DANIELLA DE GRANDE CURI

**Polimorfismos do gene *BMP4* em pacientes
com a síndrome dos ovários policísticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Curi, Daniella De Grande

Polimorfismos do gene BMP4 em pacientes com a síndrome dos ovários policísticos / Daniella De Grande Curi. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Proteína morfogenética óssea 4 3.Polimorfismo de nucleotídeo único 4.Hirsutismo 5.Cabelo

USP/FM/DBD-328/14

Dedicatória

Ao meu marido Daniel Teruo Famano, que sempre me apoia, acredita nos meus ideais e me ajuda de todas as formas a conquistar meus desafios. Minha fonte de inspiração para ser uma pessoa cada vez melhor. Você é muito importante para mim.

Aos meus pais Maria Odice De Grande Curi e Jamil Curi (*in memoriam*), responsáveis pela pessoa que sou hoje. Obrigada pelo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel que acreditou no meu projeto e que muito me ensinou durante esta jornada. Sua competência e sabedoria são inspirações na minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat pelo apoio para que este projeto fosse concretizado.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Junior, por todo apoio na execução deste trabalho .

A Profa. Dra. Angela Maggio da Fonseca, Dra Sylvia Asaka Yamashita Hayashida, Prof. Dr. José Antônio Marcondes, Dr. José Alcione Macedo Almeida, Prof. Dr. Vicente Renato Bagnoli, que me receberam em seus ambulatórios e que muito me ensinaram todo o tempo em que tive a oportunidade de acompanhá-los.

Aos colegas Erika Mendonça, Fúlvia P B Beretta, Maria Cristina C Nogueira, Marina Iahn Aun, Michele P Rocha, Viviane R Ferreira, Álvaro Anzai, Cezar N Matsuzaki e Cristiano R G Barcelos. Vocês são muito mais que colegas, são grandes amigos que levarei para minha vida toda.

Às colegas Alice Francisco e a Vera Bain pelo coleguismo e auxílio na elaboração do grupo controle deste estudo.

À toda equipe do Laboratório de Biologia molecular (LIM 58): Dra. Kátia Cândido Carvalho, Juciara da Costa Silva, Thiago Hideki Gonçalves, Marinalva F. Almeida, Natália Garcia e Rodrigo R. Marcondes e também à Claudia Porto, pela grande ajuda e paciência. Apreendi muito com vocês.

A todos os funcionários do Departamento de Ginecologia que com dedicação e bom humor contribuíram para que esta jornada fosse mais amena.

Às pacientes que sem elas, nada disso teria se concretizado.

Ao estatístico Aristides Tadeu Correia, pelo empenho e paciência em me ajudar nas análises estatísticas desta tese.

À minha família querida que mesmo de longe sempre me apoiou.

Aos meu sogros Dirce Suzumi Oku Famano e Mário Kikuo Famano por terem me recebido em sua família.

Aos meus queridos amigos que são minha família também. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Mari F. Cestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 20011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. O pelo	6
2.2. Anatomia do folículo piloso.....	7
2.3. Morfogênese do folículo piloso e seu controle molecular.....	9
2.4. O ciclo de crescimento e diferenciação do pelo	12
2.5. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMP)	15
2.6. BMP4 e o folículo piloso	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MÉTODOS.....	22
4.1 Casuística	23
4.2. População do estudo	23
4.2.1. Grupo SOP	23
4.2.2. Grupo Controle	24
4.3. Avaliação clínica	24
4.4. Polimorfismos estudados.....	25
4.5. Exames subsidiários de análise clínica	26
4.6. Dosagens bioquímicas e hormonais.....	26
4.7. Extração do DNA de sangue periférico	28
4.8. Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i> -PCR) e polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP): PCR-RFLP	29
4.8.1. PCR	29
4.8.2. RFLP.....	30
4.8.3. Leitura dos Fragmentos das Amostras	30

4.9. Análise Estatística	33
4.9.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	33
4.9.2. Análise estatística descritiva	33
4.9.3. Análise estatística inferencial.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Características clínicas da população estudada	36
5.2. Características laboratoriais da população estudada	38
5.3. Associação entre polimorfismos e SOP	40
5.4. Associação entre polimorfismos e hirsutismo.....	42
5.5. Associação entre o polimorfismo rs4898820 e as variáveis clínicas e laboratoriais das pacientes com SOP.....	43
5.6. Associação entre o polimorfismo 538T/C e as variáveis clínicas e laboratoriais das pacientes com SOP.....	45
6. DISCUSSÃO.....	48
6.1. Polimorfismos e presença de SOP e hirsutismo	50
6.2. Polimorfismos e variáveis laboratoriais	52
7. CONCLUSÕES.....	56
8. ANEXOS	58
9. REFERÊNCIAS.....	88

Listas

FIGURAS

Figura 1 -	Anatomia do folículo piloso.....	8
Figura 2 -	Regulação molecular da morfogênese do folículo piloso.....	11
Figura 3 -	Ciclo do folículo piloso.....	14
Figura 4 -	Representação esquemática da interação dos moduladores moleculares na diferenciação das <i>stem cells</i> no pelo.....	18
Figura 5 -	Localização dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C no gene BMP4.....	25
Figura 6 -	Fragmentos de PCR do polimorfismo rs4898820- <i>Tas1</i> em gel de acrilamida/bisacrilamida corado pela prata	32
Figura 7 -	Fragmentos de PCR do polimorfismo 538T/C- <i>Hph1</i> em gel de agarose impregnado com brometo de etídeo	32

TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores utilizados para pesquisa dos polimorfismos.....	29
Tabela 2 -	Características clínicas das mulheres dos grupos SOP e Controle	37
Tabela 3 -	Variáveis laboratoriais das mulheres dos grupos SOP e Controle	39
Tabela 4 -	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C nas mulheres com SOP e controle	40
Tabela 5 -	Frequências genotípica e alélica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C em pacientes com SOP hirsutas e não hirsutas e controle.	42

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação entre as frequências alélicas para 538T/C nos grupos estudados.	41
Gráfico 2 -	Polimorfismo rs4898820 e Hormônio folículo estimulante (FSH-IU/L). A: Comparação entre os genótipos GG, GT, TT; B: Comparação entre os genótipos GG+GT e TT.....	44
Gráfico 3 -	Polimorfismo 538T/C e HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment). A: Comparação entre os genótipos TT, TC e CC. B: Comparação entre os genótipos TT+TC e CC.	46
Gráfico 4 -	Polimorfismo 538T/C e glicose (mg/dL). Comparação entre os genótipos TT+TC e CC.....	46
Gráfico 5 -	Polimorfismo 538T/C e proteína carreadora dos hormônios sexuais (SHBG nmol/L)	47
Gráfico 6 -	Polimorfismo 538T/C e testosterona livre (ng/dL)	47

Resumo

Curi DDG. *Polimorfismos do gene BMP4 em pacientes com a síndrome dos ovários policísticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo e heterogêneo, caracterizado por hiperandrogenismo e anovulação crônica. Dentre as manifestações clínicas do hiperandrogenismo, o hirsutismo é o mais frequente e pode estar presente em cerca de 70% das pacientes com SOP. Sabe-se que o crescimento e diferenciação do pelo são regulados por fatores locais, endócrinos, parácrinos e genéticos. No entanto, a fisiopatologia do hirsutismo ainda é pouco conhecida. O gene *BMP4* (que codifica a Proteína Morfogenética Óssea-4) relaciona-se ao controle do crescimento e diferenciação do pelo, porém não há estudos sobre seu papel no hirsutismo em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. Foram estudadas 245 mulheres, 142 SOP e 103 controles em que analisaram-se os polimorfismos rs4898820 e 538 T/C, para verificar frequências genotípicas e alélicas. Nas pacientes com SOP foi investigada a existência de associação entre esses polimorfismos e hirsutismo e parâmetros laboratoriais e clínicos. Não houve diferença significativa na frequência dos polimorfismos entre os grupos. Não houve associação dos polimorfismos com hirsutismo. Quando analisados os exames laboratoriais das mulheres com SOP, houve associação do genótipo mutado do polimorfismo 538 T/C (CC) com níveis mais altos de SHBG, menores de glicemia e maior sensibilidade à insulina. Houve também associação entre os alelos mutados (CC ou TC), com menores níveis de testosterona livre. Encontrou-se diferença significativa para o FSH nas portadoras do genótipo mutado para o polimorfismo rs4898820 (TT). Não houve associação dos polimorfismos com hirsutismo.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Proteína morfogenética óssea 4, 3.Polimorfismo de nucleotídeo único, 4.Hirsutismo

Summary

Curi DDG. *Polimorphisms of BMP4 gene in patients with polycystic ovary syndrome* [PhD Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex and heterogeneous endocrine disorder characterized by chronic anovulation and hiperandrogenism. Among the clinical manifestations of hyperandrogenism, hirsutism is the most frequent and may be present in approximately 70% of patients with PCOS. It is known that the hair growth and differentiation are coordinated by local, endocrine, paracrine and genetic factors. However, the pathophysiology of hirsutism is poorly understood. *BMP-4* (Bone Morphogenetic Protein-4) is a gene involved in the hair growth and differentiation, but there are no studies about its action in hirsutism in women with polycystic ovary syndrome. A total of 245 women, 142 with PCOS diagnostic and 103 control women were studied to investigate the allelic frequency of the single nucleotide polymorphisms rs4898820 and 538 T/C in PCOS in comparison with the control group. In PCOS group, we sought to investigate a possible association between the genetic variations and the hirsutism. There were no differences for the polymorphisms between groups. There was no association between the genotypes and the presence of hirsutism in PCOS women. When the polymorphisms were analyzed in the PCOS group, those who had homozygous genotype for 538 T/C (CC) had lower levels of SHBG, lower levels of glucose and better insulin sensitivity. Mutated allele (CC or TC), were associated with lower levels of free testosterone. Those who had the mutated genotype for the polymorphism rs4898820 (TT) had higher levels of FSH.

Descriptors: 1.Polycystic ovary syndrome 2.Bone Morphogenetic Protein-4
3.Polymorphism, single nucleotide 4.Hirsutism

1 Introdução

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino complexo caracterizado por hiperandrogenismo e disfunção ovariana. Atinge 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. Pode estar associada à obesidade, infertilidade e aumento do risco para diabetes melito e doença cardiovascular ⁽¹⁾. Além disso, apresenta, em número considerável de pacientes, resistência insulínica com hiperinsulinemia compensatória ^(2, 3).

A síndrome, descrita pela primeira vez por Stein e Leventhal em 1935⁽⁴⁾, caracteriza-se por grande heterogeneidade clínica e laboratorial e, por isso, seu diagnóstico constitui um desafio para clínicos e estudiosos no assunto ⁽⁵⁾. Por exemplo, segundo a Sociedade de Excesso de Androgênios e SOP (AES-PCOS), em 2006, a SOP pode expressar até nove fenótipos diferentes, de acordo com a presença de hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou hiperandrogenemia) e disfunção ovariana (anovulação e/ou ovários policísticos), dentre os quais, seis apresentam hirsutismo e, em apenas três destes os níveis androgênicos estão elevados (hiperandrogenemia). Para contemplar essa heterogeneidade, foi formulado o Consenso de Rotterdam em 2003, que propõe anovulação crônica, hiperandrogenismo e ovários de aparência policística, como elementos do diagnóstico. Paciente com a presença de dois ou mais critérios, pode ser diagnosticada com síndrome ⁽⁵⁾.

Dentre as manifestações hiperandrogênicas, o hirsutismo é o mais frequente (60%), seguido pela acne (15-25%) e alopecia androgenética (5%). O hirsutismo é o principal sinal clínico do hiperandrogenismo e sua causa mais comum é a SOP ⁽⁷⁾. Sua avaliação clínica é semi-objetiva e o método mais utilizado para sua quantificação foi descrito originalmente por Ferriman e Gallwey, 1961 ^(7, 8, 9) e modificado por Hatch e colaboradores ⁽¹⁰⁾.

Em muitos casos, o hirsutismo é resultado do excesso da produção aumentada de androgênios ou de seus níveis circulantes. No entanto, em proporção significativa, mulheres hirsutas apresentam níveis androgênicos normais, como ocorre no hirsutismo idiopático ou mesmo na SOP. Por outro

lado, há casos em que os níveis séricos encontram-se elevados porém, clinicamente há um impacto discreto como em mulheres asiáticas, por exemplo ⁽⁷⁾. A sua fisiopatologia ainda não está bem estabelecida, mas pode estar relacionada a uma alteração da sensibilidade do folículo piloso ao androgênio para mais ou para menos, a fatores relacionados à resposta local ao estímulo androgênico ou mesmo peculiaridades nas diferentes vias de sinalização envolvidas no crescimento e diferenciação dos pelos ⁽¹¹⁾.

Os pelos da superfície corporal são estruturas tubulares, queratinizadas com variações na cor, diâmetro e secção transversal. Os folículos pilosos contêm compartimentos epitelial e mesenquimal, que são ciclicamente remodelados. A indução e morfogênese do folículo piloso dependem de eventos complexos de comunicação bidirecional entre o epitélio e o mesênquima. As fases de crescimento e regressão dos folículos pilosos são moduladas por um amplo espectro de hormônios como gonadal, tireoidiano, adrenal, hipofisário e pineal. Pelo fato da unidade pilosebácea expressar todas as enzimas envolvidas na esteroidogênese, ela não deve ser vista apenas como um recipiente de sinais de transmissores distantes, mas sim uma comunidade organizada na qual as células emitem, recebem e coordenam sinais moleculares de várias fontes fora do seu entorno ^(12, 13).

Além de interferir no bem-estar da físico, psíquico e social da mulher, o hirsutismo pode ser um sinalizador de distúrbios hormonais associados. Recentemente, tem-se demonstrado também uma associação forte entre o hirsutismo, resistência à insulina e alterações metabólicas como obesidade e síndrome metabólica ⁽⁷⁾. No entanto, pouco se conhece da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares que levam pacientes com SOP a apresentarem excesso de pelos. Nesse sentido, nosso trabalho propõe investigar genes candidatos que poderiam estar associados a esse fenômeno.

Nossa hipótese é que alterações genéticas no *BMP4* (proteína morfogenética óssea) estão associadas ao hirsutismo e a achados clínicos e laboratoriais em mulheres com SOP. O racional é que a variação genética

modificaria a atividade do gene e levaria a uma maior ativação do crescimento do pelo e sua diferenciação. Até o momento, não há na literatura estudo que avalie o papel da via BMP nos folículos pilosos de pacientes com SOP.

Desse modo, diante das dúvidas quanto à fisiopatologia do hirsutismo propusemos, neste estudo, a avaliar a presença de variações no gene *BMP4* e estudar sua associação com esse achado, bem como outros e parâmetros clínicos e laboratoriais.

2 Revisão da Literatura

2.1 O PELO

Os pelos são órgãos filiformes, de origem epidérmica que recobrem a superfície do corpo dos mamíferos. São constituídos por queratina produzida pelos folículos pilosos, e sua função primária é servir como isolamento e proteção ⁽⁷⁾. Nos seres humanos, além de proteção, os pelos são importantes na questão das interações sociais. A perda de pelos (alopecia) ou seu crescimento excessivo em áreas indesejadas (hirsutismo e hipertricose) podem levar a um grande desconforto físico e emocional ⁽¹⁴⁾.

Estruturalmente, existem três tipos de pelos. O primeiro é o chamado lanugem; é um pelo macio com aproximadamente 40 μm de diâmetro, característico do período pré-natal e que desaparece nos primeiros meses após o parto. O segundo, é o pelo velo, também macio, porém mais longo do que os lanugem e tipicamente com menos de 30 μm de diâmetro. Não possuem medula central e, em geral, não são pigmentados. Por último, os pelos terminais, tipicamente maiores que 60 μm , possuem medula central e são mais longos e mais pigmentados que os anteriores ^(7, 15).

Ao nascimento, os pelos terminais são encontrados no couro cabeludo, sobrancelhas e cílios, enquanto os pelos do tipo velo são encontrados nos outros locais. Durante a puberdade, os folículos dos pelos velo na genitália e axilas de ambos os sexos e em tronco e barba nos homens se transformam em folículos pilosos terminais sob a influência primordial dos hormônios sexuais ⁽¹⁵⁾.

2.2 ANATOMIA DO FOLÍCULO PILOSO

Anatomicamente, o folículo piloso compreende as seguintes porções: o infundíbulo, situado entre o óstio e o ponto de inserção da glândula sebácea. O istmo, que localiza-se entre a abertura da glândula sebácea e o ponto de inserção do músculo eretor do pelo, e o segmento inferior, que é a porção situada abaixo do músculo eretor do pelo (Figura 1) ⁽¹⁶⁾.

O folículo maduro é composto por camadas concêntricas de células cuja porção mais central é a haste propriamente dita (Figura 1). A haste é composta pela cutícula externa, córtex e medula e, no pelo humano, é descontínua ou até ausente no lanugem e no pelo velo. Circundando a haste encontra-se a bainha radicular interna, composta pela cutícula da bainha, a chamada camada de Huxley e a camada de Henle (Figura 1). Mais externamente, encontra-se a bainha radicular externa e, por fim, a camada vítrea ou basal ⁽¹⁷⁾. Cada folículo apresenta porções epitelial e mesenquimal. A espessura do pelo está relacionada ao tamanho do bulbo, que por sua vez, é ditado pelo volume do componente mesenquimal do folículo ⁽¹⁸⁾.

O epitélio é subdividido em uma porção superior permanente, distal ao músculo eretor do pelo, e uma porção inferior, incluindo o bulbo, que se refaz a cada ciclo. No bulbo encontram-se as células com o maior grau de proliferação do corpo humano, os queratinócitos da matriz do pelo. Estas células podem se diferenciar em tricócitos e células da bainha radicular interna. A bainha externa, a matriz do pelo, e a haste derivam de células tronco epiteliais do bulge, área localizada abaixo da glândula sebácea e que funcionam como uma população de células tronco pluripotentes para a pele ⁽¹⁶⁾.

O mesênquima do folículo maduro é organizado em dois compartimentos comunicantes: tecido conjuntivo circunjacente e a papila dérmica folicular. A papila dérmica contém um pequeno número de fibroblastos especializados denominados células da papila dérmica e uma grande quantidade de matriz extracelular contendo mucopolissacarídeos. As

células tronco mesenquimais têm a função de recrutamento de novas células para a papila dérmica ^(17, 19). Além das células tronco mesenquimais, o folículo piloso ainda contém precursores de mastócitos e células tronco neuronais sendo que estas últimas podem se diferenciar em neurônios e vasos sanguíneos. O grande número de células tronco fazem do folículo um órgão muito interessante no campo de pesquisa da biologia das células tronco ⁽¹⁶⁾.

FONTE: adaptado de Krause e Foitzik, 2006 ⁽¹⁶⁾.

Figura 1 - Anatomia do folículo piloso. **A:** folículo piloso anágeno, secção longitudinal; **B:** detalhe do bulbo. MEP: músculo eretor do pelo; PD: papila dérmica; BRI: bainha radicular interna; BRE: bainha radicular externa; GS: glândula sebácea

2.3 MORFOGÊNESE DO FOLÍCULO PILOSO E SEU CONTROLE MOLECULAR

A morfogênese do folículo pode ser subdividida em três fases principais: indução, organogênese e citodiferenciação (maturação), e resulta da interação entre células mesenquimais e epiteliais, mediada por moléculas sinalizadoras ^(20, 21).

O desenvolvimento do folículo piloso se inicia através de um aglomerado de queratinócitos epidérmicos que se alarga e se alonga, organizando-se em placas epiteliais. A placa epitelial se expande para formar o germe primitivo do pelo, que gera a porção epitelial do folículo piloso ⁽²²⁾. Estas células epidérmicas crescem obliquamente na derme, em associação com as células mesenquimais, e desenvolvem então três saliências que darão origem às glândulas sebáceas (mais superficial), a mais profunda servirá como futuro local das células tronco epiteliais e onde o músculo eretor do pelo se inserirá, e uma terceira saliência que se desenvolve superficialmente ao broto da glândula sebácea e dará origem à glândula apócrina em determinadas regiões ⁽²²⁾.

Na extremidade mais proximal, as células mesodérmicas se transformam na papila dérmica e junto com as células epiteliais formam o bulbo. O lúmen central é formado por apoptose e queratinização das células epiteliais no infundíbulo e então, o primeiro pelo cresce ⁽¹⁹⁾.

Referente aos mecanismos moleculares, a formação do folículo piloso é regulada por uma série de vias de sinalização que promovem a sua indução ou inibição. Os sinais que controlam a comunicação dérmica-epidérmica incluem as moléculas secretadas da família WNT/*Wingless*, Sonic Hedgehog (SHH) e membros das famílias TGF β /BMP, FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) e TNF (fator de necrose tumoral), entre outros. Três vias são importantes na promoção do desenvolvimento do folículo piloso. O primeiro sinal essencial para a indução do folículo advém da via WNT, através da via de sinalização canônica da β -catenina ⁽²³⁾. Outro sinal

importante para o desenvolvimento da placa epitelial é a proteína EDA (Ectodysplasin A), membro da superfamília do TNF. Sua isoforma ativa, EDA A1, se liga ao receptor EDAR e ativa seu efetor NF κ B (fator nuclear Kappa B). Por fim, a molécula de sinalização Noggin, antagonista da BMP e também membro da superfamília do TGF β . Enquanto as vias WNT/ β catenina, EDA A1/EDAR/NF κ B e Noggin/Lef1 promovem o desenvolvimento da placa epitelial, as vias de sinalização da BMP e DKK (Dickkopf) têm papel inibidor^(20, 23).

Após a formação da placa epitelial, ocorre a condensação dérmica dos fibroblastos, que é mediada pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), expresso na placa e induzido pelo Eda/Edar e WNT/ β -catenina epiteliais^(15, 20).

O começo da organogênese é marcado pela proliferação massiva dos queratinócitos. Para que haja progressão da formação do folículo, é necessário que o efeito inibitório da BMP seja bloqueado. Este efeito é mediado pelo Noggin que, além de antagonizar o efeito da BMP, regula a indução epitelial do folículo através do Lef1 e promove a expressão de Shh (Sonic hedgehog) via Lef1. A via Shh tem papel na indução, diferenciação e especialização celular em vários tecidos embrionários. No folículo, é necessário para a proliferação epitelial e seu crescimento. Assim como o Noggin e o Shh, o TGF- β 2 também apresenta importante papel na organogênese, regulando a proliferação e a adesão das células⁽²⁰⁾.

A diferenciação é caracterizada pelo desenvolvimento de todos os compartimentos do folículo piloso e sofre ação de diversas moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição de acordo com a estrutura a ser formada⁽²¹⁾.

A Figura 2 mostra a expressão dos diferentes fatores de crescimento, seus receptores, moléculas da matriz e reguladores transcricionais do epitélio do folículo piloso e mesênquima durante diferentes estágios do desenvolvimento do folículo piloso.

FONTE: Adaptado de Cotsarelis e Botchkarev, 2011 ⁽¹⁵⁾

Figura 2 - Regulação molecular da morfogênese do folículo piloso. A Figura mostra os estágios de desenvolvimento do folículo piloso e a expressão de fatores de crescimento, seus receptores, moléculas da matriz e reguladores transcricionais nas diferentes fase

2.4 O CICLO DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO PELO

O ciclo do pelo consiste em mudanças rítmicas do folículo piloso ao longo de várias fases denominadas anágena (crescimento), catágena (regressão) e telógena (repouso), Figura 3. Acredita-se que este fenômeno esteja associado à limpeza da pele de debris e parasitas além de excreção de químicos deletérios que são encapsulados nos tricócitos ⁽¹⁶⁾.

A fase anágena compreende a completa regeneração e crescimento da porção proximal do pelo, porção que cicla. As células que regeneram esta porção do folículo, células do germe secundário, recebem sinal para proliferação e crescimento para a derme e formam as linhagens epiteliais que produzem as camadas cilíndricas e se diferenciam para produzir a haste com as características da região da pele. A fase anágena é subdividida em seis estágios, onde o tempo de duração de cada estágio é praticamente o mesmo em todos os folículos, exceto na fase VI, cuja duração dita o comprimento do pelo e muda de acordo com a região onde o folículo se encontra ⁽¹⁷⁾.

Muitos reguladores moleculares estão presentes tanto na ativação da morfogênese quanto na indução e duração das várias fases do desenvolvimento do pelo. A duração da fase anágena é prolongada pela ação da IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina) do HGF (fator de crescimento dos hepatócitos) e do VEGF (fator crescimento de vasos), e encurtada pelo FGF5 (fator de crescimento fibroblasto), TGF β 1, TGF β 2, IL-1 β (interleucina1 β), IFN- γ , que também induzem a fase catágena. A expressão destes reguladores estão sob o controle de sinais ainda não bem definidos. Alguns exemplos destes sinais são o fator nuclear- κ B, membros da família WNT e TGF β /BMP, assim como seus antagonistas Shh e β -cateninas, respectivamente ^(12, 22, 24).

A fase anágena termina com a involução do folículo piloso, resultando em apoptose ⁽²⁴⁾. A papila dérmica não entra em apoptose devido à expressão do supressor de apoptose *BCL-2* (*B-cell lymphoma*). Nesta fase a

papila dérmica se condensa e repousa abaixo do bulge. O gene *hairless* (Hr) é o responsável pelo controle da apoptose em tecidos específicos e na ordem correta ⁽²⁴⁾.

Depois do período de proliferação e diferenciação, o crescimento folicular é interrompido e se inicia a fase catágena. O primeiro sinal desta fase é a parada de produção de melanina, levando a uma terminação proximal não pigmentada no pelo telógeno. A fase catágena consiste em um processo altamente controlado de diferenciação celular e apoptose, levando à parada de crescimento celular e pigmentação, liberação da papila, perda da diferenciação das camadas do folículo inferior, remodelamento da matriz extracelular e encolhimento do folículo inferior para cima através da apoptose ^(12, 16).

Alguns indutores da fase catágena já são reconhecidos como o FGF5 (fator de crescimento de fibroblastos), TGF β 1 (fator de necrose tumoral), TGF β 2, neurotrofinas NT-3, NT-4, INF-g (interferon gama), prolactina e estrogênios ⁽¹²⁾.

No final da catágena, o folículo entra na fase telógena, período de relativa quiescência da atividade proliferativa e bioquímica. O folículo permanece neste estágio até ser reativado por sinais intra e extra foliculares ⁽¹⁶⁾.

Existem várias teorias propostas na tentativa de explicar como ocorre o ciclo do pelo. Estas teorias devem incluir as características do ciclo (periodicidade, persistência e autonomia), a variação entre os sítios, e a sensibilidade a numerosos sinais moduladores do crescimento extra folicular como hormônios, fatores de crescimento e dieta. Uma das teorias propostas é a da inibição-desinibição. Nesta teoria, a fase anágena seria iniciada pela perda de um inibidor (mecanismo de liberação de inibidor) ⁽²²⁾. Botchkarev e colaboradores em 1999 mostraram que a formação do folículo piloso está, pelo menos em parte, controlada por um mecanismo de liberação de inibidor: o complexo BMP-4/Noggin, corroborando com a teoria de inibição-desinibição ⁽²⁵⁾.

FONTE: Adaptado de Schneider et al., 2009 ⁽²¹⁾.

Figura 3 - Ciclo do folículo piloso. Durante a vida, o folículo piloso passa por vários ciclos de involução e regeneração. PD: papila dérmica; BRE: bainha radicular externa; BRI: bainha radicular interna; GS: glândula sebácea; MEP: músculo eretor do pelo

2.5 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMP)

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), do inglês *Bone Morphogenetic Proteins* pertencem à superfamília TGF β de proteínas estruturalmente relacionadas que regulam uma série de respostas biológicas em diferentes células e tecidos durante o desenvolvimento embriológico e após o nascimento ^(26, 27). Apresentam esta denominação por terem sido isoladas inicialmente de extratos de ossos e pela habilidade de induzirem a formação ectópica de osso em áreas não ósseas ⁽²⁸⁾.

Atualmente, a família BMP apresenta mais de 20 proteínas secretadas com homologia estrutural e exercem suas atividades biológicas via interação com receptores BMPs específicos, tipo I e tipo II ⁽²⁹⁾. Baseado em sua homologia e função, as BMPs são subdivididas em pelo menos quatro subgrupos: BMP2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10 e BMP12/13/14 ⁽³⁰⁾. As BMPs atuam por meio da ligação a receptores transmembrana de serina/treonina quinase (receptores BMP), ativando as vias de sinalização celular por fosforilação e translocação de moléculas de sinalização do citoplasma para o núcleo celular. A transdução de sinal até o núcleo é feita pelo recrutamento de reguladores transcricionais, principalmente as SMAD 1/5 ou componentes da via da MAPK, *mitogen-activated protein kinase* e envolve uma série de regulações próprias da via. A via é constituída por ligantes, receptores específicos e antagonistas ⁽²⁶⁾.

Nos mamíferos, a estrutura do *BMP* é altamente conservada, e a comparação de regiões maduras do *BMP* entre humanos e ratos mostra uma homologia entre 90% a 100% ⁽²⁸⁾.

Uma série de estudos da década de 90 mostrou que a família BMP também tem importante papel na fisiologia reprodutiva ⁽²⁶⁾. A BMP15 é produzida exclusivamente pelo oócito e tem papel importante no controle de taxas de ovulação de várias espécies. No ser humano, mutações nesse gene se relacionam com casos de infertilidade e amenorréia primária ⁽³¹⁾.

O GDF9 (fator de diferenciação do crescimento-9), que pertence a essa família, é considerado fator fundamental no controle do crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos preantrais, e sua inativação se relaciona a infertilidade por defeitos na foliculogênese ovariana ⁽³²⁾. Além disso, estudos demonstraram que a expressão do GDF9 em ovários de mulheres com SOP é aberrante e poderia explicar as alterações na foliculogênese ovariana nessas pacientes ^(25, 26). Sproul e colaboradores, em 2010, demonstraram que pacientes com SOP portadoras de polimorfismos do gene *GDF9* apresentavam maior escore no índice de Ferriman e Gallwey que as não portadoras ⁽²⁷⁾.

A BMP4 e a BMP7 são expressas nas células da teca interna do ovário e estão envolvidos na produção de androgênios ^(26, 32). Estudos com células da teca humanas e bovinas demonstraram que a presença de BMP4 e 7, em culturas destas células, promovem uma diminuição da produção de androgênios via inibição da P450c17 (CYP17) pela BMP ^(32, 33).

A proteína BMP7 ainda é intensamente expressa na epiderme, papila dérmica e estruturas extra foliculares como as glândulas sebáceas e sudoríparas, músculo eretor do pelo e vasos sanguíneos ⁽³⁴⁾.

A via BMP tem também um papel criticamente importante para a orquestração adequada da morfogênese e na regulação do ciclo do folículo piloso ⁽²⁵⁾. Uma série de estudos experimentais, usando manipulação genética em animais, trouxe avanços significativos para o entendimento da fisiologia do pelo. As evidências demonstram que a via BMP regula o ciclo do folículo piloso pela inibição da indução anágena e sua ação é antagonizada pelo Noggin, um sistema essencial de inibição/desinibição no desenvolvimento desta fase ^(16, 35). A super expressão de Noggin, aumenta o número de folículos, aumenta a proliferação da matriz e aumenta de modo marcante a fase anágena dos folículos ⁽²¹⁾.

2.6 BMP4 E O FOLÍCULO PILOSO

A BMP4 é uma proteína codificada pelo gene *BMP4*, situado no cromossomo 14q22-q23^(36, 37).

O gene *BMP4* contém duas regiões promotoras, A e B. A região *BMP4* 1A é a promotora dominante. A expressão do gene é tecido-específica e tempo dependente e é controlada por diversos elementos *cis*-DNA conhecidos como módulos. Módulo é um dispositivo de processamento de informação ligado ao DNA e que comunica suas informações ao maquinário de transcrição basal⁽³⁸⁾.

O *BMP4* participa do desenvolvimento embrionário do folículo piloso, se expressando, junto com o Noggin, nas células de condensação mesenquimal, abaixo da placa epitelial. A neutralização da atividade inibitória da BMP2 e BMP4 pelo Noggin estimula o desenvolvimento do folículo piloso⁽³⁹⁾. Estudos sugerem que a atividade inibitória da BMP no folículo ocorra principalmente pela diminuição do fator de transcrição Lef-1 e da molécula de adesão da célula neural na placa epitelial. O Lef-1 é um componente essencial da via de sinalização da WNT/ β -catenina e tem papel fundamental no desenvolvimento do folículo piloso⁽⁴⁰⁾.

O mesmo processo ocorre no folículo pós natal onde as vias de sinalização WNT/ β -catenina e BMP são necessárias para a atividade cíclica do folículo⁽⁴⁰⁾.

Durante a fase telógena, a BMP4 é produzida tanto pelos fibroblastos da papila dérmica quanto pelos queratinócitos do germe secundário e, interage com o BMPRII expresso no germe secundário, impedindo o início da fase anágena. O Noggin é um importante inibidor da BMP4 na fase de transição de telógena para anágena. A administração de Noggin no epitélio folicular e mesênquima ativa a fase anágena no folículo telógeno e, este efeito de indução da fase anágena pelo Noggin, é mediado em parte pela sinalização do Shh e a produção de Shh, por sua vez, é inibida pela BMP4.

Portanto, a neutralização da atividade da BMP4 pelo Noggin permite uma elevação do Shh durante a iniciação do crescimento do folículo ⁽⁴¹⁾.

Outro componente importante para a diminuição da sinalização da BMP é o fator de transcrição *Msx-2* (*muscle segment homeobox*), expresso nos queratinócitos da matriz que medeia os efeitos da BMP na expressão dos fatores de transcrição de Lef-1, Foxn1 e Hoxc13, que por sua vez, regulam a expressão dos genes dos queratinócitos ⁽⁴⁰⁾. Os genes envolvidos no crescimento e diferenciação do pelo estão representados na Figura 4.

FONTE: : Adaptado de Schneider et al., 2009 ⁽²¹⁾.

Figura 4 - Representação esquemática da interação dos moduladores moleculares na diferenciação das *stem cells* no pelo

O primeiro estudo de polimorfismo do *BMP4* foi realizado em 1999 por Mangino e colaboradores, através da técnica de digestão enzimática (RFLP-*restriction fragment length polymorphism*) com *Hph1*. O polimorfismo foi localizado na posição do nucleotídeo 538 (T- C), resultando na alteração de um aminoácido de Valina para Alanina ⁽⁴²⁾. Desde então, alguns polimorfismos do *BMP4* têm sido analisados, sendo a grande maioria em alterações ósseas, dentárias e alguns estudos em animais ^(43, 44) mas nenhum estudo em pelo humano.

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as variantes genéticas rs4898820 e 538T/C do gene *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*) em mulheres com e sem a síndrome dos ovários policísticos (SOP).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos entre os grupos SOP e controle.
2. Determinar e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em mulheres com SOP, com e sem hirsutismo, e controle.
3. Verificar a existência de associação entre os polimorfismos e os seguintes parâmetros: clínicos (hirsutismo, IMC, circunferência abdominal), marcadores de sensibilidade à insulina e parâmetros laboratoriais (esteroides sexuais e perfil lipídico), nas mulheres com SOP.

4 Métodos

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi realizado no Setor de Ginecologia Endócrina da Divisão da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas e na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq nº0576/10 (Anexo A). As participantes assentiram em fazer parte do estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informado livre e esclarecido (TCLE) (Anexos B e C).

Foram incluídas 245 mulheres com idades entre 18 a 39 anos. Desse total, 142 tinham diagnóstico de SOP e 103 eram mulheres com ciclos regulares e sem hirsutismo. As mulheres recrutadas com diagnóstico de SOP eram pacientes novas e de segmento atendidas no Ambulatório da Disciplina de Ginecologia, setor de Ginecologia Endócrina e também da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP. As mulheres do grupo controle foram recrutadas dos ambulatórios de Ginecologia e através de mutirões.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.2.1 Grupo SOP

Mulheres com idades entre 18 e 39 anos, com diagnóstico de SOP segundo critério de Rotterdam ⁽⁴⁾. Especificamente, presença de pelo menos dois dos seguintes achados: hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial, anovulação crônica e padrão ultrassonográfico de ovários policísticos.

Critérios de não inclusão: gravidez, uso de contraceptivo hormonal nos últimos três meses e presença de outras doenças que mimetizassem a síndrome (hiperprolactinemia, disfunção adrenal, hipotireoidismo, tumores virilizantes).

4.2.2 Grupo Controle

Mulheres com idades entre 18 e 39 anos, ciclos menstruais regulares com intervalos entre 25 a 35 dias e que concordaram em participar do estudo.

Critérios de não inclusão: o uso de contraceptivo hormonal nos últimos três meses e a presença de hirsutismo. Hirsutismo foi considerado quando índice de Ferriman e Gallwey modificado por Hatch e colaboradores⁽¹⁰⁾ era maior ou igual a 8 pontos.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foram obtidos de todas as participantes anamnese com informações sobre o ciclo menstrual e uso de medicamentos, além de serem realizadas medidas peso, altura e avaliação de hirsutismo.

O ciclo menstrual foi considerado anormal quando os intervalos entre as menstruações eram menores que 21 dias ou maiores que 35 dias.

O hirsutismo foi avaliado através do índice de Ferriman e Gallwey modificado por Hatch e posteriormente subdividido em: ausência de hirsutismo ($F/G \leq 7$) e presença de hirsutismo $F/G \geq 8$.

4.4 POLIMORFISMOS ESTUDADOS

Os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) pesquisados nesse estudo foram selecionados, por meio de revisão da literatura, de estudos realizados envolvendo o gene *BMP4* ^(43, 45, 46). O primeiro polimorfismo do *BMP4* descrito foi o 538T/C, localizado na posição do nucleotídeo 538 (T-C), e a troca de timina por citosina promove a alteração do aminoácido valina para alanina ⁽⁴²⁾. O segundo polimorfismo, rs4898820 está localizado no sítio de ligação do fator de transcrição MRF-2 e foi estudado em pacientes com melanoma cutâneo ⁽⁴⁶⁾. A Figura 4 ilustra o gene *BMP4* e a localização dos polimorfismos selecionados.

Figura 5 - Localização dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C no gene *BMP4*

- A- cromossomo 14, a seta indica a posição do gene *BMP4*.
- B- Polimorfismos selecionados e a sequência gerada nas reações de PCR. As letras em azul sublinhadas indicam a localização do fragmento. As letras pretas em negrito, o tamanho dos fragmentos de PCR gerados e as letras em vermelho os oligonucleotídeos utilizados na amplificação.
- C- Estrutura do gene *BMP4*. A caixa azul clara indica a região 5'UTR (não traduzida), as azuis escuras com as letras E indicam os exons e as setas verdes, os introns. A caixa verde indica a região 3'UTR e as setas pretas, pontilhada e contínua, indicam a região dos polimorfismos rs4898820 e 538 T/C, respectivamente

4.5 EXAMES SUBSIDIÁRIOS DE ANÁLISE CLÍNICA

Foi coletado sangue periférico, parte do sangue foi destinado a exames bioquímicos e hormonais e parte aos estudos genéticos.

Os exames bioquímicos e hormonais foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Hormônios como TSH, T4livre, 17OH-progesterona, SDHEA e prolactina foram avaliados para exclusão de distúrbios tireoidianos, deficiência da 21-hidroxilase e hiperprolactinemia, respectivamente.

O sangue destinado aos estudos genéticos foi encaminhado para o Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM-58) da Disciplina de Ginecologia, em frascos contendo EDTA. A fração contendo polimorfonucleares foi separada do soro e das hemácias por centrifugação (3.000 rpm por 20 minutos a 4° C) e conservada a -20° C para posterior extração de DNA genômico.

4.6 DOSAGENS BIOQUÍMICAS E HORMONAIS

Glicemia, colesterol total e frações e triglicérides foram dosados para o rastreamento de dislipidemias e diabetes melito tipo 2.

Hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), estradiol (E2), prolactina (PRL), testosterona total (T), androstenediona, 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP), globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG), insulina (I), foram obtidos na fase folicular do ciclo menstrual (entre primeiro e quarto dias do ciclo menstrual) em mulheres eumenorréicas e, aleatoriamente nas mulheres com amenorréia ou espaniomenorréia.

Na inclusão das pacientes foram também realizadas as seguintes dosagens hormonais: progesterona (P) para afastar ovulação nas mulheres espanio ou amenorréicas; hormônio tireotrófico (TSH) e tetraiodotironina livre (T4 livre) para exclusão de afecções tireoidianas, sulfato de

deidroepiandrosterona (SDHEA) e 17-hidroxiprogesterona (17OHP) para exclusão de afecção adrenal e, quando necessário, foi realizado teste da cortrosina.

As concentrações de glicose, colesterol total e triglicérides, foram dosadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado. A lipoproteína de alta densidade (HDL) foi obtida pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação química das lipoproteínas que contém apolipoproteína B, utilizando-se reagente precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotungstico.

As concentrações de testosterona, estradiol, T4 livre, e progesterona foram determinadas por método fluoroimunoensaio (Auto DELFIA[®]), 17OHP e DHEA por radioimunoensaio (DSL[®]) e androstenediona por radioimunoensaio (DPC[®]).

As dosagens de prolactina, LH, FSH, insulina, SHBG e TSH foram obtidas pelo método imunofluorimétrico (Auto DELFIA[®]) e o SDHEA por eletroquímioensaio (Roche Elecsys[®]). A testosterona livre foi calculada pela formula de Vermeulen, utilizando-se os níveis de testosterona total e SHBG⁽⁴⁷⁾.

As mulheres do grupo SOP foram submetidas ao teste de estímulo com ACTH sintético para afastar deficiência da 21-hidroxilase e ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) para avaliar presença de diabete melito ou intolerância a hidrato de carbono. Estes testes foram realizados no ambulatório de Endocrinologia , às 8 horas da manhã, após jejum noturno de 12 horas.

4.7 EXTRAÇÃO DO DNA DE SANGUE PERIFÉRICO

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo do DNA blood (Quiagen), conforme descrito a seguir:

1. Em um tubo de 1,5 mL contendo 200 μ L de concentrado leucocitário adicionou-se 20 μ L de protease e 200 μ L de TAL. Feita agitação em vortex para homogeneizar a solução seguida de incubação a 56°C por 10 minutos.
2. Após breve centrifugação foi adicionado 200 μ L de etanol (96-100%). Nova centrifugação e transferência da amostra para coluna de 2 mL, onde foi adicionado 500 μ L de TAW1. Nova centrifugação a 8000rpm por um minuto.
3. Adicionado 500 μ L de TAW2 e centrifugado à velocidade máxima por três minutos.
4. A coluna então foi transferida para novo tubo de 2 mL e centrifugada a velocidade máxima por um minuto, e então transferida novamente para um tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 100 μ L de H₂O MilliQ, com nova incubação a temperatura ambiente por cinco minutos para aumentar o rendimento de DNA recuperado.
5. Centrifugação final a 8000 rpm por um minuto.
6. Realizada a quantificação do DNA genômico através de espectrofotometria em aparelho NanoDrop (Thermoscientific) com comprimento de onda de 280 nm.

As amostras foram armazenadas a -20° C para posterior utilização.

4.8 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (*POLYMERASE CHAIN REACTION- PCR*) E POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA (*RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORFISM- RFLP*): PCR-RFLP

4.8.1 PCR

Para a realização da PCR, foi utilizado o protocolo do Kit Promega.

Os iniciadores (*primers*) utilizados para a pesquisa dos polimorfismos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para pesquisa dos polimorfismos

Polimorfismo	Iniciadores
rs4898820 (-3445T/G)	F: 5_-CTG GGC AAG TGA GGG GAA T-3e R: 5_-AAC TTG GGA AGA TAT CCT GAA ATT CCT-3
538T/C	F: 5' CCT AAC TGT GCC TAG 3' R: 3' CAT AAC CTC ATA AAT GTT TAT ACG G 3'

F: Forward; R: Reverse

O protocolo para realização do PCR das amostras consistiu da preparação de solução com 26 µL de 10x PCR buffer, 5,2 µL de DNTP 10 µM, 7,8 µL de MgCl₂ (50 µM), 5,2 µL de Primer S (10 µM), 5,2 µL de Primer AS (10 µM), 1,04 µL de Taq, 144,56 µL de água destilada e 5 µL de DNA das amostras.

Essa solução ficou a 95°C por 5 minutos e depois foi submetida a ciclagem a 95°C por 1 minuto, 50°C para o primeiro polimorfismo e 55°C para o segundo polimorfismo (temperatura de anelamento) por 1 minuto e 72°C por dois minutos. Foram repetidos 40 ciclos para cada uma das amostras, e entre os ciclos, as amostras ficavam numa temperatura de intervalo de 72°C por 7 minutos.

4.8.2 RFLP

Após a PCR, as amostras foram submetidas à restrição enzimática. A enzima *Tas1* foi utilizada para pesquisa do polimorfismo rs4898820 e a enzima *Hph1* para a pesquisa do 538T/C.

Para a análise do padrão de restrição, em ambos os casos foram usados 15 µL de PCR, 1,5 µL de enzima e 2,5 µL de água destilada, totalizando 20 µL de amostra. A reação da enzima *Hph1* ocorreu a 37°C *por toda noite* e a da enzima *Tas1*, a 65°C também por toda noite.

A enzima de restrição *Tas1* reconhece o trecho 5'...AATT...3' e 3'...TTAA...5' da sequência de PCR amplificada. Os fragmentos esperados após a clivagem são de 110 + 24pb para o genótipo selvagem (GG), 93+24+17pb para genótipo mutado (TT) e 110+93+24+17pb para o genótipo heterozigoto (GT).

A enzima *Hph1* reconhece o trecho clivagem 5'...GGTGA(n)... 3'e 3'...CCACT(n)...5' da sequência de PCR amplificada. Os fragmentos esperados após clivagem com a enzima *Hph1* são de 110+87pb para o genótipo selvagem (TT), 197pb para genótipo mutado (CC) e 197+110+87pb para o genótipo heterozigoto (TC).

4.8.3 Leitura dos Fragmentos das Amostras

As amostras digeridas com *Tas1* foram submetidas a corrida eletroforética em géis de acrilamida/bisacrilamida a 8% e coradas pela prata (Figura 6).

O protocolo para o gel de Acrilamida utilizado foi o seguinte:

1. Acrilamida 29%/Bisacrilamida 1% (29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida) acrescidas de 100mL de água Milli-Q. Agitar uma hora, filtrar com papel filtro e armazenar em geladeira protegido da luz.

2. TBE 10X (Tris Borato EDTA) pH 8,3 (108 g Tris base, 55 g de ácido bórico 40 ml de EDTA 1/2 M pH8.0) acrescido de 1 litro de H₂O Milli-Q q.s.p. com pH em 8.3 e autoclavado.
3. NaOH 3% (30 g em 1000 ml H₂O Milli-Q). Armazenado em recipiente de vidro ou plástico.
4. Prata - AgNO₃ 0,45% (0,45 g em 100 ml de água Milli-Q). Armazenado em frasco protegido de luz e reutilizar até 5 vezes.
5. APS 10% (Persulfato de Amônia) – 0,1 g em 1 ml de água Milli-Q. Aliquotados em eppendorfes, tampa fechada com parafilme e armazenado em freezer a -20°C.
6. Fixador: 100 ml de Etanol 100%, 7,5 ml de ácido acético e água q.s.p. 1 litro.

Para a confecção do gel foram utilizados 6mL da solução contendo 1,6 mL de acrilamida/bisacrilamida; 0,6 mL de TBE10x e 3,8 mL de água Milli-Q. Foram acrescentados a esta solução 60 µL de APS10% e 6 µL de TEMED.

As amostras foram então corridas no gel de acrilamida por mais ou menos quarenta minutos e após o término, o gel foi deixado por 10 minutos no fixador e então lavado duas vezes com água destilada por 5 minutos e incubado por 20 minutos em solução de prata. Lavado duas vezes com água destilada e adicionada solução reveladora de NaOH 3% e 1,0ml de formaldeído até que as bandas aparecessem para que a leitura fosse realizada.

As amostras digeridas com *Hph*1 foram corridas em gel de agarose 3% impregnado com brometo de etídio (Figura 7). Após término da corrida, o gel foi analisado em fotodocumentador, através do programa Quantum ST4.

Figura 6 - Fragmentos de PCR do polimorfismo rs4898820-*Tas1*, em gel de acrilamida/bisacrilamida corado pela prata. GT: genótipo heterozigoto (93+110pb); TT: mutado (93pb); GG: selvagem (110pb)

Figura 7 - Fragmentos de PCR do polimorfismo 538T/C-*Hph1*, em gel de agarose impregnado com brometo de etídeo. TC: genótipo heterozigoto (197+110+87pb); CC: mutado (197pb); TT: selvagem (110+87pb)

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.9.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O princípio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas dos polimorfismos rs4898820G/T e 538T/C da nossa população estavam em equilíbrio genético. Este modelo matemático é utilizado para calcular as frequências genotípicas a partir das frequências alélicas. Demonstra que as frequências genotípicas de uma população se mantêm constantes quando não há força evolutiva atuando sobre a mesma. Para que o princípio seja demonstrado, a população em questão deve estar em equilíbrio genético. Portanto, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é muito útil para o estudo dos mecanismos evolutivos de uma população ⁽⁴⁸⁾. Diz-se que os polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando $p > 0,05$ ⁽⁴⁹⁾.

4.9.2 Análise estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos com distribuição normal foram realizadas apresentando as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão ($\pm DP$). Os dados quantitativos sem distribuição normal foram expressos através das medianas e intervalos interquartil 25-75% ($IQ_{25-75\%}$). O pressuposto da distribuição normal de cada variável foi avaliado com o teste de Kolmogorov Smirnov. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens.

4.9.3 Análise estatística inferencial

Para todas as variáveis que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste *t*-Student (dois grupos) e Anova de um fator (três grupos). Quando foi necessário realizar comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Bonferroni. Para as variáveis que não se verificou distribuição normal, recorreu-se aos testes não-paramétricos de Mann Whitney (dois grupos) e Kruskal Wallis (três grupos) e, para as comparações múltiplas, foi utilizado o

teste de Dunne. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui-Quadrado.

Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais.

As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 21 (SPSS 21.0 for Windows).

5 Resultados

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram estudadas, no total, 245 mulheres, sendo 142 pertencentes ao grupo SOP e 103 ao grupo controle. Todas as mulheres do grupo controle apresentavam ciclos regulares, não usavam contraceptivo hormonal e não apresentavam hirsutismo. As características clínicas estão apresentadas no Anexo D.

As pacientes do grupo SOP preencheram critérios diagnósticos segundo o consenso de Rotterdam. Neste grupo, 34,53% apresentavam amenorreia; 55,4% espaniomenorreia; 5,75% eram eumenorréicas e 4,32% metrorragia ou hipermenorreia. A prevalência de hirsutismo nas mulheres com SOP foi de 72,14% enquanto 27,86% tinham índice de Ferriman e Gallwey menor que 7. A análise das variáveis clínicas entre os grupos está resumida na Tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade ($p=0,991$). A comparação entre IMC e circunferência abdominal mostrou diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2 - Características clínicas das mulheres dos grupos SOP e Controle

Variável	Grupo	Média	±DP	Mediana	P
Idade^a	SOP	26,28	5,86	26,00	0,991
	Controle	26,49	6,55	25,00	
Altura^b	SOP	1,60	0,06	1,60	0,155
	Controle	1,61	0,07	1,62	
Peso^a	SOP	76,58	18,85	75,00	<0,001
	Controle	64,99	11,06	64,00	
IMC^a	SOP	29,77	7,00	29,36	<0,001
	Controle	24,89	3,92	24,46	
CA^b	SOP	93,15	16,91	93,00	0,002
	Controle	75,50	6,75	73,50	

^aTeste Mann Whitney; ^bTeste t- Student; Altura (m); Peso (Kg); IMC: índice de massa corpórea (Kg/m²); CA: circunferência abdominal (cm); DP: desvio padrão; p<0,05.

5.2 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

As características laboratoriais das mulheres estudadas estão apresentadas na Tabela 3 e nos Anexos E e F.

Não se observou diferença significativa entre os grupos em relação aos FSH, estradiol, prolactina, SDHEA, colesterol total e LDL. Houve diferença significativa entre os grupos quando comparados LH, testosterona total e livre, SHBG, androstenediona, 17-hidroxiprogesterona, HDL e triglicérides. As análises das comparações das variáveis laboratoriais estão resumidas nas Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis laboratoriais das mulheres dos grupos SOP e Controle

Variável	Grupo	Média	±DP	Mediana	P
FSH (IU/L)	SOP	5,0	1,48	5,00	0,467
	Controle	4,66	2,02	5,15	
LH (IU/L)	SOP	10,52	5,83	9,60	<0,001
	Controle	5,48	3,12	5,35	
Estradiol (pg/mL)	SOP	58,92	25,95	53,00	0,190
	Controle	63,68	54,17	43,35	
Prolactina (ng/dL)	SOP	8,69	4,43	7,80	0,203
	Controle	10,18	5,13	9,10	
Testosterona T (ng/dL)	SOP	93,44	39,62	88,00	<0,001
	Controle	42,18	20,18	39,50	
Testosterona L (pmol/L)	SOP	65,58	36,95	58,25	<0,001
	Controle	19,68	14,39	14,00	
SHBG (nmol/L)	SOP	34,34	19,09	29,00	<0,001
	Controle	65,11	31,29	58,00	
Androstenediona (ng/mL)	SOP	3,47	1,28	3,40	<0,001
	Controle	2,07	1,15	2,00	
SDHEA (ng/mL)	SOP	2350,14	1108,90	2240,00	0,990
	Controle	2354,14	958,61	2160,00	
17OH-P (ng/mL)	SOP	1,31	0,67	1,20	0,004
	Controle	0,92	0,77	0,70	
Colesterol Total (mg/dL)	SOP	177,18	31,61	178,00	0,681
	Controle	173,76	37,52	169,00	
HDL (mg/dL)	SOP	49,73	14,13	48,00	<0,001
	Controle	66,94	17,40	66,00	
LDL (mg/dL)	SOP	103,74	26,85	101,00	0,132
	Controle	93,29	25,97	96,00	
Triglicérides (mg/dL)	SOP	123,10	69,19	109,00	<0,001
	Controle	68,31	32,03	51,00	

Teste t-Student: FSH, androstenediona, SDHEA, Colesterol total, LDL; Mann Whitney: LH, Estradiol, Prolactina, Testosterona total e livre, SHBG, Glicose, HDL, Triglicérides, 17OH-progesterona, FSH: Hormônio folículo estimulante; LH: Hormônio Luteinizante. testosterona T: total; Testosterona L: livre; 17OH-P: 17hidroxi-progesterona; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade, p<0,05.

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E SOP

A Tabela 4 apresenta as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C nos grupos SOP e Controle. Não houve diferença significativa entre os grupos para o rs4898820. Quando analisadas as frequências alélicas para 538T/C, o p foi de 0,063 (Gráfico 1).

Tabela 4 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C nas mulheres com SOP e controle

Polimorfismo		SOP N(%)	Controle N(%)	Total	P
rs4898820					
Genótipo	GG	30 (22,10)	27 (27,30)	57	0,399
	GT	69 (50,70)	52 (52,50)	121	
	TT	37 (27,20)	20 (20,2)	57	
	Total	136	99		
Genótipo	GG	30 (22,10)	27 (27,30)	57	0,357
	GT+TT	106 (77,90)	72 (72,70)	178	
Alelo	G	129 (47,40)	106 (53,50)	235	0,191
	T	143 (52,60)	92 (46,50)	235	
	Total	272	198	470	
538T/C					
Genótipo	TT	45 (32,10)	40 (39,20)	85	0,133
	TC	62 (44,30)	48 (47,10)	110	
	CC	33 (23,60)	14 (13,70)	47	
	Total	140	102	242	
Genótipo	TT	45 (32,10)	40 (39,20)	85	0,255
	TC+CC	95 (67,90)	62 (60,80)	157	
Alelo	T	152 (54,30)	128 (62,70)	280	0,063
	C	128 (45,70)	76 (37,30)	204	
	Total	280	204	484	

rs4898820: GG: Selvagem; GT: heterozigoto; TT: Mutado. G: Selvagem; T: Mutado.
538T/C: TT: Selvagem; TC: Heterozigoto; CC: Mutado. T: selvagem; C: Mutado.

Gráfico 1 - Comparação entre as frequências alélicas para 538T/C nos grupos estudados

5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E HIRSUTISMO

As pacientes do grupo SOP foram subdividas em dois grupos, hirsutas ($F/G \geq 8$) e não hirsutas ($F/G < 8$), e comparadas com o grupo controle para avaliar a associação entre hirsutismo e os polimorfismos rs4898820 e 538T/C. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. A Tabela 5 mostra o resumo das análises.

Tabela 5 - Frequências genotípica e alélica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C em pacientes com SOP hirsutas e não hirsutas e controle

Polimorfismo		Hirsutas N (%)	Não Hirsutas N (%)	Controle N (%)	P
rs4898820 Genótipo	GG	25 (25,30)	5 (13,50)	27 (27,30)	0,200
	GT	45 (45,50)	24 (64,90)	52 (52,50)	
	TT	29 (29,30)	8 (21,60)	20 (20,20)	
	Total	99	37	99	
Alelo	G	95 (48,00)	34 (45,90)	106 (53,50)	0,407
	T	103 (52,00)	40 (54,10)	92 (46,50)	
	Total	198	74	198	
538T/C Genótipo	TT	32 (31,70)	13 (33,30)	40 (39,20)	0,297
	TC	47 (46,50)	15 (38,50)	48 (47,10)	
	CC	22 (21,80)	11 (28,20)	14 (13,70)	
	Total	101	39	102	
Alelo	T	110 (55,00)	41 (52,60)	128 (62,70)	0,166
	C	91 (45,00)	37 (47,4)	76 (37,30)	
	Total	201	78	201	

rs4898820: GG: Selvagem; GT: heterozigoto; TT: Mutado; G: Selvagem. T: Mutado.
538T/C: TT: Selvagem; TC: Heterozigoto; CC: Mutado; T: selvagem. C: Mutado.

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO rs4898820 E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DAS PACIENTES COM SOP

No intuito de avaliar a influência dos diferentes genótipos sobre os achados clínicos e laboratoriais, realizou-se o estudo de associação entre os genótipos GG (selvagem), GT (heterozigoto) e TT (mutado). Uma vez que a literatura não apresenta nenhum trabalho nesta área, decidiu-se também estudar o impacto do genótipo heterozigoto em relação ao selvagem e ao mutado nas seguintes configurações:

Genótipos selvagem e heterozigoto versus mutado- GG+GT/TT;

Genótipos heterozigoto e mutado versus selvagem- GT+TT/GG. As análises estão representadas nos Anexos G, H e I.

Não houve associação entre as variantes clínicas e o polimorfismo (Anexo G).

Associação entre os genótipos GG, GT e TT e as variantes laboratoriais

Encontrou-se diferença significativa neste grupo para o FSH ($p<0,001$). Pacientes com genótipo heterozigoto (GT) apresentaram valores de FSH menores que aquelas com genótipo selvagem (GG) ou homozigoto recessivo (TT), Gráfico 2A. A comparação entre os genótipos pelo teste de Bonferroni mostrou $p=0,001$ para TT x GT, $p=0,099$ para TT X GG e $p=0,112$ para GT X GG.

Associação entre genótipos selvagem e heterozigoto versus mutado (GG + GT/ TT) e as variantes laboratoriais

Comparando-se a associação dos genótipos selvagem (GG) e heterozigoto (GT) com o homozigoto recessivo (TT), também observou-se diferença estatística para o FSH ($p=0,008$). Pacientes com menores níveis

de FSH apresentaram maior frequência dos genótipos selvagem (GG) e heterozigoto. O Gráfico 2B ilustra a distribuição dos genótipos de acordo com os grupos.

Gráfico 2 - Polimorfismo rs4898820 e Hormônio Folículo Estimulante (FSH-IU/L). **A:** Comparação entre os genótipos GG, GT, TT; **B:** Comparação entre os genótipos GG+GT e TT nas pacientes com SOP

Associação entre genótipos mutado e heterozigoto versus selvagem (TT + GT/ GG) e as variantes laboratoriais

Não se observou diferença significativa quando comparados os genótipos que apresentavam pelo menos um alelo alterado (GT e TT), em relação ao selvagem (GG).

5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO 538T/C E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DAS PACIENTES COM SOP

No intuito de avaliar a influência dos diferentes genótipos sobre os achados clínicos e laboratoriais, realizou-se o estudo de associação entre os genótipos TT (selvagem), TC (heterozigoto) e CC (mutado). Uma vez que a literatura não apresenta nenhum trabalho nesta área, decidiu-se também estudar o impacto do genótipo heterozigoto em relação ao selvagem e ao mutado nas seguintes configurações:

Genótipos selvagem e heterozigoto versus mutado- TT+TC/CC;

Genótipos heterozigoto e mutado versus selvagem- TC+CC/TT. As análises estão representadas nos Anexos G, H e I.

Não houve associação entre as variantes clínicas e o polimorfismo (Anexo G).

Associação entre os genótipos TT, TC e CC e as variantes laboratoriais

Encontrou-se diferença estatística para o índice HOMA-IR ($p=0,015$). A presença do genótipo heterozigoto mostrou correlação com os maiores índices de HOMA-IR. O Gráfico 3A ilustra a distribuição genotípica destas variáveis. A comparação entre os genótipos pelo teste de Bonferroni mostrou $p=0,024$ para CC x TC, $p=0,099$ para CC X TT e $p=0,112$ para TC X TT.

Associação entre genótipos selvagem e heterozigoto versus mutado (CC + TC/ TT) e as variantes laboratoriais

Observou-se diferença estatística para o HOMA-IR ($p=0,045$), glicose ($p=0,038$) e SHBG ($p=0,002$). A presença do genótipo homozigoto recessivo CC apresentou correlação com maiores valores de SHBG, menores níveis

glicêmicos e maior sensibilidade insulínica. Os dados estão representados nos Gráficos 3B, 4 e 5, respectivamente.

Gráfico 3 - Polimorfismo 538T/C e HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment). **A:** Comparação entre os genótipos TT, TC e CC. **B:** Comparação entre os genótipos TT+TC e CC nas pacientes com SOP

Gráfico 4 - Polimorfismo 538T/C e glicose (mg/dL). Comparação entre os genótipos TT+TC e CC nas pacientes com SOP

Gráfico 5 - Polimorfismo 538T/C e proteína carreadora dos hormônios sexuais (SHBG nmol/L)

Associação entre os genótipos TC + CC /TT e as variantes laboratoriais

Observou-se diferença estatística para a testosterona livre. A presença de pelo menos um alelo mutado mostrou associação com menores níveis testosterona livre (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Polimorfismo 538T/C e testosterona livre (pmol/L)

6 Discussão

A SOP é o distúrbio endócrino mais frequente nas mulheres em idade reprodutiva. Muito tem sido discutido sobre sua atual nomenclatura, critérios diagnósticos e complicações futuras ^(47, 50, 51, 52). A Sociedade de Excesso de Androgênio (AES) em 2009, através de revisão da literatura baseada em evidências considerou a SOP uma alteração primariamente relacionada ao hiperandrogenismo. O hirsutismo é o principal marcador clínico do hiperandrogenismo ⁽⁶⁾ porém, nem todas as mulheres com hirsutismo apresentam androgênios séricos elevados. Por outro lado, mulheres com valores elevados de androgênios podem não apresentar hirsutismo ⁽⁵³⁾. Isto demonstra que a fisiopatologia do hirsutismo é muito complexa e envolve outros fatores além dos androgênios.

Na nossa população de estudo, 72,14% das pacientes com SOP analisadas apresentavam hirsutismo na primeira consulta, enquanto 27,86% não eram hirsutas. A presença de hirsutismo neste estudo foi semelhante à encontrada por Azziz e colaboradores em 2004, onde avaliaram mil mulheres com excesso de androgênio e encontraram uma prevalência de hirsutismo em 75,5% destas mulheres ⁽⁵³⁾. As mulheres do grupo controle não apresentavam hirsutismo.

Para o ciclo menstrual, 94,25% das pacientes SOP apresentavam algum distúrbio menstrual (amenorréia, espaniomenorréia, hipermenorragia e metrorragia), apenas 5,75% apresentavam ciclos eumenorréicos (8 mulheres). Destas mulheres eumenorréicas, apenas uma apresentou progesterona ovulatória, sendo considerada como SOP ovulatória, as demais, apesar de eumenorréicas, eram anovulatórias. No grupo controle, todas as mulheres apresentavam ciclos regulares sem uso de contraceptivos hormonais.

O peso, IMC e circunferência abdominal foram muito diferentes entre os grupos SOP e controle. Parte desta diferença pode ser explicada pela própria síndrome que promove um estado hiperandrogênico e

hiperinsulinêmico que contribuem para o estabelecimento e manutenção da obesidade, em especial a obesidade visceral ⁽⁵⁴⁾.

6.1 POLIMORFISMOS E PRESENÇA DE SOP E HIRSUTISMO

Este é o primeiro estudo realizado para avaliar polimorfismos do *BMP4* em pacientes com SOP e sua associação com a presença de hirsutismo e alterações metabólicas e hormonais. Nossa hipótese inicial era a de que modificações no gene *BMP4* poderiam se relacionar a condições clínicas em que as fases de crescimento do pelo se encontrariam alteradas.

Dois estudos avaliaram a proteína BMP4 em pacientes com SOP, mas não polimorfismos. van Houten e colaboradores em 2013, estudaram 14 mulheres com SOP através da dosagem sérica de BMP2, BMP4 e BMP6 por imunoenensaio e relataram níveis indetectáveis em todas as análises ⁽⁵⁵⁾. Khalaf e colaboradores, analisaram células da granulosa (obtidas quando as pacientes foram submetidas à fertilização in vitro) em oito mulheres com SOP e seis controles e não encontraram diferença na expressão proteica do BMP4 entre os grupos ⁽⁵⁶⁾.

O primeiro polimorfismo do *BMP4* foi descrito por Mangino e colaboradores em 1999, através da técnica de RFLP por meio da digestão com *Hph*1. Estes pesquisadores localizaram o polimorfismo na posição 538 do gene e a troca de nucleotídeos timina pela citosina, o que leva à troca do aminoácido valina para alanina ⁽⁴²⁾. Em 2010, Abhishek e colaboradores analisaram este polimorfismo na anemia falciforme (doença hematológica causada por uma mutação no gene da hemoglobina e que cursa com complicações ósseas devido à hiperplasia da medula óssea e oclusões vasculares). Estes autores não encontraram associação entre a doença e presença do polimorfismo ⁽⁴⁵⁾. Por outro lado, Lin e colaboradores encontraram associação entre o polimorfismo e a presença de lábio leporino em crianças chinesas e levantaram a possibilidade da troca de aminoácidos levar à síntese de uma variante de BMP4 funcionalmente insuficiente,

resultando em uma mudança quantitativa ou qualitativa na produção do BMP ou na eficácia na ligação ao seu receptor ⁽⁵⁷⁾.

O polimorfismo rs4898820 (pesquisado por meio da enzima de restrição *Tas1*), está localizado na posição -3445 do gene *BMP4*, no sítio de ligação do fator de transcrição do MRF-2, um fator de transcrição adipócito-específico, e consiste na troca de uma Timina por Guanina ^(43, 46). Capasso e colaboradores avaliaram a presença deste e de outros polimorfismos em indivíduos sãos e em portadores de melanoma cutâneo e não encontraram associação para o polimorfismo rs4898820 ⁽⁴⁶⁾.

No presente estudo, não foi encontrada associação entre o polimorfismo rs4898820 e presença de SOP. Quando avaliada a frequência alélica para o polimorfismo 538T/C, o p foi marginal ($p=0,063$), mostrando uma tendência para a associação deste polimorfismo e SOP. Talvez um número maior de pacientes pudesse demonstrar esta associação.

A associação entre os polimorfismos e hirsutismo também não foi confirmada. Em estudo piloto prévio, com vinte mulheres no grupo controle e quarenta pacientes com SOP (vinte com hirsutismo e vinte sem hirsutismo), foi encontrada uma tendência à maior prevalência do genótipo homozigoto recessivo, de praticamente o dobro, nas mulheres com SOP e hirsutismo para o polimorfismo rs4898820, enquanto o grupo SOP sem hirsutismo foi semelhante ao controle, o que nos motivou a continuar o estudo e aumentar a população estudada. Com o aumento da amostra a hipótese inicial não foi confirmada. Não existem outros artigos na literatura que tenham comparado a presença de polimorfismos do *BMP4* e presença de hirsutismo em pacientes com SOP. O estudo mais próximo foi o realizado por Sproul e colaboradores em 2010, onde avaliaram dois polimorfismos do *GDF9* (rs11739194 e rs30178) e encontraram maiores escores de F/G em portadores do alelo mutado. Estes autores associaram a diferença do escore ao aumento da produção androgênica pelas células da teca ovariana, que poderia ser estimulado pela presença destes polimorfismos ⁽²⁷⁾.

6.2 POLIMORFISMOS E VARIÁVEIS LABORATORIAIS

Na análise do polimorfismo rs4898820, identificamos associação estatisticamente significativa entre a variação genética e os níveis de FSH. Pacientes com SOP portadoras do genótipo TT (mutado) apresentaram maiores níveis de FSH que as portadoras dos genótipos GT e GG.

A síntese e liberação do LH e FSH são reguladas pelo GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), pelos esteróides gonadais e por membros da família TGF- β (fator de crescimento tumoral-beta) como as activinas e inibinas. As activinas estimulam a secreção de FSH enquanto as inibinas diminuem sua síntese e liberação, e o aumento da frequência dos pulsos de GnRH promove a secreção do LH enquanto a diminuição da frequência dos pulsos promove a secreção de FSH ⁽⁵⁸⁾. Recentemente, membros das BMPs, da superfamília TGF β , , demonstraram serem capazes de modular a secreção de FSH ^(58, 59, 60). Faure e colaboradores, estudando células hipofisárias de ovinos, demonstraram que o BMP4 e BMP6 são capazes de diminuir os níveis de FSH, antagonizar o efeito da activina na secreção do FSH e de amplificar o efeito inibitório do 17- β estradiol. Estes autores demonstraram ainda que o efeito inibidor do BMP foi encontrado apenas para o FSH e não para o LH ⁽⁵⁹⁾. Teresaka e colaboradores estudando células produtoras de GnRH de murinos, demonstraram que a BMP4 suprime a expressão de GnRH induzida pela Kisspeptina (componente chave na regulação da secreção do GnRH em humanos e outros mamíferos) ⁽⁶⁰⁾. Segundo Faure e colaboradores, a diferença de efeito do BMP na secreção de FSH entre murinos e ovinos poderia refletir diferentes padrões de receptores da BMP, levando a diferentes vias de sinalização ⁽⁵⁹⁾. Independente da via de sinalização, a BMP4 é capaz de interferir na secreção do FSH e a diferença entre os níveis e FSH encontrada neste estudo poderia ser explicada pela maior ou menor ação da BMP4 nas células gonadotróficas das pacientes portadoras do polimorfismo. Não existem estudos na literatura que tenham avaliado estes achados para

que pudesse ser feita comparação e pouco se sabe sobre o efeito da troca da base guanina para timina na promoção de alguma alteração estrutural ou funcional da proteína codificada. O que se sabe é que este polimorfismo está localizado em uma região reguladora de transcrição ⁽⁴⁶⁾.

Encontrou-se associação entre o polimorfismo 538 T/C e maiores níveis de SHBG, menor resistência insulínica e menores níveis glicêmicos na pacientes portadoras do genótipo mutado (CC). Sabe-se que a BMP4 está expressa em células β pancreáticas, assim como seu receptor BMPR1A e que sua ação, via sinalização pela SMAD, está envolvida no processo de expressão e secreção da insulina. Ratos com menor expressão do receptor do BMPR1A apresentam diminuição da expressão de genes envolvidos na produção insulínica com consequente desenvolvimento de diabetes ⁽⁶¹⁾. Além disso, a BMP4 está também expressa em adipócitos humanos, tanto subcutâneo quanto visceral e sua maior concentração está inversamente relacionada ao índice de massa corpórea (IMC). Estes resultados sugerem que o *BMP* participa do processo de regulação da adipogênese e suas consequências metabólicas ⁽⁶²⁾. Qian e colaboradores ainda encontraram que a BMP4 é capaz de remodelar a célula de gordura branca para um adipócito com estrutura e função semelhante à da célula de gordura marrom, aumentando assim a taxa metabólica corporal e melhorando a sensibilidade insulínica ⁽⁶²⁾. Relacionando os dados encontrados na literatura com os achados do nosso estudo, pode-se pensar que a presença do polimorfismo 538 T/C levaria a um efeito protetor nas pacientes com SOP portadoras dessa variação. Não é sabido quais efeitos estes polimorfismos provocariam na estrutura e função da proteína do BMP4. Lin e colaboradores, em estudo de crianças chinesas com lábio leporino, encontraram que a presença do genótipo TT (fragmentos de 110 + 87pb), se correlacionou ao maior risco de fenda palatina. Estes autores sugerem que a troca dos aminoácidos poderia levar a uma variante da proteína BMP4 funcionalmente insuficiente, resultante de uma mudança qualitativa ou quantitativa na produção local da proteína BMP4 ou na efetividade quando ligada ao seu receptor ⁽⁵⁷⁾. Pensando assim, as portadoras do genótipo mutado (CC), deste estudo,

poderiam apresentar maior expressão de BMP4 nas células pancreáticas e adiposas, levando a um efeito protetor.

A presença deste polimorfismo também apresentou associação positiva com a testosterona livre ($p=0,037$). Menores níveis de testosterona livre se correlacionaram à presença de pelo menos um alelo mutado. Em 2000, Dooley e colaboradores ⁽³²⁾ demonstraram a presença de BMP4 e activina em cultivo de células da teca humana e sua participação na esteroidogênese. Quando as células eram estimuladas com forskolina na presença de BMP4, a produção de androstenediona era inibida. O mesmo efeito não foi encontrado para a progesterona, que não era inibida. Ao estudarem a ação da BMP4 sobre as enzimas CYP17, CYP11A1, 3 β HSD e Star, verificaram que a BMP4 inibia a ação da enzima CYP17, o que explicaria a redução na produção de androstenediona e não da progesterona. Esta hipótese também foi confirmada por Glister e colaboradores em 2005 ⁽³³⁾, em estudo com células ovarianas da teca de bovinos. Estes pesquisadores demonstraram que a BMP4, 6 e 7 são capazes de suprimir a produção de androstenediona basal durante indução com LH e que esta supressão é dose-dependente. Também verificaram a diminuição da expressão de mRNA da CYP17, identificando esta enzima como o alvo da BMP. Talvez, a associação positiva entre polimorfismo e testosterona livre possa ser explicada em parte pela produção e/ou ação local do BMP4 nas células da teca, levando a menor produção androgênica, apesar dos níveis de androstenediona e testosterona total não terem sido significativos e em parte pelos achados de níveis de SHBG mais elevados nas portadoras do polimorfismo.

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos e a presença de hirsutismo como esperado, porém achados interessantes no perfil metabólico das pacientes portadoras do polimorfismo 538 T/C abrem portas para que maiores estudos sejam realizados tanto sobre o polimorfismo quanto ao um provável efeito protetor do BMP4 nestas pacientes.

Talvez para o polimorfismo 538T/C, ampliando-se os grupos, poderíamos encontrar uma correlação entre SOP e prevalência de polimorfismo, mas não para o hirsutismo.

7 Conclusões

1. Não houve diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C entre mulheres com e sem a síndrome dos ovários policísticos.
2. Não houve diferença significativa na frequência alélica e genotípica dos polimorfismos entre as mulheres com e sem a síndrome dos ovários policísticos para presença de hirsutismo.
3. Nas pacientes com SOP, não houve diferença significativa entre os polimorfismos e presença de hirsutismo, IMC ou circunferência abdominal. Houve associação significativa entre o polimorfismo rs4898820 e níveis aumentados de FSH. Houve associação significativa entre o polimorfismo 538T/C e níveis mais elevados de SHBG, menores níveis de glicose, maior sensibilidade à insulina e níveis menores de testosterona livre.

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética para Projetos de Pesquisa- CAPPesq

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 25/03/2011, **APROVOU** *ad-referendum* o Protocolo de Pesquisa nº 0576/10, intitulado: "ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO HIRSUTISMO EM PACIENTES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS" apresentado pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologista, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Gustavo Arantes Rosa Maciel

Pesquisador (a) Executante: Daniella De Grande Curi

CAPPesq, 25 de março de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO

Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Grupo SOP**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO HIRSUTISMO EM
PACIENTES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

2. PESQUISADOR Executante : Daniella De Grande Curi

PESQUISADOR Responsável : Gustavo Arantes Rosa Maciel

CARGO/FUNÇÃO: Assistente da Disciplina de Ginecologia.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 87874.

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): A senhora está sendo convidada a participar voluntariamente desta pesquisa por ter sido diagnosticada com a síndrome dos ovários policísticos. Essas informações estão sendo fornecidas a senhora ou seu responsável, para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar pacientes que apresentam a síndrome dos ovários policísticos. O objetivo deste estudo é verificar se existem diferenças genéticas entre mulheres com a síndrome e mulheres sem a doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: será executada coleta de sangue da veia do antebraço, além de serem realizadas avaliações clínicas como peso, pressão arterial, quantificação dos pêlos e medida da circunferência abdominal. O sangue coletado será utilizado para análises hormonais, glicemia, colesterol total e frações e estudo genético (polimorfismos) nos genes responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome dos ovários policísticos.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço e exame clínico. Serão coletados aproximadamente cinco tubos de ensaio.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: A senhora poderá sentir desconforto na hora da coleta do sangue devido a picada com a agulha e, eventualmente, apresentar hematoma no local.

5 – Benefícios para o participante: Este estudo tem por finalidade facilitar o tratamento do excesso de pêlos de mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, no futuro.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não existe outro tipo de procedimento alternativo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer momento do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr Gustavo A.R. Maciel que pode ser encontrado no endereço: Av Dr Enéas de Carvalho, 255, Instituto Central, Ginecologia, 10º andar, fone: 30696647 (Clínica Ginecológica). Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as demais pacientes, não sendo divulgada a sua identificação;

10 – Direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais e totais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Eu discuti com o Dr Gustavo Arantes Rosa Maciel sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Grupo Controle**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATANASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO:M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO: NºAPTO:.....

BAIRRO.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO HIRSUTISMO EM
PACIENTES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

2. PESQUISADOR Executante : Daniella De Grande Curi

PESQUISADOR Responsável : Gustavo Arantes Rosa Maciel

CARGO/FUNÇÃO: Assistente da Disciplina de Ginecologia.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 87874.

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): A senhora está sendo convidada a participar voluntariamente deste estudo por não apresentar a doença em questão e, portanto, fará parte do grupo controle. Essas informações estão sendo fornecidas a senhora ou seu responsável, para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar pacientes que apresentam a síndrome dos ovários policísticos. O objetivo deste estudo é verificar se existem diferenças genéticas entre mulheres com a síndrome e mulheres sem a doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: será executada coleta de sangue da veia do antebraço, além de serem realizadas avaliações clínicas como peso, pressão arterial, quantificação dos pêlos e medida da circunferência abdominal. O sangue coletado será utilizado para análises hormonais, glicemia, colesterol total e frações e estudo genético (polimorfismos) nos genes responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome dos ovários policísticos. Serão coletados aproximadamente cinco tubos de ensaio.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – será executada coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço e exame clínico.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: A senhora poderá sentir desconforto na hora da coleta do sangue devido à picada com a agulha e, eventualmente, apresentar hematoma no local.

5 – Benefícios para o participante: Este estudo tem por finalidade facilitar o tratamento do excesso de pêlos de mulheres com a síndrome dos ovários policísticos, no futuro. Para a senhora, que não apresenta a doença, não há benefício direto, porém a senhora estará contribuindo para avanços no diagnóstico e tratamento da síndrome.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não existe outro tipo de procedimento alternativo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer momento do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr Gustavo A.R. Maciel que pode ser encontrado no endereço: Av Dr Enéas de Carvalho, 255, Instituto Central, Ginecologia, 10º andar, fone: 30696647 (Clínica Ginecológica).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 –E-mail: cappel@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as demais pacientes, não sendo divulgada a sua identificação;

10 – Direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais e totais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Eu discuti com o Dr Gustavo Arantes Rosa Maciel sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual). *(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle

Número	Grupo	Idade	CM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
1	SOP	28	2	85,60	1,55	35,63	—	17
2	SOP	21	1	98,35	1,64	36,57	113	3
3	SOP	26	2	58,00	1,65	21,30	—	17
4	SOP	31	1	87,70	1,53	37,46	114	20
5	SOP	22	4	89,60	1,55	37,29	104	17
6	SOP	26	2	63,30	1,68	22,43	76	3
7	SOP	18	2	63,20	1,58	25,32	78	15
8	SOP	31	2	62,00	1,50	27,56	85	18
9	SOP	35	2	78,20	1,53	33,41	96	15
10	SOP	23	2	47,10	1,55	19,60	69	6
11	SOP	27	2	66,00	1,58	26,44	96	6
12	SOP	33	1	83,40	1,57	33,84	121	6
13	SOP	26	2	55,00	1,57	22,31	—	14
14	SOP	25	2	82,70	1,60	32,30	89	4
15	SOP	30	2	97,00	1,76	31,31	105	6
16	SOP	19	1	95,60	1,60	37,34	106	18
17	SOP	20	3	79,95	1,68	28,33	94	16
18	SOP	23	1	50,60	1,65	18,59	74	27
19	SOP	24	1	58,15	1,61	22,43	79	1
20	SOP	23	1	95,05	1,62	36,22	110	17
21	SOP	26	1	100,20	1,55	41,71	129	22
22	SOP	30	2	69,10	1,50	30,71	96	17
23	SOP	36	3	76,50	1,66	27,76	101	12
24	SOP	30	2	84,30	1,68	29,87	97	4
25	SOP	21	1	52,60	1,45	25,02	80	17
26	SOP	26	1	54,85	1,54	23,13	—	15
27	SOP	25	4	99,60	1,69	34,87	100	0
28	SOP	34	3	81,60	1,57	33,10	—	15
29	SOP	32	2	82,85	1,53	35,39	—	8
30	SOP	25	2	58,00	1,62	22,10	106	3
31	SOP	21	4	62,80	1,56	25,81	82	14
32	SOP	26	2	116,40	1,74	38,45	—	7
33	SOP	38	2	79,00	1,65	29,02	107	30
34	SOP	26	—	—	—	—	—	8
35	SOP	32	2	60,10	1,64	22,35	—	8
36	SOP	31	2	95,00	1,69	33,26	—	8
37	SOP	26	1	55,00	1,59	21,76	—	10
38	SOP	25	2	91,90	1,61	35,45	118	10
39	SOP	30	1	75,00	1,61	28,93	—	13
40	SOP	18	2	64,70	1,63	24,35	93	9

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (continuação)

Número	Grupo	Idade	CM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
41	SOP	18	2	54,20	1,62	20,65	68	12
42	SOP	31	1	61,20	1,52	26,49	85	14
43	SOP	28	1	66,45	1,70	22,99	72	17
44	SOP	18	2	84,40	1,67	30,26	90	18
45	SOP	34	2	78,30	1,54	33,02	93	8
46	SOP	29	2	98,70	1,63	37,15	107	8
47	SOP	25	1	79,50	1,56	32,67	94	14
48	SOP	30	1	53,40	1,63	20,10	69	11
49	SOP	19	2	62,75	1,59	24,82	—	9
50	SOP	27	2	77,55	1,63	29,19	95	23
51	SOP	34	1	63,60	1,51	27,89	—	15
52	SOP	34	2	69,80	1,58	27,96	83	19
53	SOP	20	2	57,60	1,68	20,41	—	0
54	SOP	18	2	73,40	1,53	31,36	84	14
55	SOP	31	2	55,70	1,58	22,31	78	11
56	SOP	33	2	82,05	1,55	34,15	113	7
57	SOP	20	2	57,60	1,69	20,17	—	11
58	SOP	34	2	113,25	1,62	43,15	112	13
59	SOP	28	1	94,80	1,72	32,04	113	7
60	SOP	18	2	53,10	1,55	22,10	77	11
61	SOP	25	2	83,45	1,71	28,54	102	8
62	SOP	27	1	47,40	1,64	17,62	64	7
63	SOP	27	1	108,15	1,65	39,72	112	8
64	SOP	32	2	57,60	1,68	20,41	—	3
65	SOP	18	2	83,30	1,70	28,82	103	22
66	SOP	20	2	55,60	1,60	21,72	—	10
67	SOP	36	2	82,00	1,59	32,44	—	9
68	SOP	18	2	45,00	1,51	19,74	62	9
69	SOP	34	2	101,00	1,65	37,10	118	11
70	SOP	38	1	101,00	1,68	35,79	112	20
71	SOP	37	1	82,20	1,50	36,53	—	4
72	SOP	19	1	68,65	1,54	28,95	85	8
73	SOP	29	1	105,00	1,66	38,10	—	12
74	SOP	29	2	81,50	1,56	33,49	105	10
75	SOP	37	2	71,60	1,55	29,80	—	1
76	SOP	31	2	97,50	1,65	35,81	106	12
77	SOP	21	2	102,95	1,63	38,75	115	7
78	SOP	27	3	47,15	1,56	19,37	68	9
79	SOP	23	2	90,00	1,60	35,16	92	16
80	SOP	34	2	103,00	1,64	38,30	—	9

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (continuação)

Número	Grupo	Idade	PM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
81	SOP	21	1	75,00	1,60	29,30	90	13
82	SOP	29	2	90,65	1,52	39,24	120	23
83	SOP	27	1	79,50	1,64	29,56	97	6
84	SOP	32	1	79,70	1,57	32,33	107	11
85	SOP	23	2	73,00	1,66	26,49	82	4
86	SOP	28	1	78,50	1,56	32,26	106	28
87	SOP	18	1	54,90	1,61	21,31		18
88	SOP	19	2	104,25	1,66	37,83	112	27
89	SOP	26	2	63,45	1,68	22,48	79	6
90	SOP	32	1	86,70	1,53	37,04		24
91	SOP	25	2	94,80	1,61	36,57	100	5
92	SOP	28	1	115,00	1,72	38,87	111	16
93	SOP	24	1	71,70	1,67	25,71	91	18
94	SOP	22	2	92,89	1,66	33,71	91	20
95	SOP	20	2	43,00	1,48	19,63	68	5
96	SOP	30	2	58,75	1,60	22,95	78	21
97	SOP	30	2	93,05	1,68	32,97	109	2
98	SOP	24	3	71,55	1,55	29,78	89	16
99	SOP	29	1	97,10	1,69	34,00	101	21
100	SOP	29	2	73,55	1,55	30,61	100	18
101	SOP	35	2	87,00	1,71	29,75	—	24
102	SOP	30	2	58,90	1,49	26,53	72	16
103	SOP	31	2	56,45	1,52	24,43	—	17
104	SOP	18	3	51,40	1,59	20,33	68	22
105	SOP	28	1	95,40	1,61	36,80	106	15
106	SOP	34	3	74,80	1,47	34,62	114	24
107	SOP	24	1	58,50	1,61	22,57	70	17
108	SOP	29	2	76,35	1,56	31,37	97	3
109	SOP	23	1	51,40	1,52	22,25	71	22
110	SOP	23	2	99,05	1,58	39,68	66	2
111	SOP	21	1	88,69	1,56	36,44	103	6
112	SOP	23	2	71,95	1,53	30,74	89	5
113	SOP	18	2	100,40	1,62	38,26	108	30
114	SOP	33	2	50,10	1,53	21,40	71	2
115	SOP	29	2	78,55	1,65	28,85	91	15
116	SOP	27	1	131,55	1,63	49,51	130	13
117	SOP	23	2	72,75	1,57	29,51	89	25
118	SOP	33	2	62,00	1,48	28,31	96	8
119	SOP	32	1	62,60	1,58	25,08	78	12
120	SOP	26	2	64,75	1,58	25,94	83	18

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (continuação)

Número	Grupo	Idade	PM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
121	SOP	20	4	—	—	—	—	3
122	SOP	29	1	75,00	1,70	25,95	90	20
123	SOP	33	1	91,10	1,51	39,95	118	10
124	SOP	23	2	59,10	1,68	20,94	—	2
125	SOP	28	1	70,70	1,55	29,43	—	7
126	SOP	22	4	55,05	1,65	20,22	75	1
127	SOP	37	2	70,15	1,62	26,73	89	9
128	SOP	24	1	53,75	1,59	21,26	70	5
129	SOP	21	3	60,10	1,60	23,48	74	10
130	SOP	18	4	64,70	1,58	25,92	77	12
131	SOP	18	2	130,85	1,59	51,76	135	14
132	SOP	21	2	95,95	1,66	34,82	97	6
133	SOP	25	2	69,15	1,61	26,68	81	13
134	SOP	18	2	52,00	1,61	20,06	67,5	8
135	SOP	24	1	61,40	1,64	22,83	71	15
136	SOP	18	2	73,00	1,68	25,86	—	15
137	SOP	18	1	77,25	1,68	27,37	84	22
138	SOP	24	1	108,15	1,50	48,07	111	18
139	SOP	41	1	102,86	1,56	42,27	—	8
140	SOP	27	1	101,00	1,67	36,21	—	10
141	Controle	34	3	63,00	1,70	21,80	77	0
142	Controle	38	3	58,00	1,61	22,38	—	0
143	Controle	33	3	—	1,70	—	86,5	0
144	Controle	21	3	58,00	1,64	21,56	70,5	0
145	Controle		3	65,00	1,78	20,52	70	0
146	Controle		3	55,55	1,60	21,70	73,5	0
147	Controle	20	3	—	—	—	—	0
148	Controle	18	3	—	—	—	—	0
149	Controle	18	3	—	—	—	—	0
150	Controle	19	3	—	—	—	—	0
151	Controle	18	3	—	—	—	—	0
152	Controle	18	3	—	—	—	—	0
153	Controle	18	3	—	—	—	—	0
154	Controle	18	3	—	—	—	—	0
155	Controle	19	3	—	—	—	—	0
156	Controle	18	3	—	—	—	—	0
157	Controle	20	3	—	—	—	—	0
158	Controle	18	3	—	—	—	—	0
159	Controle	19	3	—	—	—	—	0
160	Controle	19	3	—	—	—	—	0

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (continuação)

Número	Grupo	Idade	PM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
161	Controle	20	3	—	—	—	—	0
162	Controle	19	3	—	—	—	—	0
163	Controle	18	3	—	—	—	—	0
164	Controle	19	3	—	—	—	—	0
165	Controle	18	3	—	—	—	—	0
166	Controle	19	3	—	—	—	—	0
167	Controle	21	3	—	—	—	—	0
168	Controle	18	3	—	—	—	—	0
169	Controle	18	3	—	—	—	—	0
170	Controle	28	3	—	—	—	—	0
171	Controle	26	3	—	—	—	—	0
172	Controle	33	3	—	—	—	—	0
173	Controle	27	3	—	—	—	—	0
174	Controle	31	3	—	—	—	—	0
175	Controle	28	3	—	—	—	—	0
176	Controle	21	3	—	—	—	—	0
177	Controle	23	3	—	—	—	—	0
178	Controle	19	3	—	—	—	—	0
179	Controle	29	3	—	—	—	—	0
180	Controle	25	3	—	—	—	—	0
181	Controle	23	3	—	—	—	—	0
182	Controle	22	3	—	—	—	—	0
183	Controle	24	3	—	—	—	—	0
184	Controle	24	3	—	—	—	—	0
185	Controle	21	3	—	—	—	—	0
186	Controle	23	3	—	—	—	—	0
187	Controle	24	3	—	—	—	—	0
188	Controle	18	3	—	—	—	—	0
189	Controle	30	3	67,00	1,67	24,02	—	0
190	Controle	30	3	80,00	1,65	29,38	—	0
191	Controle	39	3	64,00	1,62	24,39	—	0
192	Controle	23	3	53,00	1,63	19,95	—	0
193	Controle	32	3	70,00	1,66	25,40	—	0
194	Controle	25	3	69,00	1,64	25,65	—	0
195	Controle	28	3	79,00	1,57	32,05	—	0
196	Controle	34	3	64,00	1,70	22,15	—	0
197	Controle	33	3	72,00	1,60	28,13	—	0
198	Controle	40	3	67,00	1,60	26,17	—	0
199	Controle	25	3	—	—	—	—	0
200	Controle	38	3	—	—	—	—	0

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (continuação)

Paciente	Grupo	Idade	PM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
201	Controle	28	3	53,00	1,56	21,78	—	0
202	Controle	34	3	52,00	1,48	23,74	—	0
203	Controle	25	3	52,00	1,63	19,57	—	0
204	Controle	39	3	65,00	1,58	26,04	—	0
205	Controle	26	3	65,00	1,57	26,37	—	0
206	Controle	39	3	77,00	1,61	29,71	—	0
207	Controle	32	3	49,00	1,54	20,66	—	0
208	Controle	40	3	65,00	1,60	25,39	—	0
209	Controle	34	3	59,00	1,57	23,94	—	0
210	Controle	31	3	88,00	1,65	32,32	—	0
211	Controle	24	3	68,00	1,55	28,30	—	0
212	Controle	30	3	95,00	1,70	32,87	—	0
213	Controle	30	3	66,00	1,60	25,78	—	0
214	Controle	32	3	90,00	1,69	31,51	—	0
215	Controle	31	3	77,00	1,59	30,46	—	0
216	Controle	29	3	60,00	1,56	24,65	—	0
217	Controle	30	3	57,00	1,65	20,94	—	0
218	Controle	34	3	53,00	1,63	19,95	—	0
219	Controle	28	3	65,00	1,63	24,46	—	0
220	Controle	29	3	64,00	1,60	25,00	—	0
221	Controle	22	3	58,00	1,70	20,07	—	0
222	Controle	31	3	54,00	1,62	20,58	—	0
223	Controle	28	3	76,00	1,50	33,78	—	0
224	Controle	34	3	64,00	1,75	20,90	—	0
225	Controle	21	3	52,00	1,68	18,42	—	0
226	Controle	22	3	80,00	1,79	24,97	—	0
227	Controle	35	3	58,00	1,54	24,46	—	0
228	Controle	24	3	58,00	1,58	23,23	—	0
229	Controle	40	3	65,00	1,71	22,23	—	0
230	Controle	26	3	63,00	1,57	25,56	—	0
231	Controle	33	3	68,00	1,56	27,94	—	0
232	Controle	23	3	97,00	1,72	32,79	—	0
233	Controle	28	3	71,00	1,62	27,05	—	0
234	Controle	24	3	57,00	1,63	21,45	—	0
235	Controle	24	3	50,00	1,63	18,82	—	0
236	Controle	25	3	65,00	1,63	24,46	—	0
237	Controle	23	3	52,00	1,44	25,08	—	0
238	Controle	32	3	59,00	1,50	26,22	—	0
239	Controle	25	3	71,00	1,57	28,80	—	0
240	Controle	34	3	55,00	1,63	20,70	—	0

Continua...

ANEXO D - Variáveis clínicas dos grupos SOP e Controle (conclusão)

Paciente	Grupo	Idade	PM	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	CA (cm)	F/G
241	Controle	36	3	55,00	1,50	24,44	—	0
242	Controle	22	3				—	0
243	Controle	37	3	72,00	1,60	28,13	—	0

PM: Ciclo menstrual: 1-amenorréia, 2-espaniomenorréia, 3-eumenorréia, 4-hipermenorrágia;
IMC: índice de massa corpórea; CA: Circunferência abdominal; F/G: índice de Ferriman e Gallwey.

ANEXO E - Perfil laboratorial das pacientes com SOP

Nº	FSH	LH	PRL	TT	TI	SBG	SDHEA	Andro
1	7,20	10,10	5,20	94,00	54,80	39,40	1067	2,40
2	4,40	8,10	5,10	101,00	72,40	28,50	2502	2,80
3	4,50	8,70	10,30	138,00	89,60	34,80	1892	3,70
4	3,30	7,10	6,40	112,00	68,50	37,20	1488	2,70
5	3,30	1,50	8,70	72,00	53,00	26,00	3470	3,10
6	5,80	28,00	10,00	103,00	—	—	—	—
7	4,60	7,00	5,00	158,00	—	18,00	2823	4,90
8	5,20	12,00	2,50	78,00	56,50	27,20	2153	1,90
9	6,30	6,50	3,90	110,00	68,70	36,00	2680	3,00
10	5,50	18,10	12,70	142,00	58,80	65,30	1036	3,40
11	5,80	14,10	6,30	85,00	76,00	11,00	3800	4,80
12	3,90	8,80	4,00	78,00	47,00	36,20	—	2,46
13	4,90	11,00	4,19	91,00	—	8,90	4200	5,00
14	3,40	7,10	13,10	152,00	—	23,00	3970	5,00
15	—	—	11,70	87,00	76,00	19,00	2460	—
16	5,80	6,50	8,00	112,00	—	11,00	1770	—
17	1,80	5,90	9,70	92,00	50,00	44,00	3720	4,20
18	5,30	1,90	8,80	81,00	73,00	18,00	3690	3,00
19	5,50	12,80	4,00	91,00	64,00	29,00	2160	3,91
20	3,50	7,00	3,30	152,00	—	16,00	882	3,80
21	4,10	9,30	23,20	135,00	98,00	29,00	2460	5,10
22	6,10	12,80	5,00	123,00	92,50	27,00	4170	4,10
23	5,30	6,00	4,00	50,00	38,00	24,00	2870	2,00
24	4,30	12,70	8,10	101,00	72,00	29,00	1940	4,30
25	8,20	26,00	8,30	126,00	—	17,70	3105	5,00
26	5,20	13,80	7,80	150,00	—	18,20	6510	7,70
27	4,20	8,10	19,40	132,00	95,00	29,00	3490	5,00
28	5,10	2,30	10,80	43,00	24,00	38,00	2530	1,30
29	4,40	6,90	24,40	51,00	51,00	11,60	543	1,50
30	6,20	21,00	13,40	86,00	—	80,00	1640	2,52
31	4,80	6,80	3,40	54,00	48,50	17,10	2379	4,10
32	7,30	11,60	15,80	63,00	56,00	16,00	2380	—
33	4,40	10,50	14,70	154,00	—	33,00	3480	4,62
34	4,40	14,30	12,50	96,00	35,00	73,50	—	2,42
35	4,80	12,50	14,60	43,00	21,00	47,10	1880	2,30
36	1,80	3,70	15,20	80,00	—	48,00	1050	3,00
37	5,30	35,60	7,40	87,00	29,00	84,50	3940	2,28
38	3,10	10,90	7,30	90,00	65,00	26,10	—	—

Continua

...

ANEXO E - Perfil laboratorial das pacientes com SOP (continuação)

Nº	FSH	LH	PRL	TT	TI	SHBG	SDHEA	Andro
39	3,90	9,00	6,40	100,00	—	19,00	3050	2,03
40	6,40	13,20	7,30	72,00	48,00	31,00	1820	5,00
42	5,30	11,10	0,60	147,00	88,50	39,30	1234	3,10
43	5,00	19,20	19,50	75,00	—	23,00	3122	6,70
44	3,40	5,10	10,50	61,00	—	—	1330	—
45	3,70	6,30	13,60	58,00	50,40	18,60	1998	1,90
46	3,00	6,80	7,00	78,00	—	—	2015	2,40
47	5,10	9,10	6,50	98,00	85,00	20,00	3830	4,10
48	5,90	29,80	13,60	219,00	93,50	65,40	2515	3,10
49	6,70	18,00	4,30	176,00	—	6,20	2641	4,50
50	3,90	2,60	8,40	28,00	15,10	42,00	1283	1,90
51	5,5	4,3	5,4	55,00	30,10	42,30	437	4,5
52	6,10	13,70	11,60	85,00	59,00	29,00	4370	5,20
53	5,10	4,70	14,20	54,00	20,00	74,00	2160	—
54	3,90	15,20	7,60	149,00	—	25,00	1546	7,50
55	5,20	20,70	3,70	156,00	73,30	55,80	1477	1,90
56	4,00	1,40	11,10	38,00	30,00	22,00	1180	2,70
57	9,40	11,30	11,50	89,00	37,50	62,00	1480	1,90
58	—	—	9,30	53,00	23,00	24,00	2550	1,40
59	5,70	9,70	5,70	99,00	79,00	24,00	2350	4,70
60	2,60	5,30	8,60	63,00	52,00	21,00	3180	2,50
61	5,30	11,60	7,80	51,00	39,00	24,00	1410	3,50
62	5,00	20,80	—	104,00	47,00	57,00	—	—
63	4,60	13,70	4,80	86,00	55,00	34,00	—	4,00
64	4,70	14,50	15,00	72,00	64,00	21,10	1220	2,06
65	4,80	2,10	13,60	40,00	36,00	15,00	—	3,30
66	4,80	9,70	21,00	57,00	35,00	35,10	3960	3,70
67	5,60	6,90	7,10	149,00	91,00	36,40	1440	2,58
68	8,70	8,20	15,00	99,00	36,00	76,00	2440	3,20
69	3,60	5,80	8,30	160,00	—	23,00	767	4,30
70	4,40	7,20	7,00	153,00	97,00	36,00	1030	—
71	4,90	8,00	12,60	113,00	68,00	38,00	1890	1,40
72	4,50	9,10	13,10	109,00	64,00	25,00	2450	1,90
73	6,60	15,40	6,50	65,00	34,00	45,00	848	3,10
74	1,40	8,10	3,80	67,00	—	15,00	1560	3,00
75	6,70	5,20	9,60	22,00	13,00	—	1320	1,90
76	3,10	6,20	4,70	60,00	65,00	11,00	1590	3,10
77	4,20	7,40	8,10	54,00	49,00	17,00	2250	3,20

Continua

ANEXO E - Perfil laboratorial das pacientes com SOP (continuação)

Nº	FSH	LH	PRL	TT	TI	SHBG	SDHEA	Andro
78	4,50	7,00	7,60	79,00	47,00	38,00	1760	2,97
79	—	—	—	29,00	22,60	22,10	—	—
80	7,40	11,20	8,30	54,00	40,20	25,10	2517	2,10
82	1,60	2,60	6,80	49,00	31,00	33,00	2110	2,00
83	5,90	9,20	4,40	88,00	57,70	32,60	277	1,40
84	4,10	15,80	11,50	105,00	57,00	—	1940	5,00
85	3,60	2,40	6,80	80,00	68,00	19,00	3690	2,90
86	3,40	9,90	4,60	92,00	55,40	37,40	1118	1,00
87	7,20	16,60	8,30	144,00	60,50	64,20	3137	2,80
88	6,10	20,90	4,50	141,00	—	16,00	2433	2,40
89	3,70	2,50	11,30	113,00	55,00	40,20	2106	2,30
90	8,6	10,4	6,1	125,00	91,2	28,70	364	3,7
91	4,70	1,90	6,90	52,00	48,00	16,00	2978	2,70
92	4,00	9,60	8,50	153,00	—	22,00	3010	4,30
93	5,00	11,90	9,60	86,00	52,00	37,00	1700	—
94	2,80	5,90	4,00	62,00	61,00	14,00	2140	4,50
95	6,60	24,70	7,80	181,00	66,00	79,00	1760	4,70
96	5,60	14,90	5,10	60,00	60,00	54,00	3030	2,88
97	3,80	9,30	9,10	101,00	78,10	25,00	2410	5,00
98	8,10	10,80	9,50	79,00	65,00	22,00	4580	4,60
99	5,20	14,50	—	98,00	87,20	19,00	1630	4,50
100	5,40	7,50	3,40	130,00	53,00	66,00	1660	4,20
101	7,30	18,50	5,90	110,00	64,10	40,00	1981	4,00
102	2,70	4,80	—	127,00	72,00	42,00	—	4,20
103	—	—	20,90	150,00	—	28,00	3200	3,90
104	2,60	8,10	6,00	114,00	48,60	62,00	2740	2,40
105	4,30	2,60	11,20	152,00	—	20,00	1300	3,30
106	5,30	16,80	—	211,00	—	14,00	—	—
107	5,90	12,90	10,20	92,00	50,00	53,00	2790	5,40
108	4,90	14,40	6,50	88,00	79,00	18,00	3410	2,10
109	5,00	14,20	5,20	65,00	58,90	17,20	1406	3,40
110	4,90	7,60	8,60	80,00	34,00	61,00	2710	4,00
111	5,70	10,50	4,30	192,00	—	38,00	2570	5,40
112	4,60	12,10	6,80	91,00	64,00	37,00	1930	4,50
113	3,30	7,40	6,40	114,00	92,80	23,20	2992	6,60
114	3,10	9,80	6,20	76,00	23,00	73,20	1432	5,50
115	5,30	13,40	4,60	60,00	34,90	38,40	683	2,80
116	5,30	5,90	5,80	34,00	20,20	36,10	1097	1,50

Continua

ANEXO E - Perfil laboratorial das pacientes com SOP (conclusão)

Nº	FSH	LH	PRL	TT	TI	SHBG	SDHEA	Andro
117	5,60	13,60	9,20	61,00	30,30	48,60	1060	2,70
118	5,50	9,50	10,80	72,00	54,00	25,00	2230	4,50
119	6,00	16,40	12,50	88,00	50,00	41,00	3640	3,90
120	8,40	8,40	3,50	55,00	25,30	54,00	1060	2,30
122	7,50	14,10	13,20	66,00	34,00	47,00	3070	—
123	4,30	8,10	3,50	97,00	67,60	29,80	1593	2,80
124	6,20	12,70	6,40	71,00	34,00	53,00	3240	3,30
125	5,5	6,0	3,8	99,00	84,10	20,90	4696	3,8
126	4,50	11,20	3,70	88,00	23,00	114,00	2150	4,20
127	4,60	12,90	5,00	52,00	25,00	50,00	938	4,70
128	4,00	10,90	15,50	35,00	15,00	59,00	2530	4,00
129	—	—	6,10	67,00	60,00	17,00	3590	—
130	6,10	8,40	12,00	102,00	92,00	19,00	4890	—
131	5,80	14,10	13,00	70,00	53,00	25,00	1960	—
132	5,70	7,60	7,20	27,00	30,80	8,00	913	3,80
133	2,90	2,30	8,10	64,00	23,60	73,00	2950	2,20
134	8,30	18,00	8,90	93,00	40,00	61,00	2500	—
135	5,30	4,20	5,00	119,00	—	—	2864	3,80
136	4,80	8,30	9,50	77,00	17,00	49,00	4660	2,70
137	5,60	11,80	9,30	65,00	36,00	15,00	2640	4,00
138	7,10	7,90	3,80	116,00	—	21,00	2300	—
139	—	—	—	41,00	36,00	18,00	—	—
140	3,30	—	11,90	45,00	38,00	16,20	1920	3,50

FSH: Hormônio folículo estimulante (IU/L); LH: Hormônio luteinizante (IU/L); PRL: Prolactina (ng/dL); TT: Testosterona total (ng/dL); SHBG: Proteína carreadora de hormônios sexuais (nmol/L); SDHEA: Sulfato de dehidroepiandrosterona (ng/mL); Andro: Androstenediona (ng/mL).

ANEXO F - Análises bioquímicas das pacientes com SOP

Nº	CT	HDL	LDL	TG	Glicose	Insulina	HOMA
1	219	45	150	120	85	4,90	1,03
2	248	38	—	486	149	46,20	17,00
3	140	73	50	86	82	12,50	2,53
4	161	37	97	136	89	21,00	4,61
5	171	47	101	113	90	16,30	3,62
6	166	35	109	109	95	—	—
7	214	55	129	148	89	13,90	3,05
8	204	37	88	393	98	18,00	4,36
9	177	61	95	106	109	22,30	6,00
10	201	69	124	138	96	60,50	14,34
11	212	57	133	109	102	5,10	1,28
12	226	44	144	192	91	13,60	3,06
13	155	48	93	68	94	13,90	3,23
14	165	49	90	105	93	25,60	5,88
15	137	35	84	64	88	18,70	4,06
16	210	26	163	107	104	24,20	6,21
17	150	42	86	109	82	17,30	3,50
18	95	27	55	63	95	10,40	2,44
19	178	55	104	94	95	11,80	2,77
20	103	38	52	63	88	14,50	3,15
21	154	51	87	82	92	17,10	3,88
22	213	46	140	136	77	24,20	4,60
23	183	44	113	130	91	7,70	1,73
24	166	52	89	124	100	17,80	4,40
25	240	53	136	253	90	19,20	4,27
26	186	52	116	90	89	10,30	2,26
27	205	28	146	197	94	16,00	3,71
28	220	37	152	154	86	23,90	5,08
29	185	48	115	110	104	48,00	12,33
30	235	36	147	258	—	—	—
31	178	40	108	150	110	50,00	13,58
32	133	48	61	122	90	15,40	3,42
33	194	39	131	121	88	—	—
34	191	58	112	103	80	—	—
35	182	76	95	57	90	12,70	2,82
36	186	63	101	112	88	9,40	2,04
37	173	57	104	57	84	—	—
38	215	115	92	41	87	9,60	2,06

Continua

ANEXO F - Análises bioquímicas das pacientes com SOP (continuação)

Nº	CT	HDL	LDL	TG	Glicose	Insulina	HOMA
39	155	47	82	132	83	14,90	3,05
40	206	46	150	48	79	14,10	2,75
41	126	49	65	60	89	4,20	0,92
42	199	56	132	56	87	11,80	2,53
43	164	54	92	91	95	3,60	0,84
44	145	52	82	185	83	16,10	3,30
45	178	68	99	125	92	15,90	3,61
46	227	89	117	107	84	25,60	5,31
47	201	51	129	104	92	12,80	2,91
48	174	64	96	68	79	4,90	0,96
49	228	78	130	102	79	11,90	2,32
50	124	39	85	149	104	14,60	3,75
51	174	35	112	135	105	37,00	9,59
52	173	31	118	118	89	17,90	3,93
53	—	—	—	—	79	8,30	1,62
54	145	62	68	75	99	12,70	3,10
55	178	70	94	68	95	4,90	1,15
56	142	39	87	82	85	11,40	2,39
57	133	51	76	28	116	4,90	1,40
58	173	47	111	75	97	14,90	3,57
59	203	46	125	158	88	16,90	3,67
60	—	—	—	—	—	—	—
61	152	61	77	68	88	8,40	1,83
62		46	—	43	84	4,10	0,85
63	174	—	108	136	92	14,70	3,34
64	197	42	128	134	86	17,60	3,74
65	142	34	87	105	76	14,80	2,78
66	197	55	123	95	88	8,60	1,87
67	167	35	107	125	96	28,90	6,85
68	192	92	52	102	76	6,30	1,18
69	191	43	97	336	81	28,30	5,66
70	192	55	110	135	98	38,00	9,20
71	161	48	85	139	89	22,60	4,97
72	171	39	94	192	88	14,20	3,09
73	132	42	79	57	104	21,20	5,44
74	186	30	115	206	83	26,00	5,33
75	219	49	157	66	82	6,70	1,36
76	182	35	91	340	78	24,40	4,70

Continua

ANEXO F - Análises bioquímicas das pacientes com SOP (continuação)

Nº	CT	HDL	LDL	TG	Glicose	Insulina	HOMA
77	169	39	86	219	101	28,60	7,13
78	157	46	97	69	80	7,60	1,50
79	—	—	—	175	93	45,30	10,40
80	184	53	110	103	83	11,90	2,44
81	160	53	93	72	88	26,30	5,71
82	146	37	91	89	90	14,30	3,18
83	186	40	115	154	93	24,40	5,60
84	208	37	144	136	90	15,60	3,47
85	147	43	77	135	86	10,10	2,14
86	212	35	135	210	82	30,60	6,20
87	206	66	131	45	87	4,90	1,05
88	188	53	121	68	88	17,20	3,74
89	170	51	106	66	75	4,90	0,91
90	190	36	107	234	95	31,00	7,27
91	136	38	71	134	78	8,40	1,62
92	126	33	66	134	91	28,00	6,29
93	191	74	91	132	81	7,80	1,56
94	187	39	126	—	84	10,60	2,20
95	165	74	80	53	82	5,90	1,19
96	173	63	97	65	107	4,70	1,24
97	202	52	103	237	93	13,70	3,15
98	177	32	101	219	85	8,60	1,80
99	—	40	—	206	97	16,40	3,93
100	179	52	90	185	82	10,40	2,11
101	204	80	100	118	87	7,00	1,50
102	—	55	—	133	68	6,00	1,01
103	222	70	109	140	88	20,20	4,39
104	139	44	87	42	84	7,70	1,60
105	193	56	121	78	84	19,90	4,13
106	227	40	142	223	125	—	—
107	141	70	63	40	89	5,90	1,30
108	181	40	81	189	91	18,10	4,07
109	144	38	72	168	81	16,60	3,32
110	170	70	90	51	78	6,00	1,16
111	159	27	93	193	100	21,50	5,31
112	212	51	130	153	99	10,30	2,52
113	210	45	146	97	87	39,20	8,42
114	183	70	99	69	86	4,80	1,02

Continua

ANEXO F - Análises bioquímicas das pacientes com SOP (conclusão)

Nº	CT	HDL	LDL	TG	G	Insulina	HOMA
115	167	42	87	192	83	9,10	1,86
116	187	58	115	70	96	33,30	7,89
117	113	39	61	66	81	6,60	1,32
118	214	52	144	92	93	17,00	3,90
119	214	48	146	101	83	2,50	0,51
120	155	55	76	122	90	11,00	2,44
121	138	53	70	73	96	16,70	3,96
122	238	61	157	98	83	9,20	1,89
123	180	40	118	111	103	16,40	4,17
124	156	55	88	65	83	3,60	0,74
125	179	35	127	83	85	9,60	2,01
126	131	48	66	86	81	10,00	2,00
127	239	48	163	141	107	7,00	1,85
128	150	46	91	67	86	3,40	0,72
129	125	43	59	113	83	6,80	1,39
130	140	68	60	61	85	6,50	1,36
131	194	40	138	81	104	22,50	5,78
132	173	34	114	124	86	10,40	2,21
133	194	59	123	—	86	7,90	1,68
134	188	51	123	71	77	11,40	2,17
135	214	60	120	171	83	12,80	2,62
136	105	57	52	105	92	7,50	1,70
137	125	45	73	168	84	16,40	3,40
138	152	62	81	45	83	13,40	2,75
139	—	—	—	—	99	20,30	4,96
140	177	32	119	1	89	39,60	—

CT: Colesterol total mg/dL; HDL: Lipoproteína de alta densidade (mg/dL)

LDL: Lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); Glicose (mg/dL);

Insulina ($\mu\text{U/mL}$); HOMA: *Homeostasis Model Assessment*

Anexo G - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e para as variáveis hormonais

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
538T/C					
IMC	CC	33	28,85	7,45	0,390
	TT+TC	105	30,06	6,86	
	TT	43	29,68	7,28	0,920
	TC+CC	74	91,63	16,70	
	TT	43	29,68	7,28	0,623
	TC	62	30,32	6,60	
	CC	33	30,32	7,45	
CA	CC	27	89,57	18,57	0,205
	TT+TC	80	94,36	16,26	
	TT	33	96,58	17,14	0,163
	TC+CC	74	91,63	16,70	
	TT	43	96,58	17,17	0,278
	TC	47	92,81	15,61	
	CC	27	89,57	18,57	
rs4898820					
IMC	GG	30	29,47	7,52	0,800
	GT+TT	104	29,83	6,86	
	TT	36	28,84	6,31	0,364
	GG+GT	98	30,09	7,22	
	GG	30	29,47	7,52	0,560
	GT	68	30,36	7,13	
	TT	36	28,84	6,31	
CA	GG	21	91,93	16,53	0,713
	GT+TT	84	93,45	17,03	
	TT	26	91,46	14,32	0,518
	GG+GT	79	93,70	17,66	
	GG	21	91,93	16,53	0,722
	GT	68	30,36	7,13	
	TT	26	91,46	14,32	

IMC: Índice de massa corpórea; CA: Circunferência abdominal.

Anexo H - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e variáveis hormonais

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
rs4898820					
FSH (IU/L)	TT	36	5,56	1,45	0,008
	GG+GT	94	4,78	1,45	
	GG	27	5,45	1,89	0,148
	GT+TT	103	4,88	1,34	
	GG	27	5,45	1,89	<0,001
	GT	67	4,51	1,14	
	TT	36	5,56	1,45	
LH (IU/L)	TT	36	11,78	4,38	0,169
	GG+GT	94	10,21	6,25	
	GG	27	11,38	8,29	0,580
	GT+TT	103	10,45	5,02	
	GG	27	11,38	8,29	0,180
	GT	67	9,74	5,22	
	TT	36	11,78	4,38	
Estradiol (pg/mL)	TT	36	57,12	24,93	0,511
	GG+GT	87	60,54	26,69	
	GG	27	62,12	30,07	0,563
	GT+TT	96	58,81	25,04	
	GG	27	62,12	30,07	0,751
	GT	60	59,82	46,25	
	TT	36	57,12	24,93	
Testosterona total (ng/dL)	TT	37	94,86	35,78	0,982
	GG+GT	99	94,17	40,95	
	GG	30	87,73	45,12	0,299
	GT+TT	106	96,23	37,76	
	GG	30	87,73	45,12	0,565
	GT	69	96,97	39,02	
	TT	37	94,86	35,78	
Testosterona livre (pmol/L)	TT	35	68,00	32,03	0,723
	GG+GT	93	65,37	39,03	
	GG	28	59,53	39,15	0,292
	GT+TT	100	67,93	36,55	
	GG	28	59,53	39,15	0,575
	GT	65	67,89	39,00	
	TT	35	68,00	32,03	
SHBG (nmol/L)	TT	37	32,35	18,58	0,390
	GG+GT	94	35,56	19,43	
	GG	29	36,96	17,75	0,465
	GT+TT	102	34,00	19,60	
	GG	29	36,96	17,75	0,620
	GT	65	34,94	20,23	
	TT	37	32,35	18,58	

Continua

Anexo H - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e variáveis hormonais (continuação)

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
rs4898820					
SDHEA (ng/mL)	TT	36	2525,91	1125,23	0,263
	GG+GT	88	2277,88	1110,11	
	GG	26	2081,07	797,12	0,089
	GT+TT	98	2421,21	1179,02	
	GG	26	2081,08	797,12	0,302
	GT	62	2360,42	1231,99	
	TT	36	2525,92	1125,24	
Androstenediona (ng/mL)	TT	34	3,68	1,34	0,343
	GG+GT	83	3,42	1,27	
	GG	25	3,10	1,27	0,082
	GT+TT	92	3,61	1,32	
	GG	25	3,10	1,32	0,204
	GT	58	3,56	1,24	
	TT	34	3,68	1,34	
538T/C					
FSH (IU/L)	CC	33	5,03	1,48	0,898
	TT+TC	101	4,99	1,48	
	TT	43	5,00	1,49	0,994
	TC+CC	91	5,00	1,48	
	TT	43	5,00	1,49	0,991
	TC	58	4,98	1,49	
	CC	33	5,03	1,48	
LH (IU/L)	CC	32	11,77	7,65	0,261
	TT+TC	101	10,12	5,10	
	TT	43	10,68	5,07	0,827
	TC+CC	90	10,44	6,18	
	TT	43	10,68	5,07	0,271
	TC	58	9,71	5,13	
	CC	32	11,77	7,65	
Estradiol (pg/mL)	CC	30	62,08	22,41	0,499
	TT+TC	97	57,95	26,98	
	TT	42	59,77	26,95	0,798
	TC+CC	85	58,50	25,60	
	TT	42	59,77	26,95	
	TC	58	9,71	5,13	
	CC	30	62,08	22,42	
Testosterona total (ng/dL)	CC	33	98,78	47,44	0,377
	TT+TC	107	91,79	36,98	
	TT	45	99,93	39,30	0,183
	TC+CC	95	90,36	39,61	
	TT	45	99,93	39,30	0,131
	TC	62	85,88	34,32	
	CC	33	98,78	47,44	

Continua

Anexo H - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e variáveis hormonais (conclusão)

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
538T/C					
Testosterona livre (pmol/L)	CC	33	58,07	33,28	0,179
	TT+TC	99	68,08	37,92	
	TT	43	76,63	44,52	0,034
	TC+CC	89	60,24	31,58	
	TT	43	76,63	44,52	0,051
	TC	56	61,51	30,78	
	CC	33	58,07	33,28	
SHBG (nmol/L)	CC	33	45,29	23,80	0,002
	TT+TC	101	30,77	15,84	
	TT	43	76,63	44,52	0,175
	TC+CC	91	35,89	19,98	
	TT*	43	27,00	74,00-97,00	0,094
	TC*	58	26,60	18,50-39,80	
	CC*	33	38,40	62,00-122,00	
SDHEA (ng/mL)	CC	32	2348,00	888,31	0,990
	TT+TC	96	2350,86	1177,43	
	TT	38	2342,39	970,53	0,959
	TC+CC	90	2353,42	1167,49	
	TT	38	2342,39	970,53	0,998
	TC	58	2356,41	1303,49	
	CC	32	2348	1685,00	
Androstenediona (ng/mL)	CC	31	3,34	1,34	0,496
	TT+TC	90	3,52	1,26	
	TT	37	3,61	1,27	0,438
	TC+CC	84	3,41	1,29	
	TT	37	3,61	1,27	0,681
	TC	53	3,46	1,27	
	CC	31	3,34	1,34	

±DP: Desvio padrão, FSH: Hormônio folículo-estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; SHBG: Proteína carreadora dos hormônios sexuais; SDHEA: Sulfato de dehidroepiandrosterona. * Teste não paramétrico de Kruskal Wallis, análise em mediana e intervalo interquartil.

Anexo I - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e variáveis bioquímicas

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
rs4898820					
Colesterol (mg/dL)	TT	37	178,32	30,32	0,747
	GG+GT	92	176,40	30,59	
	GG	29	175,44	33,67	0,763
	GT+TT	100	177,39	29,56	
	GG	29	175,44	33,67	0,930
	GT	63	176,84	29,35	
	TT	37	178,32	30,32	
HDL (mg/dl)	TT	36	51,86	14,63	0,391
	GG+GT	95	49,48	13,89	
	GG	29	51,37	33,67	0,513
	GT+TT	102	49,78	29,56	
	GG	29	51,37	10,31	0,476
	GT	66	48,65	15,20	
	TT	36	51,86	14,63	
LDL (mg/dL)	TT	37	101,59	27,83	0,588
	GG+GT	92	104,39	25,86	
	GG	29	104,37	28,42	0,855
	GT+TT	100	103,36	25,88	
	GG	29	104,37	28,42	0,864
	GT	63	104,39	24,84	
	TT	37	101,59	27,83	
Triglicérides (mg/dL)	TT	36	117,19	49,92	0,652
	GG+GT	95	122,70	66,40	
	GG	30	109,36	56,74	0,237
	GT+TT	101	124,70	63,54	
	GG	30	109,36	56,74	0,332
	GT	65	128,86	69,97	
	TT	36	117,19	49,92	
Glicose 0 (mg/dL)	TT	32	90,50	9,56	0,905
	GG+GT	80	90,26	9,41	
	GG	23	89,47	11,17	0,628
	GT+TT	89	90,55	8,96	
	GG	23	89,47	11,17	0,888
	GT	57	90,57	8,69	
	TT	32	90,50	9,56	
Glicose 120 (mg/dL)	TT	31	111,19	32,06	0,145
	GG+GT	78	120,91	30,81	
	GG	23	120,56	31,73	0,679
	GT+TT	86	117,50	31,38	
	GG	23	120,56	31,73	0,347
	GT	55	121,05	30,72	
	TT	31	111,194	32,06	
Insulina 0 (µU/mL)	TT	31	13,50	7,67	0,117
	GG+GT	78	18,49	13,32	
	GG	23	16,03	10,31	0,647
	GT+TT	86	17,35	12,65	
	GG	23	16,03	10,31	0,178
	GT	55	19,52	14,36	
	TT	31	13,50	7,67	

Continua

Anexo I - Distribuição genotípica dos polimorfismos *Hph1* e *Tas1* e variáveis bioquímicas (continuação)

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	p
rs4898820					
Insulina 120 (µU/mL)	TT	30	105,42	74,34	0,055
	GG+GT	68	180,00	184,83	
	GG	21	123,91	99,27	0,293
	GT+TT	77	166,24	175,40	
	GG	23	120,56	31,73	0,072
	GT	47	183,78	150,73	
	TT	30	105,42	74,34	
HOMA-IR	TT	36	2,80	1,62	0,065
	GG+GT	93	3,78	2,71	
	GG	29	3,35	2,21	0,706
	GT+TT	100	3,55	2,58	
	GG	29	3,35	2,21	0,071
	GT	64	3,98	2,91	
	TT	36	2,80	1,62	
538T/C					
Colesterol (mg/dL)	CC	33	174,24	31,25	0,539
	TT+TC	100	178,16	31,82	
	TT	41	176,85	32,26	0,935
	TC+CC	92	177,33	31,49	
	TT	41	176,85	32,26	0,782
	TC	59	179,06	31,76	
	CC	33	174,24	31,25	
HDL (mg/dl)	CC	33	50,54	13,29	0,706
	TT+TC	102	49,47	14,45	
	TT	42	52,80	16,81	0,089
	TC+CC	93	48,34	12,60	
	TT	42	52,80	16,81	0,127
	TC	60	47,13	12,15	
	CC	33	50,54	13,29	
LDL (mg/dL)	CC	33	50,54	13,29	0,696
	TT+TC	99	49,47	14,45	
	TT	41	101,51	25,32	0,524
	TC+CC	91	104,74	27,58	
	TT	41	101,51	25,32	0,643
	TC	58	106,22	28,13	
	CC	33	102,15	26,3	
Triglicérides (mg/dL)	CC	32	109,43	59,32	0,202
	TT+TC	103	127,34	71,72	
	TT	43	110,16	49,57	0,138
	TC+CC	92	129,15	76,16	
	TT*	43	105,00	105,00-136,00	0,070
	TC*	60	119,00	92,75-153,75	
	CC*	32	189,00	65,25-149,50	
Glicose 0 (mg/dL)	CC	25	86,69	6,79	0,038
	TT+TC	97	90,85	10,73	
	TT	43	90,61	8,69	0,844
	TC+CC	79	90,24	10,63	
	TT	43	110,16	49,57	0,146
	TC	54	91,62	9,04	
	CC	25	87,24	7,16	

Continua

Anexo I - Distribuição genotípica dos polimorfismos rs4898820 e 538T/C e variáveis bioquímicas (conclusão)

Variável	Genótipo	N	Média	±DP	P
538T/C					
Glicose 120 (mg/dL)	CC	24	87,24	31,35	0,159
	TT+TC	88	91,22	31,34	
	TT	37	112,89	26,29	0,212
	TC+CC	75	120,20	33,65	
	TT	37	112,89	26,29	0,072
	TC	51	125,18	33,87	
	CC	24	109,75	31,35	
Insulina 0 (μU/mL)	CC	25	16,04	15,66	0,590
	TT+TC	86	17,56	11,17	
	TT	36	18,38	6,81	0,072
	TC+CC	75	14,78	14,04	
	TT	36	14,78	6,81	0,178
	TC	50	19,55	16,35	
	CC	25	16,04	15,66	
Insulina 120 (μU/mL)	CC	23	120,63	84,96	0,219
	TT+TC	77	167,92	176,75	
	TT	34	128,17	107,75	0,200
	TC+CC	66	171,92	181,72	
	TT	34	128,17	107,75	0,072
	TC	43	176,10	148,84	
	CC	23	120,63	84,96	
HOMA-IR	CC	31	2,72	2,02	0,045
	TT+TC	101	3,85	2,88	
	TT	42	3,19	1,39	0,143
	TC+CC	90	3,77	3,17	
	TT	42	3,19	1,39	0,015
	TC	59	4,32	3,52	
	CC	31	2,72	2,02	

±DP: Desvio padrão; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment- insulin resistance* (valores normais ≤ 2,7). * Teste não paramétrico de Kruskal Wallis, análise em mediana e intervalo interquartil.

9 Referências

1. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 November 1, 2006;91(11):4237-45.
2. Khoury MY, Baracat EC, Pardini DP, Haidar MA, da Motta EL, de Lima GR. Polycystic ovary syndrome: clinical and laboratory evaluation. *São Paulo Med J.* 1996; 114 (4):1222-5.
3. Maciel GAR, Soares Junior JM, Alves da Motta EL, Abi Haidar M, de Lima GR, Baracat EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril.* 2004; 81(2): 355-60.
4. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-91.
5. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19 (1):41-7.
6. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil and Steril.* 2009;91(2):456-88.

7. Escobar-Morreale HF, Carmina E, Dewailly D, Gambineri A, Kelestimur F, Moghetti P, et al. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2012; 18(2):146-70.
8. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961 Nov;21:1440-7.
9. Yildiz BO, Bolour S, Woods K, Moore A, Azziz R. Visually scoring hirsutism. *Hum Reprod Update*. 2010;16(1):51-64.
10. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Aug 1;140(7):815-30.
11. Rosenfield RL. Clinical Practice. Hirsutism. *N Engl J Med*. 2005;353(24):2578-88.
12. Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, Gustafsson J-A, Paus R. The Hair Follicle as an Estrogen Target and Source. *Endocr Rev*. 2006;27(6):677-706.
13. Chen WC, Zouboulis CC. Hormones and the pilosebaceous unit. *Dermatoendocrinol* 2009;1(2):81-6.
14. Koulouri O, Conway GS. Management of hirsutism. *BMJ*. 2009;338:b847.
15. Cotsarelis G, Botchkarev V. Distúrbios do pelo e das unhas. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller As, Leffell DJ. *Fitzpatrick-Tratado de Dermatologia*. Copyright by Livraria e Editora Revinter Ltda; 2011. p. 739-49.
16. Krause K, Foitzik K. Biology of the Hair Follicle: The Basics. *Semin Cutan Med and Surg*. 2006;25(1):2-10.

17. Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev.* 2001;81(1):449-94.
18. Tobin DJ, Gunin A, Magerl M, Handijski B, Paus R. Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme: implications for hair growth control. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):895-904
19. Randall VA. Androgens and human hair growth. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994; 40(4):439-57.
20. Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, Qureshi WM, Filip S, Mokry J. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan 22;15(1):1647-70.
21. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr Biol.* 2009;19(3):132-42.
22. Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays.* 2005;27(3):247-61.
23. Yang L, Peng R. Unveiling hair follicle stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010 Dec;6(4):658-64.
24. Foitzik K, Krause K, Conrad F, Nakamura M, Funk W, Paus R. Human Scalp Hair Follicles Are Both a Target and a Source of Prolactin, which Serves as an Autocrine and/or Paracrine Promoter of Apoptosis-Driven Hair Follicle Regression. *Am J Pathol.* 2006;168(3):748-56.
25. Botchkarev VA, Sharov AA. BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth. *Differentiation.* 2004;72(9-10):512-26.

-
26. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 2004 Feb;25(1):72-101.
 27. Sproul K, Jones MR, Mathur R, Azziz R, Goodarzi MO. Association study of four key folliculogenesis genes in polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 2010;117(6):756-60.
 28. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998;16(3):247-52.
 29. Massague J, Chen Y-C. Controlling TGF β signaling. *Genes Dev.* 2000; 14:627-644.
 30. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* 2011 Apr;23(4):609-20.
 31. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update.* 2014 Nov-Dec;20(6):869-83.
 32. Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR, Carr BR. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(9):3331-7.
 33. Glister C, Richards SL, Knight PG. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology.* 2005;146(4):1883-92.

-
34. Adly MA, Assaf HA, Hussein MR. Expression of bone morphogenetic protein-7 in human scalp skin and hair follicles. *Br J Dermatol*. 2006;154(3):551-4.
35. Sharov AA, Mardaryev AN, Sharova TY, Grachtchouk M, Atoyan R, Byers HR, et al. Bone Morphogenetic Protein Antagonist Noggin Promotes Skin Tumorigenesis via Stimulation of the WNT and Shh Signaling Pathways. *Am J Pathol*. 2009;175(3):1303-14.
36. Tabas JA, Hahn GV, Cohen RB, Seaunez HN, Modi WS, Wozney JM, et al. Chromosomal assignment of the human gene for bone morphogenetic protein 4. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;(293):310-6.
37. Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*. 2002 Feb;118(2):216-25.
38. Zhang J, Tan X, Contag CH, Lu Y, Guo D, Harris SE, et al. Dissection of promoter control modules that direct Bmp4 expression in the epithelium-derived components of hair follicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 24;293(5):1412-9.
39. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, et al. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol*. 1999;1(3):158-64.
40. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Sharov AA, Funa K, Huber O, Gilchrist BA. Modulation of BMP signaling by Noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2002;118(1):3-10.
41. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Nakamura M, Huber O, Funa K, Lauster R, et al. Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *FASEB J*. 2001;15(12):2205-14.

-
42. Mangino M, Torrente I, De Luca A, Sanchez O, Dallapiccola B, Novelli G. A single-nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protei-4 (BMP4) gene. *J Hum Genet.* 1999;44(1):76-7.
43. Mórocz M, Czibula A, Grózer ZB, Szécsényi A, Almos PZ, Raskó I, et al. Association study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B gene promoter polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2011;15;36(2):123-30.
44. Antunes LS, Küchler EC, Tannure PN, Costa MC, Gouvêa CV, Olej B, et al. BMP4 Polymorphism is Associated With Nonsyndromic Oral Cleft in a Brazilian Population Cleft Palate Craniofac J. 2013;50(6):633-8.
45. Abhishek K, Sohail M, Kumar R, Patra PK, Choudhary SB. Mutation - 538 T/C in bone morphogenetic protein 4 do not increase the risk in sickle-cell disease with orthopedic complications but strongly associated with increased LDH and uric acid level in Indian patients from Chhattisgarh and Jharkhand states. *C lin Chim Acta.* 2010 May 2;411(9-10):664-70.
46. Capasso M, Ayala F, Russo R, Avvisati RA, Asci R, Iolascon A. A predicted functional single-nucleotide polymorphism of bone morphogenetic protein-4 gene affects mRNA expression and shows a significant association with cutaneous melanoma in Southern Italian population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(12):1799-807.
47. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3666-72.
48. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Variação genética em indivíduos e populações: mutação e polimorfismo. In: Thompson & Thompson editors. *Genética Médica.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p.181-214.

-
49. Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA*. 2009 Jan 14;301(2):191-7.
50. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):28-38.e25.
51. Dunaif A, Fauser BC. Renaming PCOS--a two-state solution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Nov;98(11):4325-8.
52. Azziz R. Polycystic ovary syndrome: what's in a name? *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Apr;99(4):1142-5.
53. Azziz R, Sanchez LA, Knochelhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):453-62.
54. Barber TM¹, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Aug;65(2):137-45.
55. van Houten EL, Laven JS, Louwers YV, McLuskey A, Themmen AP, Visser JA. Bone morphogenetic proteins and the polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res*. 2013;30;6(1):32.
56. Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, et al. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. *Eur J Endocrinol*. 2013; 20;168(3):437-44.
57. Lin JY, Chen YJ, Huang YL, Tang GP, Zhang L, Deng B, et al. Association of bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with

nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese children. *DNA Cell Biol.* 2008;27(11):601-5.

58. Nicol L, Faure MO, McNeilly JR, Fontaine J, Taragnat C, McNeilly AS. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in LbetaT2 gonadotrophs. *J Endocrinol.* 2008;196(3):497-507.

59. Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, et al. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol.* 2005;186(1):109-21.

60. Terasaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, Nakamura E, Inagaki K, Toma K, et al. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Dec 5;381(1-2):8-15.

61. Yasunaga M, Oumi N, Osaki M, Kazuki Y, Nakanishi T, Oshimura M, et al. Establishment and characterization of a transgenic mouse model for in vivo imaging of Bmp4 expression in the pancreas. *PLoS One.* 2011;6(9):249-56.

62. Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY, et al. MP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26;110(9):798-807