

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA TOFFOLI RIBEIRO

Perfil de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários
Policísticos: um estudo caso-controle

Versão corrigida

Fonte: adaptado de Genética Virtual (2019)

Ribeirão Preto
2019

CAMILA TOFFOLI RIBEIRO

**Perfil de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários
Policísticos: um estudo caso-controle**

Versão corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Co-orientadora: Dra. Lisandra Cristina Caetano da Silva

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Toffoli-Ribeiro, Camila

Perfil de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos: um estudo caso-controlado. Ribeirão Preto, 2019.

119 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Co-orientadora: Lisandra Cristina Caetano da Silva

1. Síndrome dos Ovários Policísticos. 2. Obesidade 3. Composição Corporal. 4. Metilação. 5. Gene *POMC*. 6. Gene *FTO*.

Nome: TOFFOLI-RIBEIRO, Camila

Título: Perfil de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos: um estudo caso-controle

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em: 30 de outubro de 2019

Banca Examinadora

Profa. Dra.: Rosana Maria dos Reis

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra.: Carla Barbosa Nonino

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra: Cristina Laguna Benetti Pinto

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva - Orientadora

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Dedicatória

À minha família, pelo tudo que representa.

Agradecimentos

À Professora Ana Carolina Japur, por seu intelecto brilhante e disposição em ajudar. Fazer o outro crescer de forma tão generosa é um dom!

À Lisandra Cristina. Nas horas difíceis é que vemos o caráter e grandeza de uma pessoa. Você é enorme!

À Paulinha, que estava lá quando foi mais necessário.

À Cris Libardi, pela alegria, pelos ensinamentos e capacidade de tornar claras ideias confusas.

À Cris Padovan pela ajuda inestimável sem ter nenhuma obrigação em fazê-lo. Fazer tese é trabalhoso, mas sempre traz alguns presentes no caminho!

Às queridas colegas da UFU doutoras Angélica Debs, Márcia Aires e Gizeli dos Anjos, amigas de todas as horas e dificuldades, pelo apoio durante a elaboração deste trabalho.

Ao departamento de GO da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, do qual me despeço no doutorado: todos e cada um de vocês tem minha gratidão. Por me ajudarem a me construir como pessoa e como médica. Por poder exercer a ginecologia e obstetrícia com muita felicidade e dedicação a cada dia. Hoje que sou professora, sei exatamente o quanto me deram! Para sempre grata!

“Não tenha medo de caminhar devagar. Mas sim de permanecer inerte.”

(Provérbio Japonês)

TOFFOLI-RIBEIRO, C. **Perfil de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos**: um estudo caso-controle. 2019. 114 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) associa-se ao risco aumentado de resistência insulínica (RI) e intolerância à glicose (IG), condições exacerbadas em vigência de obesidade. O fenótipo obeso é altamente prevalente na SOP, e possui etiologia multifatorial. Estudos tem sugerido a participação de mecanismos epigenéticos, como a metilação gênica, na aquisição do traço fenotípico obeso. Por outro lado, não está claro qual método é mais adequado para avaliar a adiposidade das mulheres com SOP. No presente estudo o objetivo primário foi avaliar o perfil de metilação de fragmento da região promotora dos genes produtor de proopiomelanocortina (*POMC*) e do *fat and obesity gene (FTO)*, envolvidos no controle de apetite e peso corporal, em portadoras de SOP. Foi objetivo secundário analisar em portadoras de SOP e em controles as correlações entre resistência insulínica (RI) e intolerância à glicose (IG) com a adiposidade corporal. Estudo caso-controle, com 39 mulheres com SOP e 35 controles, pareadas por idade e índice de massa corporal (IMC). Para a análise da metilação gênica, o DNA extraído de leucócitos de sangue periférico foi modificado por bissulfato de sódio, amplificado por PCR em tempo real, e a porcentagem de metilação foi determinada utilizando a técnica de *High Resolution Melting*. Foram realizados teste oral de tolerância à glicose (TOTG, 75g glicose), índice HOMA-IR, bioimpedância elétrica (BIA), densitometria de corpo inteiro (DXA), medidas antropométricas (relação cintura/quadril (RCQ), relação cintura/estatura (RCE), IMC) e índice de adiposidade visceral (IAV). Os resultados da metilação foram agrupados nos seguintes padrões: hipometilado (0 - 20%); parcialmente metilado (50%) ou hipermetilado ($\geq 80\%$). O perfil de metilação dos genes *POMC* e *FTO* não foi diferente entre os grupos. Para o gene *POMC*, observou-se perfil hipermetilado na maioria das pacientes (~90%), parcialmente metilado em uma mulher com SOP e duas controles, e não houve perfil hipometilado. De maneira antagonista, para o gene *FTO*, o perfil foi hipometilado na maioria das pacientes (~90%), parcialmente metilado em duas mulheres SOP e uma controle, e não houve perfil hipermetilado. Na sequência, os grupos foram subdivididos em eutróficos ($IMC < 24,9 \text{ Kg/m}^2$) e com excesso de peso ($IMC \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$); não houve diferença no perfil de metilação de ambos os genes entre os subgrupos constituídos por IMC. Foi concluído que embora o perfil de metilação das regiões estudadas dos genes *POMC* e *FTO* tenha sido semelhante entre os grupos, não estão descartadas diferenças em outras regiões dos mesmos genes, ou das mesmas regiões gênicas em outros tecidos. Quanto às variáveis metabólicas e adiposidade, os níveis médios da TOTG foram mais elevados no grupo SOP, enquanto o índice de gordura apendicular (obtido pela DXA) foi mais elevado nos controles. Entre as mulheres com SOP as correlações observadas entre IMC, RCE e o IAV com variáveis do metabolismo glicídico foram semelhantes às obtidas para a DXA, enquanto no grupo SOP eutrófico houve correlação somente entre TOTG e a gordura androide pela DXA. Foi concluído que IMC, RCE e IAV são adequados para avaliar a adiposidade na SOP. Mulheres SOP eutróficas podem se beneficiar da DXA, devido ao aumento do risco metabólico associado à maior quantidade de gordura androide.

Palavras-chave: Síndrome dos ovários policísticos. Obesidade. Composição corporal. Metilação. Gene *POMC*. Gene *FTO*.

TOFFOLI-RIBEIRO, C. **Methylation profile of *POMC* and *FTO* genes in Polycystic Ovaries Syndrome (PCOS): a case control study.** 2019. 114 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Polycystic Ovaries Syndrome (PCOS) is associated with increased risk of insulin resistance (RI) and glucose intolerance (GI), conditions which are exacerbated in obesity. The etiology for the high prevalence of the obese phenotype in PCOS is multifactorial, and studies have suggested the participation of epigenetic mechanisms, such as gene methylation, in the acquisition of this phenotypic trait. On the other hand, it is not clear which method is best suited to assess the adiposity of PCOS women. In the present study, the primary objective was to evaluate in PCOS women the methylation profile of a fragment pro-opiomelanocortin gene (*POMC*) and fat and obesity gene (*FTO*), involved in appetite control and body weight. It was secondary objective to correlate the values obtained in the assessment of adiposity by four different methods, with the values of insulin resistance (IR) and glucose intolerance (GI). A case-control study was performed, with 39 women with PCOS and 35 controls, matched for age and body mass index (BMI). For the gene methylation analysis, DNA extracted from peripheral blood leucocytes was modified by sodium bisulfite, amplified by real-time PCR, and subjected to the *High Resolution Melting* technique. The adiposity assessment was done using the electrical bioimpedance (BIA); whole body densitometry (DXA); anthropometric measurements (waist / hip ratio (WHR), waist-to-height ratio (WHtR), BMI) and visceral adiposity index (VAI) that were correlated to HOMA-IR and glycemia after oral overload with 75g of glucose (GTT). The methylation results were grouped into the following patterns: hypomethylated (0-20%); partially methylated (50%) or hypermethylated ($\geq 80\%$). The methylation profile of the *POMC* and *FTO* genes was not different between groups. For the *POMC* gene, hypermethylated profile was observed in most patients ($\sim 90\%$), partially methylated in one PCOS woman and two controls, and there was no hypomethylated profile. Antagonistically, for the *FTO* gene, the profile was hypomethylated in most patients ($\sim 90\%$), partially methylated in two PCOS women and one control, and there was no hypermethylated profile. Subsequently, the groups were subdivided by categories of BMI in eutrophic (BMI up to $24.9 \text{ kg} / \text{m}^2$) and overweight (BMI $\geq 25.0 \text{ kg} / \text{m}^2$). There was no difference in the methylation pattern of *POMC* and *FTO* genes among the subgroups constituted by BMI. It was concluded that although the methylation profile of the studied regions of the *POMC* and *FTO* genes was similar between the groups, differences in other regions of the same genes or in the same gene regions in other tissues are not ruled out. Regarding metabolic and body composition variables, the average TOTG levels were higher in the PCOS group, while the appendicular fat index (obtained by DXA) was higher in the controls. The correlations observed between BMI, WHtR and VAI with glycemic metabolism variables were similar to those obtained for DXA. Among eutrophic PCOS women there was moderate correlation between android fat and GTT. Considering the cost-effectiveness, it was concluded that BMI, WHtR and VAI are adequate to evaluate PCOS adiposity. Eutrophic PCOS women, by contrast, can benefit from DXA.

Keywords: Polycystic ovaries syndrome, obesity, body composition, methylation, *POMC* gene, *FTO* gene.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fisiopatologia da SOP	17
Figura 2 - Participação dos neurônios produtores de <i>POMC</i> na regulação do apetite	20
Figura 3 - Fluxograma do recrutamento de pacientes e da formação de grupos segundo o IMC	31
Figura 4 - Método da conversão por bissulfito de sódio	38
Figura 5 - Visualização da amplificação dos fragmentos após PCR em tempo real	40
Figura 6 - Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós- sobrecarga com o índice de adiposidade visceral entre os grupos SOP e controle	50
Figura 7 - Curva padrão da porcentagem de metilação de fragmento de região promotora do gene <i>POMC</i>	51
Figura 8 - Curva padrão da porcentagem de metilação de fragmento de região promotora do gene <i>FTO</i>	52
Figura 9 - Resultado do HRM para a metilação de fragmento de região promotora do gene <i>POMC</i> no grupo de pacientes portadoras de SOP	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 - <i>Primers</i> dos genes <i>FTO</i> e <i>POMC</i> de acordo com o <i>NCBI genebank</i> , com o tamanho do amplicon em pares de bases (pb)	40
Tabela 2 - Análises comparativas entre os grupos SOP e controle em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por DXA e por BIA, e variáveis metabólicas	44
Tabela 3 - Análises comparativas realizadas entre as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle, subdivididas em eutróficas e excesso de peso, em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por DXA e BIA	46
Tabela 4 - Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com variáveis antropométricas, DXA e BIA, nos grupos SOP e controle	48
Tabela 5 - Coeficientes de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com IMC, RCE e parâmetros de DXA e BIA de mulheres portadoras de SOP e controles, divididas por subgrupos de acordo com o IMC (grupos eutróficos e grupos com excesso de peso).....	49
Tabela 6 - Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene <i>POMC</i> entre mulheres SOP e controles	54
Tabela 7 - Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene <i>FTO</i> entre mulheres SOP e controles	54
Tabela 8 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene <i>POMC</i> de acordo com subgrupos de IMC em mulheres SOP e controles	55
Tabela 9 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento de região promotora do gene <i>FTO</i> de acordo com subgrupos de IMC em mulheres SOP e controles	55
Tabela 10 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene <i>POMC</i> entre mulheres com excesso de peso e mulheres eutróficas	56
Tabela 11 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene <i>FTO</i> entre mulheres com excesso de peso e mulheres eutróficas.....	56

Lista de Abreviaturas

5meC	5-metil-citosina
<i>Alu</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
BIA	Bioimpedância elétrica
CC	Circunferência da Cintura
CpG	Citosina – Fosfato – Guanina (Ilha CpG)
CQ	Circunferência do Quadril
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMT	DNA metil transferases
DXA	Densitometria de corpo inteiro
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
Eu	Eutróficas
ExP	Excesso de peso
FAMED-UFU	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
<i>FTO</i>	<i>Fat Mass and Obesity associated gen</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IAV	Índice de Adiposidade Visceral
IG	Intolerância à Glicose
IGA	Índice de Gordura Apendicular
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	Hormônio Luteinizante

MCR4	<i>Melanocortin Receptor 4</i>
MG	Massa Gorda
MM	Massa Magra
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POMC	Pro-Opiomelanocortina
RCE	Relação Cintura: Estatura
RCQ	Relação Cintura: Quadril
RI	Resistência Insulínica
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose simplificado
WHO	<i>World Health Organization</i>
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA	Ácido Ribonucléico

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Síndrome do Ovário Policístico e aspectos metabólicos.....	16
1.2	Obesidade, SOP e epigenética.....	18
1.3	Avaliação da Obesidade.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Primário.....	29
3.2	Objetivos Secundários.....	29
4	SUJEITOS E MÉTODOS.....	30
4.1	Desenho do Estudo.....	30
4.2	<i>Sujeitos.....</i>	32
4.2.1	<i>Cálculo Amostral.....</i>	32
4.2.2	<i>Critérios de Inclusão.....</i>	33
4.2.2.1	<i>Grupo de estudo.....</i>	33
4.2.2.2	<i>Grupo controle.....</i>	33
4.2.3	<i>Critérios de Exclusão.....</i>	33
4.3	Métodos e variáveis a serem estudadas.....	34
4.3.1	<i>Variáveis bioquímicas.....</i>	34
4.3.2	<i>Variáveis biométricas.....</i>	35
4.3.3	<i>Variáveis Genéticas (Análise da Metilação do DNA).....</i>	36
4.3.3.1	<i>Extração do DNA.....</i>	36
4.3.3.2	<i>Modificação do DNA pela técnica do bissulfito de sódio.....</i>	37
4.3.3.3	<i>Análise da metilação dos genes FTO e POMC por High Resolution Melting.....</i>	38
4.4	Análises Estatísticas.....	41
4.5	Aspectos Éticos.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Variáveis metabólicas e composição corporal.....	43
5.1.1	<i>Correlações entre medidas de adiposidade e RI.....</i>	47
5.1.2	<i>Correlações entre medidas de adiposidade e IG.....</i>	47

5.1.3	<i>Correlações entre IAV, RI e IG</i>	50
5.2	Análise do perfil de metilação dos genes <i>POMC</i> e <i>FTO</i>	51
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A - ARTIGO 1	77
	ANEXO B - ARTIGO 2	98
	ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	114
	ANEXO D – PORCENTAGENS DE METILAÇÃO OBSERVADAS NOS GENES <i>POMC</i> E <i>FTO</i> NO GRUPO DE MULHERES SOP.....	118
	ANEXO E - PORCENTAGENS DE METILAÇÃO OBSERVADAS NOS GENES <i>POMC</i> E <i>FTO</i> NO GRUPO DE CONTROLES OVULADORAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do Ovário Policístico e aspectos metabólicos

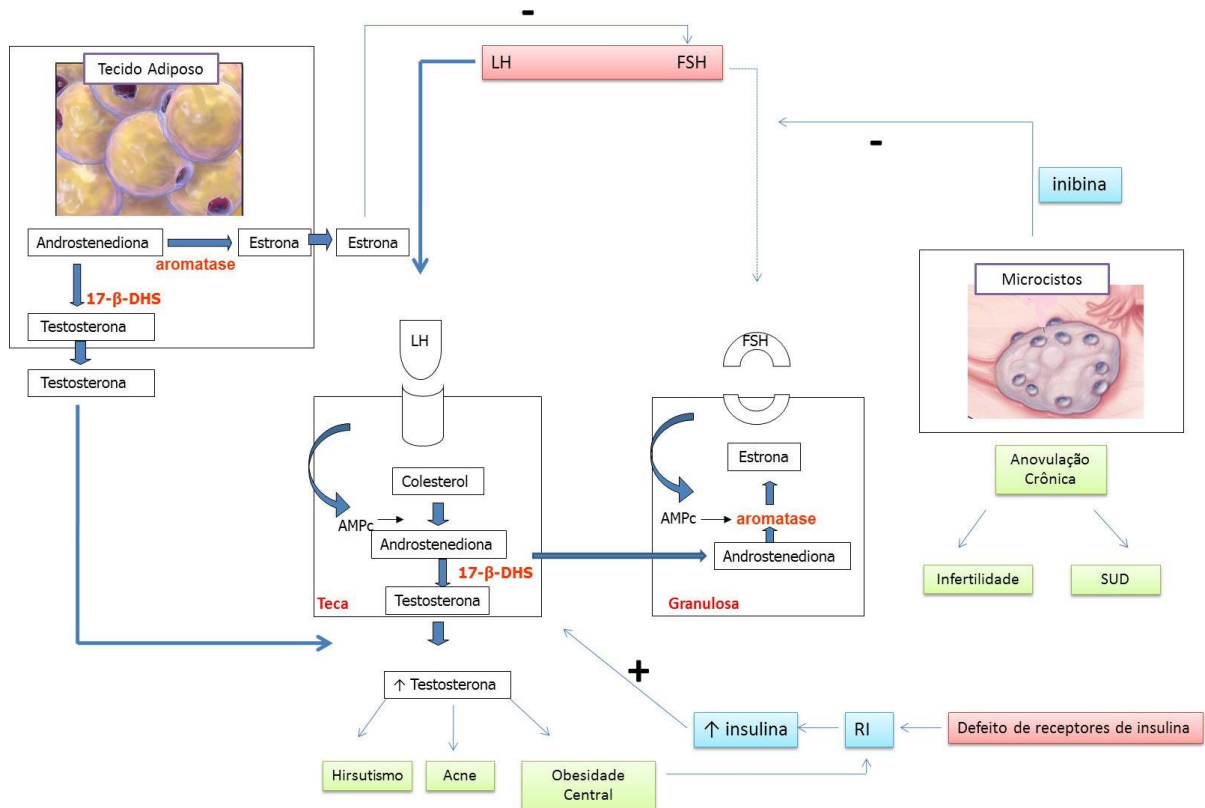
A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) caracteriza-se pela produção aumentada e crônica de androgênios, cuja causa não está bem esclarecida, apesar da evidente predominância em determinadas famílias sugerir padrão de hereditariedade (ZHAO et al., 2012). A busca por genes especificamente implicados como causa de SOP tem resultado em achados contraditórios, porém alguns possíveis candidatos podem ser apontados (EWENS et al., 2010; PAU; SAXENA; WELT, 2013).

A prevalência da SOP é estimada em 4 a 8% das mulheres em idade reprodutiva, pelos critérios do *National Institutes of Health*, mas pode chegar a 18% pelos critérios das *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) e *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (SIRMANS; PATE, 2013), o que a torna a mais prevalente endocrinopatia da mulher no menacme.

Na fisiopatologia da SOP é ponto crítico o estímulo do compartimento da teca ovariana, com decorrente produção crônica e elevada de androgênios, os quais são aromatizados em estrona nas células da granulosa e tecidos periféricos. Esse processo é contínuo e acíclico, levando a desequilíbrio entre as gonadotrofinas hipofisárias, pois a estrona exerce retrocontrole negativo na secreção de hormônio folículo estimulante (FSH). Neste sentido, o hormônio luteinizante (LH) passa a predominar em relação ao FSH, e o estímulo do LH sobre a teca torna-se maior que o do FSH sobre a granulosa, promovendo produção exagerada de androgênios que não são aromatizados na mesma proporção. Ocorre liberação de excesso de androgênios na circulação sanguínea, criando um círculo vicioso. Com a alteração do padrão pulsátil das gonadotrofinas e relativa diminuição do FSH, os processos de seleção e dominância folicular ficam prejudicados, resultando na formação de microcistos. Fator adicional que contribui para a interrupção do recrutamento folicular é o microambiente hiperandrogênico no ovário, pois a presença de fluido folicular rico em estrogênio é vital para desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Os microcistos assim constituídos serão fonte de secreção de inibina, a qual se somará aos efeitos inibitórios da estrona sobre a secreção do FSH. O padrão menstrual típico da paciente portadora de SOP são os ciclos oligomenorreicos

ou amenorreia secundária, intercalando-se a períodos de perdas sanguíneas irregulares, que podem ser volumosas, características de sangramento uterino anormal de causa ovulatória (Figura 1) (FRITZ; SPEROFF, 2011).

Figura 1 - Fisiopatologia da SOP



A produção crônica de androgênios pela teca resulta nas manifestações fenotípicas clássicas de hiperandrogenismo, principalmente acne e hirsutismo. A aromatização da androstenediona em estrona no tecido periférico inibe a liberação de FSH hipofisário, levando ao predomínio do LH. O LH por sua vez estimula a teca a manter produção elevada de androgênios. Os valores limítrofes (baixos) de FSH impedem o adequado recrutamento, seleção e dominância folicular, resultando em microcistos visibilizados à ecografia, anovulação crônica e infertilidade. Resistência insulínica concomitante pode estar presente, com elevação de risco metabólico e conseqüente estímulo direto da insulina sobre a teca, reforçando a produção androgênica.

Fonte: Elaboração própria.

As repercussões da SOP são multissistêmicas, com influência nos âmbitos estético, metabólico e reprodutivo. Todavia, a associação com risco cardiovascular é o fator mais preocupante no aspecto de prevenção de doenças, tendo a resistência à insulina (RI), o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), a obesidade e a síndrome metabólica sido demonstrados em proporção mais elevada nas portadoras da síndrome (MORAN et al., 2010).

Apesar da RI não ser considerada critério diagnóstico de SOP pelas diferentes entidades que estudam o assunto (AZZIZ et al., 2006; TEEDE et al., 2018; ZAWADZKI; DUNAIF, 1992), é elemento chave na fisiopatologia da síndrome, e sua presença está associada a quadros mais exuberantes de hiperandrogenismo.

Mulheres com SOP podem apresentar alteração molecular (fosforilação elevada da serina e redução da fosforilação da tirosina) no receptor da insulina, o que reduz sua capacidade de ligação (DUNAIF et al., 1995). A alteração na distribuição da gordura corporal com predomínio da gordura visceral, observada mesmo nas SOP magras, é outro fator imputável para menor sensibilidade à insulina (SVENDSEN et al., 2008).

A RI, por sua vez, é fator de risco para o desenvolvimento da intolerância à glicose (IG) e do DM2 (RUTTER et al., 2005), estágios mais avançados de comprometimento do metabolismo glicídico. Moran et al. (2010) realizaram revisão sistemática e metanálise com o objetivo de estimar as diferenças na prevalência e incidência de IG e DM2 nas pacientes SOP e encontraram risco mais elevado para ambas as condições, com *odds ratio* (OR) de 2,54 para IG e de 4,00 para DM2, em comparação a controles pareadas pelo Índice de Massa Corporal (IMC). A associação com a obesidade aumenta a probabilidade do diagnóstico de RI, a qual está presente em 30% das SOP eutróficas e 70% das obesas (RANDEVA et al., 2012).

1.2 Obesidade, SOP e epigenética

Cerca de 2,80 milhões de adultos falecem por ano mundialmente em decorrência de sobrepeso ou obesidade, pois esta condição aumenta a ocorrência de doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns tipos de câncer como endométrio, mama e cólon (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2013).

Certamente o desequilíbrio entre ingestão calórica e gasto energético, com predomínio da primeira, é o fator que atualmente responde pela epidemia de obesidade a que temos assistido. O sedentarismo associado a dietas ricas em alimentos de alto teor calórico, fácil digestibilidade, elevado teor de gordura e alto índice glicêmico estão presentes em abundância, inclusive nos países em desenvolvimento, onde a obesidade já é uma preocupação maior do que a desnutrição. Dados referentes ao ano de 2010 do Instituto

Brasileiro de Geografia e Estatística apontam excesso de peso (sobrepeso e obesidade) em 48% das mulheres brasileiras (BRASIL, 2014).

Apesar de o ambiente a que os indivíduos são expostos ser obesogênico, os estudos epidemiológicos demonstram que o risco individual de se tornar obeso é variável e os determinantes genéticos são cruciais nesse aspecto (ANDREASEN et al., 2008; OGDEN et al., 2006). Embora aceite-se o conceito clássico da genética de que a tendência familiar determinante do fenótipo está presente no genoma do indivíduo, deve-se considerar também a plasticidade do desenvolvimento que, segundo Gluckman e Hanson (2008, p. S63) “é um conjunto de mecanismos que podem ajustar o potencial genético evolucionário do organismo, tornando-o mais adaptado ao seu ambiente”.

Os estímulos ambientais tanto podem alterar as taxas de transcrição do genótipo, quanto podem promover alterações epigenéticas, como a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e as modificações de histonas. Tais modificações, apesar de potencialmente herdáveis, não são acompanhadas por uma alteração na sequência de DNA. Importantes processos como o imprinting genômico e a inativação do cromossomo X ocorrem devido a mecanismos epigenéticos (JONES, 2012; LI, 2002; WU; MORRIS, 2001). A regulação da transcrição pode ocorrer tanto através do bloqueio direto da ligação de fatores regulatórios às suas sequências-alvo, quanto por meio da ligação de proteínas aos sítios metilados, formando complexos que impedem a ligação dos fatores necessários à transcrição ou ao silenciamento (NAN et al., 1998; LI, 2002; TAKIZAWA et al., 2001).

A modificação do DNA por meio da metilação ocorre especialmente nas regiões em que há muitas sequências de citosinas adjacentes a guaninas (ilhas CpG¹). A reação de metilação do DNA é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT), que adicionam um grupo metila ao carbono 5 da citosila, formando a 5-metil-citosina (5meC). Existem diferentes tipos de DNMT: a DNMT3a e a DNMT3b são enzimas que catalisam a reação de metilação *de novo*, enquanto a DNMT1 faz a manutenção do padrão de metilação do DNA durante a divisão celular (YONG; HSU; CHEN, 2016).

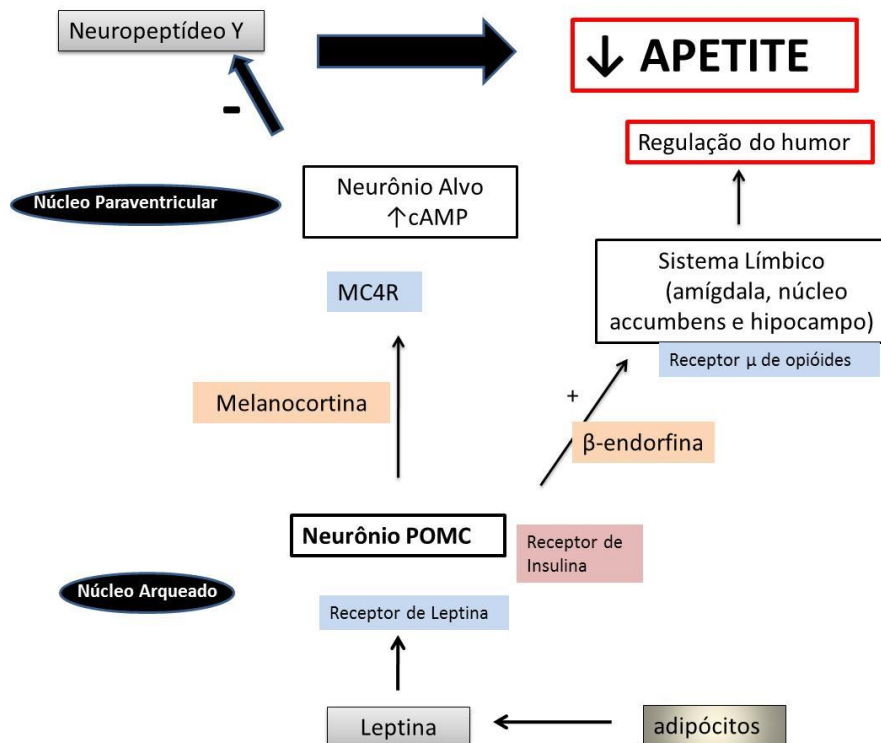
A metilação do DNA pode ainda promover o silenciamento de pequenas sequências de DNA que se transpõem pelo genoma, os elementos transponíveis. Os elementos *Alu* (*Arthrobacter luteus*) constituem cerca de 10% do genoma humano e apesar de sua

¹ CpG: Citosina – Fosfato – Guanina.

contribuição para o processo evolutivo das espécies e para a variabilidade genética interindividual, a sua inserção em determinados locais do genoma pode ocasionar muitas doenças (SIJEN; PLASTERK, 2003). Observa-se que a metilação destes elementos pode silenciá-los, impedindo sua transcrição ou nova transposição, entretanto, o mecanismo epigenético pode ainda levar a alterações na expressão de genes adjacentes, causando um efeito não desejável (BOURC'HIS; BESTOR, 2004).

Kuehnen e Krude (2012) demonstraram que crianças alemãs obesas apresentam hipermetilação no íntron 2 do gene da pró-opiomelanocortina (*POMC*), um importante gene que participa da regulação do apetite (Figura 2). Na região hipermetilada observou-se a presença das seqüências retrotransponíveis *Alu* o que levou a hipótese de que, na tentativa de inativar os elementos *Alu*, a expressão de *POMC* foi alterada, gerando um risco aumentado para o ganho de peso.

Figura 2 - Participação dos neurônios produtores de *POMC* na regulação do apetite



Após ingestão alimentar, os adipócitos produzem a leptina, que estimula os neurônios *POMC*. Ocorre a produção de melanocortina e ligação ao receptor *MCR4* (*Melanocortin Receptor 4*). Na seqüência, o *MCR4* inibe, no núcleo paraventricular, a liberação do neuropeptídeo Y, o qual é potente orexígeno. O efeito final é a inibição do apetite. Portanto, neurônios *POMC* podem ser considerados anorexígenos. Indivíduos obesos com hipofunção do gene *POMC* devido hipermetilação, mesmo estando alimentados e com elevada quantidade de adipócitos, manterão a tendência de continuar ingerindo alimentos, o que contribui para o fenótipo obeso

Fonte: Modificado de Plagemann et al. (2009).

O papel da metilação do gene *POMC* foi muito bem ilustrada no estudo de Plagemann et al. (2009), o qual, por ser experimental, foi capaz de demonstrar relação de causalidade entre metilação e obesidade de forma clara; algo que não é possível em estudos clínicos com humanos. Os pesquisadores promoveram hiperalimentação em ratos recém-nascidos e observaram o desenvolvimento de rápido ganho de peso, hiperleptinemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Posteriormente, estudaram o padrão de metilação de *POMC* no hipotálamo, concluindo que ele apresentava a região promotora hipermetilada (PLAGEMANN et al., 2009). Com esse desenho experimental puderam comprovar que o excesso de alimentação no período neonatal precoce induziu alterações adquiridas no DNA que levaram à aquisição de comportamento de ingestão aumentada de alimentos (PLAGEMANN et al., 2009).

É possível que o mecanismo de superalimentação precoce seja o responsável pela obesidade em filhos de mães diabéticas, de gestantes com ganho excessivo de peso durante a gravidez e de mães obesas, pois no período intrauterino ou precocemente na vida pós-natal é a etapa em que há maior plasticidade dos circuitos de apetite/saciedade (GLUCKMAN; HANSON, 2008).

Os opioides endógenos são mediadores produzidos pelos neurônios produtores de pro-opiomelanocortina (neurônios *POMC*), e estão potencialmente alterados na SOP. Estes neurônios projetam-se para várias áreas cerebrais, incluindo os componentes do sistema límbico, como a amígdala, hipocampo e núcleo accumbens. A partir do precursor pró-opiomelanocortina, produzem as β -endorfinas, as quais ligam-se aos receptores μ . Há evidências de que as pacientes SOP tem alteração da sensibilidade a estes opioides, porém a causa deste fenômeno não está bem estabelecida (BERENT-SPILLSON et al., 2011; FARRELL; ANTONI, 2010).

Berent-Spillson et al. (2011) postularam que em pacientes SOP deve haver uma hipoatividade do sistema opioide, e que a resistência à insulina poderia ser o fator responsável por essa alteração. Para testar essa hipótese desenvolveram estudo utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET-scan) comparando pacientes SOP com RI a pacientes controles, quanto à disponibilidade dos receptores opioides μ . Neste estudo foi detectado maior número de receptores disponíveis nas pacientes SOP, ou seja, por apresentarem menor atividade do sistema endógeno de endorfinas, seus receptores sofrem *up-regulation*, sugerindo que a alteração da atividade do sistema opioide endógeno poderia

ser também responsável pelo aumento do apetite na SOP (Figura 2), além de contribuir para a instalação de transtornos do humor.

Alterações na metilação do gene *POMC*, localizado no cromossomo 2p23.3, particularmente nos neurônios reguladores do mecanismo de apetite/saciedade são uma hipótese para a compreensão da instalação da obesidade na SOP. Contudo, a influência de outros mediadores, tais como a grelina, deve ser considerada. Este peptídeo intestinal está elevado antes de se iniciar uma refeição, estimulando a ingestão de alimentos, e sofre supressão no período pós-prandial. Pacientes SOP parecem ter menor saciedade pós-prandial do que controles pareadas por peso (MORAN et al., 2004), este efeito já foi atribuído à menor supressão pós-prandial da grelina (MORAN et al., 2007), porém há ainda controvérsia na literatura com relação a este mecanismo (JAPUR et al., 2014).

Outro gene que tem assumido destaque na busca pela compreensão da contribuição de fatores genéticos na obesidade é o *FTO* (*Fat and Obesity associated gene*), localizado no cromossomo 16q12.2 (JIA et al., 2011). O gene *FTO* influencia a homeostase energética, por mecanismos não inteiramente compreendidos. A análise da sequência do *FTO* mostra que este gene é homólogo ao das enzimas Fe(II)-e 2-oxoglutarato(2OG)oxigenase-dependentes, envolvidas em diversos processos, incluindo reparo de DNA, metabolismo de ácidos graxos e modificações pós-translacionais. Gerken et al. (2007) demonstraram elevada expressão do *FTO* em núcleos hipotalâmicos relacionados ao controle da homeostase em murinos. A 2OG oxigenase tem uma atividade catalítica, que envolve a demetilação do DNA de genes envolvidos no metabolismo. É possível que o *FTO* possa atuar como uma enzima de reparação do ácido nucleico, e uma quebra nos processos de reparo genômico pode levar a obesidade e síndrome metabólica. Ainda não está estabelecido se a atividade alterada de demetilase do *FTO* é responsável pelo aumento da massa gorda associada com a variante do gene e se esta alteração de atividade está associada com maior ingestão alimentar, menor gasto energético ou ambos (GERKEN et al., 2007).

A ocorrência de polimorfismos adquiridos em um único nucleotídeo em um códon específico dentro de um gene (SNP) pode levar à produção de proteína diferente ou pode não ter efeito aparente nenhum (GRIFFITHS et al., 2008). Determinados SNP do gene *FTO*, particularmente os designados por rs7202116 e rs9939609, têm sido associados ao desenvolvimento do fenótipo obeso. O polimorfismo rs7202116 foi relacionado com a

variação no IMC entre indivíduos de haplótipos “opostos” (portadores do SNP em homozigose comparados a indivíduos sem nenhum alelo de risco) chegando a 7% (YANG et al., 2012). A forma como os diferentes alelos são capazes de influenciar na variabilidade é desconhecida, mas parece haver ruptura nos mecanismos de homeostase na presença do alelo de risco (YANG et al., 2012), podendo o gene ter papel relevante na regulação de peptídeos intestinais e circuitos cerebrais ligados à recompensa, conforme descrito por Karra et al. (2013). Os referidos autores demonstraram em indivíduos não obesos, pareados por IMC e por adiposidade, que os homozigotos para o rs9939609 (denominados AA) apresentavam maiores quantidades de acil-grelina, menor supressão de apetite pós-prandial e respostas neuronais alteradas a estímulos visuais alimentares quando comparados a indivíduos sem nenhuma cópia do SNP (haplótipo TT).

Em um estudo de desenho inovador, Bell et al. (2010) estratificaram mulheres de acordo com o haplótipo de risco para obesidade e DM2, denominado alelo A (caracterizado pela presença do SNP rs8050136), no locus do gene *FTO*. Em seguida, procederam à quantificação da metilação entre os diferentes haplótipos, observando aumento da metilação do DNA nas pacientes que apresentavam o haplótipo de risco. Com esse achado, abre-se uma nova frente de investigação, que busca analisar a interação entre genética e epigenética, oferecendo perspectiva de estudo em doenças complexas, que não podem ser compreendidas restringindo-se a análise ao genótipo, como é o caso da obesidade.

Wojciechowski et al. (2012) analisaram o SNP rs9939609 no gene *FTO* em pacientes com SOP e observaram que houve maior ganho de peso nas pacientes que tinham o alelo de risco para obesidade com relação aos controles. Entretanto, este SNP não foi analisado com relação às modificações epigenéticas (WOJCIECHOWSKI et al., 2012). Em estudo com 733 mulheres chinesas, Yuan et al. (2015) demonstraram que a associação entre o SNP rs9939609 do *FTO* e SOP não é tão intensa quando feito o controle para o IMC, mas verificaram interação entre o polimorfismo do *FTO* e do *MCR4* combinados na SOP.

Pesquisadores brasileiros não comprovaram maior prevalência dos SNP rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO* em mulheres brasileiras portadoras de SOP comparadas a controles ovuladoras. Os autores observaram, contudo, níveis de glicemia mais elevados entre as portadoras dos SNP (RAMOS; SPRITZER, 2015).

Podemos concluir que há ainda inconsistências e controvérsias quanto ao impacto de alterações genéticas, particularmente os polimorfismos, quanto à sua capacidade de produzir alterações fenotípicas nas portadoras de SOP. São crescentes as evidências sugestivas da contribuição do epigenoma no desenvolvimento da obesidade na população em geral (ZHOU et al., 2017), justificando a proposição de novas pesquisas nesta área.

Por outro lado, há consenso na literatura quanto à observação de maiores índices de obesidade na SOP. Lim et al. (2012) em trabalho de revisão sistemática e meta-análise encontraram prevalência significativamente elevada de sobrepeso (RR: 1,95), obesidade (RR: 2,77) e obesidade central (1,73) nas mulheres SOP quando comparadas a controles ovuladoras (LIM et al., 2012). Há, inclusive, pesquisadores que sugerem que o ganho de peso precede o desenvolvimento de SOP, com especulações de que a obesidade seria fator causal e não consequência da moléstia (LAITINEN et al., 2003). Contudo isso não foi comprovado em outros trabalhos (YILDIZ; KNOCHENHAUER; AZZIZ, 2008) e a questão permanece sob debate.

Outro ponto pacífico na literatura refere-se à piora das manifestações clínicas em todos os aspectos entre as pacientes SOP obesas em relação às eutróficas. Há aumento do risco do desenvolvimento da síndrome metabólica, da IG e do *Diabetes Mellitus* (DM). Na esfera reprodutiva, apresentam piora do padrão menstrual, com melhora do padrão ovulatório após uma perda de 5 a 10% do peso (ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, 2012). Neste sentido, o controle da obesidade e a prática de atividade física está formalmente indicada em qualquer guideline que se refere ao tratamento de mulheres com SOP (ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004; TEEDE et al., 2018).

1.3 Avaliação da Obesidade

Dada a elevada prevalência e as repercussões da obesidade na SOP, o método ideal de avaliação da adiposidade nesta condição deve apresentar correlação com parâmetros metabólicos, especificamente a RI e a IG e, também, um custo-benefício favorável.

A antropometria engloba um conjunto de técnicas de aplicação rápida e de baixo custo, com reprodutibilidade variável, que pode ser utilizado para avaliação clínica da adiposidade. Dentre as medidas antropométricas mais frequentemente empregadas estão

incluídos o IMC, as medidas da cintura (CC) e do quadril (CQ), e a relação entre cintura e quadril (RCQ). De acordo com a WHO devem ser classificados como portadores de sobrepeso e de obesidade pacientes que apresentam valores de IMC de 25 ou mais e de 30 ou mais, respectivamente (WHO, 2000). Maiores valores de IMC apresentam implicações crescentes de riscos à saúde (BRAY; 1996; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1998; WHO, 1998).

Habitualmente há correlação direta entre IMC e quantidade de gordura corporal, embora para alguns indivíduos isso possa não refletir a realidade, como em grupos que apresentam maior massa muscular (ex: atletas e policiais) (GALLAGHER et al., 2000) ou no processo do envelhecimento, em que há manutenção do peso corporal concomitante à sarcopenia (massa muscular substituída por gordura) (ANDREOLI et al., 2009). Esse fato tem motivado a investigação de outros métodos de avaliação da composição corporal, com destaque para métodos que permitam estabelecer com maior precisão uma relação entre a quantidade de tecido adiposo (ou massa gorda – MG) e o risco metabólico potencial.

Dentre os diversos métodos descritos na literatura para avaliação da composição corporal, destacam-se a bioimpedância elétrica (BIA) e a densitometria de corpo inteiro (DXA). A BIA baseia-se no princípio da diferença de condutividade elétrica entre os tecidos corporais, ou seja, os tecidos adiposo e ósseo são condutores fracos de eletricidade, enquanto a massa magra (MM) é altamente condutora. O método da BIA possibilita a identificação da água corporal, MM e MG, expressas em porcentagens (MIRANDA et al., 2012). Alguns modelos de equipamentos de BIA são portáteis e de baixo custo, porém o método não fornece informações a respeito da distribuição de gordura (ANDREOLI et al., 2009). O método de DXA avalia a composição corporal em três compartimentos distintos: osso/mineral, gordura, e todo o restante da massa livre de gordura não representada por osso. Cada um destes compartimentos corporais apresenta diferentes absorbâncias de duas fontes de energia geradoras de raio-X, o que permite estimar a massa de gordura por regiões corporais, como tronco, abdome e membros. O método da DXA permite uma avaliação bastante acurada da composição corporal, mas apresenta custo elevado e o aparelho não é portátil (ANDREOLI et al., 2009).

Lang et al. (2015b) estudaram amostra de mais de 600 indivíduos quanto ao perfil metabólico, dados antropométricos e DXA, e observaram que, conforme esperado, os

indivíduos obesos e com sobrepeso eram metabolicamente menos saudáveis. Por outro lado, a análise por DXA demonstrou que entre os indivíduos magros, os que apresentavam menor massa muscular obtiveram pior desempenho na avaliação metabólica. Em publicação posterior, o mesmo grupo de autores calculou quais parâmetros da DXA poderiam ser usados para correlação com saúde metabólica, com objetivo de uso rotineiro na prática clínica (LANG et al., 2015a). Em estudo com população de policiais, foi verificado que a DXA apresentou melhor correlação com fatores de risco metabólico, do que a análise do IMC (SHARP et al., 2012) tornando atrativo seu emprego.

Especificamente em mulheres SOP, Ezeh et al. (2014) observaram que a relação entre MG e MM aferida com BIA apresentou correlação inversa com a efetividade da insulina, o que não foi comprovado nos controles, sugerindo que essa medida poderia ser considerada como um marcador de risco metabólico. Por outro lado, ao utilizar a DXA, Svendsen et al. (2008) analisaram subpopulação de pacientes magras com SOP, e verificaram que as SOP magras têm maior proporção de gordura distribuída no tronco proporcionalmente à gordura periférica, o que se associou a maior RI neste subgrupo. Esta característica fenotípica de distribuição de gordura corporal não foi verificada no grupo SOP com obesidade.

Apesar de a maioria dos estudos priorizar a análise relacionada à massa gorda, a qual é tida como a maior responsável por perfil metabólico desfavorável, isso pode não ser necessariamente verdadeiro em pacientes SOP. Comerford et al. (2012) realizaram estudo da composição corporal por DXA, e do metabolismo por curva glicêmica (31 aferições de glicemia e insulina em 180 minutos). Observaram inicialmente que a quantidade de MG se correlacionou positivamente com a resistência à insulina. Contudo, ponderando que conforme aumenta o peso se elevam tanto a MG como a MM, realizaram pareamento das pacientes SOP a controles ovuladoras de acordo com a MG e verificaram que quanto maior a MM, maior a resistência à insulina. Surpreendentemente, isso não se verificou ao controlar as pacientes pela MM. Uma explicação possível é que mulheres SOP apresentam uma expansão da MM devido ao efeito mitogênico da insulina, que causaria aumento da síntese protéica e massa muscular (JOHANSSON; ARNQVIST, 2006).

Outra questão que tem sido amplamente investigada é se os índices que incluem variáveis antropométricas em sua fórmula são capazes de prever o resultado dos métodos padrão ouro de avaliação da composição corporal. Recentemente, a relação cintura/estatura

(RCE) e o índice de adiposidade visceral (IAV) têm sido indicados como métodos capazes de prever a gordura abdominal (OH; SUNG; LEE, 2013; SWAINSON et al., 2017). Considerando que em mulheres SOP a gordura visceral pode elevar o risco de RI, caso a associação entre índices antropométricos e quantidade de gordura abdominal seja efetivamente comprovada, esses índices poderão ser utilizados em substituição à BIA ou DXA, como alternativa para avaliação do risco metabólico dessas pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

A maioria dos programas de saúde aborda a obesidade como uma condição a ser combatida, delineando-se estratégias que têm como meta diminuir as consequências do problema já instalado. Os resultados em longo prazo são, geralmente, frustrantes (VAN DIJK et al., 2014). Estudos que busquem compreender o determinismo da obesidade, particularmente em condições de elevada prevalência, como é o caso da SOP, permitirão no futuro a mudança de paradigma do combate para a prevenção. Da mesma forma, a identificação de marcadores clínicos que possam indiretamente medir a condição metabólica permite um monitoramento de baixo custo em larga escala e sem a necessidade de recursos adicionais e propicia a intervenção precoce.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Primário

Avaliar o perfil de metilação dos genes *POMC* e *FTO* em mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos, comparando-o ao de controles ovuladoras.

3.2 Objetivos Secundários

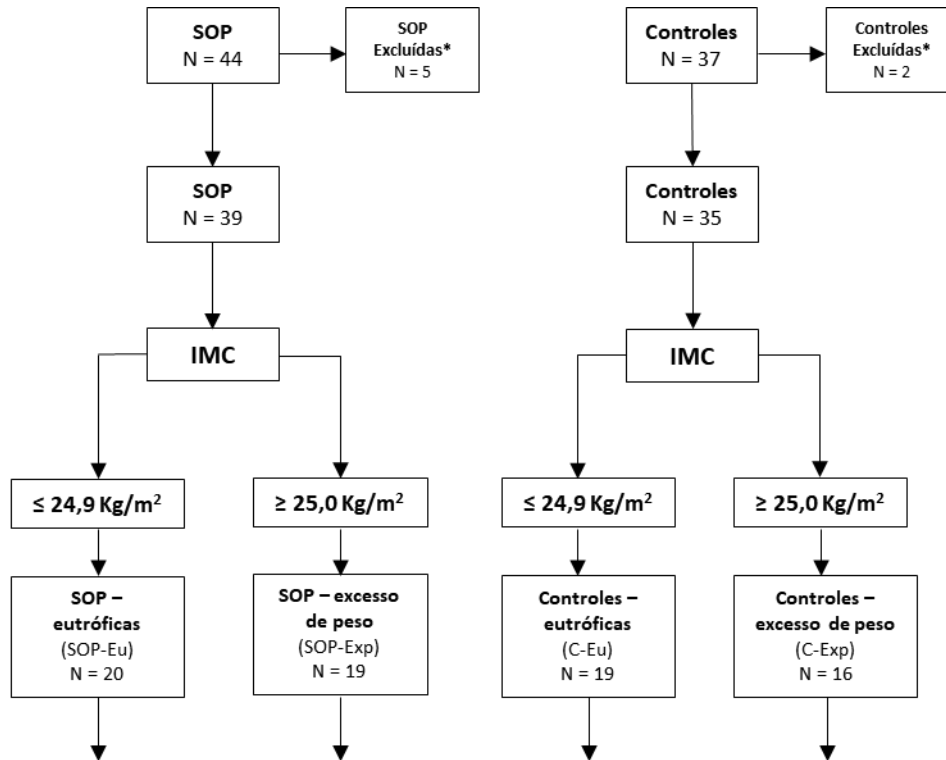
- Verificar se há diferença no padrão de metilação dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com o IMC ou com a composição corporal em mulheres portadoras de SOP.
- Correlacionar a adiposidade avaliada por quatro métodos diferentes com a RI e a IG, em pacientes portadoras de SOP em comparação a controles ovuladoras.
- Analisar se as mulheres SOP apresentam risco metabólico maior (RI, Teste Oral de Tolerância à Glicose simplificado - TOTG e IAV, medidas antropométricas e composição corporal) do que mulheres controle pareadas por IMC.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Estudo observacional, analítico, tipo caso-controle, em que 39 pacientes com SOP foram comparadas a 35 controles com ciclos regulares, pareadas por índice de massa corporal e idade com o grupo de estudo, obedecendo-se a diferença de $\pm 2,0 \text{ kg/m}^2$ ao pareamento, observando-se que cada controle estivesse na mesma categoria de IMC de cada caso recrutado. Caso esse parâmetro não fosse atingido, outro controle foi escolhido. Os grupos de estudo foram ainda subdivididos em dois subgrupos de acordo com a presença ou não de excesso de peso para análise mais detalhada (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma do recrutamento de pacientes e da formação de grupos segundo o IMC



Variáveis analisadas:

- Bioquímicas: colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, teste oral de tolerância à glicose 75g (TOTG75), insulina basal, HOMA-IR.
- Antropometria: peso, estatura, IMC, circunferência da cintura (CC), circunferência do quadril (CQ), índice cintura/quadril (RCQ), índice cintura/estatura (RCE).
- Índice de Adiposidade Visceral.
- Bioimpedância: massa gorda, massa magra, massa gorda/massa magra.
- Densitometria de corpo inteiro: massa gorda, massa magra, massa gorda/massa magra, índice de gordura apendicular e gordura androide.
- Padrão de metilação: gene *POMC*, gene *FTO*.

*motivos para exclusão: teste da cortosina positivo para hiperplasia adrenal congênita (n = 1); engravidaram antes de realizar a coleta dos exames preconizados (n = 2); iniciaram contracepção hormonal antes da coleta dos exames (n = 4)

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Sujeitos

Este trabalho foi desenvolvido com a parceria de duas Instituições de Ensino Superior: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (FAMED-UFU). Os exames bioquímicos, medidas antropométricas, BIA e DXA foram realizados no município de Uberlândia, bem como o primeiro processamento da amostra de sangue periférico, conforme descrito abaixo. Quanto à análise genética, os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia da Reprodução do Bloco Multiusuários do serviço de Reprodução Humana da FMRP-USP, e os dados da metilação foram analisados no Setor de Nutrologia do Departamento de Clínica Médica da mesma faculdade.

As pacientes do grupo de estudo foram recrutadas no Ambulatório de Ginecologia Endócrina da UFU, serviço de referência no SUS da cidade de Uberlândia para as portadoras de SOP. As pacientes do grupo controle foram recrutadas no Ambulatório de Ginecologia Geral da mesma instituição; serviço frequentado, em sua maioria, por mulheres que procuram consulta ginecológica de rotina, residentes na área de abrangência atendida pelo Hospital de Clínicas-UFU, ou para agendar cirurgia de laqueadura tubária. Foram também enviados e-mails, e afixados cartazes no Campus universitário em busca de controles voluntárias. Com o intuito de seguir alocação adequada das pacientes, alguns exames adicionais foram realizados, cujos resultados não foram apresentados. Em ambos os grupos foram dosados o FSH, a prolactina, o TSH e a testosterona. Na presença de alteração em algum destes exames, a paciente foi descartada caso houvesse sido recrutada para o grupo controle. A dosagem de 17-alfa-hidroxiprogesterona foi realizada em todos os casos de SOP, para descartar hiperplasia adrenal congênita. O ultrassom transvaginal foi realizado nos casos em que não havia exame recente na rotina ginecológica.

4.2.1 Cálculo Amostral

O número de pacientes necessário para avaliação da metilação do DNA é bastante variável entre os estudos. Considerando-se relevância estatística uma diferença de 0,8 desvio padrão, com poder do teste de 80% e nível de significância (alfa) de 0,05, o cálculo foi de 30

pacientes no grupo de estudo, pareadas por IMC e idade ao grupo controle, numa proporção de 1:1. O objetivo foi detectar 30% de diferença no padrão de metilação da região estudada para os referidos genes.

4.2.2 Critérios de Inclusão

4.2.2.1 Grupo de estudo

1. Pacientes classificadas como portadoras de SOP pelo consenso de Rotterdam, 2004 (ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004);
2. Idade entre 18 e 35 anos;
3. Concordância em participar do estudo, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2.2.2 Grupo controle

1. Idade entre 18 e 35 anos;
2. Ciclos Menstruais regulares espontâneos;
3. Ausência de histórico de infertilidade;
4. Concordância e assinatura do TCLE.

4.2.3 Critérios de Exclusão

1. Uso de medicação hormonal nos últimos três meses anteriores à inclusão no estudo;
2. Uso de hipoglicemiantes orais ou medicamentos indutores de perda de peso;
3. Presença de endocrinopatias de qualquer natureza.
4. Gestantes ou em período de amamentação.

4.3 Métodos e variáveis a serem estudadas

4.3.1 Variáveis bioquímicas

As pacientes foram submetidas a punção venosa para coleta de sangue, em tubo por aspiração a vácuo. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- a) Perfil lipídico: colesterol total, *High Density Lipoprotein* (HDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL) e triglicérides. O sangue foi coletado após jejum de 12 horas, em frasco de coleta a vácuo de 4 ml, com gel separador. Após 30 minutos, foi centrifugado a 2200g por 10 minutos a 18^o C. O teste foi realizado por ensaio enzimático (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 2014) (método enzimático colorimétrico, Roche Diagnóstica©, Brasil);
- b) Teste oral de tolerância à glicose simplificado (TOTG 75g): feito em duas coletas; a primeira em jejum, em tubo com anticoagulante, e a segunda após duas horas da administração de sobrecarga de 75g de glicose por via oral. Esta última foi ingerida no máximo em cinco minutos. O sangue foi centrifugado a 2200 g por 10 minutos a 18°C. Sem aliquotar, o exame foi realizado em 1,0 ml de plasma, por ensaio enzimático (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 2014) (método da hexoquinase, Roche Diagnóstica©, Brasil);
- c) Insulina basal: foi colhido sangue em um tubo de 4 mL com gel separador. Após 30 minutos o material foi centrifugado a 2200g por 10 minutos a 4°C (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 2014) e a quantificação foi realizada por quimioluminescência (Roche Diagnóstica©, Brasil). O *Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance* (HOMA-IR) foi calculado de acordo com a fórmula: $HOMA-IR = \text{glicemia mg\%} \times \text{insulina } \mu\text{UI/ml} / 405$ (JENSTERLE et al., 2008), considerando-se como resistência à insulina $HOMA-IR > 2,7$ (GELONEZE et al., 2009).

4.3.2 Variáveis biométricas

As pacientes foram avaliadas clinicamente para obtenção das seguintes variáveis biométricas:

- a) Antropometria: peso corporal; estatura; cálculo do IMC ($\text{IMC} = \text{peso corporal (kg)}/\text{estatura(m)}^2$); CC (medida realizada no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, utilizando-se uma fita antropométrica inextensível de fibra de vidro com precisão de 0,1 cm, adotando-se o valor médio de três medidas) (HEYWARD; STOLARCZYK, 2000); RCQ; RCE. Os valores obtidos para o IMC foram classificados de acordo com as referências da WHO (WHO, 1998).
- b) Bioimpedância elétrica: após avaliação antropométrica, as pacientes foram submetidas à BIA (aparelho Biodynamics 310e, marca TBW©), de acordo com a seguinte padronização: com as pacientes em posição deitada, com as pernas afastadas e os braços em paralelo, afastados do tronco, a pele nos pontos de colocação dos eletrodos foi limpa com álcool, e objetos de metal ou joias removidas. Os eletrodos foram posicionados em locais específicos da mão direita e do pé direito, com a corrente elétrica imperceptível introduzida por meio dos eletrodos distais e capturada pelos eletrodos proximais (MIRANDA et al., 2012). As pacientes foram orientadas a manter jejum, inclusive de água, pelo menos 4 horas antes do teste; não realizar exercício físico pelo menos nas 12 horas antes da avaliação; não consumir álcool pelo menos nas 48 horas que antecedem o teste; não ingerir medicamentos diuréticos pelo menos nos sete dias prévios à avaliação. O exame não foi realizado se as pacientes estivessem no período pré-menstrual (MIRANDA et al., 2012; VITOLLO, 2008).
- c) Densitometria de corpo inteiro: foi agendada em clínica colaboradora do estudo (aparelho GE *Lunar Prodigy DXA System*); este exame foi realizado em dia distinto do exame de BIA, por radiologista experiente. Para o exame foram retirados todos os objetos metálicos (adornos). O posicionamento da paciente foi padronizado, estando a paciente centralizada na mesa, mãos viradas para o lado com os polegares para cima, palmas direcionadas para as pernas e os braços esticados ao longo do corpo, em medida única.

- d) A calibração do aparelho de densitometria foi feita com fantasma para coluna óssea diariamente e semanalmente com fantasma para modelo tricompartmental de análise (HANGARTNER et al., 2013). O exame é realizado em 5 a 10 minutos, e as leituras foram feitas pelo *Lunar Prodigy DXA System, software version 11.20*. Foram obtidos dados sobre quantidade de MG e MM em gramas e em percentual; índice de MG/MM e dados sobre a distribuição de gordura nos diferentes compartimentos: gordura androide (limite inferior na linha horizontal que conecta as espinhas ilíacas anterossuperiores, limite superior definido como 20% acima da borda inferior, paralelamente à linha do queixo e lateralmente pelas margens da cintura) e gordura ginóide (limitada superiormente pela parte superior do trocânter maior, e limite inferior a 96 mm do trocânter maior, sendo a parte lateral delimitada pelo tecido subcutâneo do quadril). Foi também obtido o índice de gordura apendicular (IGA), mediante a fórmula: massa gorda das pernas (em g) + massa gorda dos braços (em g)/ massa gorda do tronco (em g).
- e) Cálculo do Índice de adiposidade visceral: foi realizado conforme a fórmula a seguir = $[Cintura / (36.58 + (1.89 \times IMC))] \times (TG / 0.81) \times (1.52 / HDL)$, estando as concentrações de triglicérides e HDL em mmol/l (AMATO et al., 2010).

4.3.3 Variáveis Genéticas (Análise da Metilação do DNA)

4.3.3.1 Extração do DNA

Para a extração de DNA, 5 ml de sangue periférico foi coletado em tubos contendo Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA), e armazenado a 4°C. Após centrifugação do sangue total, o plasma foi desprezado e as hemácias e leucócitos foram obtidos, adicionados a tampão de lise de glóbulos vermelhos, resultando em pellet contendo o DNA genômico dos leucócitos, o qual foi mantido a -80o C até o momento da extração com o kit QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen® cat#51106). Segundo as orientações do fabricante, foram realizadas as seguintes etapas para obtenção do DNA genômico: lise celular; remoção de componentes celulares; remoção de interferentes na coluna, lavagem, secagem do DNA na coluna e eluição

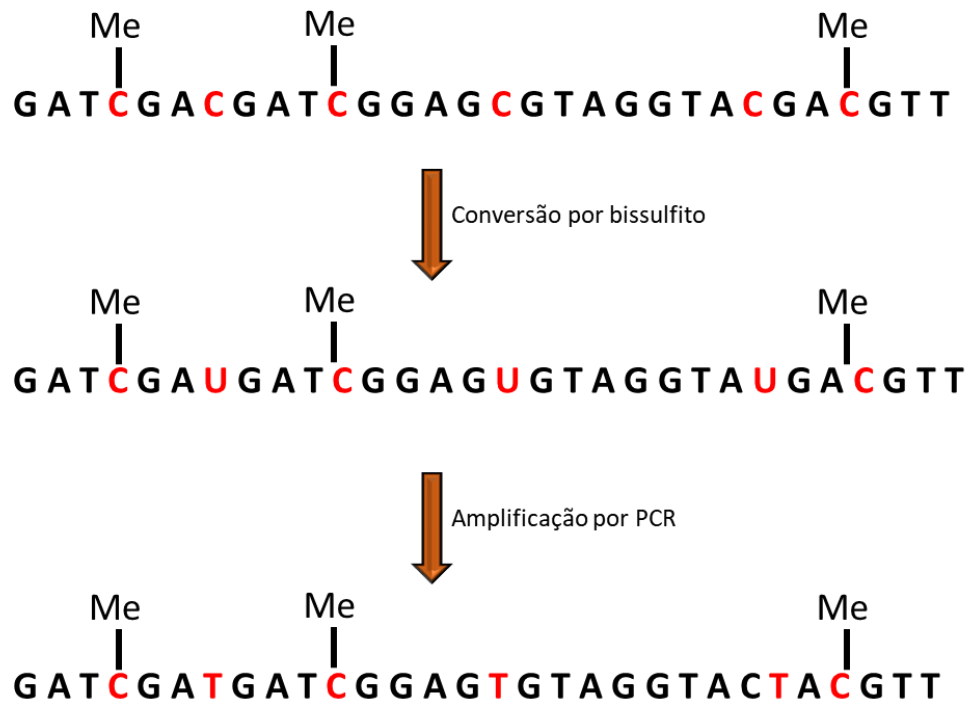
do material genômico preso à coluna. A seguir, realizou-se quantificação do DNA obtido utilizando-se o Nanodrop (Spectrophotometer Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), analisando-se as concentrações para uso nos experimentos, bem como as razões de absorbâncias 260/280 (igual ou próximo a 1,8) e 260/230 (valores de 2,0-2,2), que indicam a pureza do material obtido.

4.3.3.2 Modificação do DNA pela técnica do bissulfito de sódio

A modificação por bissulfito foi realizada utilizando o kit *EZ DNA Methylation™* (Zymo Research Corp, USA), em diferentes etapas, de acordo com as especificações do fabricante. Aproximadamente 1,5µg de DNA foi acrescido de tampão de diluição M (5µl), em volume total de 50µl, seguindo-se a incubação da amostra a 37°C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 100µl do reagente de conversão CT e foi realizada a incubação na ausência de luz por 16 horas, a 50°C, em aparelho termociclador (ProFlex™ PCR System, Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA). Após a incubação por 10 minutos a 4°C, múltiplas etapas de lavagem com soluções fornecidas no kit e centrifugações foram realizadas. Procedeu-se a dessulfonação com o tampão apropriado, realizou-se incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, seguida por lavagem e centrifugação. Ao final, adicionou-se 10 µl do tampão de eluição diretamente à coluna, as amostras foram centrifugadas e o DNA modificado eluído da coluna foi estocado a -80°C para uso posterior.

O resultado do método de modificação do DNA por bissulfito de sódio é a conversão das citosinas não metiladas em uracilas na presença de bissulfito, e estas serão convertidas em timinas no processo de amplificação do material genético. Já as citosinas metiladas, não sofrem transformação pelo bissulfito, e permanecerão como citosinas (Figura 4).

Figura 4 - Método da conversão por bissulfito de sódio



As citosinas metiladas não sofrem modificação pela técnica, enquanto as não metiladas são transformadas em uracilas. Durante o processo de amplificação, as uracilas são convertidas em timinas. Assim, quanto maior a metilação, maior a quantidade de citosinas no gene amplificado ao final do processo.

Fonte: Adaptado de Active Motif (2019).

4.3.3.3 Análise da metilação dos genes *FTO* e *POMC* por *High Resolution Melting*

Para amplificação do DNA modificado por bissulfito, foram desenhados iniciadores (oligonucleotídeos ou *primers*) na ilha CpG da região promotora dos genes *POMC* e *FTO*. A região promotora foi identificada utilizando o *UCSC genome browser*² e as ilhas CpG utilizando o programa *Methprimer* (LI; DAHIYA, 2002). A identificação do padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* foi realizada através da técnica de *High Resolution Melting* (HRM) utilizando o equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

A princípio, o DNA passa por amplificação através de *PCR* em tempo real. Nesta amplificação, as uracilas presentes na molécula de DNA modificado são copiadas nos novos fragmentos como timina, portanto onde inicialmente no DNA genômico encontrávamos uma

² Cf. <https://genome.ucsc.edu>.

citossina, base nitrogenada pirimídica, passamos a encontrar uma timina, base nitrogenada púrica (Figura 4).

Na sequência, este produto de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) recém-sintetizado passa por um aumento sucessivo e gradual de temperatura até 95°C para se observar o ponto de dissociação da dupla fita dos fragmentos. A temperatura em que ocorre essa dissociação é chamada de ponto de *melting*, e permite estimar o grau de metilação do DNA. No ponto de *melting*, quanto maior o número de timinas, mais fácil se dará sua dissociação, pois enquanto as bases púricas realizam duas ligações de hidrogênio no pareamento com a base da fita homologa de DNA, as bases pirimídicas realizam três ligações de hidrogênio. Portanto, quanto mais timinas encontramos no fragmento de DNA, mais baixo seu ponto de dissociação, e quanto mais citosinas, maior será a temperatura observada para dissociação (HERMAN et al., 1996; TAYLOR et al., 2010). O *software* separa todas as amostras de acordo com a análise da curva de *melting*, criando as chamadas variantes. Comparando-se os padrões de metilação conhecidos com as amostras estudadas, o *software* infere a qual variante a amostra pertence. A análise ideal apresenta o número de variantes igual ao número de controles de metilação empregados, mas se um número maior de variantes é constatado, a estimativa de metilação é realizada criando-se um possível intervalo para a metilação (por exemplo 0 a 20%), de acordo com especificações do fabricante.

Para a análise das regiões potencialmente metiladas, foram desenhados *primers* dos genes de interesse a partir das sequências depositadas no Genebank³ e os sítios CpG foram determinados pelo programa MethyPrimer (LI; DAHIYA, 2002) e pela ferramenta Epigenomics do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁴ (Tabela 1).

³ Cf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.

⁴ Cf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

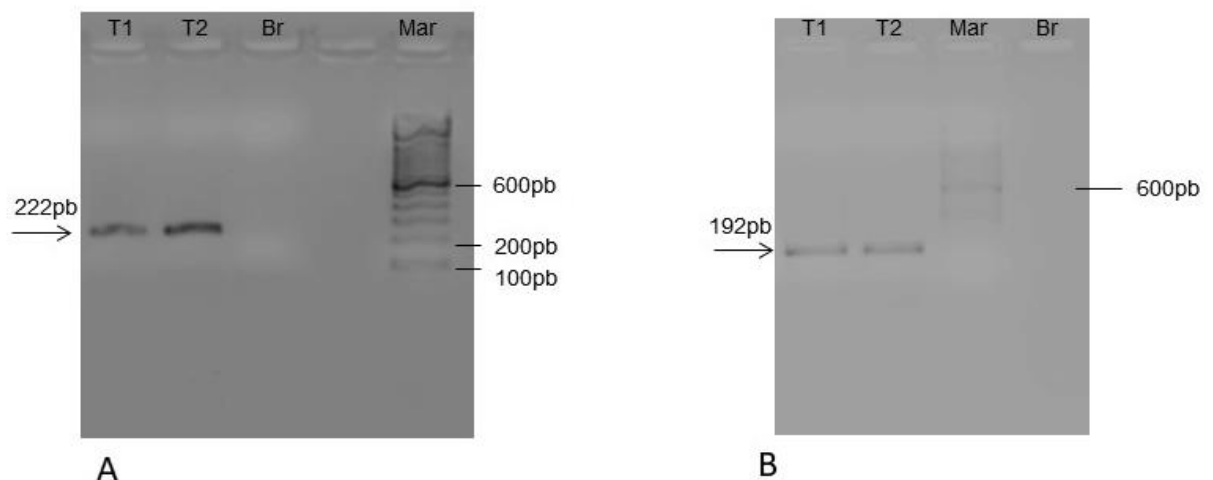
Tabela 1 - *Primers* dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com o *NCBI genebank*, com o tamanho do amplicon em pares de bases (pb)

Gene	Sequência de referência do NCBI	<i>Primers</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>FTO</i>	NG_012969.1	Forward: 5' TTGTAGTGGGGAGGGTTAGTAATT 3' Reverse: 5' CAAAAAAACTACATTTCCCAAAA3'	192
<i>POMC</i>	NG_008997.1	Forward: 5'GATGTATTTTTGGGGGAAGA 3' Reverse: 5'CAATAACAAAATCTTAAATACCCAC 3'	222

Fonte: Elaboração própria.

A curva de eficiência dos *primers* sintetizados foi realizada utilizando-se DNA modificado por bissulfito de uma amostra controle, em que foi realizada uma diluição seriada do DNA e procedeu-se amplificação por PCR em tempo real, utilizando-se 5µl de *Power Sybr Green Master mix* (ThermoFisher Scientific) reagente, 2,5 pmols cada primer (*forward* e *reverse*), 3µl de água ultra pura e 2µl de DNA modificado e diluído. A amplificação foi realizada em aparelho 7500 FAST (Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) e, ao final, o produto de amplificação foi observado em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red, obtendo-se o *amplicon* do tamanho esperado (Figura 5).

Figura 5 - Visualização da amplificação dos fragmentos após PCR em tempo real



Em A, fragmento de 222pb do gene *POMC* e em B, observação do fragmento de 192pb do gene *FTO*. T: amostras teste, Br: amostra controle negativo de amplificação, Mar: marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb).

Fonte: Elaboração própria.

Procedeu-se então à amplificação das sequências de interesse preparando-se a reação com 10µl de *Melt Doctor Master mix* (Applied Biosystems®) 6µl de água ultrapura, 5µM de cada *primer* (*reverse* e *forward*), 2µl de DNA modificado e diluído (1:3), totalizando 20µl de reação, conforme as especificações do fabricante. A amplificação foi realizada em aparelho *7500 Fast*, no modo de quantificação de curva padrão, incluindo a análise de Curva de *melting*. A reação apresentou o passo inicial de desnaturação do DNA de 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 59°C por 1 minuto, e curva de *melting* contínua à reação. As amostras de referência para a metilação foram aplicadas em todas as placas analisadas, sendo utilizado o padrão comercial *EpiTech Control Kit* (Qiagen), que fornece DNA modificado por bissulfito 100% metilado e 0% metilado, a partir dos quais, foram realizadas diluições para obter uma curva incluindo as porcentagens de 0, 20, 50, 80 e 100% tendo-se ao final a análise da metilação em 0, 20, 50, 80 e 100% de metilação. Os dados obtidos foram então analisados no *software* HRM 3.1 de acordo com as instruções do fabricante, e o padrão de metilação das amostras foi organizado em tabelas para análise estatística.

4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism®⁵ versão 6.00 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla California USA, e pela plataforma R, *R Development Core Team*⁶ (2009), Vienna, Austria.

Inicialmente as variáveis foram estudadas com o método D'Agostino e Pearson quanto ao padrão de distribuição, sendo categorizadas em variáveis paramétricas (distribuição normal) e não-paramétricas (sem distribuição normal). As variáveis contínuas paramétricas foram comparadas utilizando o teste *t* de *Student*, enquanto as não paramétricas utilizando o teste de *Wilcoxon*. Para a comparação entre mais de dois grupos de variáveis, utilizamos o teste de ANOVA, com pós teste de Tukey para variáveis de distribuição normal, e Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para variáveis não paramétricas.

⁵ Cf. www.graphpad.com.

⁶ Cf. www.R-project.org.

Para as análises de correlação utilizamos o coeficiente de correlação de *Pearson* quando a análise foi entre duas variáveis paramétricas, enquanto o coeficiente de correlação de *Spearman* foi adotado entre variáveis não paramétricas. O coeficiente de correlação (r) foi considerado fraco quando o valor foi entre 0,3 e 0,5; moderado quando entre 0,5 e 0,7; forte quando entre 0,7 e 0,9 e muito forte quando maior ou igual a 0,9. A comparação entre frequências de variáveis discretas foi feita utilizando o teste exato de *Fisher*. As análises foram consideradas significantes quando $p < 0,05$, adotando-se testes bicaudais.

4.5 Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e, após pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com o CAAE nº 42385515.3.0000.5152 (Anexo A).

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados iniciando-se pela descrição da amostra, medidas de adiposidade e correlação destas com parâmetros metabólicos (objetivos secundários). Em seguida passaremos aos resultados referentes à metilação gênica (objetivo primário), posto que as informações sobre parâmetros metabólicos serão utilizadas para discutir as análises de metilação.

5.1 Variáveis metabólicas e composição corporal

Mulheres incluídas nos grupos SOP e controle apresentaram idade média similar, 25 anos para o grupo SOP e 26 anos para o grupo controle ($p = 0,5024$). Desde que o pareamento dos grupos foi feito pelo IMC, valores médios similares foram identificados para mulheres SOP e controles, assim como foi demonstrado para todas as outras variáveis antropométricas analisadas. Não foram identificadas diferenças nas medidas realizadas para avaliação da composição corporal pelos métodos BIA e DXA, exceto para o índice de gordura apendicular (IGA) que foi significativamente menor nas mulheres SOP ($p = 0,0435$) (Tabela 2).

Inicialmente foram comparados os grupos independentemente da presença ou não do excesso de peso. Valores médios similares foram demonstrados para variáveis metabólicas para as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle em relação à glicose sanguínea de jejum, índice HOMA-IR, lipídeos séricos (colesterol, HDL colesterol, LDL colesterol e triglicerídeos), assim como para a frequência de RI e de IG. Valores médios mais elevados foram demonstrados para glicose sanguínea duas horas pós-sobrecarga (TOTG) em mulheres SOP quando comparadas aos controles ($p = 0,0090$) (Tabela 2).

Os valores médios de massa gorda aferidos pela DXA foram significativamente mais elevados do que os aferidos pela BIA, tanto para as mulheres SOP (30,80% vs.39,20%; $p < 0,0001$) como para os controles (31,4% vs 43,40; $p < 0,0001$).

Tabela 2 - Análises comparativas entre os grupos SOP e controle em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por DXA e por BIA, e variáveis metabólicas

	SOP (n=39)	Controle (n=35)	p
Variáveis Antropométricas			
IMC (Kg/m ²)	24,43 (20,90 - 33,84)	24,20 (21,75 - 31,00)	0,7280
Cintura (cm)	83,50 (72,00 - 103,30)	81,00 (72,00 - 93,50)	0,4660
Quadril (cm)	102,00 (95,63 - 117,00)	101,00 (95,00 - 110,00)	0,9966
RCQ	0,8109 (0,7553 - 0,8715)	0,8000 (0,7577 - 0,844)	0,2067
RCE	0,5138 (0,4441 - 0,6284)	0,5000 (0,4565 - 0,5994)	0,2776
Bioimpedância			
MG (%)	30,80 (26,00 - 39,30)	31,40 (25,60 - 36,40)	0,6829
MM (%)	69,20 (60,70 - 74,00)	68,60 (63,60 - 74,40)	0,6829
MG/MM	0,4450 (0,3500 - 0,6425)	0,4600 (0,3400 - 0,5700)	0,5909
Densitometria			
MG (%)	39,20 (33,30 - 48,70)	43,40 (33,30 - 49,00)	0,4413
MG/MM	0,6400 (0,5000 - 0,9500)	0,7100 (0,5000 - 0,9100)	0,7273
Gordura Ginóide (%)	49,50 (42,60 - 54,40)	51,50 (44,90 - 56,00)	0,5732
Gordura Androide (%)	46,70 (34,40 - 54,90)	46,20 (35,90 - 53,90)	0,7425
Índice de Gordura Apendicular	0,9200 (0,7400 - 1,1100)	1,040 (0,9500 - 1,1200)	0,0435*
Variáveis Metabólicas			
HOMA-IR	1,910 (1,330 - 4,120)	1,975 (1,153 - 2,695)	0,0576
Glicose sanguínea de jejum (mg/dl)	87,00 (80,75 - 94,00)	86,00 (79,75 - 90,00)	0,2213
TOTG (mg/dl)	105,00 (90,50 - 118,00)	92,50 (83,50 - 103,30)	0,0090*
Colesterol total (mg/dl)	170,50 (150,3 - 200,30)	168,00 (148,5 - 194,5)	0,9473
HDL colesterol (mg/dl)	47,50 (39,00 - 59,50)	49,50 (41,75 - 59,25)	0,5387
LDL colesterol (mg/dl)	103,00 (86,30 - 121,50)	98,00 (87,70 - 126,5)	> 0,9999
Triglicerídeos (mg/dl)	85,85 (53,75 - 143,80)	78,00 (59,00 - 102,00)	0,3426
RI (n, %)	15 mulheres (38,46% da amostra)	8 mulheres (22,22% da amostra)	0,1386
IG (n, %)	3 mulheres (7,69% da amostra)	0 mulheres (0 % da amostra)	1,0000

RCQ: relação cintura/quadril; RCE: relação cintura/estatura; IAV: índice de adiposidade visceral; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda/massa magra; Índice de Gordura apendicular: MG braços+ MG pernas/ MG tronco; TOTG: glicose sanguínea pós sobrecarga; resistência à insulina (RI): HOMA-IR > 2.7; Intolerância à glicose (IG): glicose sanguínea de jejum ≥ 100mg% e/ou glicose sanguínea pós-sobrecarga ≥ 140 mg%. *p < 0,05. Os resultados foram expressos em mediana (p25 - p75).

Fonte: Elaboração própria.

Posteriormente, os grupos SOP e controle foram subdivididos em Eutróficas (Eu) ou Excesso de peso (ExP). Como era esperado, na avaliação da quantidade de MG, relação MG/MM, e gordura androide, pelos métodos da BIA e da DXA, foram identificados valores mais elevados nos subgrupos com excesso de peso, quando comparados aos eutróficos. Porém, o índice de gordura apendicular foi maior nas SOP-Eu do que nas SOP-ExP ($p = 0,0002$).

Nas comparações entre grupos de mesmo IMC, os valores médios do índice de gordura apendicular pela DXA foram mais baixos para mulheres SOP-ExP quando comparadas às mulheres C-ExP ($p = 0,0134$). As outras variáveis de medida da BIA e DXA foram semelhantes entre grupos de mesmo IMC (Tabela 3).

Tabela 3 - Análises comparativas realizadas entre as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle, subdivididas em eutróficas e excesso de peso, em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por DXA e BIA

	SOP		Controle		SOP-Eu X C-Eu	SOP- ExP X C- ExP	C-Eu X C- ExP	SOP- ExP X C-Eu	SOP-Eu X SOP- ExP	SOP-Eu X C- ExP
	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	C-Eu (n = 19)	C-ExP (n = 16)						
Antropometria										
RCQ	0,7688 (0,7444 - 0,8080)	0,8748 (0,8355 - 0,9332)	0,7912 (0,7374 - 0,8046)	0,8387 (0,7817 - 0,8748)	0,9993	0,2281	0,0199	< 0,0001	< 0,0001	0,0130
IMC (kg/m ²)	21,16 (19,52 - 23,15)	33,84 (30,20 - 37,63)	22,14 (20,55 - 23,03)	31,03 (27,55 - 37,88)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
RCE	0,4509 (0,4273 - 0,4906)	0,6220 (0,5849 - 0,6810)	0,4575 (0,4348 - 0,4865)	0,6066 (0,5378 - 0,6552)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Bioimpedância										
MG (%)	27,05 (25,48 - 30,10)	39,00 (33,63 - 41,55)	25,80 (23,60 - 29,70)	37,50 (34,00 - 41,18)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
MM (%)	72,95 (69,90 - 74,53)	61,00 (58,45 - 66,38)	74,20 (70,30 - 76,40)	62,50 (58,83 - 66,00)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
MG/MM	0,3700 (0,34 - 0,43)	0,6350 (0,50 - 0,71)	0,3500 (0,31 - 0,42)	0,6000 (0,51 - 0,70)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
Densitometria										
MG	33,80 (28,38 - 37,33)	48,70 (45,70 - 52,70)	34,80 (29,70 - 41,10)	48,40 (45,78 - 54,53)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Gordura Androide	34,75 (29,20 - 41,43)	54,90 (52,60 - 59,60)	36,00 (30,90 - 43,90)	53,90 (51,80 - 57,05)	0,9395	0,9391	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MG/MM	0,5100 (0,3925 - 0,5925)	0,9500 (0,8400 - 0,1100)	0,5300 (0,4200 - 0,6700)	0,9350 (0,8425 - 1,198)	0,7626	0,8452	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Gordura Apendicular	1,015 (0,9000 - 1,205)	0,8100 (0,6500 - 0,9300)	1,070 (1,010 - 1,150)	1,0000 (0,8550 - 1,100)	0,9885	0,0134*	0,5530	< 0,0001	0,0002	0,7328

C-Eu: controles eutróficas; C- ExP : controles com excesso de peso; SOP-Eu: grupo SOP eutróficas; SOP- ExP : grupo SOP com excesso de peso; RCQ: relação cintura/quadril; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); RCE: relação cintura/estatura; IAV: índice de adiposidade visceral; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda/massa magra; Índice de Gordura Apendicular: MG braços+ MG pernas/MG tronco; * $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em mediana (p25 - p75).

Fonte: Elaboração própria.

5.1.1 Correlações entre medidas de adiposidade e RI

Dentre as mulheres portadoras de SOP, a correlação entre o HOMA-IR e medidas antropométricas foi forte e positiva, exceto para a RCQ em que esta foi moderada. O mesmo foi verificado para as medidas de avaliação da composição corporal pela DXA (MG, gordura androide e MG/MM), ainda com correlação positiva moderada para gordura ginoide. Com o método da BIA, foi identificada correlação moderada entre o HOMA-IR e a MG, MM e MG/MM (Tabela 4). Nas pacientes do grupo controle as correlações foram menos evidentes, sendo moderadas para o HOMA-IR em relação às medidas antropométricas, exceto pela RCQ que apresentou correlação fraca; também para BIA e DXA as correlações com HOMA-IR foram moderadas, sendo que neste último só não houve correlação para a gordura apendicular ($p=0,29$) (Tabela 4).

5.1.2 Correlações entre medidas de adiposidade e IG

Nas mulheres SOP foi demonstrada correlação positiva moderada entre a TOTG e a RCE, o IMC e as seguintes variáveis da DXA: MG, MG/MM, gordura androide e índice de gordura apendicular. Foi detectada correlação fraca entre a TOTG e as medidas da CC, CQ e RCQ, bem como para a gordura ginoide pela DXA e todas as medidas feitas pela BIA (MG, MM e MG/MM), sendo que a correlação com MM foi sempre negativa (Tabela 4). Já no grupo controle, não houve correlação do TOTG com nenhuma variável de medida antropométrica, tampouco medidas de DXA e a correlação com a BIA foi fraca para todas as medidas.

Especificamente para as mulheres classificadas como SOP-Exp a variável RCE apresentou correlação moderada e positiva com o HOMA-IR. Já para o grupo SOP-Eu foi observada correlação positiva moderada entre TOTG e a gordura androide pela DXA. A MG e índice de gordura apendicular pela DXA apresentaram correlação fraca, positiva e negativa, respectivamente, com a TOTG nas SOP-Eu (Tabela 5).

Tabela 4 - Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com variáveis antropométricas, DXA e BIA, nos grupos SOP e controle

	SOP (n = 39)				CONTROLE (n = 35)			
	HOMA-IR		TOTG		HOMA-IR		TOTG	
Antropometria	p	r	p	r	p	r	p	r
Cintura (cm)	< 0,0001*	0,7857 ^c	0,0030*	0,4750 ^a	< 0,0001*	0,6805 ^b	0,0522	0,3358
Quadril (cm)	< 0,0001*	0,7104 ^c	0,0133*	0,4034 ^a	< 0,0001*	0,6297 ^b	0,0681	0,3166
RCQ	< 0,0001*	0,6399 ^b	0,0223*	0,3749 ^a	0,0086*	0,4434 ^a	0,5692	0,1012
IMC (Kg/m ²)	< 0,0001*	0,7423 ^c	0,0009*	0,5156 ^b	< 0,0001*	0,6707 ^b	0,1568	0,2483
RCE	< 0,0001*	0,7979 ^c	0,0014*	0,5065 ^b	< 0,0001*	0,6652 ^b	0,0998	0,2870
Bioimpedância								
MG (%)	< 0,0001*	0,6220 ^b	0,0519	0,3221	< 0,0001*	0,6893 ^b	0,0165*	0,4084 ^a
MM (%)	< 0,0001*	-0,6220 ^b	0,0519	-0,3221	< 0,0001*	-0,6893 ^b	0,0165*	-0,4084 ^a
MG/MM	< 0,0001*	0,6262 ^b	0,0485*	0,3266 ^a	< 0,0001*	0,6869 ^b	0,0162*	0,4093 ^a
Densitometria								
MG (%)	< 0,0001*	0,7164 ^c	0,0007*	0,5261 ^b	< 0,0001*	0,6989 ^b	0,1336	0,2625
Gordura Androide (%)	< 0,0001*	0,7729 ^c	0,0002*	0,5723 ^b	< 0,0001*	0,7112 ^c	0,1304	0,2647
Gordura Ginóide (%)	< 0,0001*	0,6406 ^b	0,0034*	0,4637 ^a	0,0001*	0,6644 ^b	0,0469*	0,3431 ^a
Gordura Apendicular	0,0061*	-0,4423 ^a	0,0002*	-0,5619 ^b	0,2913	-0,1864	0,8946	-0,02361
MG/MM	< 0,0001*	0,7198 ^c	0,0006*	0,5296 ^b	0,0001*	0,7417 ^c	0,0317*	0,3691 ^a

TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga; RCQ: relação cintura/quadril; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); RCE: relação cintura/estatura; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda /massa magra; Índice de Gordura apendicular: braços + pernas/tronco; *p < 0.05; ^acorrelação fraca (0,3 ≤ r < 0,5); ^bcorrelação moderada (0,5 ≤ r < 0,7); ^ccorrelação forte (0,7 ≤ r < 0,9).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com IMC, RCE e parâmetros de DXA e BIA de mulheres portadoras de SOP e controles, divididas por subgrupos de acordo com o IMC (grupos eutróficos e grupos com excesso de peso)

	SOP								CONTROLE							
	HOMA-IR				TOTG				HOMA-IR				TOTG			
	SOP-Eu (n = 20)		SOP- ExP (n = 19)		SOP-Eu (n = 20)		SOP- ExP (n = 19)		C-Eu (n = 16)		C-ExP (n = 19)		C-Eu (n = 19)		C- ExP (n = 16)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IMC (Kg/m ²)	0.3550	0.1245	0.4345	0.0716	0.3493	0.1312	0.3475	0.1577	0.4300	0.0661	0.5791 ^b	0.0258	-0.1519	0.5346	0.1221	0.6646
RCE	0.3678	0.1106	0.6593 ^b	0.0050	0.4731 ^a	0.0351	0.04543	0.8628	0.4651 ^a	0.0448	0.4893	0.0657	-0.1165	0.6349	0.07968	0.7758
Bioimpedância – MG (%) DXA	0.3085	0.1857	0.4555	0.0662	0.1121	0.6379	0.2521	0.3289	0.5432 ^b	0.0162	0.3810	0.1607	0.3186	0.1837	0.1828	0.5144
MG (%)	0.2649	0.2591	0.2885	0.0962	0.4651 ^a	0.0388	0.2666	0.2849	0.7372 ^c	0.0003	0.3467	0.2044	0.01412	0.9543	0.03640	0.8975
Gordura Androide (%)	0.4720 ^a	0.0356	0.1211	0.2956	0.5308 ^b	0.0160	0.4652	0.0517	0.7531 ^c	0.0002	0.2181	0.4318	-0.1265	0.6060	-0.1032	0.7144
Índice de Gordura Apendicular	-0.0580	0.8082	-0.2871	0.2481	-0.4527 ^a	0.0451	-0.3434	0.1880	-0.1983	0.4158	0.1808	0.5152	0.3171	0.1859	-0.0648	0.8184

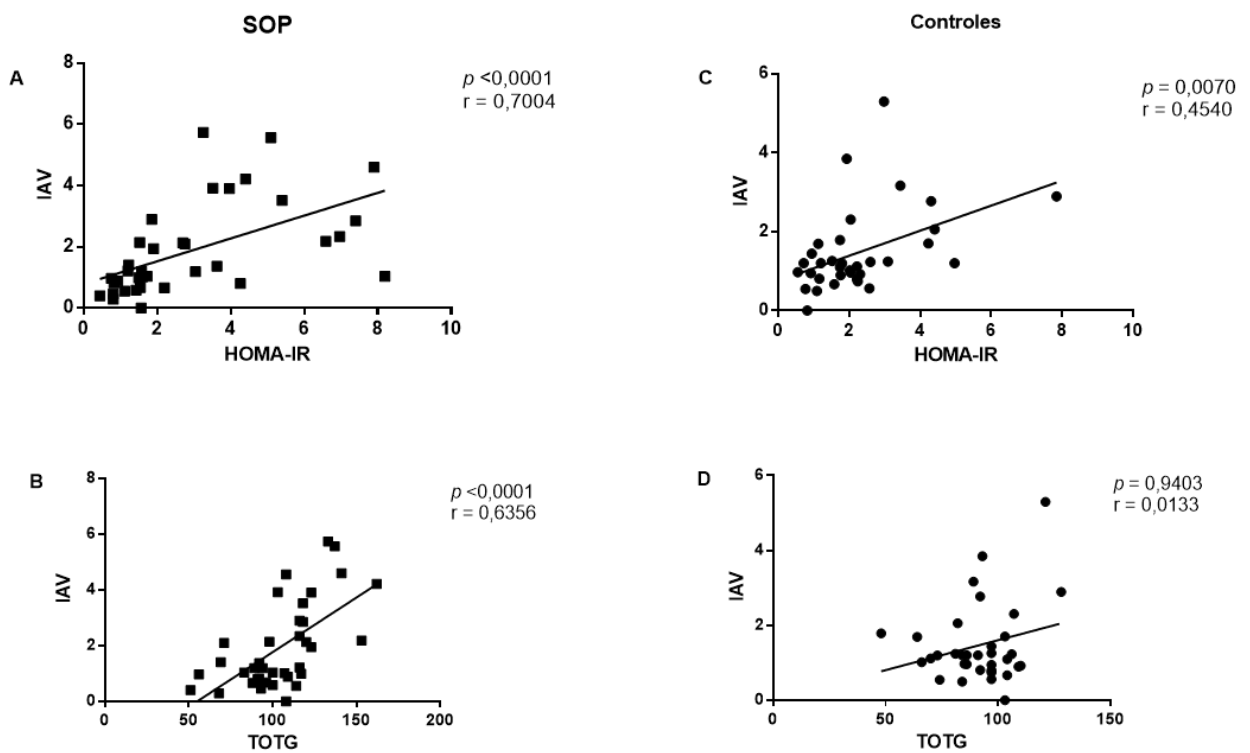
C-Eu: controles eutróficas; C- ExP : controles com excesso de peso; SOP-Eu: grupo SOP eutróficas; SOP- ExP : grupo SOP com excesso de peso; TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); MG: massa gorda; Índice de Gordura Apendicular: MG dos braços+ MG das pernas/MG do tronco; ^acorrelação fraca ($0,3 \leq r < 0,5$); ^bcorrelação moderada ($0,5 \leq r < 0,7$); ^ccorrelação forte ($0,7 \leq r < 0,9$)

Fonte: Elaboração própria.

5.1.3 Correlações entre IAV, RI e IG

Os valores médios do IAV foram semelhantes entre os grupos ($p = 0,2141$). Contudo, entre as mulheres SOP, foi demonstrado que o IAV apresentou correlação positiva forte com o HOMA-IR e correlação positiva moderada com a TOTG. Nos controles observamos correlação fraca para o HOMA-IR (Figura 6).

Figura 6 - Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com o índice de adiposidade visceral entre os grupos SOP e controle



IAV: índice de adiposidade visceral; TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga.

Fonte: Elaboração própria.

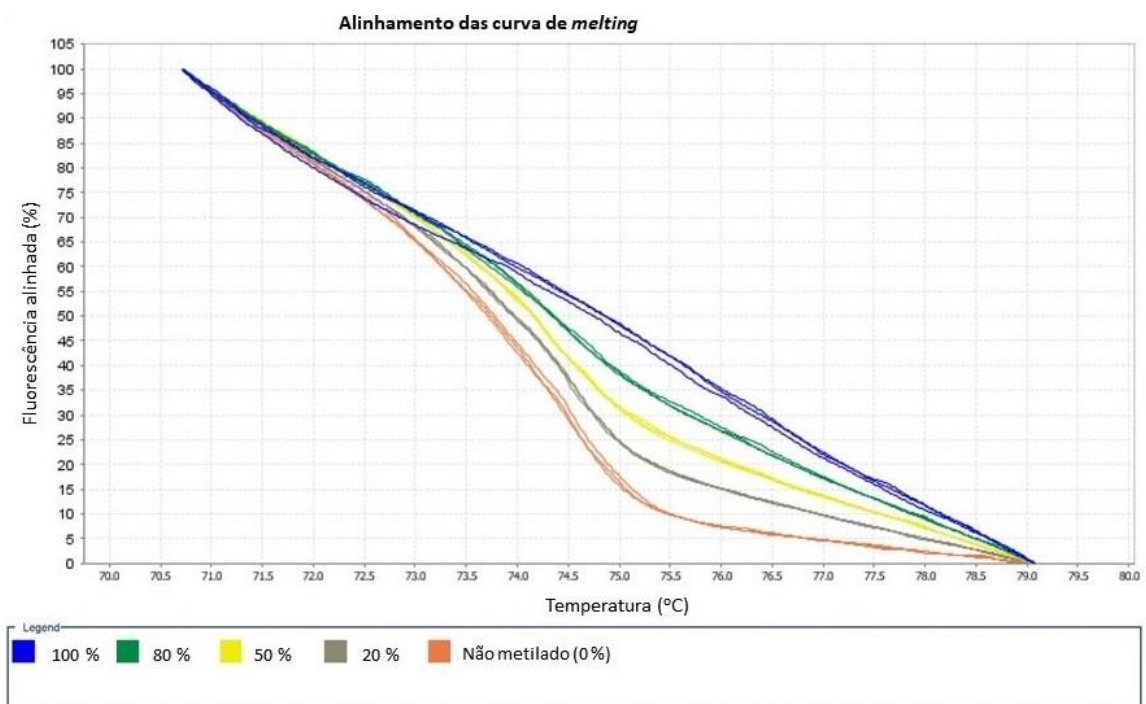
Os valores médios do IAV foram semelhantes entre os grupos de mesmo IMC (SOP-Eu vs. C-Eu, $p = 0,9665$; SOP-Exp vs. C-Exp, $p = 0,3839$), enquanto foram maiores para os grupos com excesso de peso quando comparados com os grupos eutróficos (SOP-Exp vs. SOP-Eu, $p = 0,0003$; C-Exp vs. C-Eu, $p = 0,0271$).

5.2 Análise do perfil de metilação dos genes *POMC* e *FTO*

Os resultados apresentados referem-se a um total de 38 mulheres no grupo SOP e 35 no grupo controle, uma vez que uma amostra foi descartada no grupo SOP devido a falha de amplificação do material.

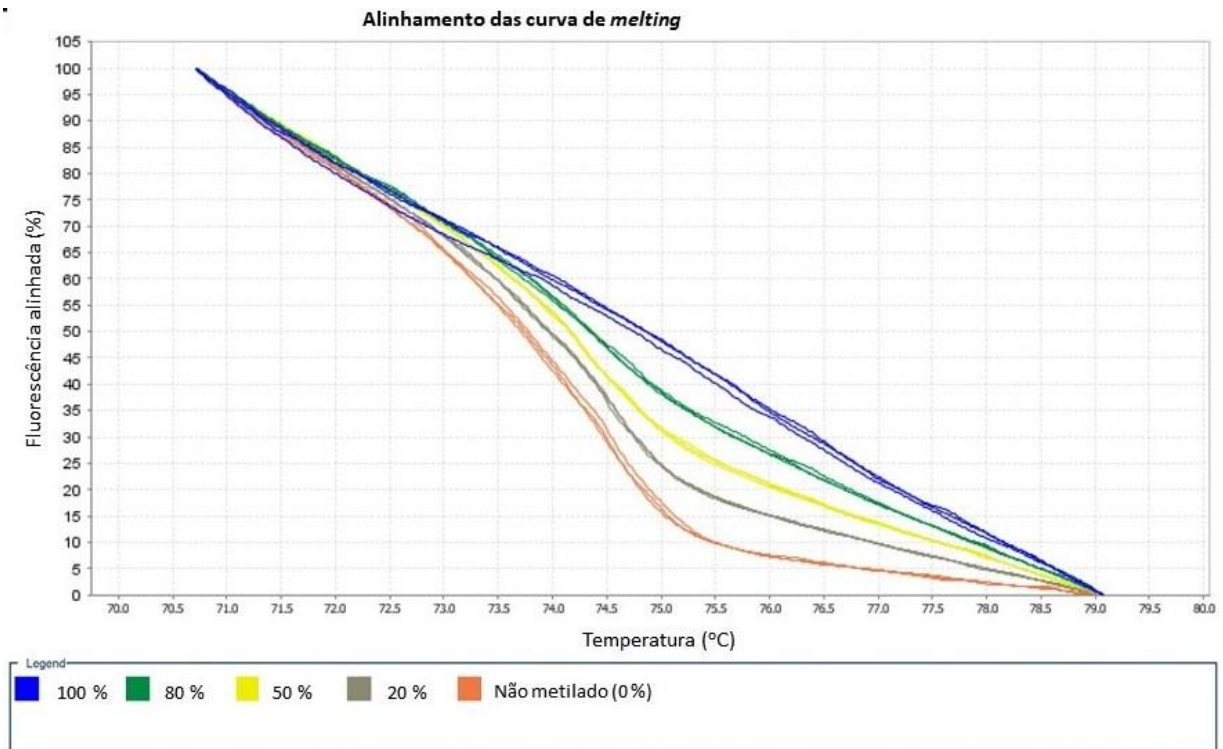
A técnica HRM foi realizada para análise do perfil de metilação de parte da região promotora dos genes *POMC* e *FTO* após a modificação do DNA por bissulfito de sódio. A porcentagem de metilação foi comparada a uma curva padrão com metilação variando de 0%, 20%, 50%, 80 e 100%. Na figuras 7 e 8 estão apresentadas as curvas incluindo as porcentagens de metilação avaliadas (0, 20, 50, 80 e 100%) para os gene *POMC* e *FTO*, respectivamente.

Figura 7 - Curva padrão da porcentagem de metilação de fragmento de região promotora do gene *POMC*



Fonte: Elaboração própria.

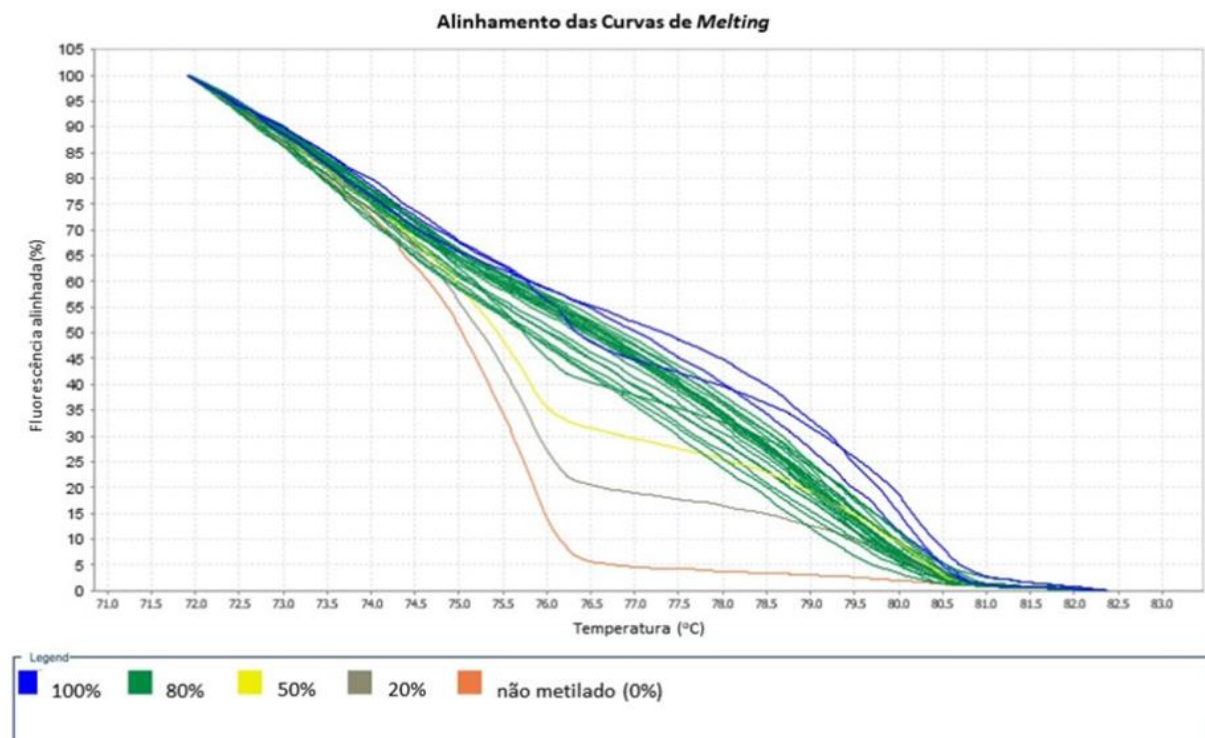
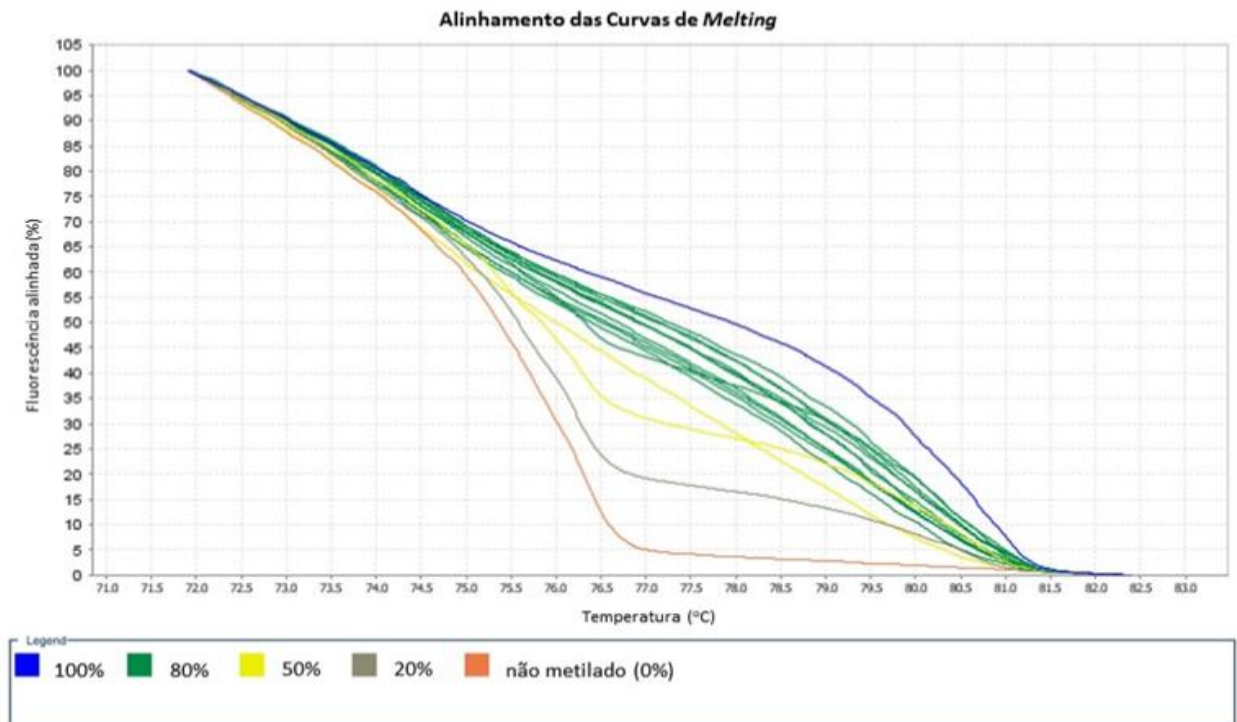
Figura 8 - Curva padrão da porcentagem de metilação de fragmento de região promotora do gene FTO



Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, as amostras das pacientes estudadas foram comparadas com as curvas obtidas a partir do DNA padrão, permitindo concluir qual a porcentagem de metilação estava presente em cada amostra estudada. Como exemplo, pode-se ver as curvas geradas para o gene *POMC* entre as pacientes SOP, na Figura 9.

Figura 9 - Resultado do HRM para a metilação de fragmento de região promotora do gene *POMC* no grupo de pacientes portadoras de SOP



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados obtidos foram agrupados de acordo com a porcentagem de metilação incluindo os seguintes padrões: hipometilado (0-20%); parcialmente metilado (50%) ou hipermetilado ($\geq 80\%$), para ambos os genes estudados (Anexos B e C). Não foi observada diferença no padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* entre os grupos SOP e controle. Para o gene *POMC* a maioria dos pacientes (~90%) apresentou perfil hipermetilado (>80%), sendo o perfil parcialmente metilado (~50%) observado em uma participante do grupo SOP e duas do controle, enquanto nenhuma participante apresentou o perfil hipometilado (tabela 6). De maneira antagonista, o gene *FTO* apresentou-se hipometilado conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 6 - Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene *POMC* entre mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>POMC</i>)	SOP	Controle	Total
0 - 20%	0 0%	0 0%	0
50%	1 2,63%	2 5,71%	3
$\geq 80\%$	37 97,37%	33 94,29%	70
Total	38	35	73
Valor p	0.6044		

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene *FTO* entre mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>FTO</i>)	SOP	Controle	Total
0 - 20%	36 94,74	34 97,14	70
50%	2 5,26%	1 2,86%	3
$\geq 80\%$	0 0%	0 0%	0
Total	38	35	
Valor p	1,0		

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, os resultados foram agrupados de acordo com a faixa de IMC, conforme as Tabelas 8 e 9. Não houve diferença entre os grupos de IMC e o padrão de metilação do gene *POMC*. A mesma análise foi feita para o gene *FTO* e, também, não foi observada diferença entre os grupos de IMC e o padrão de metilação.

Tabela 8 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene *POMC* de acordo com subgrupos de IMC em mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>POMC</i>)	SOP n = 38		Controle n = 35		Total
	SOP-EU n = 19	SOP-Exp n = 19	C-Eu n = 19	C-Exp n = 16	
0 - 20%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0
50%	1 5,26%	0 0%	2 10,53%	0 0%	3
≥ 80%	18 94,74%	19 100%	17 89,47%	16 100%	70
Total	19	19	19	16	73
Valor p	0.6111				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento de região promotora do gene *FTO* de acordo com subgrupos de IMC em mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>FTO</i>)	SOP n = 38		Controle n = 35		Total
	SOP-Eu n = 19	SOP-Exp n = 19	C-Eu n = 19	C-Exp n = 16	
0 - 20%	19 100%	17 89,47%	18 94,74%	16 100%	70
50%	0 0%	2 10,53%	1 5,26%	0 0%	3
≥ 80%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0
Total	19	19	19	16	73
Valor p	0.6111				

Fonte: Elaboração própria.

Na sequência agrupamos as pacientes conforme a faixa de IMC em grupos eutrófico e com excesso de peso, independentemente de a amostra ser proveniente do grupo de

mulheres SOP ou controle, comparando o grau de metilação dos genes *POMC* e *FTO* entre os grupos. Conforme pode ser visto nas Tabelas 10 e 11, não houve diferença entre o grupo eutrófico e o grupo com excesso de peso, para os genes *POMC* e *FTO*.

Tabela 10 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene *POMC* entre mulheres com excesso de peso e mulheres eutróficas

% aproximada de Metilação (<i>POMC</i>)	Eutrófico N = 38	Excesso peso N = 35	Total
0 - 20%	0 0%	0 0%	0
50%	3 7,89%	0 0%	3
≥ 80%	35 92,11%	35 100%	70
Total	38	35	73
Valor p	0.2409		

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 11 – Comparação das porcentagens de metilação de fragmento da região promotora do gene *FTO* entre mulheres com excesso de peso e mulheres eutróficas

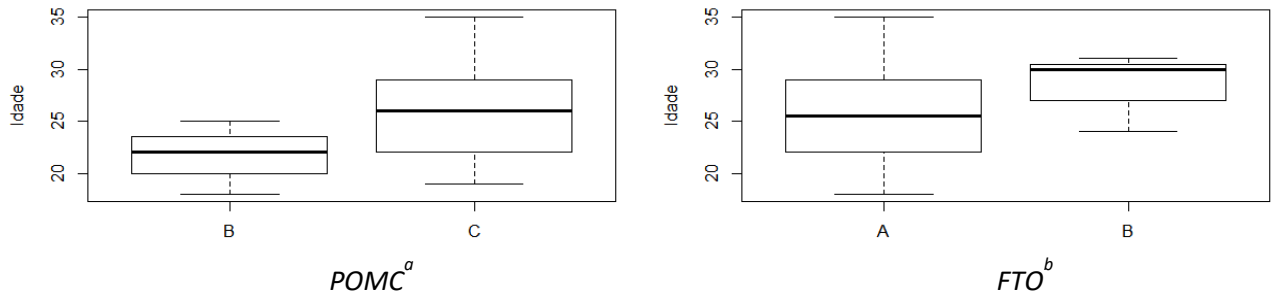
% aproximada de Metilação (<i>FTO</i>)	Eutrófico N = 38	Excesso peso N = 35	Total
0 - 20%	37 97,37%	33 94,29%	70
50%	1 2,63%	2 5,71%	3
≥ 80%	0 0%	0 0%	0
Total	38	35	73
Valor p	0.6044		

Fonte: Elaboração própria.

Com o intuito de analisar se a idade pode ter sido fator de confusão no grau de metilação observado, foi feita comparação entre a idade média dos grupos, constituídos conforme porcentagem de metilação, independentemente de a amostra ser proveniente do

grupo de mulheres SOP ou controle. Não foi detectada diferença entre a idade média dos grupos assim constituídos para os genes *POMC* e *FTO*, de acordo com a figura 10.

Figura 10 – Comparação entre a idade média dos grupos estabelecidos conforme perfil de metilação de fragmentos de região promotora dos genes *POMC* e *FTO*



A: perfil hipometilado; B: perfil parcialmente metilado; C: perfil hipermetilado; ^a: $p = 0.102$; ^b: $p = 0.238$

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser verificado nas tabelas do material suplementar (Anexos B e C), para o gene *POMC* houve somente uma paciente portadora de SOP e duas controles com perfil parcialmente metilado, enquanto todas as demais apresentaram padrão hipermetilado. Diferentemente, para o gene *FTO*, duas pacientes apresentaram perfil parcialmente metilado no grupo SOP e uma no grupo controle, ao passo que as demais apresentaram padrão hipometilado. O fato de haver tamanha disparidade numérica entre os grupos estabelecidos conforme o perfil de metilação impossibilitou a análise estatística para consecução de um dos objetivos secundários proposto no início do estudo, que seria de verificar se havia diferença no padrão de metilação dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com a composição corporal em mulheres portadoras de SOP comparadas a controles.

6 DISCUSSÃO

O menor índice de gordura apendicular à DXA em mulheres SOP com excesso de peso, conforme observado neste estudo, é informação inédita na literatura, e sugere tendência a fenótipo de distribuição centrípeta de gordura. Já é sabido que ao ganhar peso, mulheres SOP o fazem acumulando massa gorda no tronco (BOUMOSLEH et al., 2017), enquanto nos controles o incremento de massa gorda tem distribuição mais homogênea, sem acúmulo específico na região abdominal ou visceral. A gordura apendicular tem sido considerada como fator protetor contra síndrome metabólica na população em geral (PARK et al., 2014), posto que o predomínio de massa gorda nos apêndices pressupõe menor quantidade de gordura visceral, resultando em menor risco cardiovascular. A menor massa de gordura apendicular na SOP pode ser um marcador de risco peculiar a esta condição, e que no nosso estudo se correlacionou inversamente com a intolerância à glicose.

Por outro lado, os parâmetros clínicos de avaliação de risco metabólico CC, RCQ e composição corporal pela BIA, foram semelhantes entre mulheres SOP e controles, tanto na comparação geral, como nos subgrupos constituídos por faixa de IMC, o que contraria resultados de outros autores (AL-JEFOUT; ALNAWASEH; AL-QTAITAT, 2017; EZEH et al., 2014).

O rigor no pareamento dos nossos grupos, com margem de 2 kg/m² de diferença no IMC, e a observância de mesma categoria de IMC ao recrutamento podem explicar a diferença observada com relação à literatura existente. Além disso, a amostra foi constituída por mulheres jovens, o que pode ter contribuído para esse achado, uma vez que as manifestações fenotípicas da SOP podem levar tempo maior para aparecer, pois são influenciadas por anos de exposição crônica a níveis de androgênio elevados (PEDROSO et al., 2012). Outra justificativa para a não diferença entre os grupos seria o tamanho amostral, uma vez que o estudo foi delineado para análises de metilação e pode ter sido insuficiente para se avaliar marcadores de risco cardiovascular.

O fato da CC e RCQ não terem sido maiores nas mulheres SOP, enquanto a gordura apendicular foi menor, sugere que as manifestações fenotípicas são mais sutis em pacientes jovens, sendo a DXA mais sensível para esta avaliação. A *American Association of Clinical Endocrinologists* recomenda a aferição da RCQ como marcador de obesidade central e RI na SOP (GOODMAN et al., 2015), mas em nossos resultados, além de não haver diferença entre os

grupos, a correlação da RCQ foi moderada com a RI e fraca com a IG. Em contrapartida, foi observado que a RCE se correlacionou fortemente à RI e moderadamente à IG, sendo este talvez um marcador mais fidedigno de risco metabólico. A RCE tem sido sugerida na literatura como alternativa, por ser obtida tão facilmente quanto a RCQ, e por apresentar boa correlação com síndrome metabólica tanto em mulheres SOP (BEHBOUDI-GANDEVANI et al., 2016) como controles (SAVVA; LAMNISOS; KAFATOS, 2013; SWAINSON et al., 2017). Neste estudo, o IMC também se apresentou como marcador de boa qualidade tanto para RI (correlação forte) como para IG (correlação moderada). Os resultados observados favorecem a utilização da RCE e do IMC como as medidas antropométricas de eleição quanto à capacidade de correlação com IG. A CC também pode ser adotada para avaliar correlação com a RI (forte correlação), mas seu uso é limitado para a avaliação de IG (fraca correlação).

Foram observados 15 casos de RI nas mulheres SOP e 8 casos nos controles, e embora clinicamente essa diferença possa ser valorizada, não atingiu significância estatística. O perfil lipídico também foi semelhante entre os grupos, em acordo com resultado relatado por outros autores (BOUMOSLEH et al., 2017). A TOTG, por outro lado, foi maior nas mulheres SOP. Sabe-se que o distúrbio do metabolismo glicídico se inicia na resistência insulínica, entretanto, o fato de ter sido avaliada apenas a insulina de jejum, representada pelo índice de HOMA-IR, poderia justificar a não identificação da hiperinsulinemia que ocorreu nestas pacientes. Provavelmente, quando há resistência insulínica, a presença de SOP acelera a evolução do distúrbio metabólico, o que facilita a progressão para a IG em mulheres de mesmo IMC. O HOMA-IR elevou-se com o aumento do IMC tanto nas mulheres SOP como nos controles, fato que está de acordo com resultados de outros pesquisadores (MARTINEZ et al., 2017).

Nas mulheres SOP, a maioria das variáveis aferidas pela DXA demonstrou correlações fortes e moderadas para RI e IG, respectivamente. O método da BIA apresentou desempenho inferior, uma vez que todas as variáveis aferidas apresentaram correlações moderadas com RI e fracas com IG. A DXA é considerada método de referência para aferir a porcentagem de gordura corporal devido à elevada acurácia, e diferentes autores vem demonstrando que a BIA pode subestimar a quantidade de gordura corporal, particularmente em pacientes mais obesos (CHEN et al., 2016). Neste estudo verificamos que na comparação das medidas de massa gorda pela DXA *versus* BIA houve uma diferença de cerca de 10% a mais na gordura corporal pela DXA tanto em pacientes SOP como controles. Entretanto, nenhum dos métodos de avaliação da composição

corporal (BIA ou DXA) forneceu informações adicionais às medidas antropométricas para a identificação de risco metabólico, não havendo, portanto, indicação rotineira de seu uso. Exceção foi encontrada nos casos de pacientes sem excesso de peso, aonde a gordura androide teve correlação moderada com TOTG nas pacientes com SOP e correlação forte com HOMA-IR nos controles. Nestas situações talvez haja benefício em se adicionar a DXA na propedêutica complementar das pacientes.

Uma alternativa aos métodos de avaliação da composição corporal é o emprego de fórmulas que combinem variáveis aferidas na prática clínica, e que apresentem correlação com transtornos do metabolismo glicídico. O IAV foi originalmente descrito como indicador da gordura visceral com capacidade de se correlacionar com risco cardiometabólico na população em geral (AMATO et al., 2010). Em mulheres coreanas jovens portadoras de SOP, o *cutoff* estabelecido como ótimo do IAV para predizer a gordura visceral (área visceral de gordura na tomografia computadorizada $> 100 \text{ cm}^2$) foi de 1.79 (sensibilidade de 82,6% e especificidade de 84,7%) (OH; SUNG; LEE, 2013), sendo o IAV considerado alternativa de baixo custo à tomografia, correlacionando-se com a RI. No presente estudo, nas mulheres SOP houve correlação forte entre o IAV e a RI, e moderada entre o IAV e IG.

A relação da gordura visceral com a resistência periférica à insulina já foi bem documentada na literatura (SVENDSEN et al., 2008). Portanto, fatores que predisponham à obesidade também aumentam o risco para distúrbios metabólicos futuros. Tanto é assim, que pacientes com SOP tem risco de IG e DM2 de 3 a 7 vezes mais elevado do que a população da mesma faixa etária, e 2 vezes mais elevado quando comparado com controles da mesma idade e IMC, sendo o risco maior associado àquelas com IMC mais elevado (RANDEVA et al., 2012). Isso mostra claramente a associação entre a obesidade e a doença cardiovascular, amplificada nas pacientes com SOP.

Como estratégias primárias de tratamento para pacientes com SOP, principalmente se há excesso de peso, estão as modificações de estilo de vida que incluem a reeducação alimentar e exercício físico regular (TEEDE et al., 2018), reconhecendo-se a importância da prevenção na progressão da doença metabólica. Estratégias que possam atuar antes da instalação da obesidade teriam impacto mais significativo e eficaz na abordagem destas pacientes. Neste sentido, estudos que identifiquem indivíduos com predisposição genética ao excesso de peso, ou mesmo,

condições clínicas que se correlacionem com modificações epigenéticas, poderiam guiar novas estratégias terapêuticas para pacientes com SOP.

A observação de agregação familiar da SOP e seus traços fenotípicos sugere herança genética para esta endocrinopatia. Contudo, embora inúmeros estudos sobre genômica tenham sido realizados, poucas variantes genéticas e mutações foram replicadas em diferentes populações com SOP (ESCOBAR-MORREALE, 2018). A epigenética pode contribuir nesse sentido, pois compreende o estudo de mecanismos moleculares que regulam a atividade gênica, mas que não são causadas por variações na sequência do gene. A metilação é um desses mecanismos epigenéticos que pode impactar na interação entre gene e meio ambiente na aquisição de um traço fenotípico, como a própria SOP, ou uma característica associada a ela, que é o caso da obesidade (FILIPPOU; HOMBURG, 2017). Estudo experimental realizado por Xu et al. (2014) favorece essa hipótese. Os autores realizaram exposição de peixes-zebra a androgênios durante o período embrionário e observaram que a houve alteração na metilação global nos ovários dos peixes, bem como elevação da glicemia pós-prandial, achados que se mantiveram na prole dos peixes expostos (XU et al., 2014).

No presente estudo não foi observada diferença no perfil de metilação dos genes *FTO* e *POMC* entre os grupos SOP e controle para as regiões analisadas, genes estes que, de acordo com a literatura, estão associados à obesidade. Variantes do gene *FTO* presumivelmente implicadas na obesidade, como o SNP rs9939609, foram descritas em associação à SOP. Por outro lado, não há consenso entre os estudos de associação do haplótipo de risco do *FTO* e a presença de obesidade na SOP, sugerindo a influência de outros fatores como os mecanismos epigenéticos que modulam a expressão gênica (LIU; CHEN, 2017). Zhou et al. (2017) estudaram 942 indivíduos, de ambos os sexos, e demonstraram que a obesidade associada ao haplótipo rs9939609 do gene *FTO* ocorre somente na presença de níveis mais elevados de metilação (ZHOU et al., 2017) em pacientes com idade média próxima a 50 anos. Contudo, esse estudo não avaliou especificamente pacientes com SOP.

Estudos que incluíram outros genes relacionados a metabolismo, que não o *FTO* e *POMC*, concluíram que a idade pode influenciar no ganho de metilação e a hipermetilação é um dos fatores implicados na redução da taxa metabólica basal e obesidade que ocorre com o envelhecimento (RÖNN et al., 2008). Uma pesquisa com coorte de gêmeos monozigóticos corrobora a influência da idade na quantidade de metilação verificada (BOKS et al., 2009), fato

que justificaria nossos achados, uma vez que as pacientes de nosso estudo tinham idade média de 25 anos.

Outra justificativa para a semelhança no padrão de metilação do *FTO* entre os grupos, pode ter sido o tamanho amostral. Na etapa de delineamento do estudo, foi feita análise estatística para estimativa de tamanho amostral necessário, contudo devido a não haver estudos prévios específicos sobre a metilação desse gene na SOP, o cálculo pode ter sido subestimado. Considerando que a literatura é já consistente na associação entre o gene *FTO* e a presença de obesidade, se esperaria que o padrão de metilação neste estudo entre pacientes eutróficas e com excesso de peso fosse diferente. Porém, mesmo ao se estratificar as pacientes por peso, não houve diferença, independente do diagnóstico de SOP, sugerindo que esta amostra não se comportou conforme a literatura atual sobre o tema.

Outro gene cuja metilação foi avaliada neste estudo foi o *POMC*. A possível associação desse gene com a SOP foi sugerida por Ewens et al. (2010) ao estudarem 453 famílias com pelo menos um caso de SOP. Foi analisada a frequência de transmissão de alelos de SNP às pacientes afetadas, e um SNP do gene *POMC* foi considerado candidato para risco de SOP. Porém, é possível que a associação entre esse gene e a SOP seja variável, inclusive a depender de localização geográfica e de outros marcadores moleculares, pois outros autores não a constataram (PAU; SAXENA; WELT, 2013).

O gene *POMC* está relacionado à obesidade devido à participação no mecanismo de regulação do apetite. A metilação seria responsável por inativação (provavelmente parcial) do gene, resultando em incapacidade de inibir o orexígeno neuropeptídeo Y (PLAGEMANN et al., 2009). Em resumo, pacientes com hipermetilação do gene *POMC* teriam mais apetite, e tendência à obesidade. Neste estudo, a região promotora do gene mostrou-se hipermetilada na maioria das pacientes analisadas, não havendo diferença no padrão de metilação do gene *POMC* entre mulheres SOP e controle. Mesmo ao comparar pacientes eutróficas e com excesso de peso, independente da presença de SOP, não houve diferença no padrão de metilação. A literatura relativa à metilação do gene *POMC* em humanos é escassa e na maior parte associa-se a obesidade precoce monogênica em crianças (KRUDE et al., 1998). Na obesidade não monogênica, não está claro, todavia, o mecanismo pelo qual o gene *POMC* está envolvido na regulação anormal da ingesta e/ou gasto calórico. Em modelos experimentais, tais questões podem ser respondidas com maior acurácia, a exemplo do experimento realizado por Razolli et al.

(2019), que detectaram que dieta rica em gorduras foi capaz de aumentar a expressão do gene *POMC* e a produção de mediadores inflamatórios em ratos com tendência à obesidade, mas não em ratos magros. Os mesmos autores utilizaram células tronco humanas e as transformaram em neurônios *POMC*, e constataram que quando estas células foram expostas a níveis elevados de ácidos graxos (palmitato) houve menor processamento da pró-opiomelanocortina nos peptídeos obtidos por clivagem (α e β - melanocortina), que atuam no controle do apetite *in vivo*.

Além do envolvimento nos processos de apetite/saciedade e obesidade, mais recentemente, o estado de metilação do gene *POMC* foi associado a outras características de risco cardiovascular em crianças. Kwon et al. (2018) descreveram diminuição dos níveis de HDL em crianças que apresentavam níveis mais elevados de metilação do gene *POMC*, independentemente do IMC.

Deve ser dada relevância ao fato de que o DNA obtido para o presente estudo foi proveniente de leucócitos periféricos. Apesar de ser esta uma fonte de fácil obtenção de DNA e, portanto, utilizada em vários estudos sobre metilação, devemos estar atentos ao fato de que embora todas as células do corpo carreguem praticamente o mesmo genoma, o epigenoma pode variar entre tipos celulares distintos.

Xu, Azziz e Goodarzi (2010) usaram a técnica de análise da metilação global epigenômica, comparando o padrão de 20 pacientes SOP a 20 controles, cuja amostra era predominantemente constituída por mulheres jovens e eutróficas. Os padrões de metilação foram semelhantes no DNA de leucócitos periféricos de ambos os grupos (XU; AZZIZ; GOODARZI, 2010). Ao contrário, Shen et al. (2013) realizaram estudo em amostra de 10 pacientes SOP comparadas a 5 controles, e encontraram 40 genes cujo padrão de metilação era diferente entre casos e controles. Posteriormente, na comparação entre pacientes SOP, com e sem RI, os autores detectaram 79 genes diferentemente metilados.

Devido aos resultados conflitantes da literatura, embora seja dado como certo que a metilação em *loci* gênicos específicos possa afetar o funcionamento desses genes, assume-se que não necessariamente existam alterações detectáveis no nível global de metilação. Buscando demonstrar essa hipótese, outros autores passaram a procurar diferenças no padrão de metilação de genes em tipos celulares específicos. Xu et al. (2016) estudaram em mulheres chinesas, amostra de oito pacientes SOP obesas, oito SOP eutróficas e oito controles e seus dados demonstraram não haver diferença no padrão de metilação global entre pacientes SOP e

controles no sangue periférico, enquanto a metilação global foi significativamente mais elevada nas células da granulosa das portadoras de SOP (XU et al., 2016).

O tecido adiposo também pode apresentar padrões de metilação diferentes na SOP. Kokosar et al avaliaram a diferença entre a expressão gênica e metilação de DNA no tecido adiposo de 64 mulheres SOP, comparando-as a 30 controles, e verificaram que 30 genes foram diferentemente expressos na SOP, o que correspondeu a 33 sítios de metilação diferentes (KOKOSAR et al., 2016).

No presente estudo, não foi avaliada a metilação global, mas o perfil de metilação de um segmento da região promotora de dois genes específicos, potencialmente relacionados ao fenótipo obeso, utilizando DNA de leucócitos de sangue periférico, por um método semi-quantitativo. O perfil de metilação é tecido e tempo específico, portanto diferentes tipos celulares, como adipócitos, dentre outros, podem apresentar diferentes respostas quanto o padrão de metilação desses genes, uma possibilidade a ser explorada no futuro.

Outra questão que não foi avaliada neste estudo é quanto a participação do *FTO* em mecanismos pós-transcricionais, que podem impactar na adipogênese, e que podem ter papel crucial na aquisição de massa gorda. Zhao et al. (2014) demonstraram em estudo experimental que o *FTO* controla a clivagem do Ácido Ribonucleico mensageiro (RNAm) ao regular os níveis de RNAm *N*⁶-metiladenosina, funcionando como um fator regulatório do processamento do RNAm durante o processo de adipogênese. Posteriormente, Li et al. (2016) demonstraram em roedores que a dieta materna rica em gorduras durante a gestação é capaz de inibir a expressão do *FTO*, resultando em níveis aumentados de RNAm *N*⁶-metil-adenosina na gordura visceral da prole com 3 semanas de vida. Em conjunto, essas evidências apontam para um papel do *FTO* em splicing alternativo de RNAm. Contudo, ainda há controvérsias nessa questão, posto que outros autores não conseguiram detectar efeito da superexpressão do *FTO* nos níveis de *N*⁶-metil-adenosina no RNAm no geral, ou no Ácido Ribonucléico (RNA) total proveniente de fibroblastos embrionários de murinos (MERKESTEIN et al., 2014).

Para o gene *POMC*, por outro lado, seria interessante avaliá-lo em neurônios hipotalâmicos para podermos inferir, com mais propriedade, quanto à interferência nos mecanismos de controle do apetite/saciedade. Estudo feito durante necropsia de crianças obesas demonstrou que o gene *POMC* é expresso em células sanguíneas periféricas, onde apresenta padrão de metilação idêntico ao verificado em neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado,

diretamente envolvidos no controle do peso corporal (BIEBERMANN et al., 2006; KUEHNEN et al., 2012). Estudos clínicos *in vivo* desta natureza em humanos são impraticáveis, pela inacessibilidade ao sistema nervoso central, mas seria a maneira mais fidedigna de obter esta informação.

Outra questão que permanecerá sem resposta em estudos com o desenho de caso controle, é quanto à existência de causalidade entre o fator estudado (metilação) e o fenótipo (obesidade). Enquanto em evidências experimentais é possível demonstrar que a dieta materna ou a exposição a agentes sintéticos tem notável influência no grau de metilação do promotor do gene *POMC* (GALI RAMAMOORTHY et al., 2018; HUA et al., 2019), desencadeando obesidade e resistência insulínica na prole (HUA et al., 2019), estudos clínicos em humanos permitem inferir, no máximo, a ocorrência de associação entre as duas condições. Associação que inclusive pode ser decorrente dos mesmos fatores que levarão à obesidade. Por exemplo, sabemos que a atividade física e a dieta podem influenciar na porcentagem de metilação de um gene (BOUCHARD et al., 2010). Esses mesmos fatores podem provocar a obesidade, e não é possível estabelecer se foi a metilação que causou a obesidade, ou se tanto metilação quanto obesidade tem os mesmos fatores causais.

Dessa forma, para a falta de associação verificada no presente estudo podem ser aventadas como causas o tamanho amostral insuficiente, o rigor no pareamento pelo IMC, a fonte do DNA utilizado (leucócitos), a falta de relação causal entre as duas condições, ou a possibilidade da participação dos genes em processos pós-transcricionais. Cumpre salientar que a região promotora dos genes é maior do que o fragmento analisado, o que pode influenciar no perfil de metilação dependendo dos sítios CpG avaliados. Kuehnen et al. (2012) analisaram duas ilhas CpG do gene *POMC*, comparando o padrão de metilação gênica de crianças obesas a crianças não obesas. Os autores descreveram padrão de metilação similar para uma das ilhas, enquanto para outra, as crianças obesas apresentaram variante hipermetilada.

A obesidade humana envolve a participação de vários *loci* gênicos (HÄGG et al., 2015), que atuam por diferentes mecanismos, sendo uma característica complexa e multifatorial, em que o ambiente tem uma forte influência nos fatores genéticos, incluindo alterações epigenéticas que interferem no fenótipo dos indivíduos. Este estudo é uma contribuição quanto ao perfil de metilação de dois genes relacionados à obesidade em pacientes SOP, condição em que este traço fenotípico é altamente prevalente. Os genes estudados apresentaram perfis de metilação antagônicos, independente de possuir ou não SOP, em que o

gene *POMC* encontrou-se hipermetilado, enquanto o gene *FTO* apresentou-se hipometilado, o que não está descrito na literatura, até onde temos conhecimento. O *FTO* influencia em diferentes processos biológicos visto que esse gene atua como uma RNA demetilase e possui importante papel na regulação da expressão gênica, especialmente no processamento pós-transcricional de RNA, e no ganho e perda de metilação em RNA (MAUER et al., 2019). A metilação em RNA é uma importante modificação epigenética que pode contribuir com o desenvolvimento de diversas doenças, fornecendo mais um elemento a ser considerado em pesquisas futuras. O estudo de amostras maiores, ou com segmentos diferentes na região promotora podem trazer novos achados na compreensão dos mecanismos de regulação desses genes na SOP.

7 CONCLUSÕES

A avaliação de adiposidade das mulheres SOP no cenário clínico pode ser feita mediante o cálculo do IAV e medidas antropométricas, entre as quais destacam-se o IMC e RCE devido à sua correlação com risco metabólico. Há pouco benefício no emprego de rotina de métodos de avaliação de composição corporal, tais como a bioimpedância e a densitometria. Exceção pode se aplicar a mulheres SOP eutróficas, pois na presença de maior quantidade de gordura androide identificado pela DXA nestas pacientes o risco encontra-se aumentado. A BIA não parece acrescentar informações relevantes na avaliação de adiposidade de mulheres SOP.

Em relação ao padrão de metilação das regiões analisadas dos genes *POMC* e *FTO* não houve diferença em portadoras de SOP comparadas a controles e neste estudo nem mesmo em pacientes eutróficas e com excesso de peso. Não está descartada a possibilidade de diferenças no padrão de metilação de outras regiões gênicas, ou das mesmas regiões gênicas em diferentes tecidos.

REFERÊNCIAS

- ACTIVE MOTIF. **Bisulfite Conversion**. Carlsbad: Active Motif, 2019. Disponível em: <<https://www.activemotif.com/catalog/695/bisulfite-conversion>>. Acesso em: 25 fev. 2019.
- AL-JEFOUT, M.; ALNAWASEH, N.; AL-QTAITAT, A. Insulin resistance and obesity among infertile women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 5339, July 2017.
- AMATO, M. C. et al. Visceral Adiposity Index. **Diabetes Care**, New York, v. 33, n. 4, p. 920-922, Apr. 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes: 2018. **Diabetes Care**, New York, v. 41, Suppl. 1, p. S13-S27, Jan. 2018.
- ANDREASEN, C. H. et al. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. **Diabetes**, [New York], v. 57, n. 1, p. 95-101, Jan. 2008.
- ANDREOLI, A. et al. Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). **La Radiologia Medica**, Milan, v. 114, n. 2, p. 286-300, Mar. 2009.
- AZZIZ, R. et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 91, n. 11, p. 4237-4245, Nov. 2006.
- BEHBOUDI-GANDEVANI, S. et al. Could “a body shape index” and “waist to height ratio” predict insulin resistance and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Limerick, v. 205, p. 110-114, Oct. 2016.
- BELL, C. G. et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. e14040, 2010.
- BERENT-SPILLSON, A. et al. Insulin resistance influences central opioid activity in polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 8, p. 2494-2498, June 2011.
- BIEBERMANN, H. et al. A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human bodyweight regulation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 141-146, Feb. 2006.
- BOKS, M. P. et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e6767, Aug. 2009.

BOUCHARD, L. et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 91, n. 2, p. 309-320, Feb. 2010.

BOUMOSLEH, J. M. et al. Metabolic Concomitants of Obese and Nonobese Women with Features of Polycystic Ovarian Syndrome. **Journal of the Endocrine Society**, Washington, v. 1, n. 12, p. 1417-1427, Dec. 2017.

BOURC'HIS, D.; BESTOR, T. H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. **Nature**, London, v. 431, n. 7004, p. 96-99, Sept. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. (Cadernos de Atenção Básica, n. 38).

BRAY, G. A. Health hazards of obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 907-919, Dec. 1996.

CHEN, K. T. et al. Comparison of Standing Posture Bioelectrical Impedance Analysis with DXA for Body Composition in a Large, Healthy Chinese Population. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0160105, July 2016.

COMERFORD, K. B. et al. Lean mass and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. **Metabolism: clinical and experimental**, Philadelphia, v. 61, n. 9, p. 1256-1260, Sept. 2012.

DUNAIF, A. et al. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 96, n. 2, p. 801-810, Aug. 1995.

ESCOBAR-MORREALE, H. F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, London, v. 14, n. 5, p. 270-284, Mar. 2018.

ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Health and fertility in World Health Organization group 2 anovulatory women. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 586-599, Oct. 2012.

EWENS, K. G. et al. Family-Based Analysis of Candidate Genes for Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 95, n. 5, p. 2306-2315, May 2010.

EZEH, U. et al. Association of fat to lean mass ratio with metabolic dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. **Human reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1508-1517, July 2014.

FARRELL, K.; ANTONI, M. H. Insulin Resistance, Obesity, Inflammation, and Depression in Polycystic Ovary Syndrome: Biobehavioral Mechanisms and Interventions. **Fertility and Sterility**, New York, v. 94, n. 5, p. 1565-1574, Oct. 2010.

FILIPPOU, P.; HOMBURG, R. Is foetal hyperexposure to androgens a cause of PCOS? **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 421-432, July/Aug. 2017.

FRANKS, P. W.; LING, C. Epigenetics and Obesity: the devil is in details. **BMC Medicine**, [London], v. 8, p. 88, 2010.

FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 8th ed. Filadélfia: Lippincot Williams & Wolters Kluwer business, 2011.

GALI RAMAMOORTHY, T. et al. Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats. **International Journal of Obesity**, London, v. 42, n. 8, p. 1431-1444, Aug. 2018.

GALLAGHER, D. et al. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 3, p. 694-701, Sept. 2000.

GELONEZE, B. et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 281-287, Mar. 2009.

GERKEN, T. et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**, New York, v. 318, n. 5855, p. 1469-1472, Nov. 2007.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. **International Journal of Obesity**, London, v. 32, suppl. 7, p. S62-S71, Dec. 2008.

GOODMAN, N. F. et al. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and androgen excess and pcos society disease state clinical review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome: part 2. **Endocrine Practice**, Jacksonville, v. 21, n. 12, p. 1415-1426, Dec. 2015.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HÄGG, S. et al. Gene-based meta-analysis of genome-wide association studies implicates new loci involved in obesity. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 24, n. 23, p. 6849-6860, Dec. 2015.

HANGARTNER, T. N. et al. The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: acquisition of dual-energy X-ray absorptiometry body composition and considerations regarding analysis and repeatability of measures. **Journal of Clinical Densitometry**, Totowa, v. 16, n. 4, p. 520-536, Oct./Dec. 2013.

HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9821-9826, Sept. 1996.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. **Avaliação da composição corporal aplicada**. São Paulo: Manole, 2000.

HUA, X. et al. Exposure of pregnant mice to triclosan causes hyperphagic obesity of offspring via the hypermethylation of proopiomelanocortin promoter. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 547-558, Feb. 2019.

JAPUR, C. C. et al. Imbalance Between Postprandial Ghrelin and Insulin Responses to an Ad Libitum Meal in Obese Women With Polycystic Ovary Syndrome. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 21, n. 8, p. 1020-1026, Feb. 2014.

JENSTERLE, M. et al. Assessment of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. **International Journal of Gynaecology And Obstetrics**, [New York], v. 102, n. 2, p. 137-140, Aug. 2008.

JIA, G. et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 7, n. 12, p. 885-887, Dec. 2011.

JOHANSSON, G. S.; ARNQVIST, H. J. Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**. Endocrinology and Metabolism, Bethesda, v. 291, n. 5, p. E1124-1130, Nov. 2006.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews**. Genetics, London, v. 13, n. 7, p. 484-492, May 2012.

KARRA, E. et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsiveness. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 123, n. 8, p. 3539-3551, Aug. 2013.

KOKOSAR, M. et al. Epigenetic and transcriptional alterations in human adipose tissue of polycystic ovary syndrome. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 22883, Mar. 2016.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genetics**, New York, v. 19, n. 2, p. 155-157, June 1998.

KUEHNEN, P.; KRUDE, H. Alu elements and human common diseases like obesity. **Mobile Genetic Elements**, Austin, v. 2, n. 4, p. 197-201, July 2012.

KUEHNEN, P. et al. An Alu Element-Associated Hypermethylation Variant of the POMC Gene Is Associated with Childhood Obesity. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e1002543, Mar. 2012.

KWON, E. J. et al Association between the DNA methylations of POMC, MC4R, and HNF4A and metabolic profiles in the blood of children aged 7-9 years. **BMC Pediatrics**, [s.l.], v. 18, n. 121, Mar. 2018. doi: <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1104-0>.

- LAITINEN, J. et al. Body size from birth to adulthood as a predictor of self-reported polycystic ovary syndrome symptoms. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, Hampshire, v. 27, n. 6, p. 710-715, June 2003.
- LANG, P.-O. et al. Determination of Cutoff Values for DEXA-Based Body Composition Measurements for Determining Metabolic and Cardiovascular Health. **BioResearch Open Access**, New Rochelle, v. 4, n. 1, p. 16-25, 2015a.
- LANG, P.-O. et al. Markers of metabolic and cardiovascular health in adults: Comparative analysis of DEXA-based body composition components and BMI categories. **Journal of Cardiology**, Tokyo, v. 65, n. 1, p. 42-49, Jan. 2015b.
- LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 3, n. 9, p. 662-673, Sept. 2002.
- LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 1427-1431, Nov. 2002.
- LI, X. et al. Maternal High-Fat Intake Dynamically Programmed mRNA m6A Modifications in Adipose and Skeletal Muscle Tissues in Offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 8, pii: E1336, Aug. 2016. doi: 10.3390/ijms17081336.
- LIM, S. S. et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 618-637, Nov./Dec. 2012.
- LIU, Y.; CHEN, Y. Fat Mass and Obesity Associated Gene Polymorphism and the Risk of Polycystic Ovary Syndrome: A Meta-analysis. **Iranian Journal of Public Health**, Tihřān, v. 46, n. 1, p. 4-11, Jan. 2017.
- MARTINEZ, K. E. et al. Expanded Normal Weight Obesity and Insulin Resistance in US Adults of the National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Diabetes Research**, Nasr City, v. 2017, article ID 9502643, 2017.
- MAUER, J. et al. FTO Controls Reversible m6Am RNA Methylation during snRNA Biogenesis. **Nature Chemical Biology**, London, v. 15, n. 4, p. 340-47, Fev. 2019.
- MERKESTEIN, M. et al. Changes in gene expression associated with FTO overexpression in mice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e97162, May 2014. eCollection 2014. doi:10.1371/journal.pone.0097162.
- MIRANDA, D. E. G. A. et al. **Manual de avaliação nutricional do adulto e do idoso**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012.
- MORAN, L. J. et al. Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 89, n. 7, p. 3337-3344, July 2004.

MORAN, L. J. et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 347-363, Aug. 2010.

MORAN, L. J. et al. Postprandial ghrelin, cholecystokinin, peptide YY, and appetite before and after weight loss in overweight women with and without polycystic ovary syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 86, n. 6, p. 1603-1610, Jan. 2007.

NAN, X. et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, London, v. 393, n. 6683, p. 386-389, May 1998.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**, Chicago, v. 295, n. 13, p. 1549-1555, Apr. 2006.

OH, J.-Y.; SUNG, Y.-A.; LEE, H. J. The visceral adiposity index as a predictor of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, Silver Spring, v. 21, n. 8, p. 1690-1694, Aug. 2013.

PARK, S. Y. et al. Association between Appendicular Fat Mass and Metabolic Risk Factors. **Korean Journal of Family Medicine**, Seoul, v. 35, n. 4, p. 182-189, July 2014.

PAU, C.; SAXENA, R.; WELT, C. K. Evaluating reported candidate gene associations with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 99, n. 6, p. 1774-1778, May 2013.

PEDROSO, D. C. et al. Frequência e fatores de risco para síndrome metabólica em mulheres adolescentes e adultas com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 8, p. 357-361, Aug. 2012.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Physiology**, London, v. 587, pt. 20, p. 4963-4976, Oct. 2009.

RAMOS, R. B.; SPRITZER, P. M. FTO gene variants are not associated with polycystic ovary syndrome in women from Southern Brazil. **Gene**, Amsterdam, v. 560, n. 1, p. 25-29, Apr. 2015.

RANDEVA, H. S. et al. Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 33, n. 5, p. 812-841, Oct. 2012.

RAZOLLI, D. et al. POMC processing in the hypothalamus is directly regulated by saturated fat - implications for the development of obesity. **Neuroendocrinology**, Basel, 20 May 2019. doi:10.1159/000501023.

RÖNN, T. et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, n. 7, p. 1159-1168, May 2008.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 81, n. 1, p. 19-25, Jan. 2004.

RUTTER, M. K. et al. Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome, and Incident Cardiovascular Events in the Framingham Offspring Study. **Diabetes**, [New York], v. 54, n. 11, p. 3252-3257, Jan. 2005.

SAVVA, S. C.; LAMNISOS, D.; KAFATOS, A. G. Predicting cardiometabolic risk: waist-to-height ratio or BMI. A meta-analysis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [Auckland], v. 6, p. 403-419, 2013.

SHARP, D. S. et al. Body mass index versus dual energy x-ray absorptiometry-derived indexes: predictors of cardiovascular and diabetic disease risk factors. **American Journal of Human Biology**, New York, v. 24, n. 4, p. 400-405, Aug. 2012.

SHEN, H. R. et al. Genome-wide methylated DNA immunoprecipitation analysis of patients with polycystic ovary syndrome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64801, May 2013.

SIJEN, T.; PLASTERK, R. H. A. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. **Nature**, London, v. 426, n. 6964, p. 310-314, Nov. 2003.

SIRMANS, S. M.; PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, [Auckland], v. 6, p. 1-13, Dec. 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA / MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica**. Barueri: Manole: Minha Editora, 2014.

SVENDSEN, P. F. et al. Obesity, body composition and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 2113-2121, Sept. 2008.

SWAINSON, M. G. et al. Prediction of whole-body fat percentage and visceral adipose tissue mass from five anthropometric variables. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0177175, May 2017.

TAKIZAWA, T. et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 1, n. 6, p. 749-758, Dec. 2001.

TAYLOR, S. et al. **A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping**. Hercules: Bio-Rad Laboratories Inc., 2010. (Tech note 6004).

- TEEDE, H. J. et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1602-1618, Sept. 2018.
- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report**. Washington, DC: US DHHS, 1998. (98-4083).
- VAN DIJK, S. J. et al. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, London, v. 39, n. 1, p. 1-13, Feb. 2014.
- VITOLLO, M. R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Rúbio, 2008.
- WOJCIECHOWSKI, P. et al. Impact of FTO genotypes on BMI and weight in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, Berlin, v. 55, n. 10, p. 2636-2645, Oct. 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: WHO, 1998. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, June 3-5, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: World Health Organization, 2000. Report of a WHO Consultation on Obesity.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Overweight and obesity**. Geneva: WHO, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 18 jul. 2017.
- WU, C. T.; MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, New York, v. 293, n. 5532, p. 1103-1105, Aug. 2001.
- XU, J. et al. Comprehensive analysis of genome-wide DNA methylation across human polycystic ovary syndrome ovary granulosa cell. **Oncotarget**, Albany, v. 7, n. 19, p. 27899-27909, May 2016.
- XU, N. et al. Early Embryonic Androgen Exposure Induces Transgenerational Epigenetic and Metabolic Changes. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, Baltimore, v. 28, n. 8, p. 1329-1336, Aug. 2014.
- XU, N.; AZZIZ, R.; GOODARZI, M. O. Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 94, n. 2, p. 781-783.e1, July 2010.
- YANG, J. et al. FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. **Nature**, London, v. 490, n. 7419, p. 267-272, Oct. 2012.
- YILDIZ, B. O.; KNOCHENHAUER, E. S.; AZZIZ, R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 93, n. 1, p. 162-168, Jan. 2008.

- YONG, W.-S.; HSU, F.-M.; CHEN, P.-Y. Profiling genome-wide DNA methylation. **Epigenetics & Chromatin**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 26, Dec. 2016.
- YUAN, H. et al. Interaction between common variants of FTO and MC4R is associated with risk of PCOS. **Reproductive biology and endocrinology**: RB&E, London, v. 13, p. 55, June 2015.
- ZAWADZKI, J. K.; DUNAIF, A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: DUNAIF, A. et al. (ed.). **Polycystic Ovary Syndrome**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992. p. 377-384.
- ZHAO, H. et al. Family-based analysis of susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 294-298, Jan. 2012.
- ZHAO, X. et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. **Cell Research**, Beijing, 24, n. 12, p. 1403-1419, Dec. 2014.
- ZHOU, Y. et al. rs9939609 FTO genotype associations with FTO methylation level influences body mass and telomere length in an Australian rural population. **International Journal of Obesity**, London, v. 41, n. 9, p. 1427-1433, Sept. 2017.

ANEXO A - ARTIGO 1

Correlações entre medidas de adiposidade e variáveis metabólicas em pacientes portadoras de Síndrome dos Ovários Policísticos: um estudo caso-controle

Camila Toffoli Ribeiro^{a*}, Catarina Mendes Silva^b, Nayara Bernardes da Cunha^b, Daurea Abadia De-Souza^c, Rosana Maria dos Reis^d, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva^d

^a Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

^b Programa de Residência em Nutrição Clínica, Residência Multiprofissional em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

^c Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

^d Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*** Endereço para correspondência:** Camila Toffoli Ribeiro, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, 38405-320 Uberlândia, MG, Brasil. Fax: +55-34-3225-8602. E-mail: camtoffoli@yahoo.com.br

Conflito de Interesses e Financiamento

Nenhuma das autoras apresentou nenhum conflito pessoal ou financeiro no desenvolvimento do presente trabalho.

Agradecimentos: à Profa. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz, pela valiosa parceria da Clínica CDE na realização dos exames de densitometria óssea.

Declaração de Autoria

Camila Toffoli Ribeiro, Catarina Mendes Silva e Nayara Bernardes da Cunha participaram no desenho do estudo, análises estatísticas, interpretação de dados, redação do manuscrito. Daurea Abadia De-Souza, Rosana Maria dos Reis and Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva participaram no desenho do estudo, interpretação e revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual. Todas as autoras aprovaram a versão final para submissão.

Resumo

Objetivos: Correlacionar os valores obtidos na avaliação da adiposidade por quatro métodos diferentes, com os valores de resistência insulínica (RI) e de intolerância à glicose (IG), em portadoras de Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e em controles ovuladoras. **Métodos:** Estudo caso-controle, realizado com mulheres SOP (n=39) e controles (n=35), pareadas por índice de massa corporal (IMC). Foram realizados o teste oral de tolerância à glicose (TOTG); índice HOMA-IR; bioimpedância elétrica (BIA); densitometria de corpo inteiro (DXA); medidas antropométricas (índice cintura/quadril, índice cintura/estatura, IMC) e índice de adiposidade visceral (IAV). Os resultados foram correlacionados ao HOMA-IR e à glicemia pós-sobrecarga. **Resultados:** Em mulheres SOP, o índice HOMA-IR apresentou forte associação com as medidas obtidas pela DXA e a maioria das medidas antropométricas (exceto cintura/quadril). Associação moderada foi identificada entre os valores obtidos para TOTG e para DXA, índice cintura/estatura, e IMC. Em mulheres SOP, as medidas obtidas pela BIA apresentaram associação moderada com índice HOMA-IR e associação fraca com TOTG. O IAV de mulheres SOP apresentou correlação forte e moderada com os valores obtidos para o HOMA-IR e o TOTG, respectivamente. Especificamente em SOP eutróficas, as medidas de gordura androide apresentaram associação moderada com o TOTG. O índice de gordura apendicular pela DXA foi mais elevado nos controles. **Conclusões:** Em mulheres SOP a adiposidade pode ser avaliada pelo IMC, índice cintura/estatura e IAV, porém não pela BIA. A DXA tem aplicação prática na avaliação das mulheres SOP eutróficas, que apresentam aumento do risco metabólico associado à maior quantidade de gordura androide.

Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é caracterizada por produção cronicamente aumentada de androgênios. Em mulheres em idade reprodutiva, a SOP apresenta prevalência estimada de 4 a 8% pelos critérios do “*National Institutes of Health*”, podendo atingir 18% pelos critérios da “*ESHRE/ASRM*” (SIRMANS; PATE, 2013).

A SOP apresenta repercussões multissistêmicas, com influência nos âmbitos reprodutivo, cardiovascular, afetivo e estético, com aumento específico do risco de transtornos do metabolismo glicídico e síndrome metabólica (MORAN et al., 2010). Mulheres portadoras de SOP apresentam maior frequência de sobrepeso, obesidade e obesidade central (LIM et al., 2012), com conseqüente aumento na prevalência da resistência insulínica (RI). Em estudo de revisão sobre risco cardiometabólico em mulheres portadoras de SOP, Randeva et al. estimaram a presença de RI em 30% das SOP eutróficas e em 70% das obesas (RANDEVA et al., 2012).

A RI está associada a quadros mais exuberantes de hiperandrogenismo (RUTTER et al., 2005) e a aumento do risco relativo para intolerância à glicose (IG) e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), com valores estimados de 2,48 e 4,43, respectivamente (MORAN et al., 2010). Em acordo com essas considerações é essencial identificar qual é o melhor método para avaliação da adiposidade em mulheres SOP, com destaque para as correlações com a RI e a IG.

A antropometria engloba um conjunto de técnicas de aplicação rápida e de baixo custo, com reprodutibilidade variável, que podem ser utilizadas para avaliação clínica da adiposidade. Dentre as medidas antropométricas mais frequentemente utilizadas estão incluídos o índice de massa corporal (IMC), as medidas da cintura (CC) e do quadril (CQ), e a relação entre cintura e quadril (RCQ). De acordo com a *World Health Organization* (WHO), devem ser classificados como portadores de sobrepeso e de obesidade pacientes que apresentam valores de IMC de 25 ou mais e de 30 ou mais, respectivamente (WHO, 2000). Maiores valores de IMC apresentam implicações crescentes de riscos à saúde (BRAY, 1996; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1998; WHO, 1998).

Embora habitualmente seja identificada uma relação direta entre IMC e quantidade de gordura corporal, em algumas situações clínicas essa relação não é observada. Nessas situações estão incluídas pessoas que apresentam maior massa muscular devido à prática

regular de atividade física (GALLAGHER et al., 2000), assim como indivíduos em que a massa muscular está reduzida, como nos portadores de sarcopenia com manutenção do IMC, observada em algumas pessoas idosas (ANDREOLI et al., 2009). Esse fato tem motivado a investigação de outros métodos de avaliação da composição corporal, com destaque para métodos que permitam estabelecer com maior precisão uma relação entre a quantidade de tecido adiposo (massa gorda – MG) e o risco metabólico potencial.

Dentre os diversos métodos descritos na literatura para avaliação da composição corporal, destacam-se a bioimpedância elétrica (BIA) e a densitometria de corpo inteiro (DXA). A BIA baseia-se no princípio da diferença de condutividade elétrica entre os tecidos corporais, ou seja, os tecidos adiposo e ósseo são condutores fracos de eletricidade, enquanto a massa magra (MM) é altamente condutora. O método da BIA possibilita a identificação da água corporal, MM e MG, expressas em porcentagens (MIRANDA et al., 2012). Alguns modelos de equipamentos de BIA são portáteis e de baixo custo, porém o método não fornece informações a respeito da distribuição de gordura (ANDREOLI et al., 2009). O método de DXA avalia a composição corporal em três compartimentos distintos: osso/mineral, gordura, e todo o restante da massa livre de gordura não representada por osso. Cada um destes compartimentos corporais apresenta diferentes absorbâncias de duas fontes de energia geradoras de raio-X, o que permite estimar a massa de gordura por regiões corporais, como tronco, abdome e membros. O método da DXA permite uma avaliação bastante acurada da composição corporal, mas apresenta custo elevado e o aparelho não é portátil (ANDREOLI et al., 2009).

Outra questão que tem sido amplamente investigada é se os índices que incluem variáveis antropométricas em sua fórmula são capazes de prever o resultado dos métodos padrão ouro de avaliação da composição corporal. Recentemente, a relação cintura/estatura (RCE) e o índice de adiposidade visceral (IAV) têm sido indicados como métodos capazes de prever a gordura abdominal (OH; SUNG; LEE, 2013; SWAINSON et al., 2017). Considerando que em mulheres SOP a gordura visceral pode elevar o risco de RI, caso a associação entre índices antropométricos e quantidade de gordura abdominal seja efetivamente comprovada, esses índices poderão ser utilizados em substituição à BIA ou DXA, como alternativa para avaliação do risco metabólico dessas pacientes.

O objetivo primário do estudo foi correlacionar a adiposidade avaliada por quatro métodos diferentes com a RI e a IG, em pacientes portadoras de SOP em comparação a controles ovuladoras. O objetivo secundário foi analisar se as mulheres SOP apresentam risco metabólico maior (RI, glicemia pós-sobrecarga e IAV, medidas antropométricas e composição corporal) do que mulheres controle IMC pareadas.

Métodos

Estudo observacional, analítico, caso-controle, desenvolvido no ambulatório de ginecologia endócrina do Hospital de Clínicas de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU), no período de 2015 a 2017. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as mulheres analisadas concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram analisadas 74 mulheres, sendo 39 portadoras de SOP e 35 controles ovuladoras, com idade entre 18 e 35 anos, pareadas pelo IMC. Durante a realização do pareamento, foram adotados como critérios uma diferença máxima de $\pm 2,0 \text{ kg/m}^2$ no valor do IMC, assim como a confirmação de que o controle estava na mesma categoria de IMC do caso SOP (WHO, 2000). O diagnóstico de SOP foi realizado conforme os critérios do consenso de Rotterdam (ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004). As mulheres incluídas no grupo controle foram localizadas nos ambulatórios de planejamento familiar ou de ginecologia geral do HCU-UFU. O grupo controle foi constituído por mulheres com ciclos menstruais regulares, espontâneos, sem histórico de infertilidade. Foram excluídas do estudo mulheres em uso de medicação hormonal nos 3 meses anteriores ao recrutamento, hipoglicemiantes orais ou medicamentos indutores de perda de peso; gestantes ou mulheres em período de amamentação.

O metabolismo glicídico foi avaliado pelo *Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance* (HOMA-IR), calculado pela fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mg\%)} \times \text{insulina } (\mu\text{UI/ml}) / 405$ (JENSTERLE et al., 2008). Na interpretação dos resultados do HOMA-IR, foram classificadas como portadoras de RI as mulheres que apresentaram $\text{HOMA-IR} > 2,7$ (GELONEZE et al., 2009). A dosagem de insulina basal foi realizada pelo método de

quimioluminescência (Roche Diagnóstica©, Brasil). O teste de tolerância oral à glicose (TOTG), realizado com 75 gramas de glicose, foi utilizado como marcador de IG. As dosagens de glicose sanguínea foram realizadas pelo método da hexoquinase (Roche Diagnóstica©, Brasil). A interpretação dos dados do TOTG foi realizada em acordo com os parâmetros estabelecidos pela *American Diabetes Association* (2018). O perfil lipídico em jejum foi avaliado pela dosagem do colesterol total, HDL colesterol (*High Density Lipoprotein*), e LDL colesterol (*Low Density Lipoprotein*), e pela dosagem de triglicerídeos (método enzimático colorimétrico, Roche Diagnóstica©, Brasil).

Dentre as variáveis antropométricas, foram aferidos o peso corporal, estatura, e as medidas da CC (realizada no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca) e da CQ (realizada no maior diâmetro da região glútea). Para as medidas da CC e da CQ foi utilizado fita antropométrica inextensível de fibra de vidro, com precisão de 0,1 cm. Para análise dos valores da CC e da CQ foi adotado o valor médio de três medidas (HEYWARD; STOLARCZYK, 2000). Na sequência, foram calculados os valores do IMC [$\text{IMC} = \text{peso (kg)}/\text{estatura (m)}^2$]; da RCQ, e da RCE. Os valores obtidos para o IMC foram classificados de acordo com as referências da WHO (2000).

A avaliação pela impedância bioelétrica (BIA) foi realizada com o aparelho Biodynamics 310e, marca TBW©, seguindo o protocolo padronizado na literatura para este exame (MIRANDA et al., 2012; VITOLO, 2008).

A avaliação pelo método da DXA foi realizada uma única vez com a utilização do equipamento Lunar Prodigy DXA System, o qual encontra-se padronizado conforme os parâmetros propostos na literatura (HANGARTNER et al., 2013). As leituras foram feitas pela versão de *software* 11,20. Foram realizadas medidas referentes a quantidade de MG e de MM em gramas e em percentual, e o índice MG/MM. Em adição, foram realizadas medidas da distribuição de gordura nos diferentes compartimentos, ou seja, gordura andróide (limite inferior na linha horizontal que conecta as espinhas ilíacas anterossuperiores, limite superior definido como 20% acima da borda inferior, paralelamente à linha do queixo e lateralmente pelas margens da cintura) e gordura ginoide (limitada superiormente pela parte superior do trocânter maior, e limite inferior a 96 mm do trocânter maior, sendo a parte lateral delimitada pelo tecido subcutâneo do quadril).

Na sequência, foi obtido o índice de gordura apendicular (IGA) utilizando a fórmula: $IGA = \text{MG das pernas (g)} + \text{MG dos braços (g)} / \text{MG do tronco (g)}$, conforme especificações do fabricante. Também foi calculado o IAV por meio da fórmula matemática a seguir: $IAV = [\text{Cintura}/(36.58 + (1.89 \times \text{IMC}))] \times (\text{Triglicerídeos}/0.81) \times (1.52/\text{HDL colesterol})$, estando as concentrações de triglicerídeos e HDL colesterol em mmol/l (AMATO et al., 2010).

Os resultados obtidos para as mulheres SOP foram comparados aos resultados obtidos para as mulheres controles. A seguir, foram constituídos os seguintes subgrupos de acordo com categorias de IMC: SOP eutrófico (SOP-Eu, n = 20) e controle eutrófico (C-Eu, n = 19), com IMC até 24,9 Kg/m²; SOP com excesso de peso (SOP-Exp, n = 19) e controle com excesso de peso (C- Exp, n = 16), em que o IMC foi $\geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism[®] versão 6.00 para Windows; *GraphPad Software*⁷, La Jolla California USA e pelo programa *BioEstat 5.0*⁸. As variáveis foram estudadas com o método D'Agostino e Pearson quanto ao padrão de distribuição, sendo categorizadas em variáveis paramétricas (distribuição normal) e não-paramétricas (sem distribuição normal). As variáveis contínuas paramétricas foram comparadas utilizando o teste *t* de *Student* pareado, enquanto as não paramétricas foram comparadas utilizando o teste de *Wilcoxon* pareado. Para a comparação entre mais de 2 grupos de variáveis, foi utilizado o teste de ANOVA, com pós teste de *Tukey* para variáveis de distribuição normal, e *Kruskall-Wallis* com pós teste de *Dunn* para variáveis não paramétricas. Para as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de *Pearson* quando a análise foi realizada entre duas variáveis paramétricas, e o coeficiente de correlação de *Spearman* quando a análise foi realizada entre duas variáveis não paramétricas. O coeficiente de correlação (*r*) foi considerado fraco quando o valor identificado ficou entre 0,3 e 0,5; moderado quando entre 0,5 e 0,7; forte quando entre 0,7 e 0,9; e muito forte quando maior ou igual a 0,9. A comparação entre as frequências de variáveis discretas foi feita utilizando o teste de *Fisher*. As análises foram consideradas significantes quando foi identificado $p < 0,05$, adotando-se testes bicaudais.

⁷ Cf. www.graphpad.com.

⁸ Cf. <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/>.

Resultados

Mulheres incluídas nos grupos SOP e controle apresentaram idade média similar (25 anos e 26 anos, respectivamente; $p = 0,5024$). Desde que o pareamento dos grupos foi feito pelo IMC, valores médios similares foram identificados para mulheres SOP e controles, assim como foi demonstrado para todas as outras variáveis antropométricas analisadas. Não foram identificadas diferenças nas medidas realizadas para avaliação da composição corporal pelos métodos BIA e DXA, exceto para o índice de gordura apendicular que foi significativamente menor nas mulheres SOP ($p = 0,0435$) (Tabela 1).

Valores médios similares foram demonstrados para variáveis metabólicas para as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle em relação à glicose sanguínea de jejum, índice HOMA-IR, lipídeos séricos (colesterol, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicerídeos), assim como para a frequência de RI e de IG. Valores médios mais elevados foram demonstrados para glicose sanguínea 2 horas pós-sobrecarga (GPS) em mulheres SOP quando comparadas aos controles ($p = 0,0090$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Análises comparativas entre os grupos SOP e controle em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por DXA e por BIA, e variáveis metabólicas

	SOP (n=39)	Controle (n=35)	<i>p</i>
Variáveis Antropométricas			
IMC (Kg/m ²)	24,43 (20,90 - 33,84)	24,20 (21,75 - 31,00)	0,7280
Cintura (cm)	83,50 (72,00 - 103,30)	81,00 (72,00 - 93,50)	0,4660
Quadril (cm)	102,00 (95,63 - 117,00)	101,00 (95,00 - 110,00)	0,9966
RCQ	0,8109 (0,7553 - 0,8715)	0,8000 (0,7577 - 0,844)	0,2067
RCE	0,5138 (0,4441 - 0,6284)	0,5000 (0,4565 - 0,5994)	0,2776
Bioimpedância			
MG (%)	30,80 (26,00 - 39,30)	31,40 (25,60 - 36,40)	0,6829
MM (%)	69,20 (60,70 - 74,00)	68,60 (63,60 - 74,40)	0,6829
MG/MM	0,4450 (0,3500 - 0,6425)	0,4600 (0,3400 - 0,5700)	0,5909
Densitometria			
MG (%)	39,20 (33,30 - 48,70)	43,40 (33,30 - 49,00)	0,4413
MG/MM	0,6400 (0,5000 - 0,9500)	0,7100 (0,5000 - 0,9100)	0,7273
Gordura Ginóide (%)	49,50 (42,60 - 54,40)	51,50 (44,90 - 56,00)	0,5732
Gordura Androide (%)	46,70 (34,40 - 54,90)	46,20 (35,90 - 53,90)	0,7425
Índice de Gordura Apendicular	0,9200 (0,7400 - 1,1100)	1,040 (0,9500 - 1,1200)	0,0435*
Variáveis Metabólicas			
HOMA-IR	1,910 (1,330 - 4,120)	1,975 (1,153 - 2,695)	0,0576
Glicose sanguínea de jejum (mg/dl)	87,00 (80,75 - 94,00)	86,00 (79,75 - 90,00)	0,2213
TOTG (mg/dl)	105,00 (90,50 - 118,00)	92,50 (83,50 - 103,30)	0,0090*
Colesterol total (mg/dl)	170,50 (150,3 - 200,30)	168,00 (148,5 - 194,5)	0,9473
HDL colesterol (mg/dl)	47,50 (39,00 - 59,50)	49,50 (41,75 - 59,25)	0,5387
LDL colesterol (mg/dl)	103,00 (86,30 - 121,50)	98,00 (87,70 - 126,5)	> 0,9999
Triglicérides (mg/dl)	85,85 (53,75 - 143,80)	78,00 (59,00 - 102,00)	0,3426
RI (n, %)	15 mulheres (38,46% da amostra)	8 mulheres (22,22% da amostra)	0,1386
IG (n, %)	3 mulheres (7,69% da amostra)	0 mulheres (0 % da amostra)	1,0000

RCQ: relação cintura/quadril; RCE: relação cintura/estatura; IAV: índice de adiposidade visceral; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda/massa magra; Índice de Gordura apendicular: MG braços+ MG pernas/ MG tronco; TOTG: glicose sanguínea pós sobrecarga; resistência à insulina (RI): HOMA-IR > 2.7; Intolerância à glicose (IG): glicose sanguínea de jejum ≥ 100mg% e/ou glicose sanguínea pós-sobrecarga ≥ 140 mg%. **p* < 0,05. Os resultados foram expressos em mediana (p25 - p75).

Fonte: Elaboração própria.

Nas comparações entre grupos de mesmo IMC, os valores médios do índice de gordura apendicular pela DXA foram mais baixos para mulheres SOP-Exp quando comparadas às mulheres C-Exp ($p = 0,0134$). As outras variáveis de medida da BIA e DXA foram semelhantes entre grupos de mesmo IMC (Tabela 2).

Tabela 2 - Análises comparativas realizadas entre as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle, subdivididas em eutróficas e excesso de peso, em relação às variáveis antropométricas, composição corporal por densitometria de corpo inteiro e bioimpedância

	SOP		Controle		SOP-Eu X C-Eu	SOP- ExP X C- ExP	C-Eu X C- ExP	SOP- ExP X C-Eu	SOP-Eu X SOP- ExP	SOP-Eu X C- ExP
	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	C-Eu (n = 19)	C-ExP (n = 16)						
Antropometria										
RCQ	0,7688 (0,7444 - 0,8080)	0,8748 (0,8355 - 0,9332)	0,7912 (0,7374 - 0,8046)	0,8387 (0,7817 - 0,8748)	0,9993	0,2281	0,0199	< 0,0001	< 0,0001	0,0130
IMC (kg/m ²)	21,16 (19,52 - 23,15)	33,84 (30,20 - 37,63)	22,14 (20,55 - 23,03)	31,03 (27,55 - 37,88)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
RCE	0,4509 (0,4273 - 0,4906)	0,6220 (0,5849 - ,6810)	0,4575 (0,4348 - 0,4865)	0,6066 (0,5378 - 0,6552)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Bioimpedância										
MG (%)	27,05 (25,48 - 30,10)	39,00 (33,63 - 41,55)	25,80 (23,60 - 29,70)	37,50 (34,00 - 41,18)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
MM (%)	72,95 (69,90 - 74,53)	61,00 (58,45 - 66,38)	74,20 (70,30 - 76,40)	62,50 (58,83 - 66,00)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
MG/MM	0,3700 (0,34 - 0,43)	0,6350 (0,50 - 0,71)	0,3500 (0,31 - 0,42)	0,6000 (0,51 - 0,70)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0002
Densitometria										
MG	33,80 (28,38 - 37,33)	48,70 (45,70 - 52,70)	34,80 (29,70 - 41,10)	48,40 (45,78 - 54,53)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Gordura Andróide	34,75 (29,20 - 41,43)	54,90 (52,60 - 59,60)	36,00 (30,90 - 43,90)	53,90 (51,80 - 57,05)	0,9395	0,9391	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MG/MM	0,5100 (0,3925 - 0,5925)	0,9500 (0,8400 - 0,1100)	0,5300 (0,4200 - 0,6700)	0,9350 (0,8425 - 1,198)	0,7626	0,8452	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Gordura Apendicular	1,015 (0,9000 - 1,205)	0,8100 (0,6500 - 0,9300)	1,070 (1,010 - 1,150)	1,0000 (0,8550 - 1,100)	0,9885	0,0134*	0,5530	< 0,0001	0,0002	0,7328

C-Eu: controles eutróficas; C- ExP : controles com excesso de peso; SOP-Eu: grupo SOP eutróficas; SOP- ExP : grupo SOP com excesso de peso; RCQ: relação cintura/quadril; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); RCE: relação cintura/estatura; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda/massa magra; Índice de Gordura Apendicular: MG braços+ MG pernas/MG tronco; * $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em mediana (p25 - p75).

Fonte: Elaboração própria.

Dentre as mulheres portadoras de SOP, foi demonstrada correlação forte entre o HOMA-IR e medidas antropométricas (exceto RCQ) e medidas de avaliação da composição corporal pela DXA (MG, gordura androide e MG/MM). Com o método da BIA foi identificada correlação moderada entre o HOMA-IR e a MG, MM e MG/MM (Tabela 3).

Dentre as mulheres SOP foi demonstrada correlação moderada entre a GPS e a RCE, o IMC e as seguintes variáveis da DXA: MG, MG/MM, gordura androide e índice de gordura apendicular. Foi detectada correlação fraca entre a GPS e gordura ginóide. Para a BIA, a correlação foi fraca entre MG/MM e GPS (Tabela 3).

Especificamente para as mulheres classificadas como SOP-Eu foi observada correlação moderada entre GPS e a gordura androide pela DXA. A MG e índice de gordura apendicular pela DXA apresentaram correlação fraca com a GPS (Tabela 4).

Tabela 3 - Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga com variáveis antropométricas, bioimpedância e densitometria de corpo inteiro, nos grupos SOP e controle

	SOP				CONTROLE			
	HOMA-IR		TOTG		HOMA-IR		TOTG	
	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	C-Eu (n = 16)	C-ExP (n = 19)	C-Eu (n = 19)	C- ExP (n = 16)
IMC (Kg/m ²)	0.3550	0.4345	0.3493	0.3475	0.4300	0.5791 ^{☆☆}	- 0.1519	0.1221
RCE	0.3678	0.7131 ^{☆☆☆}	0.4731 [☆]	0.1065	0.4651 [☆]	0.4893	-0.1165	0.07968
Bioimpedância – MG (%)	0.1857	0.4555	0.1121	0.2521	0.5432 ^{☆☆}	0.3810	0.3186	0.1828
DXA								
MG (%)	0.2591	0.2885	0.4651 [☆]	0.2381	0.7372 ^{☆☆☆}	0.3467	0.01412	0.03640
Gordura Androide (%)	0.4720 [☆]	0.1211	0.5308 ^{☆☆}	0.3877	0.7531 ^{☆☆☆}	0.2181	-0.1265	-0.1032
Índice de Gordura Apendicular	-0.05796	-0.2871	-0.4527 [☆]	-0.2588	- 0.1983	0.1808	0.3171	-0.0648

TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga; RCQ: relação cintura/quadril; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); RCE: relação cintura/estatura; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda /massa magra; Índice de Gordura apendicular: braços + pernas/tronco; *p < 0.05; [☆] correlação fraca (0,3 ≤ r < 0,5); ^{☆☆} correlação moderada (0,5 ≤ r < 0,7); ^{☆☆☆} correlação forte (0,7 ≤ r < 0,9)

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós-sobrecarga e IMC e parâmetros de bioimpedância e de densitometria de mulheres portadoras de SOP e controles, divididas por subgrupos de acordo com o IMC (grupos eutróficos e grupos com excesso de peso)

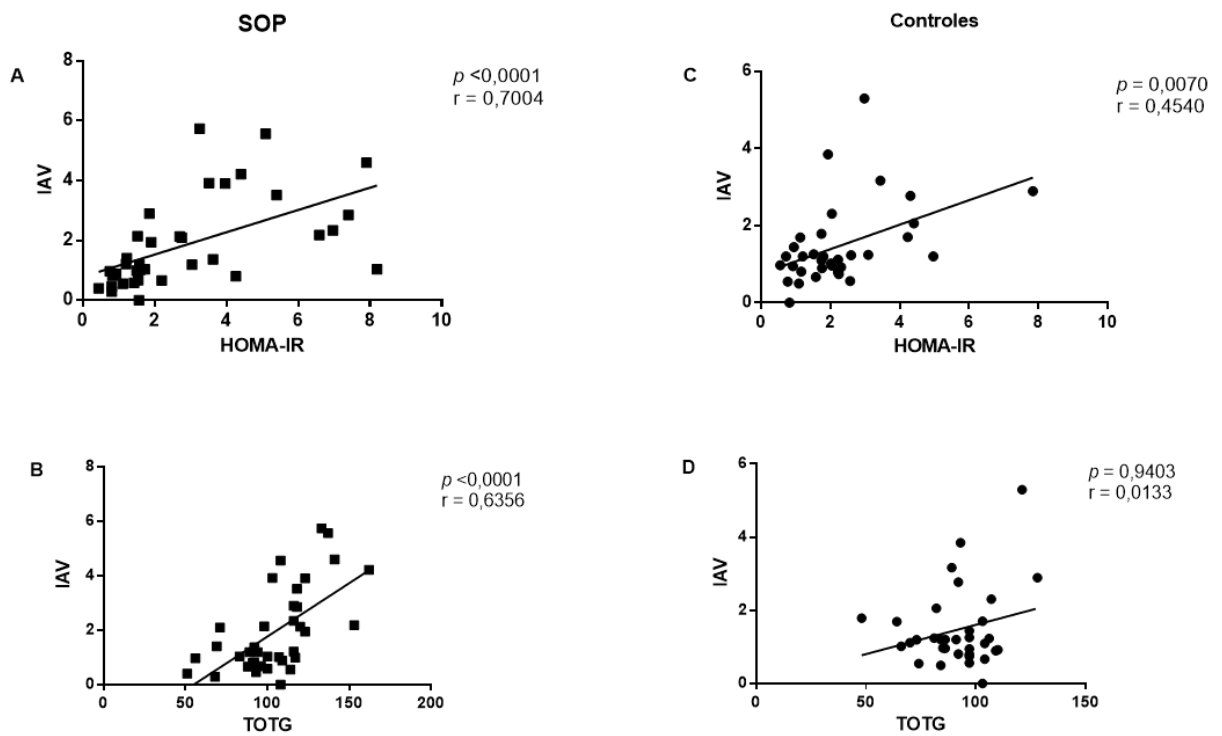
	SOP				CONTROLE			
	HOMA-IR		TOTG		HOMA-IR		TOTG	
	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	SOP-Eu (n = 20)	SOP- ExP (n = 19)	C-Eu (n = 16)	C-ExP (n = 19)	C-Eu (n = 19)	C- ExP (n = 16)
IMC (Kg/m ²)	0.3550	0.4345	0.3493	0.3475	0.4300	0.5791 ^{☆☆}	- 0.1519	0.1221
RCE	0.3678	0.7131 ^{☆☆☆}	0.4731 [☆]	0.1065	0.4651 [☆]	0.4893	-0.1165	0.07968
Bioimpedância – MG (%)	0.1857	0.4555	0.1121	0.2521	0.5432 ^{☆☆}	0.3810	0.3186	0.1828
DXA								
MG (%)	0.2591	0.2885	0.4651 [☆]	0.2381	0.7372 ^{☆☆☆}	0.3467	0.01412	0.03640
Gordura Androide (%)	0.4720 [☆]	0.1211	0.5308 ^{☆☆}	0.3877	0.7531 ^{☆☆☆}	0.2181	-0.1265	-0.1032
Índice de Gordura Apendicular	-0.05796	-0.2871	-0.4527 [☆]	-0.2588	- 0.1983	0.1808	0.3171	-0.0648

C-Eu: controles eutróficas; C- ExP : controles com excesso de peso; SOP-Eu: grupo SOP eutróficas; SOP- ExP : grupo SOP com excesso de peso; TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga; IMC: índice de massa corporal (peso/estatura²); MG: massa gorda; Índice de Gordura Apendicular: MG dos braços+ MG das pernas/MG do tronco; [☆] correlação fraca ($0,3 \leq r < 0,5$); ^{☆☆} correlação moderada ($0,5 \leq r < 0,7$); ^{☆☆☆} correlação forte ($0,7 \leq r < 0,9$)

Fonte: Elaboração própria.

Os valores médios do Índice de Adiposidade Visceral (IAV) foram semelhantes entre os grupos ($p = 0,2141$). Contudo, entre as mulheres SOP, foi demonstrado que o IAV apresentou correlação positiva forte com o HOMA-IR e correlação positiva moderada com a TOTG. Nos controles observamos correlação fraca para o HOMA-IR (Figura 1).

Figura 1 – Análises de correlação entre as variáveis HOMA-IR e glicose sanguínea pós sobrecarga com o índice de adiposidade visceral entre os grupos SOP e controle



IAV: índice de adiposidade visceral; TOTG: glicose sanguínea pós-sobrecarga.

Fonte: Elaboração própria.

Discussão

O menor índice de gordura apendicular à DXA em mulheres SOP com excesso de peso é informação inédita na literatura, e sugere tendência a fenótipo de distribuição centrípeta de gordura. Já é sabido que ao ganhar peso, mulheres SOP o fazem acumulando massa gorda no tronco (BOUMOSLEH et al., 2017), enquanto nos controles o incremento de massa gorda tem distribuição mais homogênea, sem acúmulo específico na região abdominal ou visceral. A gordura apendicular tem sido considerada como fator protetor contra síndrome metabólica na população em geral (PARK et al., 2014), posto que o predomínio de massa gorda nos apêndices pressupõe menor quantidade de gordura visceral, resultando em menor risco cardiovascular. A menor massa de gordura apendicular na SOP pode ser um marcador de risco peculiar a esta condição, e que no nosso estudo se correlacionou inversamente com a TOTG.

Por outro lado, alguns parâmetros clínicos rotineiramente usados para a avaliação de risco cardiovascular em pacientes portadoras de SOP, como os valores da CC e RCQ, bem como parâmetros de composição corporal pela BIA, foram semelhantes entre mulheres SOP e controles, o que contraria resultados de outros autores (AL-JEFOUT; ALNAWAISEH; AL-QTAITAT, 2017; EZEH et al., 2014). O rigor no pareamento dos nossos grupos, com margem de 2 kg/m² de diferença no IMC, e observância de mesma categoria de IMC ao recrutamento, é uma explicação possível. Além disso, a amostra foi constituída por mulheres jovens, o que pode ter contribuído para esse achado, uma vez que as manifestações fenotípicas da SOP podem levar tempo maior para aparecer, pois são influenciadas por anos de exposição crônica a níveis de androgênio elevados (PEDROSO et al., 2012). Outra justificativa para a não diferença entre os grupos seria o tamanho amostral, uma vez que o estudo foi delineado para análises de metilação e pode ter sido insuficiente para se avaliar marcadores de risco cardiovascular. O fato da CC e RCQ não terem sido maiores nas mulheres SOP, enquanto a gordura apendicular foi menor, sugere que as manifestações fenotípicas são mais sutis em pacientes jovens, sendo a DXA mais sensível para esta avaliação. A *American Association of Clinical Endocrinologists* recomenda a aferição da RCQ como marcador de obesidade central e RI na SOP (GOODMAN et al., 2015), mas em nossos resultados, além de não haver diferença entre os grupos, a correlação da RCQ foi moderada com a RI e fraca com a IG. Em

contrapartida, foi observado que a RCE se correlacionou fortemente à RI e moderadamente à IG, sendo este talvez um marcador mais fidedigno de risco metabólico. A RCE tem sido sugerida na literatura como alternativa, por ser obtida tão facilmente quanto a RCQ, e por apresentar boa correlação com síndrome metabólica tanto em mulheres SOP (BEHBOUDI-GANDEVANI et al., 2016) como controles (SAVVA; LAMNISOS; KAFATOS, 2013; SWAINSON et al., 2017). Neste estudo, o IMC também se apresentou como marcador de boa qualidade tanto para RI (correlação forte) como para IG (correlação moderada). Os resultados observados favorecem a utilização da RCE e do IMC como as medidas antropométricas de eleição quanto à capacidade de correlação com IG. A CC também pode ser adotada para avaliar correlação com a RI (forte correlação), mas seu uso é limitado para a avaliação de IG (fraca correlação).

Foram observados 15 casos de RI nas mulheres SOP e 8 casos nos controles, e embora clinicamente essa diferença possa ser valorizada, não atingiu significância estatística. O perfil lipídico também foi semelhante entre os grupos. A TOTG, por outro lado, foi maior nas mulheres SOP. Sabe-se que o distúrbio do metabolismo glicídico se inicia na resistência insulínica, entretanto, o fato de ter sido avaliado apenas a insulina de jejum, representada pelo índice de HOMA-IR, poderia justificar a não identificação da hiperinsulinemia que ocorre nestas pacientes. Provavelmente, quando há resistência insulínica, a presença de SOP acelera a evolução do distúrbio metabólico, o que facilita a progressão para a IG em mulheres de mesmo IMC. O HOMA-IR elevou-se com o aumento do IMC tanto nas mulheres SOP como nas controles, fato que está de acordo com resultados de outros pesquisadores (MARTINEZ et al., 2017).

Nas mulheres SOP, a maioria das variáveis aferidas pela DXA demonstrou correlações fortes e moderadas para RI e IG, respectivamente. O método da BIA apresentou desempenho inferior, uma vez que todas as variáveis aferidas apresentaram correlações moderadas com RI e fracas com IG. A DXA é considerada método de referência para aferir a porcentagem de gordura corporal devido à elevada acurácia, e diferentes autores vem demonstrando que a BIA pode subestimar a quantidade de gordura corporal, particularmente em pacientes mais obesos (CHEN et al., 2016). Neste estudo verificamos que na comparação das medidas de massa gorda pela DXA *versus* BIA houve uma diferença de cerca de 10% a mais na gordura corporal pela DXA tanto em pacientes SOP como controles. Entretanto, nenhum dos métodos

de avaliação da composição corporal (BIA ou DXA) forneceu informações adicionais às medidas antropométricas para a identificação de risco metabólico, não havendo, portanto, indicação rotineira de seu uso. Exceção foi encontrada nos casos de pacientes sem excesso de peso, aonde a gordura androide teve correlação moderada com TOTG nas pacientes com SOP e correlação forte com HOMA-IR nas pacientes controles. Nestas situações talvez haja benefício em se adicionar a DXA na propedêutica complementar das pacientes.

Uma alternativa aos métodos de avaliação da composição corporal é o emprego de fórmulas que combinem variáveis aferidas na prática clínica, e que apresentem correlação com transtornos do metabolismo glicídico. O IAV foi originalmente descrito como indicador da gordura visceral com capacidade de se correlacionar com risco cardiometabólico na população em geral (AMATO et al., 2010). Neste estudo, nas mulheres SOP houve correlação forte entre o IAV e a RI, e moderada entre o IAV e IG. Este índice já foi estudado em mulheres SOP, e mostrou-se uma alternativa de baixo custo, com excelente correlação com os achados da tomografia, que é considerada padrão ouro para avaliação de gordura visceral, sendo capaz de prever a RI (OH; SUNG; LEE, 2013).

Conclusões

A avaliação de adiposidade das mulheres SOP no cenário clínico pode ser feita mediante o cálculo do IAV e medidas antropométricas, entre as quais destacam-se o IMC e RCE devido à sua correlação com risco metabólico. Há pouco benefício no emprego de rotina de métodos de avaliação de composição corporal. Exceção pode se aplicar a mulheres SOP eutróficas, pois na presença de maior quantidade de gordura androide pela DXA o risco encontra-se aumentado. A BIA não parece acrescentar informações relevantes na avaliação de adiposidade de mulheres SOP.

Referências

AL-JEFOUT, M.; ALNAWASEH, N.; AL-QTAITAT, A. Insulin resistance and obesity among infertile women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 5339, July 2017.

AMATO, M. C. et al. Visceral Adiposity Index. **Diabetes Care**, New York, v. 33, n. 4, p. 920-922, Apr. 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes: 2018. **Diabetes Care**, New York, v. 41, Suppl. 1, p. S13-S27, Jan. 2018.

ANDREOLI, A. et al. Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). **La Radiologia Medica**, Milan, v. 114, n. 2, p. 286-300, Mar. 2009.

BEHBOUDI-GANDEVANI, S. et al. Could “a body shape index” and “waist to height ratio” predict insulin resistance and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Limerick, v. 205, p. 110-114, Oct. 2016.

BOUMOSLEH, J. M. et al. Metabolic Concomitants of Obese and Nonobese Women with Features of Polycystic Ovarian Syndrome. **Journal of the Endocrine Society**, Washington, v. 1, n. 12, p. 1417-1427, Dec. 2017.

BRAY, G. A. Health hazards of obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 907-919, Dec. 1996.

CHEN, K. T. et al. Comparison of Standing Posture Bioelectrical Impedance Analysis with DXA for Body Composition in a Large, Healthy Chinese Population. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0160105, July 2016.

EZEH, U. et al. Association of fat to lean mass ratio with metabolic dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. **Human reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1508-1517, July 2014.

GALLAGHER, D. et al. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 3, p. 694-701, Sept. 2000.

GELONEZE, B. et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 281-287, Mar. 2009.

GOODMAN, N. F. et al. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and androgen excess and pcos society disease state clinical review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome: part 2. **Endocrine Practice**, Jacksonville, v. 21, n. 12, p. 1415-1426, Dec. 2015.

HANGARTNER, T. N. et al. The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: acquisition of dual-energy X-ray absorptiometry body composition and considerations regarding analysis and repeatability of measures. **Journal of Clinical Densitometry**, Totowa, v. 16, n. 4, p. 520-536, Oct./Dec. 2013.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. **Avaliação da composição corporal aplicada**. São Paulo: Manole, 2000.

JENSTERLE, M. et al. Assessment of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. **International Journal of Gynaecology And Obstetrics**, [New York], v. 102, n. 2, p. 137-140, Aug. 2008.

LIM, S. S. et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 618-637, Nov./Dec. 2012.

MARTINEZ, K. E. et al. Expanded Normal Weight Obesity and Insulin Resistance in US Adults of the National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Diabetes Research**, Nasr City, v. 2017, article ID 9502643, 2017.

MIRANDA, D. E. G. A. et al. **Manual de avaliação nutricional do adulto e do idoso**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012.

MORAN, L. J. et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 347-363, Aug. 2010.

OH, J.-Y.; SUNG, Y.-A.; LEE, H. J. The visceral adiposity index as a predictor of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, Silver Spring, v. 21, n. 8, p. 1690-1694, Aug. 2013.

PARK, S. Y. et al. Association between Appendicular Fat Mass and Metabolic Risk Factors. **Korean Journal of Family Medicine**, Seoul, v. 35, n. 4, p. 182-189, July 2014.

PEDROSO, D. C. et al. Frequência e fatores de risco para síndrome metabólica em mulheres adolescentes e adultas com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 8, p. 357-361, Aug. 2012.

RANDEVA, H. S. et al. Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 33, n. 5, p. 812-841, Oct. 2012.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 81, n. 1, p. 19-25, Jan. 2004.

RUTTER, M. K. et al. Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome, and Incident Cardiovascular Events in the Framingham Offspring Study. **Diabetes**, [New York], v. 54, n. 11, p. 3252-3257, Jan. 2005.

SAVVA, S. C.; LAMNISOS, D.; KAFATOS, A. G. Predicting cardiometabolic risk: waist-to-height ratio or BMI. A meta-analysis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [Auckland], v. 6, p. 403-419, 2013.

SIRMANS, S. M.; PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, [Auckland], v. 6, p. 1-13, Dec. 2013.

SVENDSEN, P. F. et al. Obesity, body composition and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 2113-2121, Sept. 2008.

SWAINSON, M. G. et al. Prediction of whole-body fat percentage and visceral adipose tissue mass from five anthropometric variables. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0177175, May 2017.

TEEDE, H. J. et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1602-1618, Sept. 2018.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report**. Washington, DC: US DHHS, 1998. (98-4083).

VAN DIJK, S. J. et al. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, London, v. 39, n. 1, p. 1-13, Feb. 2014.

VITOLO, M. R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Rúbio, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: WHO, 1998. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, June 3-5, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: World Health Organization, 2000. Report of a WHO Consultation on Obesity.

ANEXO B - ARTIGO 2

Padrão de Metilação dos Genes *POMC* e *FTO* em pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos: um estudo caso-controle

Camila Toffoli Ribeiro^{a*}, Lisandra Cristina Caetano da Silva^b, Cristiana Libardi Miranda Furtado^b, Paula Lumy Takeuchi^c, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva^b

^a Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

^b Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^c Setor de Nutrologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*** Endereço para correspondência:** Camila Toffoli Ribeiro, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, 38405-320 Uberlândia, MG, Brasil. Fax: +55-34-3225-8602. E-mail: camtoffoli@yahoo.com.br

Conflito de Interesses e Financiamento

Nenhuma das autoras apresentou nenhum conflito pessoal ou financeiro no desenvolvimento do presente trabalho.

Declaração de Autoria

Camila Toffoli Ribeiro, Lisandra Cristina Caetano da Silva e Cristiana Libardi Miranda Furtado participaram no desenho do estudo, análises estatísticas, interpretação de dados e redação do manuscrito. Paula Lumy Takeuchi participou na realização de experimentos laboratoriais e interpretação de dados. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva participou no desenho do estudo, interpretação e revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual. Todas as autoras aprovaram a versão final para submissão.

Resumo

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) associa-se a risco aumentado de resistência insulínica (RI), intolerância à glicose (IG) e obesidade. Dentre as causas aventadas para a maior prevalência de obesidade na SOP, estão modificações genéticas e epigenéticas. No presente estudo, o objetivo primário foi avaliar o padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO*, envolvidos no controle de apetite e peso corporal, em portadoras de SOP comparadas a controles. Caso-controle, com 38 mulheres SOP e 35 controles, pareadas por idade e índice de massa corporal (IMC). Para a análise da metilação gênica, o DNA extraído de leucócitos de sangue periférico foi modificado por bissulfito, amplificado por PCR em tempo real, e submetido à técnica de *High Resolution Melting*. Clinicamente, as pacientes foram avaliadas com densitometria de corpo inteiro, índice HOMA-IR, glicemia após sobrecarga oral com 75g de glicose (TOTG) e lipidograma. Os resultados da metilação foram agrupados em padrões: hipometilado (0 - 20%); parcialmente metilado (50%) ou hipermetilado ($\geq 80\%$). Foi observada semelhança no padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* entre mulheres SOP e controles. Na sequência, os grupos foram subdivididos por categorias de IMC em: SOP e controle eutróficos, (IMC até 24,9 Kg/m²); SOP e controle com excesso de peso (IMC $\geq 25,0$ Kg/m²). Não houve diferença no padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* entre os subgrupos constituídos pelo IMC. As variáveis clínicas e de composição corporal foram semelhantes entre os grupos, exceto para a TOTG, mais elevada nas mulheres SOP. Foi concluído que embora o padrão de metilação das regiões estudadas dos genes *POMC* e *FTO* tenha sido semelhante em mulheres SOP e controles, não está descartada a possibilidade de haver diferenças em outras regiões dos mesmos genes, ou das mesmas regiões gênicas em outros tecidos.

Palavras-chave: Síndrome dos ovários policísticos, obesidade, composição corporal, metilação, gene *POMC*, gene *FTO*

Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) caracteriza-se pela produção aumentada e crônica de androgênios, cuja causa não está bem esclarecida, apesar da evidente predominância em determinadas famílias sugerir padrão de hereditariedade (ZHAO et al., 2012). A busca por genes especificamente implicados como causa de SOP tem resultado em achados contraditórios, porém alguns possíveis candidatos podem ser apontados (EWENS et al., 2010; PAU; SAXENA; WELT, 2013).

A prevalência da SOP é estimada em 4 a 8% das mulheres em idade reprodutiva, pelos critérios do “*National Institutes of Health*”, mas pode chegar a 18% pelos critérios da European Society Human Reproduction (*ESHRE*)/ American Society of Reproductive Medicine (*ASRM*) (SIRMANS; PATE, 2013), o que a torna a mais prevalente endocrinopatia da mulher no menacme.

Nas mulheres SOP é observada prevalência mais elevada de sobrepeso (RR: 1,95), obesidade (RR: 2,77) e obesidade central (RR:1,73), quando comparadas a controles (LIM et al., 2012). Em vigência de obesidade, as manifestações clínicas são exacerbadas na SOP, com risco aumentado para síndrome metabólica, intolerância à glicose (IG) e *Diabetes Mellitus* (DM) (RANDEVA et al., 2012).

Estudos epidemiológicos demonstram que o risco individual de se tornar obeso é variável e os determinantes genéticos são cruciais nesse aspecto (ANDREASEN et al., 2008; OGDEN et al., 2006). Embora aceite-se o conceito clássico da genética de que a tendência familiar determinante do fenótipo está presente no genoma do indivíduo, estímulos ambientais, que tanto podem alterar as taxas de transcrição do genótipo, quanto podem promover alterações epigenéticas, podem influenciar a aquisição do traço fenotípico da obesidade. A modificação do DNA por meio da metilação é um desses mecanismos epigenéticos, e ocorre especialmente nas regiões em que há muitas sequências de citosinas adjacentes a guaninas (ilhas CpG). A metilação do DNA em regiões promotoras tem sido relacionada ao silenciamento gênico transcricional (FRANKS; LING, 2010).

O mecanismo de apetite e saciedade, bem como o controle do metabolismo são vias potencialmente envolvidas na aquisição do fenótipo obeso, e poderiam desempenhar algum papel na maior prevalência da obesidade observada na SOP. Em acordo com essas considerações, destacamos o papel do gene *POMC* (pro-opiomelanocortina). Este gene encontra-se localizado no cromossomo 2p23.3, e cobaias submetidas a hiperalimentação no período neonatal precoce exibiram alterações no padrão de metilação genica, concomitantes a quadro clínico de obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia (PLAGEMANN et al., 2009). Alterações na metilação do *POMC* foram descritas no cenário clínico em crianças obesas, com padrão de herança monogênica (KUEHNEN; KRUDE, 2012).

O gene *FTO* (*fat and obesity associated gene*), localizado no cromossomo 16q12.2 (JIA et al., 2011), também tem assumido destaque na busca pela compreensão da contribuição de fatores genéticos na obesidade. O gene *FTO* parece atuar na síntese de uma enzima de reparação do ácido nucleico, cuja perda de função resultaria em quebra nos processos de reparo genômico, levando à obesidade e síndrome metabólica (GERKEN et al., 2007).

No presente estudo formulamos a hipótese de que a metilação dos genes *POMC* e *FTO* poderia ser um mecanismo implicado no maior risco para a obesidade associada à SOP.

O objetivo primário foi avaliar o padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* em mulheres portadoras de SOP comparadas a controles ovuladoras, e o objetivo secundário foi verificar se há diferença no padrão de metilação dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com o IMC ou com a composição corporal em mulheres portadoras de SOP.

Métodos

Estudo observacional, analítico, caso-controle, desenvolvido no ambulatório de ginecologia endócrina do Hospital de Clínicas de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia e na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, no período de 2015 a 2017. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as mulheres analisadas concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram analisadas 73 mulheres, sendo 38 portadoras de SOP e 35 controles ovuladoras, com idade entre 18 e 35 anos, pareadas pelo IMC. Durante a realização do pareamento, foram adotados como critérios uma diferença máxima de $\pm 2,0 \text{ kg/m}^2$ no valor do IMC, assim como a confirmação de que o controle estava na mesma categoria de IMC do caso SOP (WHO, 2000). O diagnóstico de SOP foi realizado conforme os critérios do consenso de Rotterdam (ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004). As mulheres incluídas no grupo controle foram localizadas nos ambulatórios de planejamento familiar ou de ginecologia geral do HCU-UFU. O grupo controle foi constituído por mulheres com ciclos menstruais regulares, espontâneos, sem histórico de infertilidade. Foram excluídas do estudo mulheres em uso de medicação hormonal nos 3 meses anteriores ao recrutamento, hipoglicemiantes orais ou medicamentos indutores de perda de peso; gestantes ou mulheres em período de amamentação.

O metabolismo glicídico foi avaliado pelo *Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance* (HOMA-IR), calculado pela fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mg\%)} \times \text{insulina } (\mu\text{UI/ml})/405$ (JENSTERLE et al., 2008). A dosagem de insulina basal foi realizada pelo método de quimioluminescência (Roche Diagnóstica®, Brasil). O teste de tolerância oral à glicose (TOTG), realizado com 75 gramas de glicose, foi utilizado como marcador de IG. As dosagens

de glicose sanguínea foram realizadas pelo método da hexoquinase (Roche Diagnóstica®, Brasil). O perfil lipídico em jejum foi avaliado pela dosagem do colesterol total, HDL colesterol (*High Density Lipoprotein*), e LDL colesterol (*Low Density Lipoprotein*), e pela dosagem de triglicerídeos (método enzimático colorimétrico, Roche Diagnóstica®, Brasil). Foram calculados os valores do IMC [IMC = peso (kg)/estatura (m)²], os quais foram classificados de acordo com as referências da *World Health Organization* (WHO, 2000). A avaliação da composição corporal foi realizada pelo método da densitometria de corpo inteiro (DXA), em medida única, com a utilização do equipamento *Lunar Prodigy DXA System* versão de *software* 11,20, o qual encontra-se padronizado conforme os parâmetros propostos na literatura (HANGARTNER et al., 2013). Foram realizadas medidas referentes a quantidade de massa gorda (MG) e de massa magra (MM) em gramas e em percentual, e o índice MG/MM.

Para a extração de DNA, 5 ml de sangue periférico foi coletado em tubos contendo EDTA, e armazenado a 4°C. O plasma foi desprezado e as hemácias e leucócitos foram obtidos, adicionados a tampão de lise de glóbulos vermelhos, resultando em pellet contendo o DNA genômico dos leucócitos, o qual foi extraído com o kit QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen® cat#51106). A seguir, realizou-se quantificação do DNA obtido utilizando-se o Nanodrop (Spectrophotometer Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)), analisando-se as concentrações para uso nos experimentos, bem como as razões de absorvâncias 260/280 (igual ou próximo a 1,8) e 260/230 (valores de 2,0-2,2). Em seguida, realizou-se a modificação por bissulfito, utilizando o kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O resultado do método de modificação do DNA por bissulfito de sódio é a conversão das citosinas não metiladas em uracilas na presença de bissulfito, enquanto as citosinas metiladas, não sofrem transformação. Na sequência, foram desenhados oligos na ilha CpG da região promotora dos genes POMC e FTO, para amplificação do DNA modificado por bissulfito. A região promotora foi identificada utilizando o UCSC genome browser⁹ e as ilhas CpG utilizando o programa Methprimer (LI; DAHIYA, 2002).

A identificação do padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* foi realizada através da técnica de *High Resolution Melting* (HRM) utilizando o equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). O DNA modificado passou

⁹ Cf. <https://genome.ucsc.edu>.

por amplificação através de PCR Real Time. Nesta amplificação, as uracilas presentes na molécula de DNA modificado foram copiadas nos novos fragmentos como timina. Em seguida, este produto de PCR recém-sintetizado passou por um aumento sucessivo e gradual de temperatura até 95°C para se observar o ponto de dissociação da dupla fita dos fragmentos. A temperatura em que ocorre essa dissociação é chamada de ponto de *melting*, e permite estimar o grau de metilação do DNA. No ponto de *melting*, quanto maior o número de timinas, mais fácil se dará sua dissociação (HERMAN et al., 1996; TAYLOR et al., 2010). O *software* separa todas as amostras de acordo com a análise da curva de *melting*, criando as chamadas variantes. Comparando-se os padrões de metilação conhecidos com as amostras estudadas, o *software* infere a qual variante a amostra pertence. Para a análise das regiões potencialmente metiladas, foram desenhados *primers* dos genes de interesse a partir das sequências depositadas no Genebank¹⁰ e os sítios CpG foram determinados pelo programa MethyPrimer (LI; DAHIYA, 2002) e pela ferramenta Epigenomics do NCBI¹¹ (Tabela 1).

Tabela 1 - *Primers* dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com o NCBI genebank, com o tamanho do amplicon em pares de bases

Gene	Sequência de referência do NCBI	<i>Primers</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>FTO</i>	NG_012969.1	Forward: 5' TTGTAGTGGGGAGGGTTAGTAATT 3' Reverse: 5' CAAAAAAAACTACATTTCCCAAAA3'	192
<i>POMC</i>	NG_008997.1	Forward: 5'GATGTATTTTTGGGGGAAGA 3' Reverse: 5'CAATAACAAAATCTTAAATACCCAC 3'	222

Fonte: Elaboração própria.

A curva de eficiência dos *primers* sintetizados foi realizada utilizando-se DNA modificado por bissulfito de uma amostra controle, em que foi realizada uma diluição seriada do DNA e procedeu-se amplificação por PCR em tempo real, utilizando-se 5µl de *Power Sybr Green Master mix* (ThermoFisher Scientific) reagente, 2,5 pmols cada primer (*forward* e *reverse*), 3µl de água ultra pura e 2µl de DNA modificado e diluído. A amplificação foi realizada em aparelho 7500 FAST (Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) e, ao final, o produto de amplificação foi observado em gel de agarose 1,5%, corado com

¹⁰ Cf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>.

¹¹ Cf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Gel Red, obtendo-se o amplicon do tamanho esperado. As amostras de referência para a metilação foram aplicadas em todas as placas analisadas, sendo utilizado o padrão comercial *EpiTech Control Kit* (Qiagen), que fornece DNA modificado por bissulfito 100% metilado e 0% metilado, a partir dos quais, foram realizadas diluições para obter as porcentagens de 20, 50 e 80, tendo-se ao final a análise da metilação em 0, 20, 50, 80 e 100% de metilação em DNA modificado por bissulfito.

Os resultados obtidos para as mulheres SOP foram comparados aos resultados obtidos para as mulheres controles. A seguir, foram constituídos os seguintes subgrupos de acordo com categorias de IMC: SOP eutrófico (SOP-Eu, n = 19) e controle eutrófico (C-Eu, n = 19), com IMC até 24,9 Kg/m²; SOP com excesso de peso (SOP-Exp, n = 19) e controle com excesso de peso (C- Exp, n = 16), em que o IMC foi $\geq 25,0$ Kg/m².

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism® versão 6.00 para Windows; *GraphPad Software*¹², La Jolla California USA e pela plataforma R, *R Development Core Team*¹³ (2009), Vienna, Austria.

O número de pacientes necessário para avaliação da metilação do DNA é bastante variável entre os estudos. Considerando-se relevância estatística uma diferença de 0,8 desvio padrão, com poder do teste de 80% e nível de significância (alfa) de 0,05, o cálculo foi de 30 pacientes no grupo de estudo, pareadas por IMC e idade ao grupo controle, numa proporção de 1:1. O objetivo foi detectar 30% de diferença no padrão de metilação da região estudada para os referidos genes

Inicialmente as variáveis foram analisadas com o método D'Agostino e Pearson quanto ao padrão de distribuição, sendo categorizadas em variáveis paramétricas (distribuição normal) e não-paramétricas (sem distribuição normal). As variáveis contínuas paramétricas foram comparadas utilizando o teste *t* de *Student* pareado, enquanto as não paramétricas foram comparadas utilizando o teste de *Wilcoxon* pareado. A comparação entre as frequências de variáveis discretas foi feita utilizando o teste de *Fisher*. As análises foram consideradas significantes quando foi identificado $p < 0,05$, adotando-se testes bicaudais.

¹² Cf. www.graphpad.com.

¹³ Cf. www.R-project.org.

Resultados

Mulheres incluídas nos grupos SOP e controle apresentaram idade média similar, de 25 anos para o grupo SOP e 26 anos para o grupo controle ($p = 0,5024$). Desde que o pareamento dos grupos foi feito pelo IMC, valores médios similares foram identificados para mulheres SOP e controles. Não foram identificadas diferenças nas medidas realizadas para avaliação da composição corporal pelo método da DXA.

Valores médios similares foram demonstrados para variáveis metabólicas para as mulheres incluídas nos grupos SOP e controle em relação à glicose sanguínea de jejum, índice HOMA-IR, lipídeos séricos (colesterol, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides). Valores médios mais elevados foram demonstrados para glicose sanguínea 2 horas pós-sobrecarga (TOTG) em mulheres SOP quando comparadas aos controles ($p = 0,0090$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Análises comparativas entre os grupos SOP e controle em relação às características clínicas

	SOP (n=38)	Controle (n=35)	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	24,43 (20,90 - 33,84)	24,20 (21,75 - 31,00)	0,7280
MG (%)	39,20 (33,30 - 48,70)	43,40 (33,30 - 49,00)	0,4413
MG/MM	0,6400 (0,5000 – 0,9500)	0,7100 (0,5000 – 0,9100)	0,7273
HOMA-IR	1,910 (1,330 – 4,120)	1,975 (1,153 – 2,695)	0,0576
Glicose sanguínea de jejum (mg/dl)	87,00 (80,75 – 94,00)	86,00 (79,75 – 90,00)	0,2213
TOTG (mg/dl)	105,00 (90,50 – 118,00)	92,50 (83,50 – 103,30)	0,0090*
Colesterol total (mg/dl)	170,50 (150,3 – 200,30)	168,00 (148,5 – 194,5)	0,9473
HDL colesterol (mg/dl)	47,50 (39,00 – 59,50)	49,50 (41,75 – 59,25)	0,5387
LDL colesterol (mg/dl)	103,00 (86,30 – 121,50)	98,00 (87,70 – 126,5)	> 0,9999
Triglicérides (mg/dl)	85,85 (53,75 – 143,80)	78,00 (59,00 – 102,00)	0,3426

IMC: índice de massa corporal = peso (Kg)/estatura (m)²; MG: massa gorda; MM: massa magra; MG/MM: massa gorda/massa magra; TOTG: glicose sanguínea pós sobrecarga; * $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em mediana (p25 – p75).

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados obtidos no ensaio HRM foram agrupados de acordo com a intensidade de metilação nas regiões de interesse de acordo com os seguintes padrões: hipometilado (0 -

30%); parcialmente metilado (50%) ou hipermetilado ($\geq 80\%$), para ambos os genes estudados.

A comparação do padrão de metilação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste de *Fisher*, que apontou semelhança quanto ao padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO*, conforme pode ser visto nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Teste exato de *Fisher* para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação do gene *POMC* entre mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>POMC</i>)	SOP	Controle	Total
0 - 20%	0 0%	0 0%	0
50%	1 2,63%	2 5,71%	3
$\geq 80\%$	37 97,37%	33 94,29%	70
Total	38	35	73
Valor p	0.6044		

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Teste exato de *Fisher* para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação do gene *FTO* entre mulheres SOP e controles

% aproximada de Metilação (<i>FTO</i>)	SOP	Controle	Total
0 - 20%	36 94,74	34 97,14	70
50%	2 5,26%	1 2,86%	3
$\geq 80\%$	0 0%	0 0%	0
Total	38	35	
Valor p	1,0		

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, os resultados foram agrupados de acordo com a faixa de IMC, conforme as Tabelas 5 e 6. Não houve diferença entre os grupos de IMC e o padrão de metilação do

gene *POMC*. A mesma análise foi feita para o gene *FTO* e, também, não foi observada diferença entre os grupos de IMC e o padrão de metilação.

Tabela 5 - Teste exato de *Fisher* para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação do gene *POMC* entre mulheres SOP e controles ovuladoras, de acordo com subgrupos de IMC

% aproximada de Metilação (<i>POMC</i>)	SOP n = 38		Controle n = 35		Total
	SOP-EU n = 19	SOP-Exp n = 19	C-Eu n = 19	C-Exp n = 16	
0 - 20%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0
50%	1 5,26%	0 0%	2 10,53%	0 0%	3
≥ 80%	18 94,74%	19 100%	17 89,47%	16 100%	70
Total	19	19	19	16	73
Valor p	0.6111				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Teste exato de *Fisher* para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação do gene *FTO* entre mulheres SOP e controles ovuladoras, de acordo com subgrupos de IMC

% aproximada de Metilação (<i>FTO</i>)	SOP n = 38		Controle n = 35		Total
	SOP-Eu n = 19	SOP-Exp n = 19	C-Eu n = 19	C-Exp n = 16	
0 - 20%	19 100%	17 89,47%	18 94,74%	16 100%	70
50%	0 0%	2 10,53%	1 5,26%	0 0%	3
≥ 80%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0
Total	19	19	19	16	73
Valor p	0.6111				

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida agrupamos as pacientes conforme a faixa de IMC em grupos eutrófico e com excesso de peso, independentemente de a amostra ser proveniente do grupo de mulheres SOP ou controles, comparando o grau de metilação dos genes *POMC* e *FTO* entre os

grupos. Não houve diferença entre o grupo eutrófico e o grupo com excesso de peso, para os genes *POMC* e *FTO* ($p = 0.2409$ e $p = 0.6044$).

O fato de haver disparidade numérica entre os grupos conforme o padrão de metilação, impossibilitou a análise estatística para consecução de um dos objetivos secundários proposto no início do estudo, que seria de verificar se havia diferença no padrão de metilação dos genes *FTO* e *POMC* de acordo com a composição corporal em mulheres portadoras de SOP comparadas a controles.

Discussão

A observação de agregação familiar da SOP e seus traços fenotípicos sugere herança genética para esta endocrinopatia. Contudo, embora inúmeros estudos sobre genômica tenham sido realizados, poucas variantes genéticas e mutações foram replicadas em diferentes populações com SOP (ESCOBAR-MORREALE, 2018). A epigenética pode contribuir nesse sentido, pois compreende o estudo de mecanismos moleculares que regulam a atividade gênica, mas que não são causadas por variações na sequência do gene. A metilação pode impactar na interação entre gene e meio ambiente na aquisição de um traço fenotípico, como a própria SOP, ou uma característica associada a ela, que é o caso da obesidade.

No presente estudo não foi observado padrão de metilação distinto do gene *FTO* entre pacientes SOP e controles, o que contraria resultados prévios da literatura (ZHOU et al.; 2017). Contudo, além de não ter sido realizado especificamente com mulheres SOP, a idade média no referido estudo foi próxima a 50 anos. Estudos que incluíram outros genes relacionados a metabolismo, concluíram que a metilação pode aumentar com a idade, e esse é um dos fatores implicados na redução da taxa metabólica basal que ocorre com o envelhecimento (RÖNN et al., 2008). A influência do envelhecimento na quantidade de metilação foi corroborada por estudos de coorte com gêmeos monozigóticos (BOKS et al., 2009). As pacientes do presente estudo tinham idade média de 25 anos, o que talvez justifique os achados.

Outra justificativa para a semelhança no padrão de metilação do *FTO* entre os grupos, pode ter sido o tamanho amostral. Na etapa de delineamento do estudo, foi feita análise estatística para estimativa de tamanho amostral necessário, contudo devido a não haver

estudos prévios específicos sobre a metilação desse gene na SOP, o cálculo pode ter sido subestimado.

Considerando que a literatura é já consistente na associação entre o gene *FTO* e a presença de obesidade, se esperaria que o padrão de metilação entre pacientes eutróficas e com excesso de peso fosse diferente. Porém, mesmo ao se estratificar as pacientes por peso, não houve diferença, independente do diagnóstico de SOP, sugerindo que esta amostra não se comportou conforme a literatura atual sobre o tema.

Outro gene cuja metilação foi avaliada neste estudo foi o *POMC*. A possível associação desse gene com a SOP foi sugerida por alguns autores (EWENS et al., 2010), mas foi contestada por outros (PAU; SAXENA; WELT, 2013).

O gene *POMC* está relacionado à obesidade devido à participação no mecanismo de regulação do apetite. A metilação seria responsável por inativação (provavelmente parcial) do gene, resultando em incapacidade de inibir o orexígeno neuropeptídeo Y (PLAGEMANN et al., 2009). Em resumo, pacientes com hipermetilação do gene *POMC* teriam mais apetite, e tendência à obesidade. Surpreendentemente, neste estudo, o gene mostrou-se hipermetilado na maioria das pacientes analisadas em ambos os grupos, não havendo diferença no padrão de metilação do gene *POMC* entre mulheres SOP e controle. Mesmo ao comparar pacientes eutróficas e com excesso de peso, independente da presença de SOP, não houve diferença no padrão de metilação. A literatura relativa à metilação do gene *POMC* é escassa e na maior parte associa-se a obesidade precoce em crianças (KRUDE et al., 1998).

Deve ser dada relevância ao fato de que o DNA obtido para o presente estudo foi proveniente de leucócitos periféricos. Apesar de ser esta uma fonte de fácil obtenção de DNA e, portanto, utilizada em vários estudos sobre metilação, devemos estar atentos ao fato de que embora todas as células do corpo carreguem praticamente o mesmo genoma, o epigenoma pode ser variar entre tipos celulares distintos.

Buscando avaliar essa hipótese, Xu et al. (2016) demonstraram não haver diferença no padrão de metilação global entre pacientes SOP e controles no sangue periférico, enquanto a metilação global foi significativamente mais elevada nas células da granulosa das portadoras de SOP (XU et al., 2016). O tecido adiposo também pode apresentar padrões de metilação diferentes na SOP. Kokosar et al avaliaram a diferença entre a expressão gênica e metilação de DNA no tecido adiposo de 64 mulheres SOP, comparando-as a 30 controles, e verificaram

que 30 genes foram diferentemente expressos na SOP, o que correspondeu a 33 sítios de metilação diferentes (KOKOSAR et al., 2016).

No presente estudo, não foi avaliada a metilação global, mas o padrão de metilação de dois genes específicos, potencialmente relacionados ao fenótipo obeso, utilizando DNA de leucócitos de sangue periférico. Para o estudo da metilação do gene *FTO*, a obtenção de amostras de tipos celulares distintos, como adipócitos, é uma possibilidade a ser explorada no futuro. Para o gene *POMC*, por outro lado, seria interessante avaliá-lo em neurônios hipotalâmicos para podermos inferir, com mais propriedade, quanto à interferência nos mecanismos de controle do apetite/saciedade. Estudo feito durante necropsia de crianças obesas demonstrou que o gene *POMC* é expresso em células sanguíneas periféricas, onde apresenta padrão de metilação idêntico ao verificado em neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado, diretamente envolvidos no controle do peso corporal (BIEBERMANN et al., 2006; KUEHNEN et al., 2012). Estudos clínicos *in vivo* desta natureza em humanos são impraticáveis, pela inacessibilidade do sistema nervoso central, mas seriam a maneira mais fidedigna de obter esta informação.

Outra questão que permanecerá sem resposta em estudos com o desenho de caso controle, é quanto à existência de causalidade entre o fator estudado (metilação) e o fenótipo (obesidade). No máximo, o que poderíamos inferir, é a ocorrência de associação entre as duas condições. Associação que inclusive pode ser decorrente dos mesmos fatores que levarão à obesidade. Por exemplo, sabemos que a atividade física e a dieta podem influenciar na porcentagem de metilação de um gene (BOUCHARD et al., 2010). Esses mesmos fatores podem provocar a obesidade, e não é possível estabelecer se foi a metilação que causou a obesidade, ou se tanto metilação quanto obesidade tem os mesmos fatores causais.

Dessa forma, para a falta de associação verificada no presente estudo podem ser aventadas como causas o tamanho amostral insuficiente, a fonte do DNA utilizado (leucócitos), ou falta de relação causal entre as duas condições. Cumpre salientar que a região promotora dos genes é maior do que o fragmento analisado, o que pode influenciar no perfil de metilação dependendo dos sítios CpG avaliados. Kuehnen et al. (2012) analisaram duas ilhas CpG do gene *POMC*, comparando o padrão de metilação gênica de crianças obesas a crianças não obesas. Os autores descreveram padrão de metilação similar para uma das ilhas, enquanto para outra, as crianças obesas apresentaram variante hipermetilada. Podemos

afirmar, portanto, que a similaridade no padrão de metilação dos genes *POMC* e *FTO* restringe-se aos fragmentos analisados, nos grupos SOP e controle.

Conclusões

Em relação ao padrão de metilação das regiões analisadas dos genes *POMC* e *FTO* não houve diferença em portadoras de SOP comparadas a controles. Não está descartada a possibilidade de diferenças no padrão de metilação de outras regiões gênicas, ou das mesmas regiões gênicas em diferentes tecidos.

Referências

ANDREASEN, C. H. et al. Low physical activity accentuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. **Diabetes**, [New York], v. 57, n. 1, p. 95-101, Jan. 2008.

BIEBERMANN, H. et al. A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human bodyweight regulation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 141-146, Feb. 2006.

BOKS, M. P. et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e6767, Aug. 2009.

BOUCHARD, L. et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 91, n. 2, p. 309-320, Feb. 2010.

ESCOBAR-MORREALE, H. F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, London, v. 14, n. 5, p. 270-284, Mar. 2018.

EWENS, K. G. et al. Family-Based Analysis of Candidate Genes for Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 95, n. 5, p. 2306-2315, May 2010.

FRANKS, P. W.; LING, C. Epigenetics and Obesity: the devil is in details. **BMC Medicine**, [London], v. 8, p. 88, 2010.

GERKEN, T. et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**, New York, v. 318, n. 5855, p. 1469-1472, Nov. 2007.

HANGARTNER, T. N. et al. The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: acquisition of dual-energy X-ray absorptiometry body composition and

considerations regarding analysis and repeatability of measures. **Journal of Clinical Densitometry**, Totowa, v. 16, n. 4, p. 520-536, Oct./Dec. 2013.

HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9821-9826, Sept. 1996.

JENSTERLE, M. et al. Assessment of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. **International Journal of Gynaecology And Obstetrics**, [New York], v. 102, n. 2, p. 137-140, Aug. 2008.

JIA, G. et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 7, n. 12, p. 885-887, Dec. 2011.

KOKOSAR, M. et al. Epigenetic and transcriptional alterations in human adipose tissue of polycystic ovary syndrome. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 22883, Mar. 2016.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genetics**, New York, v. 19, n. 2, p. 155-157, June 1998.

KUEHNEN, P.; KRUDE, H. Alu elements and human common diseases like obesity. **Mobile Genetic Elements**, Austin, v. 2, n. 4, p. 197-201, July 2012.

KUEHNEN, P. et al. An Alu Element-Associated Hypermethylation Variant of the POMC Gene Is Associated with Childhood Obesity. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e1002543, Mar. 2012.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 1427-1431, Nov. 2002.

LIM, S. S. et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 618-637, Nov./Dec. 2012.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**, Chicago, v. 295, n. 13, p. 1549-1555, Apr. 2006.

PAU, C.; SAXENA, R.; WELT, C. K. Evaluating reported candidate gene associations with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 99, n. 6, p. 1774-1778, May 2013.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Physiology**, London, v. 587, pt. 20, p. 4963-4976, Oct. 2009.

RANDEVA, H. S. et al. Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 33, n. 5, p. 812-841, Oct. 2012.

RÖNN, T. et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, n. 7, p. 1159-1168, May 2008.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, New York, v. 81, n. 1, p. 19-25, Jan. 2004.

SIRMANS, S. M.; PATE, K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, [Auckland], v. 6, p. 1-13, Dec. 2013.

TAYLOR, S. et al. **A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping**. Hercules: Bio-Rad Laboratories Inc., 2010. (Tech note 6004).

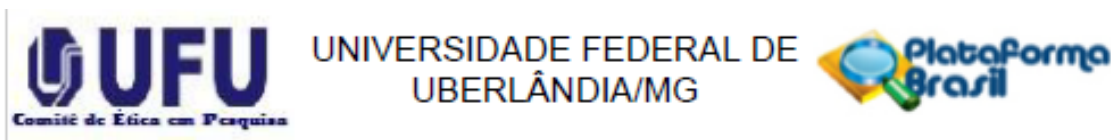
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization, 2000. Report of a WHO Consultation on Obesity.

XU, J. et al. Comprehensive analysis of genome-wide DNA methylation across human polycystic ovary syndrome ovary granulosa cell. **Oncotarget**, Albany, v. 7, n. 19, p. 27899-27909, May 2016.

ZHAO, H. et al. Family-based analysis of susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. **Human Reproduction (Oxford, England)**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 294-298, Jan. 2012.

ZHOU, Y. et al. rs9939609 FTO genotype associations with FTO methylation level influences body mass and telomere length in an Australian rural population. **International Journal of Obesity**, London, v. 41, n. 9, p. 1427-1433, Sept. 2017.

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epigenética na Síndrome do Ovário Policístico: análise da metilação dos genes FTO e POMC e implicações no risco para obesidade. Um estudo caso-controle.

Pesquisador: Camila Toffoli Ribeiro

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 42385515.3.0000.5152

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.067.181

Data da Relatoria: 08/05/2015

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é desordem endócrina de elevada prevalência na população, podendo comprometer até 18% das mulheres no menacme. Esta condição cursa com quadro de anovulação crônica, manifestações hiperandrogênicas e aumento de condições de risco cardiovascular, como o Diabetes Mellitus e sobrepeso/obesidade. A associação entre esta última e a SOP é ainda pouco compreendida, e um dos fatores aventados para explicá-la são diferenças genéticas entre os indivíduos portadores de SOP quando comparados à população geral. A observação clínica de maiores índices de obesidade na SOP vem sendo comprovada por um corpo crescente de evidências. Em trabalho de revisão sistemática e meta-análise encontraram prevalência significativamente elevada de sobrepeso (RR: 1,95), obesidade (RR: 2,77) e obesidade central (1,73) nas mulheres com SOP quando comparadas a controles (Lim et al. 2012). Há, inclusive, pesquisadores que sugerem que o ganho de peso precede o desenvolvimento de SOP, com especulações de que a obesidade seria fator causal e não conseqüência da moléstia (Laitinen et al. 2003). Contudo isso não foi comprovado em outros trabalhos (Yildiz, Knochenhauer, e Azziz 2008) e a questão permanece sob debate.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.067.181

Hipótese: Pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos apresentam hipermetilação dos genes FTO e POMC, achado capaz de explicar porque estas apresentam prevalência elevada de obesidade quando comparadas à população controle.

Metodologia Proposta: Estudo observacional, analítico, tipo caso-controle, com um grupo de pacientes SOP, que será comparado a controles ovuladoras, pareadas por peso com o grupo de estudo.

Critério de Inclusão: Grupo de estudo: 1.As pacientes deverão ser classificadas como SOP pelo consenso de Rotterdam, 2004 (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004); 2.Idade entre 18 e 45 anos; 3.Deverão estar de acordo com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Grupo Controle: 1.Idade entre 18 e 45 anos; 2.Deverão apresentar ciclos regulares espontâneos 3.Não poderão ter histórico de infertilidade; 4.Deverão estar de acordo com o TCLE.

Critério de Exclusão: 1. Uso de medicação hormonal nos últimos 3 meses anteriores à inclusão no estudo; 2. Uso de hipoglicemiantes orais ou medicamentos indutores de perda de peso; 3. Presença de endocrinopatias de qualquer natureza. 4. Gestantes ou em período de amamentação.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o projeto, o objetivo primário é: avaliar se pacientes portadoras de SOP apresentam diferença no padrão de metilação dos genes POMC e FTO quando comparadas ao grupo controle. E o objetivo secundário é: avaliar se há diferença no padrão de metilação do DNA dos genes POMC e FTO, entre as pacientes SOP, conforme a presença de: 1.Sobrepeso e obesidade (IMC 25 kg/m²). 2.Resistência à insulina 3.Intolerância à glicose. 4.Adiposidade abdominal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador, o estudo proposto configura pouca ameaça a integridade física da paciente, uma vez que não haverá procedimentos invasivos. Contudo, a possibilidade de haver formação de hematoma no local da punção venosa estará presente nas pacientes submetidas à coleta. A exposição à radiação para realização da densitometria de corpo inteiro será mínima, não sendo este um exame que eleva de forma significativa o risco de carcinogênese. Além disso, as pacientes estão sujeitas ao risco da quebra da confidencialidade dos dados obtidos no estudo, o que poderia submetê-las a constrangimentos de ordem moral, uma vez que a obesidade é ainda estigmatizada em nossa sociedade. A equipe executora da pesquisa compromete-se a não divulgar os nomes das pacientes e controles arroladas, manuseando os resultados exclusivamente

Continuação do Parecer: 1.067.181

sob a forma dos números dos prontuários.

Em relação aos benefícios, o pesquisador relata que: caso se encontre associação entre a metilação dos genes POMC e FTO e o fenótipo obeso das pacientes com SOP, poder-se-á delinear estratégias mais precoces e efetivas de prevenção e manejo da obesidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de forma adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer número 1.042.705, de 29 de Abril de 2015, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2016.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2017.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Setembro de 2018.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica		
Bairro: Santa Mônica		CEP: 38.408-144
UF: MG	Município: UBERLÂNDIA	
Telefone: (34)3239-4131	Fax: (34)3239-4335	E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.067.181

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica			
Bairro: Santa Mônica		CEP: 38.408-144	
UF: MG	Município: UBERLÂNDIA		
Telefone: (34)3239-4131	Fax: (34)3239-4335	E-mail: cep@propp.ufu.br	

ANEXO D – PORCENTAGENS DE METILAÇÃO OBSERVADAS NOS GENES *POMC* E *FTO* NO GRUPO DE MULHERES SOP

Amostra	% Aproximada de Metilação	% Aproximada de Metilação no gene
1	80%	0-20%
2	80%	0-20%
3	80%	0-20%
4	80%	0
6	80%	0-20%
7	80%	20%
8	80%	20%
11	100%	20%
12	80%	20%
13	80%	20%
14	80%	20%
15	80%	0-20%
16	80%	20-50%
17	80%	20%
18	80%	20%
19	80%	0
20	100%	50%
21	80%	0-20%
22	50%	20%
23	80%	0-20%
24	80%	0-20%
25	80%	0-20%
26	80%	0-20%
27	80%	0-20%
28	80%	0
31	80%	0-20%
33	80%	0-20%
34	80%	0-20%
37	80%	0
38	80%	0
40	80%	20%
46	80%	20%
48	80%	20%
60	80%	20%
65	80%	20%
67		EXCLUÍDA
71	80%	20%
72	80%	20%
74	80%	20%

ANEXO E - PORCENTAGENS DE METILAÇÃO OBSERVADAS NOS GENES POMC E FTO NO GRUPO DE CONTROLES OVULADORAS

Amostra	% Aproximada de Metilação no gene <i>POMC</i>	% Aproximada de Metilação no gene <i>FTO</i>
5	80%	20%
9	80%	20%
10	80%	20%
29	80%	0
30	80%	0-20%
32	80%	20%
35	80%	0-20%
36	80%	0-20%
39	80%	0-20%
41	80%	0-20%
42	80%	0-20%
43	80%	0
44	50%	0
45	80%	20%
47	80%	20%
49	80%	20%
50	80%	20%
51	80%	20%
52	80%	20%
53	80%	20%
54	80%	20%
55	80%	20%
56	80%	20%
57	80%	20%
58	80%	20%
59	80%	20%
61	80%	50%
62	80%	20%
63	80%	20%
64	50%	20%
66	80%	20%
68	80%	20%
69	80%	20%
70	80%	0
73	80%	20%