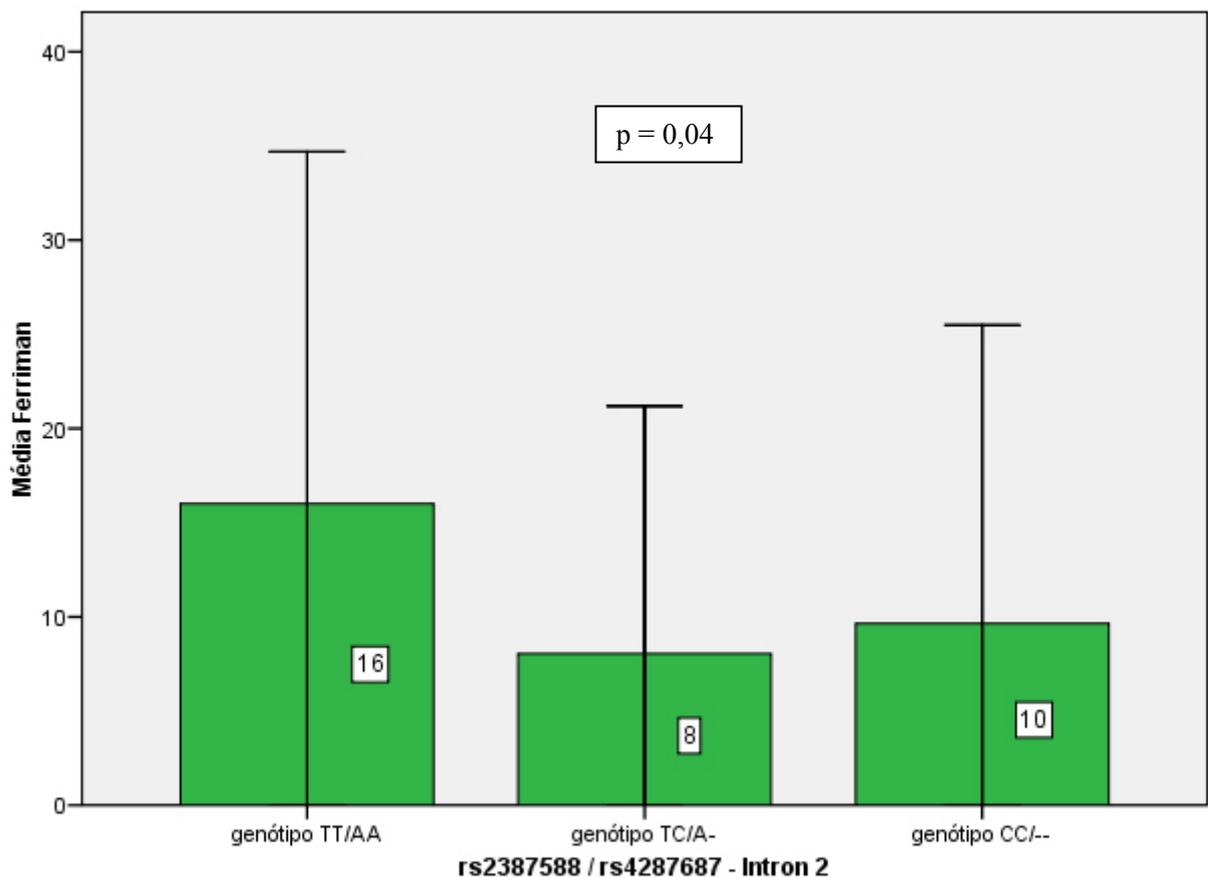


Figura 4. Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos rs2387588 / rs4287687

4.3.4.2 GENÓTIPOS DE rs2387588 / rs4287687 VERSUS PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Foram analisados 47 pacientes, sendo 17% (n=8) genótipo homozigoto selvagem (TT e AA), 46,8% (n=22) genótipo heterozigoto (TC e A-) e 36,2% (n=17) genótipo homozigoto variante (CC e --).

A média de idade do grupo homozigoto selvagem (TT e AA) de 27±9 anos, o que não diferiu da média de idade (29±6 anos e 26±7anos) (p = 0,36) dos 22 pacientes identificados com genótipo heterozigoto (TC e A-), e dos 17 pacientes identificados como homozigotos variantes (CC e --), respectivamente (p = 0,36; teste de ANOVA).

A caracterização de síndrome metabólica pode ser concluída em dois pacientes com genótipo homozigoto selvagem, em sete heterozigotos e em cinco pacientes homozigotos variantes (p = 0,93; teste de qui-Quadrado).

Não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica entre os três grupos de genótipos encontrados para os rs2387588 / rs4287687 (tabela 7 – anexo 5).

4.3.5 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE C1430A

4.3.5.1 GENÓTIPOS DE C1430A VERSUS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS C1430A

A irregularidade menstrual foi presente na maioria das pacientes com genótipo CC (n=42) e em todos os pacientes com genótipo heterozigoto (n=3) (p = 0,70; teste de qui-Quadrado).

As manifestações clínicas e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo foram encontradas em 33 (73,3%) integrantes do grupo com genótipo CC, e em dois (66,7%) do grupo genótipo

heterozigoto (CA). Não houve diferenças significativas na distribuição de nenhum dos parâmetros clínicos para diagnóstico de SOP entre os diferentes genótipos, conforme apresentado nas tabelas 8 e 9 (anexo 5).

4.3.5.2 GENÓTIPOS DE C1430A *VERSUS* PARÂMETROS CLÍNICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Foram avaliados 47 pacientes em relação à presença da variante do LH C1430A. Encontrados 93,6% (n=44) genótipo homozigoto selvagem (CC), 6,4% (n=3) com genótipo heterozigoto (CA) Não foi identificado o genótipo homozigoto variante (AA).

Os resultados da avaliação antropométrica e dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica estão apresentados na tabela 10 (anexo 5).

As médias de idade das pacientes não foram diferentes entre os dois grupos avaliados ($p = 0,44$; teste t de Student) (tabela 10 – anexo 5).

Quanto aos critérios diagnósticos de síndrome metabólica, os mesmos estiveram presentes em 14 pacientes genótipo homozigoto selvagem (CC), e em apenas um heterozigoto (CA) ($p = 1$; teste exato de Fisher).

Não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros clínicos relacionados à síndrome metabólica entre os dois grupos de genótipos encontrados para o C1430A (tabela 10 – anexo 5).

4.3.6 ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS COM GENÓTIPOS DE rs1056917

4.3.6.1 GENÓTIPOS DE rs1056917 *VERSUS* CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS

As 47 pacientes avaliadas para o rs1056917 foram divididas em três grupos de genótipos: homozigoto para o alelo selvagem (CC), heterozigoto (CT) e homozigoto para a variante alélica (TT).

A irregularidade menstrual foi presente em todos os pacientes com genótipo CC, na maioria dos heterozigotos CT (n=18), assim como na maioria dos homozigotos para a variante alélica TT (n=7) (p = 0,32; teste de qui-Quadrado).

As médias encontradas para o índice de Ferriman-Gallwey foram diferentes na presença do alelo variante T (p = 0,02; teste de ANOVA), com valores de média de 10±8 para genótipo homozigoto selvagem (CC), 7±7 para o genótipo heterozigoto (CT), e média de 14±7 para o genótipo homozigoto variante (TT) (figura 5). Aperfeiçoando a análise, foi observado um *odds ratio* de 7,4 em relação à presença da variante em caráter recessivo e o índice de Ferriman-Gallwey (intervalo de confiança de 1,6-13,3). Porém, o hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial (tabela 10 – anexo 5) não apresentou diferença estatisticamente significativa (p = 0,58; teste de qui-Quadrado), assim como a distribuição das pacientes com diferentes graus de hirsutismo segundo o genótipo (p=0,09; teste de qui-Quadrado).

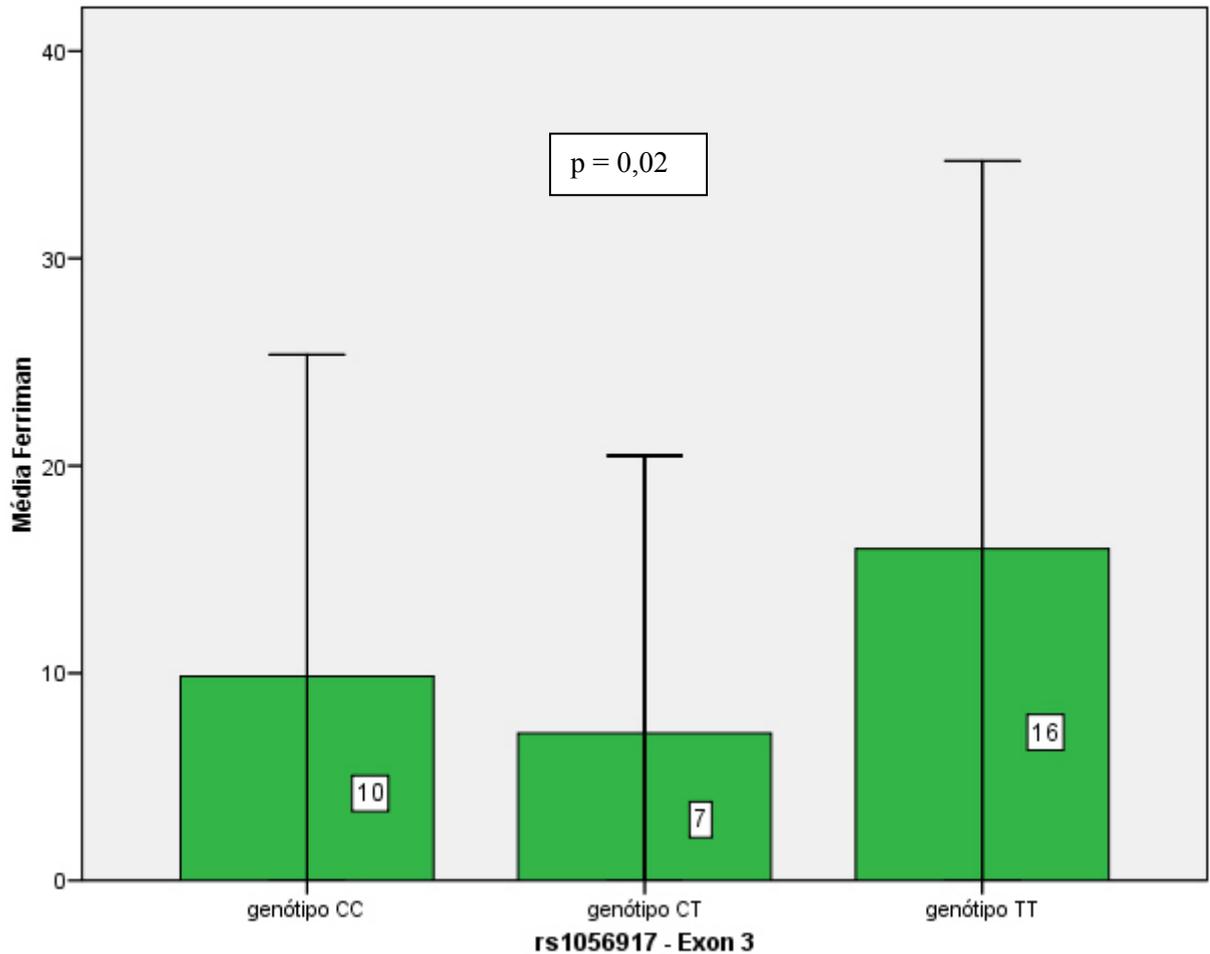


Figura 5. Distribuição da média do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos do rs1056917

4.3.6.2 GENÓTIPOS DE rs1056917 *VERSUS* PARÂMETROS CLINICOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Foram analisados os seqüenciamentos genéticos de 47 pacientes, sendo 42,6% (n=20) com genótipo homozigoto selvagem (CC); 40,4% (n=19) genótipo heterozigoto (CT) e 17% (n=8) homozigotos variantes (TT).

Entre os 20 pacientes com genótipo CC a média de idade foi de 28±7 anos o que não diferiu da média de idade (29±7 anos e 23±6 anos) dos pacientes com genótipo heterozigoto (CT) e homozigoto para a variante (TT), respectivamente (p = 0,97; teste de ANOVA).

Entre os 47 pacientes sequenciamentos analisados, a caracterização de síndrome metabólica pode ser concluída em sete indivíduos CC, em seis indivíduos CT, e em dois indivíduos TT ($p = 0,87$, teste de qui-Quadrado).

Quanto às de mais características antropométricas, de pressão arterial e de parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (tabela 12 – anexo 5).

4.4 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GENÓTIPOS IDENTIFICADOS NO GENE *LHB* E PARÂMETROS CLÍNICOS

4.4.1 ANÁLISE MÚLTIPLA DOS PERFIS DE GENÓTIPOS E PARÂMETROS CLÍNICOS

Foram identificados valores diferentes para o índice de Ferriman-Gallwey e os diversos perfis genotípicos, de forma estatisticamente significativa ($p = 0,003$; teste de ANOVA) (tabela 14). Em seguida, mesmo resultado encontrado na avaliação dos perfis de genótipo e a graduação de hirsutismo segundo o índice de Ferriman-Gallwey ($p = 0,04$; teste de qui-Quadrado) (tabela 15).

Tabela 14. Distribuição das médias de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey de acordo com os grupos genotípicos encontrados nas 50 mulheres com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos

Perfis de genótipos	Índice de Ferriman-Gallwey			p
	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	
TTCATACT	7	16	±10	0,003*
TTCATAMT	1	15	-	
TTCMYA-C	3	12	±6	
TTGCC--C	14	7	±4	
TTGCYA-C	1	4	-	
TTGMYA-C	1	9	-	
TTSMYA-C	16	7	±7	
YYGMC--C	3	24	±1	
YYSAYA-M	1	16	-	

M, alelos A ou C; Y, alelos C ou T; S, alelos C ou G; *Teste de ANOVA

Tabela 15. Distribuição dos diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey*

Perfis de genótipos	Índice de Ferriman-Gallwey			Total
	<i>Não hirsuta</i>	<i>Hirsutismo leve</i>	<i>Hirsutismo grave</i>	
TTCATACT	1	3	3	7
TTCATAMT	0	0	1	1
TTCMYA-C	1	1	1	3
TTGCC--C	10	3	1	14
TTGCYA-C	1	0	0	1
TTGMYA-C	0	1	0	1
TTSMYA-C	10	3	3	16
YYGMC--C	0	0	3	3
YYSAYA-M	0	1	0	1

M, alelos A ou C; Y, alelos C ou T; S, alelos C ou G; *p = 0,04 (teste de qui-Quadrado).

Aprofundando a análise, observa-se que para os perfis de genótipos TTGCC—C e TTSMYA-C foi maior o número de mulheres não hirsutas de acordo com o índice semi-quantitativo de Ferriman-Gallwey (figura 6). Devido ao pequeno número de sujeitos em estudo, não foi possível aprimorar a análise das proporções.

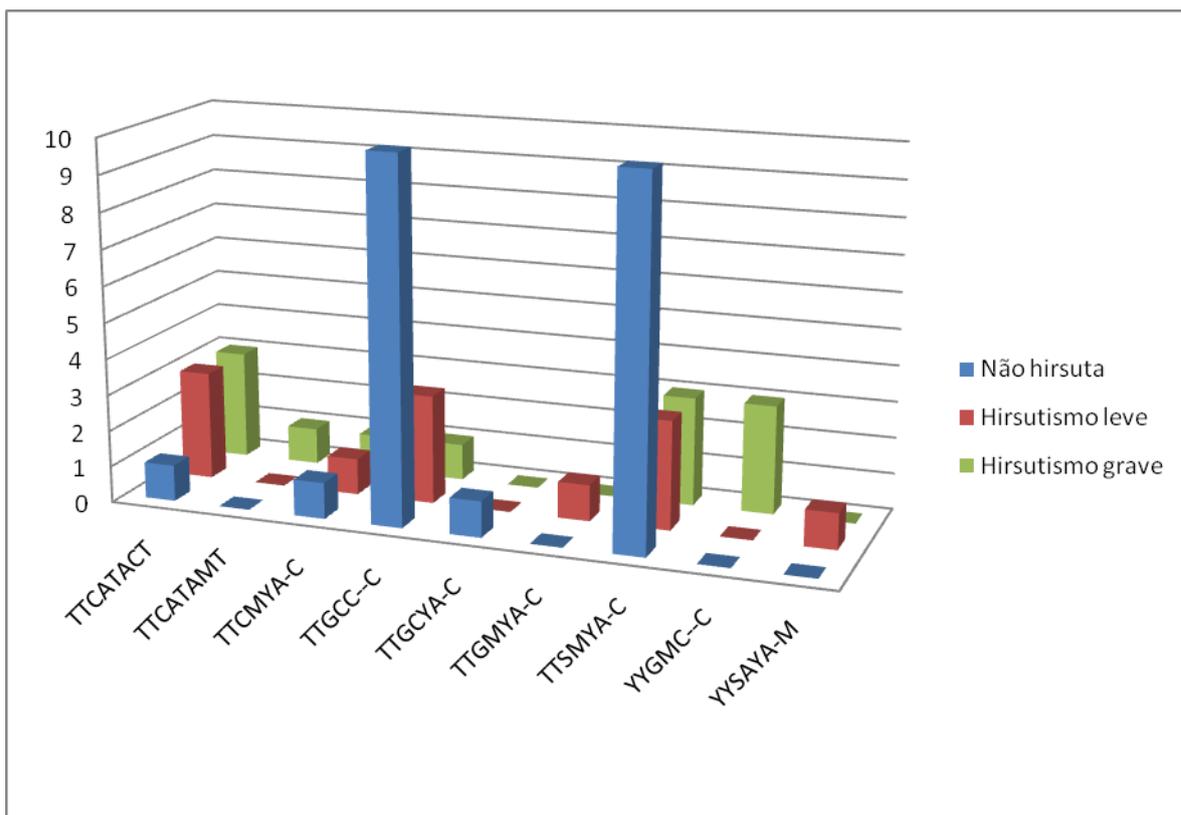


Figura 6. Distribuição do número de mulheres para os diferentes graus de hirsutismo definidos pelo índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey de acordo com cada perfil genotípico

Não foram encontradas associação dos perfis genotípicos das pacientes estudadas com a concentração sérica de testosterona e Homa RI (respectivamente, $p=0,64$ e $0,36$; teste de ANOVA) (tabelas 1 e 2 – anexo 6).

4.4.2 ANÁLISE MÚLTIPLA DOS HAPLÓTIPOS E PARÂMETROS CLÍNICOS

Foram analisados os haplótipos e suas relações com o valor do índice de Ferriman-Gallwey. Foi encontrado para o haplótipo TTCATACT e o índice de Ferriman-Gallwey um *odds ratio* de 4,2 (intervalo de confiança de 1,3-7,2). Resultado semelhante foi identificado para o haplótipo CCGAC-CC, com *odds ratio* de 19,1 (intervalo de confiança de 10,6-27,5) (tabela 16).

Tabela 16. Relação entre haplótipos e o valor do índice de hirsutismo de Ferriman-Gallwey de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos

Haplótipo	rs1800447	rs4349826	rs6521	rs1056914	rs2387588	rs427687	C1430A	rs1056917	Frequência (%)	OR (IC)
1	T	T	G	C	C	-	C	C	52,8	0,00
2	T	T	C	A	T	A	C	T	32,7	4,29 (1,36 – 7,22)
3	T	T	C	C	C	-	C	C	03,3	1,57 (-6,67 – 9,81)
4	T	T	C	A	T	A	C	C	3	7,18 (-1,63 – 15,99)
5	C	C	G	A	C	-	C	C	3	19,11 (10,66 – 27,57)
6	T	T	C	A	T	A	A	T	2,1	1,75 (-8,03 – 11,54)
7	T	T	G	A	T	A	C	T	1,1	3,56 (-10,34 – 17,47)
8	T	T	G	C	T	A	C	C	1	-1,01 (-14,46 – 12,44)
raro	*	*	*	*	*	*	*	*	<0,1	7,02 (-6,95 – 20,99)

OR, *odds ratio*; IC, Intervalo de confiança.

Foram analisados os haplótipos no que se refere às graduações de hirsutismo segundo o índice de Ferriman-Gallwey. Foi encontrado para o haplótipo TTCATACT, um *odds ratio* de 0,4 (intervalo de confiança de 0,1-0,7) (tabela 17).

Tabela 17. Relação entre haplótipos e a graduação de hirsutismo pelo índice de Ferriman-Gallwey de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos

Haplótipo	rs1800447	rs4349826	rs6521	rs1056914	rs2387588	rs427687	C1430A	rs1056917	Frequência (%)	OR (IC)
1	T	T	G	C	C	-	C	C	52,4	0,00
2	T	T	C	A	T	A	C	T	32,8	0,45 (0,14 – 0,77)
3	T	T	C	C	C	-	C	C	3,4	0,07 (-0,8 – 0,95)
4	T	T	C	A	T	A	C	C	3	1,09 (0,14 – 2,04)
5	C	C	G	A	C	-	C	C	3	1,79 (0,88 – 2,7)
6	T	T	C	A	T	A	A	T	2	0,55 (-0,52 – 1,61)
7	T	T	G	C	T	A	C	C	1	-0,23 (-1,66 – 1,2)
8	T	T	G	A	T	A	C	T	1	0,75 (-0,77 – 2,26)
raro	*	*	*	*	*	*	*	*	<0,1	0,34 (-1,12 – 1,81)

OR, *odds ratio*; IC, Intervalo de confiança

Foram encontradas para os haplótipos CCGAC-CC, TTGCTACC e TTGATACT e a elevação da concentração sérica da testosterona, *odds ratio* positivos de 45,5 (intervalo de confiança de 45,1-45,9), 2,1 (intervalo de confiança de 1,9-2,2) e 39,1 (intervalo de confiança de 39-39,3), respectivamente. No entanto, foram identificadas para os haplótipos TTCCC-CC, TTCATAACC e TTCATAAT e elevação da concentração sérica de testosterona *odds ratio* de valores numéricos negativos: -6,6 (intervalo de confiança de -7,2 - -5,9), -22,5 (intervalo de confiança de -22,9 – 22,1) e -22,6 (intervalo de confiança de -23 - -22,3), respectivamente (tabela 18).

Tabela 18. Relação entre haplótipos e a concentração sérica de testosterona total de 50 mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos

Haplótipo	rs1800447	rs4349826	rs6521	rs1056914	rs2387588	rs427687	C1430A	rs1056917	Frequência (%)	OR (IC)
1	T	T	G	C	C	-	C	C	53,5	0,00
2	T	T	C	A	T	A	C	T	29,4	2,37 (-4,34 – 9,09)
3	T	T	C	C	C	-	C	C	3,8	-6,62 (-7,29 – -5,95)
4	T	T	C	A	T	A	C	C	3,6	-22,54 (-22,96 – -22,12)
5	C	C	G	A	C	-	C	C	3,6	45,55 (45,19 – 45,91)
6	T	T	C	A	T	A	A	T	2,5	-22,65 (-23,01 – -22,3)
7	T	T	G	C	T	A	C	C	1,2	2,11 (1,97 – 2,25)
8	T	T	G	A	T	A	C	T	1,1	39,19 (39,07 – 39,31)
raro	*	*	*	*	*	*	*	*	<0,1	-17,55 (-17,74 – -17,37)

OR, *odds ratio*; IC, Intervalo de confiança.

Não foi encontrada relação entre o Homa-RI e os haplótipos definidos para o grupo de 50 mulheres com síndrome dos ovários policísticos estudadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO GENE *LHB*

A frequência do polimorfismo rs1800447 / rs34349826 no gene *LHB* diverge entre os diferentes grupos étnicos. Essa mutação tem sido identificada mundialmente em indivíduos inférteis e indivíduos férteis e saudáveis, com frequências elevadas como 41,9% na população finlandesa (HAAVISTO *et al.*, 1995) e 53,5% em aborígenes australianos (NILSSON *et al.*, 1997; TAPAINEN *et al.*, 1999; LAMMINEN *et al.*, 2000). A frequência na população de negros sul-africanos de 17,9% (NILSSON *et al.*, 1997); em tchecos 17,5% (STARKA *et al.*, 1999) e em japoneses e chineses, frequência 12 e 14% respectivamente (NILSSON *et al.*, 1997). No entanto, foi demonstrada frequência de 0% em população dos Kotas do sul da Índia (TAPAINEN *et al.*, 1999; LAMMINEN *et al.*, 2000). Um estudo realizado no Brasil identificou frequências de 16,6% e 14,4% em indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico e indivíduos saudáveis respectivamente (BERGER *et al.*, 2005). Essa variação de frequência aponta para possível vantagem deste polimorfismo durante a evolução humana. O LH variante pode representar uma forma antecessora do LH comum, por ter sido encontrado em populações de diferentes histórias evolutivas (NILSSON *et al.*, 1997; LAMMINEN *et al.*, 2000).

No que se refere à frequência da variante em mulheres com SOP, foi descrito, na Inglaterra, frequência do genótipo heterozigoto (TC/TC) de 15% em mulheres saudáveis e de 21% em obesas com SOP (RAJKHOWA *et al.*, 1995). Posteriormente, descrita nas populações finlandesas, inglesas e americanas, frequências de 22 a 72% do genótipo heterozigoto (TC/TC) em mulheres com SOP (TAPANAIEN *et al.*, 1999).

Em outro estudo, na Turquia, a variante LH foi analisada comparando-se grupo de mulheres com SOP e outro grupo sem a doença, quando se observou frequência de 3% em mulheres com SOP e de 17% em mulheres do grupo controle (KORAY *et al.*, 1999).

No presente estudo, 50 pacientes com diagnóstico de SOP foram analisados quanto à existência dos polimorfismos rs1800447 / rs34349826 do gene *LHB*. A frequência encontrada foi de 8,7% para o genótipo heterozigoto TC. Não foi identificado o genótipo homozigoto variante CC. A frequência alélica (alelo: T=95,4% e C=4,5%), foi semelhante aos valores descritos no *pubmed*, conforme as populações estudadas: para os europeus, a frequência do

alelo T é de 88,3%, e do C é de 11,7%, para os africanos, o alelo T tem 93,5% de presença e o alelo C tem 6,5%, já nos asiáticos, o T está presente em 96% e o C em 4% dos casos.

Não há, no Brasil, estudo similar de análise de frequência do LH variante rs1800447 / rs34349826 em mulheres com SOP. A taxa encontrada em nosso trabalho foi maior que a relatada por Koray *et al.* (frequência de 3%) (1999), e menor que em outros trabalhos citados (de 21% por RAJKHOWA *et al.*, 1995; e de 22 a 72% por TAPANAIEN *et al.*, 1999).

Interessante notar que a variante é progressivamente menos frequente conforme a maior distância dos países nórdicos europeus (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Observa-se mudança na frequência de 41,9% em finlandeses para 13% em outros países europeus de maior distância geográfica, e apenas 12% em japoneses (KORAY *et al.*, 1999). Localizado em grande distância dos países de maior frequência da variante, apesar da miscigenação, já seria esperado que a população brasileira apresentasse frequência reduzida da variante rs1800447 / rs34349826 do gene *LHB*.

As frequências alélicas dos demais polimorfismos do gene *LHB* analisados neste estudo, apresentaram resultados semelhantes aos descritos pelo *pubmed*, onde as frequências alélicas estão descritas de acordo com populações (tabela 21).

Tabela 19. Distribuição das frequências dos alelos dos polimorfismos do gene *LHB* das 50 mulheres estudadas com síndrome dos ovários policísticos, e as frequências alélicas para esses polimorfismos encontradas no *pubmed*, descritas para as populações em geral

Polimorfismo	Localização	Alelos selvagens	Literatura		Alelos variantes	Literatura	
		(observado-%)	População	Alelos (%)	(observado-%)	População	Alelos (%)
rs1800447	éxon 2	T (95,4)	Européia	88,3	C (4,5)	Européia	11,7
			Africana	93,5		Africana	6,5
rs34349826			Asiática	96		Asiática	4
			Européia	70,2		Européia	29,8
rs6521	éxon 2	C (59)	Africana	65,2	G (41)	Africana	34,8
			Asiática	38		Asiática	62
			Européia	41,5		Européia	58,5
rs1056914	éxon 2	A (42,2)	Africana	32,6	C (41)	Africana	67,4
			Asiática	64		Asiática	36
			Européia	29,8		Européia	70,2
rs2387588	íntron 2	T e A (40,4)	Africana	26,1	C e - (59,6)	Africana	73,9
rs4287687			Asiática	60		Asiática	40
Européia			70,2	Européia		29,8	
rs1056917	éxon 3	C (62,8)	Africana	78,3	T (37,2)	Africana	21,7
			Asiática	40		Asiática	60

5.2 rs1800447 / rs34349826 E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE

Um grupo de estudiosos finlandeses testou vários anticorpos monoclonais para mensuração de LH e detectou uma forma imunologicamente anômala de LH, em uma mulher saudável e mãe de dois filhos. Anticorpos monoclonais que reagem com LH intacto α/β dímero não detectaram níveis de LH concordantes com sua fertilidade (PETTERSON *et al.*, 1992).

No polimorfismo rs1800447 / rs34349826 do gene *LHB*, duas sucessivas mutações pontuais no éxon 2 da subunidade β são responsáveis pela produção deste LH imunologicamente anômalo. Ocorre a substituição de dois aminoácidos na molécula do LH: Trp⁸ (TCG) pela Arg⁸ e Ile¹⁵ (ATC) pela Thr¹⁵ (ACC); a última introduz uma glicosilação extra de um oligossacarídeo na Asn¹³ da subunidade β . Essa mudança molecular resulta em um LH não mensurável por anticorpos para a molécula intacta do LH pelos ensaios convencionais de

quimioluminescência (SUGANUMA et al, 1996; LAMMINEN *et al.*, 2001; BERGER *et al.*, 2005).

Petterson *et al.* (1992), Haavisto *et al.* (1995) e Nilsson *et al.* (1998) desenvolveram um método imunológico para detecção do LH abrangendo a fração LH β . Nesse método, o LH sérico é mensurado por dois ensaios imunofluorimétricos com diferentes combinações de anticorpos monoclonais. O primeiro detecta apenas o LH selvagem (método 1), e o segundo, detecta o LH selvagem e o variante (método 2). De acordo com a razão método 1/ método 2, define-se grupos de resultados baseados no perfil genotípico para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 do gene *LH β* : grupo homozigoto variante (razão zero ou aproximada), grupo heterozigoto (razão baixa, de 0,5 a 0,75) e grupo homozigoto selvagem (razão normal, de 1 a 2).

Utilizando-se deste método de detecção da concentração sérica do LH, incluindo a detecção da variante, alguns estudos têm buscado analisar valores de concentração sérica do LH em desordens ovarianas variadas.

Ao avaliar mulheres com SOP, descreveu-se uma elevação significativa da concentração sérica do LH nessas mulheres (7,5 UI/l) em relação a grupo controle saudável (4,4 UI/l), com $p = 0,001$. A concentração do LH fora avaliada pelo método 2. Quando analisadas a razão dos resultados entre os métodos 1 e 2, as mulheres cuja relação era baixa ou normal, ou seja, genótipos heterozigoto e homozigoto selvagem, nessa ordem, exibiram concentrações séricas semelhantes de LH (TAPANAINEN *et al.*, 1999).

Takahashi *et al.*, 1999, ao avaliar mulheres japonesas com diversas desordens ovarianas, não encontraram diferença entre a concentração média do LH (medida por imunofluorimetria) e a presença da variante alélica C entre grupos com ou sem desordens ovarianas.

Entretanto, em 1999, Koray *et al.* avaliaram as concentrações séricas do LH por ensaio convencional de quimioluminescência em mulheres com SOP, e encontraram valores inferiores para mulheres rs1800447 / rs34349826 genótipo heterozigoto (TC/TC) em relação ao grupo de mulheres saudáveis, com $p = 0,03$. Os demais hormônios avaliados no estudo apresentaram concentrações séricas que não diferiram entre os grupos avaliados. Essa diferença provavelmente foi encontrada pela inabilidade do método em detectar o LH variante (KORAY *et al.*, 1999). Conclusão similar a obtida em avaliação do caso de uma paciente jovem, infértil,

apresentando oligomenorréia e hirsutismo, com concentração sérica de LH normal, em que foi detectado o genótipo heterozigoto (KURIOKA *et al.*, 1999).

No Brasil, foi avaliada a presença do polimorfismo do gene *LHB* rs1800447 / rs34349826 em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico. A concentração sérica do LH foi medida por método imunofluorimétrico. Não houve relação entre a presença da variante alélica C com os valores de LH para grupo genótipo heterozigoto (TC/TC) em relação a grupo controle saudável (BERGER *et al.*, 2005). Assim também observado em relação a mulheres finlandesas com abortos recorrentes espontâneos. Nesse grupo, a concentração sérica média do LH, avaliada por método imunofluorimétrico, não diferiu entre o grupo com genótipo heterozigoto (TC/TC) e o grupo controle genótipo homozigoto selvagem (TT/TT) (TULPPALA *et al.*, 1998).

Em nosso estudo, a média da concentração sérica do LH nas pacientes com genótipo heterozigoto (TC/TC) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo de genótipo homozigoto selvagem (TT/TT) ($4,93 \pm 2,59$ mUI/ml *versus* $9,99 \pm 12,06$ mUI/ml, respectivamente, com $p = 0,412$). Apesar dos poucos representantes no grupo heterozigoto, a análise da concentração da variante foi realizada pelo método de quimioluminescência, o qual não é capaz de detectar variantes genéticas do LH. Apesar disso, os resultados não confirmaram a expectativa de se obter menor concentração sérica do LH no grupo de genótipo heterozigoto. Observa-se uma limitação existente neste estudo relacionada ao período do ciclo menstrual no qual foram coletadas as amostras sanguíneas. A coleta não foi realizada em período padronizado, uma vez que o período ideal seria a fase folicular do ciclo menstrual; o que pode ter gerado grande variação entre os valores de concentração sérica do LH obtidos nesse estudo.

5.3 rs1800447 / rs34349826 E SÍNDROME METABÓLICA

Têm sido relatadas diferenças de frequência do polimorfismo do gene *LHB* rs1800447 / rs34349826 quando relacionados obesidade e o diagnóstico de SOP. Um estudo inglês comparou a taxa entre mulheres com ciclos menstruais regulares e mulheres com a síndrome. Não foram encontrados valores significativos para o grupo de mulheres com SOP não obesas, contrastando com os resultados obtidos em mulheres obesas com a síndrome (RAJKHOWA *et al.*, 1995).

Tulppala *et al.*, 1998, ao avaliarem o polimorfismo em mulheres inférteis, encontraram relação entre a presença da variante alélica C (60%) em grupo de mulheres com sobrepeso, não identificada naquelas com peso normal (30%), com $p < 0,05$.

Em análise de mulheres japonesas com variadas desordens ginecológicas, não foi encontrada diferença na frequência da variante alélica C no grupo de pacientes com diagnóstico de SOP, com ou sem obesidade (TAKAHASHI *et al.*, 1999). O mesmo resultado foi descrito em estudo realizado com populações finlandesas, inglesas e americanas, nas quais a presença do polimorfismo foi similar entre obesas e não obesas, com ou sem a síndrome. No entanto, a frequência foi menor em obesas com SOP, sugerindo que o polimorfismo do gene do *LHB* possa exercer alguma proteção em indivíduos obesos. Concluiu-se então que a avaliação do polimorfismo rs1800447 / rs34349826 no gene *LHB* poderia discriminar indivíduos com maior ou menor risco para o desenvolvimento de SOP (TAPANAIEN *et al.*, 1999).

Em nosso trabalho, o grupo com genótipo homozigoto selvagem (TT/TT) para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 era composto de maioria obesa. Já no grupo de genótipo heterozigoto (TC/TC), todos os indivíduos eram obesos. Porém, não houve relação estatisticamente significativa entre obesidade e a presença da variante alélica C ($p = 0,28$), assim como entre o aumento da circunferência abdominal e o genótipo heterozigoto ($p = 0,13$).

Nota-se ainda, que não foi identificada relação da obesidade com os demais polimorfismos analisados. O mesmo resultado encontrado quando realizada a análise múltipla de polimorfismos identificados no gene do *LHB* das 50 pacientes com síndrome dos ovários policísticos avaliadas neste trabalho.

5.4 POLIMORFISMOS DO GENE *LHB* E PARÂMETROS DA SOP – HIPERANDROGENISMO, HIRSUTISMO E RESISTÊNCIA INSULÍNICA

O diagnóstico de hirsutismo utilizando índice semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey é passível de críticas. O índice utiliza meio matemático para definir distribuição de caracteres qualitativos anormais da pilificação. Sua realização é subjetiva, por ser examinador dependente, e ainda é sujeito à variável como a depilação. Não diferencia a importância entre as áreas corporais analisadas e não considera a velocidade de crescimento

dos pêlos corporais (BARTH *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a avaliação do índice de Ferriman – Gallwey foi realizado por um único examinador.

Foram observados diferentes valores para o índice de hirsutismo semi-quantitativo modificado de Ferriman-Gallwey na presença do alelo variante C para o rs1800447 / rs34349826, de forma estatisticamente significativa, com $p = 0,04$. Para esse polimorfismo, no grupo de mulheres com SOP estudado, entre os pacientes com genótipo homocigoto selvagem (TT/TT), 69% apresentavam-se hirsutas. Entre as pacientes heterocigotas (TC/TC), todas hirsutas, 25% apresentou hirsutismo leve e 75% hirsutismo grave, com índice de Ferriman – Gallwey mínimo de 16 e máximo de 25.

Estudos anteriores mostraram associação da SOP com hirsutismo em 86% (KORAY *et al.*, 1999) e 56,7% dos casos (AMATO *et al.*, 2006). Apesar da pequena amostra de pacientes com genótipo variante do presente estudo, obtivemos relação e frequência genotípica com o hirsutismo compatíveis às encontradas nestes trabalhos.

Na literatura, ainda não foi realizada avaliação direcionada ao estudo da relação entre o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 do gene *LHB* e a presença ou mesmo graduação do hirsutismo, assim como não há trabalho que tenha realizado, simultaneamente, avaliação da relação desse polimorfismo com hirsutismo e SOP. É possível que a maior bioatividade do LH variante possa influenciar a manifestação fenotípica da SOP, incluindo o hirsutismo, justificando os resultados descritos. No entanto, a avaliação desse parâmetro em maior número de pacientes com SOP e a identificação de maior número de indivíduos portadores do alelo C são necessárias para esclarecer essa diferença.

Autores tentaram correlacionar a presença do hirsutismo com as concentrações séricas de andrógenos.

Em um estudo inglês, o autor identificou que mulheres com genótipo heterocigoto (TC/TC) para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 apresentavam concentrações séricas elevadas de estradiol, testosterona e globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), quando comparadas com indivíduos de genótipo homocigoto selvagem (TT/TT) para o gene *LHB*. Correlacionou-se o achado com a maior atividade do LH variante *in vivo* (RAJKHOWA *et al.*, 1995). Porém, analisando pacientes finlandesas saudáveis, foram comparados grupos com *LHB* em genótipo variante (TC/TC e CC/CC) e *LHB* genótipo homocigoto selvagem (TT/TT), de

idades entre 16 e 72 anos. Não houve diferença relacionada à SHBG e à concentração sérica de estradiol para todas as idades. Apenas foi notada tendência à elevação da concentração sérica de testosterona como aumento da faixa etária, com significativa diferença entre as mulheres em menopausa, genótipo variante, e o genótipo homocigoto selvagem. Sugere-se que o *LHB* variante, por sua maior bioatividade, estaria relacionado à maior intensidade de hiperplasia estromal ovariana, com conseqüente maior produção de testosterona em mulheres menopausadas (HILL *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, a presença do hiperandrogenismo foi de 100% no grupo variante, enquanto no grupo genótipo homocigoto selvagem (TT/TT) de 76,2% ($p = 0,56$). No entanto, a avaliação laboratorial do hiperandrogenismo, pela medida da concentração sérica da testosterona total, não demonstrou significado estatístico que justificasse a influência da presença da variante alélica C e o hirsutismo. Dentre as mulheres heterocigotas (TC/TC), três apresentaram concentração sérica de testosterona normal, e apenas uma paciente teve testosterona elevada (191 ng/dl). Observa-se a dificuldade de se avaliar a testosterona sérica, por não corresponder ao tipo e concentração exata de hormônios androgênicos em ação no nível intracelular. Além disso, é possível que o pequeno número de pacientes identificadas com genótipo variante tenha influenciado esses resultados.

Ao estudar a SOP e hirsutismo, Cosar *et al.*, 2008, confirmaram não haver relação entre a presença do hirsutismo e alteração em hormônios sexuais. Porém, observaram ligação entre o hirsutismo e a sensibilidade insulínica. Alguns autores têm demonstrado que a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) estariam envolvidos com o estímulo da unidade pilosebácea, juntamente com os andrógenos. Foi demonstrada a presença de RNA mensageiro de IGF na papila dérmica do folículo piloso em região de topografia de pilificação tipicamente masculina. Porém, não foi observada sua expressão em folículos capilares cutâneos de outras localizações. Houve aumento do RNA mensageiro do IGF estimulada por andrógenos, o qual foi antagonizado por acetato de ciproterona. Desse modo, sugeriu-se o envolvimento do IGF na indução de desenvolvimento de pêlos sob estímulo andrógeno (ITAMI *et al.*, 1995). Posteriormente, em estudo envolvendo o hirsutismo idiopático, foi observado que essas pacientes apresentavam maior concentração sérica de insulina, assim como Homa – RI elevado, (ÜNLÜHIZARCI *et al.*, 2004).

De acordo com a teoria dos mecanismos que desencadeiam o hiperandrogenismo em mulheres com hiperinsulinemia, altas concentrações de insulina circulante agem no estroma

ovariano tanto por via do receptor de insulina, quanto do receptor de IGF-I. Nessas células, o IGF-I em sinergismo com o LH, promove a luteinização do estroma ovariano, atresia folicular e predominância na produção de andrógenos e, conseqüentemente, a fração livre da testosterona, contribuindo, assim, para o aumento do hiperandrogenismo (MOTTA *et al.*, 2000).

Em avaliação de mulheres hirsutas, foi demonstrada a associação entre o índice de Ferriman–Gallwey e a redução da sensibilidade insulínica. Essa relação também esteve presente em pacientes com índice da massa corpórea dentro dos limites da normalidade (AMATO *et al.*, 2006). Em contraste, estudo posterior não confirmou relação entre hirsutismo e resistência insulínica, porém foram avaliados apenas pacientes com peso normal ou sobrepeso (COSAR *et al.*, 2008).

No presente trabalho foram identificados diferentes e significativos resultados na presença dos alelos variantes de alguns polimorfismos do gene *LHB* (rs1800447 / rs34349826, rs1056914, rs2387588 / rs427687, rs1056917), para os perfis de genótipos e para os haplótipos TTCATACT e CCGAC-CC, e as médias encontradas para o índice de Ferriman-Gallwey. Para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826, o resultado poderia ser justificado pelo exposto anteriormente no que se refere à maior bioatividade do LH variante circulante. Todavia, para os demais polimorfismos, não há registros na literatura de estudos sobre a estrutura molecular e fisiologia dos mesmos que possam melhor esclarecer o resultado encontrado. Nota-se ainda, a intrigante relação do índice de Ferriman com o rs2387588 / rs427687. Esse polimorfismo encontra-se em desequilíbrio de ligação nas bases 1155 e 1162 do íntron 2. Como a região *splicing* do íntron 2 inicia-se na base 1149, conseqüentemente espera-se que esses polimorfismos não sejam traduzidos. Portanto, o resultado apresentado levanta a hipótese de que a presença dos polimorfismos rs2387588 / rs427687 poderia criar sítio de *splicing* alternativo no gene *LHB*.

Foi significativo o resultado encontrado para o haplótipo TTCATACT no que se refere à graduação de hirsutismo segundo o índice de Ferriman-Gallwey. Da mesma forma para os haplótipos CCGAC-CC, TTGATACT e TTGCTACC com a elevação da concentração sérica da testosterona, com *odds ratio* de valores numéricos positivos, denotando-os como fator de risco para a presença de hiperandrogenismo laboratorial. No entanto, para os haplótipos TTCCC-CC, TTCATACT e TTCATAAT, o *odds ratio* de valores numéricos negativos, denotou fator protetor para a presença desses haplótipos e elevação da testosterona.

Não foi identificada relação entre os polimorfismos isolados ou os haplótipos das 50 mulheres com SOP e o Homa-RI. Portanto, no presente estudo, não foi possível afirmar que a presença dos polimorfismos no gene *LHB*, estivesse associada à resistência insulínica nas 50 mulheres avaliadas com a síndrome dos ovários policísticos.

5.5 POLIMORFISMOS DO GENE *LHB* E FERTILIDADE

Infertilidade pode ser atribuída a doenças tanto masculinas quanto femininas. Afeta 10 a 20% dos casais com distribuição de frequência semelhante entre ambos (LIAO *et al.*, 1998). A SOP representa a principal causa de anovulação crônica, estando associada à infertilidade em até 75% dos casos (SERAFINI *et al.*, 2007).

A relação entre os polimorfismos do gene *LHB* e fertilidade não é bem definida. Foi descrita a possibilidade de que o polimorfismo rs1800447 / rs34349826 poderia estar envolvido em quadros de recorrência espontânea de abortamentos (definida como pelo menos três episódios consecutivos), uma vez que o LH age na manutenção e função do corpo lúteo e subsequente maturação endometrial. Entre as mulheres finlandesas estudadas, a frequência do polimorfismo foi similar a encontrada na população geral e ainda não houve relação com a presença da variante alélica C (TULPPALA *et al.*, 1998).

Outros autores estudaram mulheres japonesas com variadas desordens ginecológicas, incluindo infertilidade. O polimorfismo rs1800447 / rs34349826 foi observado em 21,1% das pacientes inférteis, e 26,2% no grupo fértil, não havendo diferença estatística entre os mesmos. As mulheres estudadas inférteis, com falência ovariana prematura – FOP - (definida como a perda de função ovariana antes dos 40 anos de idade), tinham genótipo variante em 53,3% dos casos (TAKAHASHI *et al.*, 2001).

No presente trabalho, das quatro pacientes com genótipo heterozigoto (TC/TC) para o polimorfismo rs1800447 / rs34349826, apenas uma paciente relatou gestação, com paridade correspondente. Porém, o número de pacientes avaliados foi pequeno. Acrescenta-se ainda o fato da tenra idade das mesmas, uma delas com 16 anos, sendo a de idade mais avançada, 29 anos, primigesta. Portanto, não foi possível analisar a presença da variante alélica C desse polimorfismo e sua potencial influência na fertilidade nessas pacientes.

Com o objetivo de investigar a existência de relação entre o polimorfismo do gene do *LHB* rs1056917 e a infertilidade feminina, autores observaram que 4% das mulheres inférteis com endometriose tinham genótipo heterozigoto (CT). Não foram encontrados outros polimorfismos na leitura do seqüenciamento genético dos éxons 2 e 3 do gene *LHB* das mulheres estudadas (LIAO *et al.*, 1998).

Ainda não está definido o efeito da presença do polimorfismo rs1056917 na fertilidade feminina. No entanto, a mutação, mesmo em genótipo de heterozigose, é causa de infertilidade masculina (RAMANUJAM *et al.*, 2000).

A glicina é um importante componente na formação de regiões hidrofóbicas em estruturas proteicas, e a serina apresenta cadeia polarizada. O polimorfismo rs1056917 do gene do *LHB* provoca a substituição de uma glicina pela serina, o que introduz força hidrofílica na molécula do LH. Observa-se ainda que a serina é um importante aminoácido presente no sítio de ligação de oligossacarídeos na porção carboxiterminal do hCG. A introdução da serina poderia criar um potencial sítio de glicosilação da subunidade β do LH. Isso poderia afetar sua conformação natural e conseqüentemente sua funcionalidade, podendo relacionar-se com a infertilidade (LIAO *et al.*, 1998; 2002).

Liao *et al.* (2002) estudaram também a bioatividade dos genótipos variantes do polimorfismo rs1056917, expressado em células de ovário de ratas chinesas, cotransfectadas com a subunidade alfa do LH, a variante da subunidade beta do LH e com o *LHB* genótipo homozigoto selvagem (CC). A variante alélica T não foi relacionada à alteração na eficácia da dimerização $\alpha\beta$ subunidades do LH. Entretanto, apresentou menor ligação ao seu receptor, assim como menor biopotência para estímulo da produção de progesterona, quando comparada ao homozigoto selvagem. No estudo, não foi encontrada ligação oligossacarídea relacionada à serina introduzida na variante analisada. Concluiu-se que o genótipo variante estaria relacionado à infertilidade especificamente por alteração em sua função gonadal (LIAO *et al.*, 2002).

No que diz respeito à infertilidade masculina, foram avaliadas variantes do *LHB* rs1056917 em homens inférteis chineses de Singapura. Observado 3,4% de indivíduos genótipo heterozigoto (CT), sendo que todos apresentavam varicocele (RAMANUJAM *et al.*, 2000).

Já Ramanujam *et al.* (1999) relacionaram polimorfismos distintos do gene *LHB* (rs1800447 / rs34349826 e rs1056917) com a presença de distúrbios do ciclo menstrual em mulheres chinesas de Singapura. Não foram encontrados resultados relevantes para o primeiro polimorfismo entre o grupo com distúrbio menstrual e o grupo controle. A respeito do segundo, o mesmo foi encontrado apenas em mulheres com distúrbios menstruais, de forma estatisticamente significativa.

No presente estudo, das 27 pacientes com genótipo variante para o polimorfismo rs1056917, 25,9% (n=7) são férteis. Apenas uma paciente (3,7%), que apresentou genótipo variante em heterozigose (CT), tinha histórico de três gestações com um aborto espontâneo. Porém, acrescenta-se a necessidade de melhor investigação sobre a fertilidade das 50 mulheres estudadas nesse trabalho, com um maior detalhamento sobre as tentativas de gravidez e condições relacionadas à gestação.

5.6 VARIANTE DO GENE *LHB* C1430A

Como mencionado sobre a estrutura do *LHB*, a asparagina é um importante aminoácido de N-glicosilação da molécula. A nova mutação encontrada corresponde à substituição de uma citosina por uma adenina na base 1430, localizada no éxon 3 da subunidade β do LH. Isso resulta na troca do aminoácido treonina por uma asparagina, representando um potencial sítio de uma glicosilação extra na molécula do *LHB*.

Entre as três pacientes identificadas com o genótipo heterozigoto (CA) (casos 7, 14 e 32), uma paciente (caso 14) tem fertilidade comprovada com uma gestação, sem histórico de dificuldades para engravidar. No entanto, as demais pacientes são nulíparas, sem tentativas de gravidez. Conforme relatado pelas mesmas, nos casos 7 e 14 há história de infertilidade na família (caso 7: tia paterna com duas gestações sofrendo dois abortos espontâneos; caso 14: tia materna infértil, sem histórico de abortamentos). Não foi relatado, pelos casos 7 e 14, ocorrência de neoplasias hormônio-dependentes (próstata, mama ou útero), ou endometriose ou varicocele nas respectivas famílias. A paciente correspondente ao caso 32 perdeu o seguimento e não pôde ser contactada após ter sido identificada a mutação.

Nesse estudo, como anteriormente detalhado, não foram identificadas relações entre os critérios clínicos e/ou laboratoriais analisados e a presença da variante alélica A nos genótipos

heterozigotos identificados. Estudos posteriores poderiam melhor esclarecer se existem, e quais seriam, as alterações estruturais e funcionais dessa nova mutação sobre a molécula do LHB e sua fisiologia.

6 CONCLUSÕES

-A frequência encontrada dos polimorfismos do gene *LHB* analisados em 50 mulheres brasileiras portadoras da síndrome dos ovários policísticos foi semelhante à descrita na literatura, tanto para populações normais de diferentes etnias, quanto para mulheres com SOP.

-Para os polimorfismos do gene *LHB*: rs1800447 / rs34349826, rs1056914, rs2387588 / rs427687, rs1056917, a média do índice de Ferriman-Gallwey foi diferente entre as mulheres com genótipo selvagem e variante. Para os polimorfismos rs1800447 / rs34349826 e rs1056917 essa média foi maior nos variantes em relação aos selvagens e para os polimorfismos rs1056914 e rs2387588 / rs427687 foi menor. Resultado semelhante, com *odds ratio* positivo, foi observado para os haplótipos TTCATACT (OR=4,2) e CCGAC-CC (OR=19,1).

-Os perfis genotípicos TTGCC—C e TTSMYA-C apresentaram maior número de mulheres não hirsutas.

-No que compete aos critérios clínicos de SOP, mais especificamente à manifestação clínica de hiperandrogenismo representada pela presença do hirsutismo, foi observado que as quatro mulheres com genótipo heterozigoto para o rs1800447 / rs34349826 apresentaram maior graduação do hirsutismo segundo o índice de Ferriman-Gallwey.

-Foi identificado um *odds ratio* positivo (OR=0,4) para o haplótipo TTCATACT e a presença de hirsutismo.

-No que se refere à manifestação laboratorial de hiperandrogenismo, os haplótipos CCGAC-CC, TTGATACT e TTGCTACC apresentaram *odds ratio* positivos (OR: 45,5, 2,1 e 39,1, respectivamente) para a elevação da concentração sérica da testosterona. Entretanto, os haplótipos TTCCC-CC, TTCATAACC e TTCATAAT, revelaram proteção para o hiperandrogenismo laboratorial, com *odds ratio* de valores negativos (OR=-6,6; -22,5 e -22,6).

-Em respeito à SM, não foram observadas associações entre os critérios clínicos da síndrome e os polimorfismos do gene *LHB*, assim como para os haplótipos identificados.

7 REFERÊNCIAS

- Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Pettersson K, Huhtaniemi I. Genetic Variant of Luteinizing Hormone and Risk of Breast Cancer in Older Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9: 839-842, 2000.
- Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Pettersson P, Huhtaniemi I. Luteinizing Hormone, Its β -Subunit Variant, and Epithelial Ovarian Cancer: The Gonadotropin Hypothesis Revisited. *American Journal of Epidemiology*, 154 (1): 43-49, 2001.
- Allen NE, Forrest MS, Key TJ. The association between polymorphisms in the CYP17 and 5 α -reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Mar, 10(3):185-9, 2001.
- Amato MC, Galluzzo A, Merlino S, Mattina A, Richiusa P, Criscimanna A, Giordano C. Lower insulin sensitivity differentiates hirsute from non-hirsute Sicilian women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.*;155(6):859-65, 2006.
- Annewieke W, Van den Beld, Huhtaniemi IT, Pettersson KLS, Pols AP, Grobbee DE, Jong FHD, Lamberts SWJ. Luteinizing Hormone and Different Genetic Variants, as Indicators of Frailty in Healthy Elderly Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (4): 1334-1339, 1999.
- Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 320: 559-65, 1989.
- Barth JH, Yasmin E, Balent AH. The diagnosis of PCOS: the criteria are insufficiently robust for clinical research. *Clinical Endocrinology* 67(6): 811-815, 2007.
- Berger K, Billerbeck A, Costa E, Carvalho L, Arnhold I, Mendonça B. Frequency of the allelic variant (trp8arg/ile15thr) of the luteinizing hormone gene in a brazilian cohort of healthy subjects and in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Clinics*, 60(6): 431-4, 2005.

- Bergendah M, Veldhuis JD. Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans?-Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective. *Human Reproduction*. Vol 16(6): 1058-1064, 2001.
- 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* 59: 323-31, 1999.
- Cosar E, Koken G, Sahin FK, Arioz DT, Yilmazer M. Insulin sensitivity does not differentiate by hirsutism in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J*. Jul; 55(3):465-8, 2008.
- 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 Mar*;71(3):425-30, 1999.
- Erickson GF, Hsued AJ, Quigley ME, Rebar RW, Yen SSS. Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 49:514-9, 1979.
- Ferriman D, Gallwey JD. Clinical Assessment of Body Hair Growth in Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 21: 1440-1447, 1961.
- Gazvani R, Pakarinen P, Fowler P, Logan S, Huhtaniemi L. Lack of association of the common immunologically anomalous LH with endometriosis. *Human Reproduction*, 17 (6): 1532-1534, 2002.
- Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMAIR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 72:219-220, 2006.
- Goodarzi MO, Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Guo X, Azziz R. Variants in the 5 α -Reductase Type 1 and Type 2 Genes Are Associated with Polycystic Ovary Syndrome and the Severity of Hirsutism in Affected Women *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 91, No. 10 4085-4091, 2006.

- 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.* Jan 5;263(1):36-44, 1988.
- 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. Metabolism*, 80: 1257 – 1263, 1995.
- Henke A, Gromoll J. New insights into the evolution of chorionic gonadotrophin. *Molecular and cellular endocrinology* 291:11-19, 2008.
- Hill M, Huhtaniemi IT, Hampl R, Stárka L Genetic variant of luteinizing hormone: impact on gonadal steroid sex hormones in women *Physiol Res.*50(6):583-7, 2001.
- Itami S, Kurata S, Takayasu S. Androgen Induction of Follicular Epithelial Cell Growth Is Mediated via Insulin-like Growth Factor-I from Dermal Papilla Cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 212: 988-994, 1995.
- Koray E, Erel CT, Cine N, Ozbek U, Hacıhanefioğlu 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.* Mar;71(3):425-30, 1999.
- Kurioka H, Takahashi K, Irikoma M, Okada M, Ozaki T, Ueda T, Miyazaki K. Diagnostic difficulty in polycystic ovary syndrome due to an LH-beta-subunit variant *Eur J Endocrinol.* Mar;140(3):235-8, 1999.
- Lamminen T., Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *European Journal of Pharmacology*, 414: 1-7, 2001.
- Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility *Fertil Steril.* Jan; 69(1):102-6, 1998.

- Liao WX, Goh HH, Roy AC. Functional characterization of a natural variant of luteinizing hormone. *Hum Genet.* Aug; 111(2):219-24, 2002.
- Lobo RA. Disturbances of androgen secretion and metabolism in polycystic ovary syndrome *Clin Obstet Gynaecol.* Sep; 12(3):633-47, 1985.
- Martin KA, Chang RJ, Ehrmann DA, Ibanez L, Lobo RA, Rosenfield RL, Shapiro J, Montori VM, Swiglo BA. Clinical Guidelines Evaluation and Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93 (4), 1105-1120.
- Melmed S, Kleinber DL: Anterior pituitary in Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. *Williams textbook of endocrinology.* Philadelphia saunders 8:177-279, 2003.
- Motta LDC, Casulari LA. Insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina na síndrome dos ovários policísticos. *ARS CVRANDI – Revista da Clínica Médica* 5: 44-55, 2000.
- Motta LDC, Casulari LA. Síndrome dos ovários policísticos: fisiopatologia e tratamento. *Brasília Médica* 37 (1/2): 31-37, 2000.
- 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.* Jun;67(6):998-1004, 1997.
- Nilsson CH, Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Pettersson K, Huhtaniemi IT Disparate response of wild-type and variant forms of LH to GnRH stimulation in individuals heterozygous for the LHbeta variant allele *Hum Reprod.* Feb;16(2):230-5, 2001.
- Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman *J Clin Endocrinol Metab.* Jan;74(1):164-71, 1992.

- Powell PL, Piersma D, Kevenaar ME, Van Staveren IL, Themmen APN, Iacopetta BJ, Berns EMJJ. Luteinizing Hormone Signaling and Breast Cancer: Polymorphisms and Age of Onset. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (4): 1653-1657, 2003.
- Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW, Pettersson K, Haavisto AM, Huhtaniemi I, Clayton RN. Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Sep;43(3):297-303, 1995.
- Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC, Loganath A, Goh HH, NG SC. Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders, *Clinical Endocrinology*, Volume 51(2), 243-246, August 1999.
- Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC, NG SC. Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility. *Human Reproduction*, 15 (4): 925-928, 2000.
- Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg C, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 57: 1320-9, 1976.
- Ronfield RL, Rich BH, Wolfsdorf JI, Cassorla F, Bongiovanni AM. Pubertal presentation of congenital delta 3-5beta hydroxysteroiddehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 51:345-53, 1980.
- Serafini PC, Massaguer A, Fassolas G, Motta ELA. Disfunções endócrinas na SOP com infertilidade em Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB. *Endocrinologia, Atheneu*, 37: 683-695, 2007.
- Shiraishi, K. e Naito, K. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the β subunit of the luteinizing hormone. *Endocr J*, 50(6): 733-737, 2003.
- Sorbara LR, Tang Z, Cama A, Xia J, Schenker E, Kohanski LA. Absence of insulin receptor gene mutations in three insulin-resistant woman with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 43: 1568-74, 1994.

- Starka L, Hill M, Hampl R, Huhtaniemi IT Genetic variant of luteinizing hormone in Czech Republic *Endocr Regul. Sep;33(3):103-8, 1999.*
- 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. Mar;137(3):831-8, 1996.*
- 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. Jan;71(1):96-101, 1999.*
- 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. Sep;143(3):375-81, 2000.*
- Takahashi K, Ozaki T, Kanasaki H, Miyazaki K Successful pregnancy in a woman with ovarian failure associated with mutation in the beta-subunit of luteinizing hormone. *Horm Res. 55(5):258-63, 2001.*
- Takahashi K, Karino K, Kanasaki H, Miyasaki K. Altered Kinetics of Pituitary Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in Women With Variant Luteinizing Hormone: Correlation With Ovulatory Disorders *Horm Res, 61:27-32, 2004.*
- Tapanainen J, Koivunen R, Fauser B, Taylor A, Clayton R, Rajkova M, White D, Franks S, Antilla L., Petterson K, Huhtaniemi I. A New Contributing Factor to Polycystic Ovary Syndrome: The Genetic Variant of Luteinizing Hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 84:1711-1715, 1999.*
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) *Hum. Reprod. 19: 41-47, 2004.*
- Tulppala M, Huhtaniemi I, Ylikorkala O Genetic variant of luteinizing hormone in women with a history of recurrent miscarriage *Hum Reprod. Oct;13(10):2699-702, 1998.*

Van den Beld A., Huhtaniemi I., Pettersson K., Pols H., Grobbee D., Jong F., Lamberts S. Luteinizing Hormone and Different Genetic Variants, as Indicators of Frailty in Healthy Elderly Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (4): 1334-1339, 1999.

Vilar L. *Endocrinologia Clínica* Ed Guanabara Koogan; 3. ed; 2006.

Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4): 506-513, 1991.

Yen SS, Vela P, Ryan KJ. Effect of clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome: relationship between serum gonadotropin and corpus luteum function. *J Clin Endocrinol Metab* 31:7-13, 1970.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável-Contatos

Dra. Michele Delarmelina Reis Borba

3448-5000 *Telefone Geral HUB*3448-5229 *Departamento Clínica Médica*3448-5255 *Ambulatório de Endocrinologia*

SGAN Quadra 605 L2 Norte

Asa Norte Brasília-DF

CEP 70.840-901

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA****HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O pesquisador responsável pela pesquisa intitulada “ANÁLISE DA FREQUÊNCIA E DA REPERCUSSÃO DA VARIANTE ALÉLICA DA SUBUNIDADE BETA DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS”, convida a senhora a participar como voluntária desta pesquisa. Através deste documento, vem a informá-la o seguinte:

1- Estou participando de minha livre e espontânea vontade desta pesquisa, que avaliará a manifestações clínicas e laboratoriais existentes na Síndrome de Ovários Policísticos e a correlação com presença de variante do Hormônio Luteinizante (vLH). Esta pesquisa servirá para verificar se há relação entre a existência de variantes genéticas do LH genéticas e as manifestações da Síndrome dos Ovários Policísticos. Fui claramente informada sobre esta pesquisa e o exame que será realizado:

Serei solicitada a fornecer uma amostra de sangue de cerca de 20 ml; será feita punção na minha veia para coleta de sangue. Fui satisfatoriamente informada de que este procedimento NÃO resulta em riscos graves à minha saúde, apenas terei o desconforto da picada de agulha para punções de veia. A partir da coleta do sangue, serão cultivadas as células brancas do meu sangue para obter DNA (o meu código ou identidade genética), para que nele seja estudado o gene que possa estar alterado e relacionar-se à doença.

2- Fui informada de que a minha participação nesta pesquisa é importante para os avanços dos conhecimentos da Medicina, que ocorrem através de estudos como este. Neste caso, este estudo poderá contribuir para melhorar o entendimento das doenças relacionadas ao sistema reprodutivo.

3- Poderei ter acesso a todas as informações e esclarecimentos que desejar, a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa e tenho assegurado o direito de abandonar a participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem qualquer consequência ou prejuízo para mim ou no meu atendimento, bastando para isto comunicar o meu desejo aos pesquisadores responsáveis.

4- Nenhum tipo de pagamento será feito pela minha participação como voluntária nessa pesquisa, mas tenho a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de minha responsabilidade, excetuando-se o transporte e a alimentação que se fizerem necessários.

5- Quando estiver concluída a pesquisa, poderei, sob minha expressa solicitação, ser informada detalhadamente sobre os resultados e ter uma cópia da mesma.

6- Os pesquisadores garantem que qualquer informação pessoal bem como a minha participação serão mantidas sob sigilo, e a descrição e publicação dos resultados não resultará em identificação da pessoa examinada.

Sendo assim, concordo em participar da pesquisa acima descrita.

Brasília, de de

Nome:

Pesquisador Responsável:

Assinatura:

Testemunha:

8.2 ANEXO 2

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

Termo CLI

Registro

SOP – Hiperandrogenismo - LHv**Ficha de avaliação de pacientes**

Nome:

Telefone:

Endereço:

Data de Nascimento:

Idade:

Data primeira consulta:

Data da reavaliação:

Medicamentos em uso

Cortisol Basal	Cortisol pós 1mg dexta	Prolactina	TSH
T4 livre	Glicemia	Insulina	Homa IR
FSH	LH	Testosterona	DHT
Androstenediona	17OHP	DHEA	SDHEA
Peso	Quadril		
Altura	Ferriman		
IMC	Manifestações de hiperandrogenismo		
PAS			
PAD	G P A		
PAM	Ciclos Menstruais		
Cintura	Observações		
Lipidograma			
Triglicerídeos	Colesterol Total	HDL	LDL
			VLDL

8.3 ANEXO 3

ÍNDICE SEMI-QUANTITATIVO MODIFICADO DE FERRIMAN-GALLWEY
UTILIZADO PARA AS AVALIAÇÕES DAS 50 MULHERES PORTADORAS DE
SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS



Figura 1: Escore semi-quantitativo de Ferriman e Gallwey modificado

8.4 ANEXO 4

TABELAS DE CARACTERÍSTICAS DIVERSAS DAS 50 PACIENTES CASO A CASO

Tabela – Relação de parâmetros da síndrome dos ovários policísticos e concentrações séricas hormonais caso a caso.

		Ferriman	Testosterona	LH/FSH	LH	FSH	Prolactina	TSH
1		21	62	,61	3	5	.	2,08
2		13	52	1,11	2	1	9,1	3,13
3		32	170	1,66	7	4	11,6	1,83
4		13	48	1,89	15	8	15,1	.
5		25	94	1,39	7	5	28,1	2,07
6		12	147	2,37	16	7	7,5	,55
7		15	32	,45	2	5	20,7	1,52
8		9	.	1,06	2	2	14,3	1,47
9		9	65	1,48	11	7	4,9	4,20
10		2	25	,74	4	5	4,2	.
11		0	57	3,33	12	4	3,6	3,25
12		6	28	,82	5	6	6,3	2,82
13		18	.	,83	3	3	12,6	3,57
14		16	45	,32	2	7	7,9	,72
15		5	22	1,02	7	7	9,5	2,24
16		23	.	2,32	10	4	4,6	.
17		4	45	2,53	14	5	20,9	1,69
18		9	55	,75	7	10	7,3	1,80
19		3	55	1,65	10	6	19,3	13,90
20		0	83	2,45	13	5	12,6	1,61
21		12	29	,64	5	7	7,8	.
22		6	27	,53	6	11	20,4	4,57
23		7	75	2,07	9	4	4,5	.
24		17	66	2,07	14	7	8,6	3,09
25		2	34	,69	3	4	5,9	2,31
26		24	191	1,00	3	3	18,2	1,70
Total	n	50	45	49	49	49	48	41
	Média	9,48	62,14	1,5349	9,10	5,77	12,070	2,5702
	Desvio padrão	±7,949	±42,741	±1,28557	±11,240	±2,466	±6,6147	±2,08610
	Mediana	7,50	51,90	1,0719	7,18	5,31	10,350	2,0900

Tabela – Relação de parâmetros da síndrome dos ovários policísticos e concentrações séricas hormonais caso a caso. Continuação:

		Ferriman	Testosterona	LH/FSH	LH	FSH	Prolactina	TSH
26		24	191	1,00	3	3	18,2	1,70
27		2	40	,76	5	6	8,0	2,95
28		15	13	,75	4	5	5,7	.
29		11	34	,69	3	4	26,3	4,05
30		11	31	,40	2	6	5,0	2,09
31		7	25	,71	4	6	11,0	,86
32		3	53	6,77	23	3	10,4	.
33		3	46	6,53	78	12	9,7	1,07
34		2	54	2,09	8	4	8,3	.
35		2	20	,86	12	14	10,3	3,50
36		11	190	1,74	10	6	14,9	3,36
37		0	64	1,36	8	6	12,2	2,47
38		16	104	1,41	7	5	16,7	3,78
39		0
40		4	101	,82	2	2	21,0	2,96
41		3	35	1,06	3	3	19,5	,62
42		13	31	,92	7	8	6,6	1,57
43		8	.	1,02	7	7	9,5	2,24
44		5	84	1,25	6	5	12,6	1,68
45		0	38	,52	2	3	6,8	1,20
46		23	44	1,07	7	7	22,4	3,77
47		3	82	2,22	10	4	10,6	1,94
48		22	32	1,20	8	7	15,4	1,83
49		4	67	2,92	15	5	3,7	1,22
50		3	104	2,39	23	10	27,5	2,10
Total	n	50	45	49	49	49	48	41
	Média	9,48	62,14	1,5349	9,10	5,77	12,070	2,5702
	Desvio padrão	±7,949	±42,741	±1,28557	±11,240	±2,466	±6,6147	±2,08610
	Mediana	7,50	51,90	1,0719	7,18	5,31	10,350	2,0900

Tabela –Relação de parâmetros de Síndrome Metabólica caso a caso.

	Idade	IMC	Pressão arterial sistólica	Pressão arterial diastólica	Circunferência abdominal	Glicemia	Triglicerídeos	HDL	HOMA-IR	
1	29	18,55	130	80	69	82	.	.	,88	
2	28	31,45	120	80	95	88	84	48	1,91	
3	42	34,22	130	80	105	119	247	34	9,73	
4	24	31,31	100	70	101	86	200	46	1,82	
5	16	29,72	100	70	100	82	116	33	2,81	
6	23	19,92	110	70	70	97	.	.	,74	
7	20	30,41	120	80	107	74	112	42	3,91	
8	20	31,44	110	80	68	74	104	61	,93	
9	23	42,46	120	80	118	74	51	57	1,11	
10	36	22,76	100	70	88	75	.	.	7,87	
11	35	27,47	120	80	89	102	373	44	7,18	
12	25	33,18	110	80	113	101	131	41	6,48	
13	25	27,62	120	60	82	89	85	82	,79	
14	29	27,69	110	70	97	114	115	24	6,14	
15	37	31,79	120	90	97	87	69	44	1,05	
16	20	35,38	120	90	110	82	56	46	5,32	
17	14	21,05	110	60	80	78	37	58	2,77	
18	39	37,72	120	80	104	107	60	45	3,54	
19	34	28,16	120	90	95	107	91	65	3,20	
20	32	28,02	100	60	88	98	94	64	1,32	
21	23	31,25	110	70	76	88	.	.	,43	
22	28	21,29	120	80	78	85	73	43	,99	
23	31	34,93	110	70	107	81	210	.	2,02	
24	38	20,93	100	70	81	80	83	58	10,21	
25	35	33,76	100	70	112	122	275	39	6,93	
n	50	50	50	50	50	49	40	39	49	
Total	Média	27,70	28,0080	113,16	74,48	89,55	90,35	112,82	49,97	3,8222
	Desvio padrão	±6,795	±6,82704	±12,055	±10,234	±16,500	±12,562	±73,319	±13,802	±3,33800
	Mediana	26,50	28,0642	110,00	70,00	88,00	88,00	88,00	46,00	2,7733

Tabela – Relação de parâmetros de Síndrome Metabólica caso a caso. Continuação:

	Idade	IMC	Pressão arterial sistólica	Pressão arterial diastólica	Circunferência abdominal	Glicemia	Triglicerídeos	HDL	HOMA-IR	
26	22	42,72	120	80	127	97	211	30	13,53	
27	34	28,52	142	110	86	95	49	37	3,00	
28	33	31,39	110	70	82	119	.	.	6,02	
29	22	23,04	100	60	88	107	.	.	10,99	
30	16	18,59	90	60	70	83	81	85	2,68	
31	19	21,63	120	80	80	75	71	46	8,67	
32	25	21,23	96	64	68	96	.	.	5,31	
33	22	21,72	110	60	70	91	.	.	5,12	
34	24	19,38	110	70	69	95	.	.	3,24	
35	24	20,20	110	70	69	74	50	80	2,17	
36	29	34,63	120	80	103	89	100	46	1,32	
37	26	28,11	120	80	97	93	52	45	4,87	
38	26	38,01	100	80	112	87	258	33	11,64	
39	30	21,56	100	70	70	
40	35	43,64	130	90	111	87	117	41	3,59	
41	27	26,20	110	70	87	77	112	49	1,14	
42	41	19,83	100	60	82	97	54	66	1,08	
43	37	27,55	120	70	90	95	69	44	1,85	
44	22	18,93	110	70	72	84	90	67	,43	
45	23	26,66	120	80	75	91	63	55	,45	
46	23	30,83	150	80	99	97	102	45	3,86	
47	32	31,63	130	90	97	88	86	46	2,56	
48	34	23,53	100	70	70	86	67	50	,89	
49	29	32,17	110	70	114	81	130	57	2,42	
50	24	16,21	100	60	61	71	85	53	,35	
n	50	50	50	50	50	49	40	39	49	
Total	Média	27,70	28,0080	113,16	74,48	89,55	90,35	112,82	49,97	3,8222
	Desvio padrão	±6,795	±6,82704	±12,055	±10,234	±16,500	±12,562	±73,319	±13,802	±3,33800
	Mediana	26,50	28,0642	110,00	70,00	88,00	88,00	88,00	46,00	2,7733

8.5 ANEXO 5

TABELAS DE DIVERSAS VARIÁVEIS ANALISADAS E SUAS DISTRIBUIÇÕES DE ACORDO COM OS DIVERSOS GENÓTIPOS DE CADA POLIMORFISMO AVALIADO

-POLIMORFISMO DO GENE *LHB* rs6521:**Tabela 1 – Concentrações hormonais segundo o genótipo para o rs6521**

	CC (homozigoto selvagem)			CG (heterozigoto)			GG (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona Total (ng/dl)	10	71	±56	17	48	±22	18	75	±52	1,56*
LH (mUI/ml)	10	8	±6	17	8	±6	18	12	±17	0,50*
FSH (mUI/ml)	10	5	±2	17	6	±3	18	6	±2	0,90*
LH/FSH	10	1,45	±0,7	17	1,6	±1,65	18	1,62	±1,3	0,06*

DP, desvio padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio foliculo estimulante; *Teste de ANOVA

Tabela 2 - Distribuição dos valores das médias do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos do polimorfismo do gene *LHB* rs6521

	AA (homozigoto selvagem)			AC (heterozigoto)			CC (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Ferriman & Gallwey	8	14	±7	22	11	±10	15	7	±5	0,01*

Tabela 3 – Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para rs6521 em 46 mulheres com síndrome dos ovários policísticos

	CC (homozigoto selvagem)			CG (heterozigoto)			GG (homozigoto variante)			P
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	10	28	±8	17	29	±6	18	27	±7	0,52*
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	10	29,1	±5,6	17	26,6	±6,8	18	28,3	±7,9	0,43*
Circunferência abdominal (cm)	10	94	±16	17	86	±16	18	89	±18	0,52*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	10	112	±10	17	112	±12	18	115	±14	0,67*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	10	77	±7	17	71	±9	18	76	±13	0,35*
Glicemia (mg/dl)	10	88	±14	17	92	±14	18	90	±9	0,71*
Triglicédeos (mg/dl)	10	127	±65	17	105	±84	18	104	±60	0,30*
HDL (mg/dl)	10	47	±9	17	57	±18	18	46	±12	0,10*
Homa - RI	10	4,8	±3,5	17	2,83	±2,1	18	3,8	±4,0	0,31*

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, “*Homeostasis model assessment*” - resistência insulínica; * teste de ANOVA

-POLIMORFISMO DO GENE *LHB* rs1056914**Tabela 4 – Concentrações hormonais segundo o genótipo para o rs1066914**

	AA (homozigoto selvagem)			AC (heterozigoto)			CC (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona Total (ng/dl)	8	55	±46	22	65	±45	15	67	±46	0,68*
LH (mUI/ml)	8	8	±6	22	8	±5	15	13	±19	0,37*
FSH (mUI/ml)	8	6	±2	22	6	±3	15	6	±2	0,81*
LH/FSH	8	1,29	±0,8	22	1,2	±1,4	15	1,7	±1,4	0,77*

DP, desvio padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio foliculo estimulante; *teste de ANOVA

Tabela 5 – Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para rs1056914 em 45 mulheres com síndrome dos ovários policísticos

	AA (homozigoto selvagem)			AC (heterozigoto)			CC (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	8	26	±6	22	28	±7	15	28	±8	0,93*
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	8	28,5	±5,3	22	27,9	±7,2	15	27,4	±7,9	0,93*
Circunferência Abdominal (cm)	8	89	±17	22	91	±18	15	86	±15	0,76*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	8	109	±8	22	114	±14	15	113	±12	0,82*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	8	75	±8	22	74	±8	15	75	±15	0,69*
Glicemia (mg/dl)	8	86	±14	22	91	±13	15	91	±10	0,99*
Triglicérides (mg/dl)	8	109	±51	22	121	±81	15	93	±60	0,65*
HDL (mg/dl)	8	45	±12	22	52	±16	15	50	±12	0,22*
Homa - RI	8	3,45	±2,7	22	4,1	±3,5	15	3,3	±3,5	0,90*

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, “Homeostasis model assessment”- resistência insulínica; * teste de ANOVA

-POLIMORFISMO DO GENE *LHB* rs2387588 / rs4287687**Tabela 6 – Concentrações hormonais segundo o genótipo para o rs2387588 / rs4287687 e as variáveis relacionadas à Síndrome dos Ovários Policísticos das 47 pacientes avaliadas**

	TT e AA (homozigoto selvagem)			TC e A-(heterozigoto)			CC e -- (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona Total (ng/dl)	8	76	±65	22	49	±24	17	76	±52	0,14*
LH (mUI/ml)	8	8	±5	22	7	±5	17	12	±17	0,30*
FSH (mUI/ml)	8	5	±2	22	6	±3	17	6	±2	0,77*
LH/FSH	8	1,4	±0,7	22	1,2	±0,8	17	1,7	±1,3	0,35*

DP, desvio padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; *teste de ANOVA

Tabela 7 – Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para os rs2387588 / rs4287687 em 47 mulheres com síndrome dos ovários policísticos

	TT e AA (homozigoto selvagem)			TC e A-(heterozigoto)			CC e -- (variante homozigoto)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	8	27	±9	22	29	±6	17	26	±7	0,36*
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	8	28,6	±5,7	22	27,7	±7,2	17	28,1	±7,3	0,95*
Circunferência Abdominal (cm)	8	90	±18	22	89	±16	17	90	±18	0,96
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	8	111	±11	22	114	±11	17	115	±14	0,79
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	8	76	±7	22	74	±9	17	75	±13	0,88*
Glicemia (mg/dl)	8	87	±15	22	90	±13	17	90	±10	0,76*
Triglicérides (mg/dl)	8	131	±76	22	101	±71	17	114	±68	0,63*
HDL (mg/dl)	8	47	±9	22	54	±16	17	46	±12	0,23*
Homa - RI	8	3,9	±3,4	22	3,4	±2,8	17	3,9	±4	0,86*

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, "Homeostasis model assessment"- resistência insulínica; * teste de ANOVA

MUTAÇÃO DO GENE *LHB* C1430A

Tabela 8 – Concentrações hormonais segundo o genótipo para o C1430A

	CC (homozigoto selvagem)			CA (heterozigoto)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona Total (ng/dl)	44	65	±45	3	43	±10	0,41*
LH (mUI/ml)	44	8	±5	3	9	±12	0,85*
FSH (mUI/ml)	44	6	±2	3	5	±2	0,70*
LH/FSH	44	1,3	±1,1	3	2,5	±3,6	0,64*

DP, desvio padrão; LH, Hormônio luteinizante; FSH, Hormônio folículo estimulante; *Teste t de Student

Tabela 9 - Distribuição dos valores das médias do índice de Ferriman-Gallwey de acordo com os genótipos da variante do gene *LHB* C1430A

	CC (homozigoto selvagem)			CA (heterozigoto)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Ferriman-Gallwey	44	10	±8	3	11	±7	0,73*

*Teste t de Student

Tabela 10 – Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo para C1430A em 47 mulheres com síndrome dos ovários policísticos

	CC (homozigoto selvagem)			CA (heterozigoto)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	44	28	±7	3	25	±5	0,44*
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	44	28,3	±7,1	3	6,4	±4,7	0,65*
Circunferência Abdominal (cm)	44	90	±17	3	91	±20	0,52*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	44	113	±12	3	109	±12	0,52*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	44	75	±10	3	71	±8	0,53*
Glicemia (mg/dl)	44	90	±12	3	95	±20	0,56*
Triglicerídeos (mg/dl)	44	114	±77	3	114	±2	0,99*
HDL (mg/dl)	44	51	±14	3	33	±13	0,07*
Homa - RI	44	3,8	±3,5	3	5,1	±1,1	0,52*

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, “Homeostasis model assessment”- resistência insulínica; *Teste t de Student

POLIMORFISMO DO GENE *LHB* rs1056917

Tabela 11 – Concentrações hormonais segundo o genótipo para rs1056917

	CC (homozigoto selvagem)			CT (heterozigoto)			TT (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Testosterona Total (ng/dl)	20	70	±50	19	57	±35	8	56	±46	0,29*
LH (mUI/ml)	20	8	±5	19	8	±6	8	7	±6	0,97*
FSH (mUI/ml)	20	6	±2	19	6	±3	8	5	±2	0,90*
LH/FSH	20	1,3	±0,6	19	1,6	±0,8	8	1,3	±0,7	0,78*

DP, desvio padrão; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio foliculo estimulante; *Teste de ANOVA

Tabela 12 – Características antropométricas, pressão arterial e parâmetros laboratoriais relacionados à síndrome metabólica de acordo com o genótipo rs105617 para de 47 mulheres com síndrome dos ovários policísticos

	CC (homozigoto selvagem)			CT (heterozigoto)			TT (homozigoto variante)			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
Idade (anos)	20	28	±7	19	29	±7	8	26	±6	0,97*
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	20	29	±7,8	19	27,1	±6,6	8	28,6	±5,7	0,70*
Circunferência Abdominal (cm)	20	92	±17	19	89	±17	8	89	±17	0,81*
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	20	114	±14	19	113	±12	8	110	±9	0,86*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	20	76	±12	19	73	±9	8	76	±7	0,68*
Glicemia (mg/dl)	20	92	±13	19	92	±13	8	83	±8	0,62*
Triglicerídeos (mg/dl)	20	123	±74	19	109	±86	8	104	±52	0,56*
HDL (mg/dl)	20	45	±12	19	54	±17	8	49	±7	0,15*
Homa - RI	20	4,42	±4,1	19	3,74	±2,9	8	2,93	±2,57	0,61*

DP, desvio padrão; HDL, lipoproteína de alta densidade; Homa-RI, “Homeostasis model assessment”- resistência insulínica; *Teste de ANOVA

8.6 ANEXO 6

TABELAS DE DISTRIBUIÇÕES DE VARIÁVEIS DISTINTAS DE ACORDO COM
PERFIS DE GENÓTIPOS

TABELAS DE DISTRIBUIÇÕES DE VARIÁVEIS DISTINTAS DE ACORDO COM PERFIS DE GENÓTIPOS

Tabela 1 - Distribuição das concentrações médias de testosterona de acordo com perfil genotípico das 50 pacientes com síndrome dos ovários policísticos*

Perfis de genótipos	Concentração de testosterona (ng/dl)			p
	<i>n</i>	<i>média</i>	<i>Desvio padrão</i>	
TTCATACT	7	84	±69	0,36*
TTCATAMT	1	32	-	
TTCMYA-C	3	49	±19	
TTGCC--C	14	68	±45	
TTGCYA-C	1	101	-	
TTGMYA-C	1	65	-	
TTSMYA-C	16	45	±23	
YYGMC--C	3	110	±75	
YYSAYA-M	1	45	-	

*teste de ANOVA; M, alelos A ou C; Y, alelos C ou T; S, alelos C ou G

Tabela 2 - Distribuição Homa-RI de acordo com perfil genotípico das 50 pacientes com síndrome dos ovários policísticos*

Perfis de genótipos	Homa RI			p
	<i>n</i>	<i>média</i>	<i>Desvio padrão</i>	
TTCATACT	7	3,90	±3,9	0,64*
TTCATAMT	1	3,91	-	
TTCMYA-C	3	6,20	±4,1	
TTGCC--C	14	3,39	±3,6	
TTGCYA-C	1	3,59	-	
TTGMYA-C	1	1,11	-	
TTSMYA-C	16	2,79	±2,5	
YYGMC--C	3	6,73	±5,9	
YYSAYA-M	1	6,14	-	

*teste de ANOVA; M, alelos A ou C; Y, alelos C ou T; S, alelos C ou G

8.7 ANEXO 7

DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



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