



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTUDO CASO-CONTROLE EM GENES POLIMÓRFICOS
DAS VIAS DE ESTERÓIDE ($ER-\alpha$ e $ER-\beta$) E DA INSULINA
($INSR$, $IGF2$ e $PAI-1$) NA SÍNDROME DO OVÁRIO
POLICÍSTICO**

PRISCILA DANIELE RAMOS CIRILO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Regina Rogatto

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas - Genética*

Botucatu - SP

2006

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma doença heterogênea que acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva e é caracterizada por alterações clínicas como hiperandrogenismo, anovulação crônica e irregularidades menstruais e metabólicas, como resistência insulínica, obesidade, hiperlipidemia e *diabetes mellitus* tipo 2. Esta síndrome está associada com o risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e tromboembólicas. A síndrome HAIR-AN possui manifestações clínicas semelhantes a SOP, porém por critérios de classificação atuais, compõe diagnóstico diferencial apresentando resistência insulínica severa e hiperandrogenismo. Considerando o fenótipo heterogêneo destas patologias, polimorfismos em genes da via de esteróides e da insulina podem estar associados com hiperandrogenismo e hiperinsulinemia. Foram genotipadas para os polimorfismos nos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* 41 mulheres com fenótipo SOP, 16 com fenótipo HAIR-AN e 49 controles livres da doença. As regiões polimórficas dos genes *ER- α* e *ER- β* foram submetidas a análise automatizada no seqüenciador *ABI Prism 377 DNA Sequencer* para determinação do número de repetições [TA]_n e [CA]_n, respectivamente. Os alelos foram classificados em curtos ou longos (*ER- α* - alelos curtos: <15 e longos $\geq$ 15 repetições; *ER- β* - os alelos curtos: $\leq$ 22 e longos >22 repetições). A genotipagem de *INSR* e *IGF2* contendo os polimorfismos C/T e A/G, respectivamente, foi realizada por PCR-RFLP com as enzimas de restrição *PmlI* e *ApaI*, respectivamente. Para a observação do polimorfismo 5G/4G do gene *PAI-1*, utilizou-se a técnica de PCR-SSCP e seqüenciamento direto. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os genótipos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* entre casos e controles. Entretanto, a maioria mostrou diferença estatística significativa quando os genótipos foram comparados com as características clínicas e bioquímicas ($p < 0,05$). A análise agrupada dos polimorfismos pelo programa *NeoGene Analysis* auxiliou na definição das classes genótípicas de risco possivelmente associadas com a etiologia da SOP. Estes dados demonstram que os polimorfismos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* podem modular a esteroidogênese e a ação insulínica em pacientes SOP e HAIR-AN.

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a heterogeneous disorder which is common in reproductive age women and characterized by reproductive and clinical manifestations as hyperandrogenism, anovulatory infertility, increased ovarian secretion, and hyperinsulinaemia, as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. The PCOS have been associated with increased risk for development cardiovascular and thromboembolic events. The syndrome of hyperandrogenism, insulin resistance, and acanthosis nigricans (HAIR-AN syndrome) was included in the PCOS subset. However, actually HAIR-AN syndrome shows a differential diagnosis with severe insulin resistance and hyperandrogenism. Genetic polymorphisms in insulin action and steroid pathways genes can be associated with hyperinsulinaemia and hyperandrogenism in PCOS and HAIR-AN patients. The *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2*, and *PAI-1* genes polymorphisms were evaluated in 41 women with PCOS, 16 women with HAIR-AN, and 49 disease-free control women. The *ER- α* and *ER- β* genes polymorphisms were investigated by automated analysis (ABI Prism 377 DNA Sequencer) to determine the [TA]_n and [CA]_n repeats number, respectively. The alleles were classified as short and long (*ER- α* : <15 and $\geq$ 15 repeats, respectively; and *ER- β* : $\leq$ 22 and >22 repeats, respectively). The *INSR* and *IGF2* genes polymorphisms (C/T and A/G, respectively) were performed by PCR-RFLP methodology using the *PmlI* and *ApaI* restriction enzymes, respectively. The *PAI-1* gene polymorphisms (5G/4G) were detected by PCR-SSCP and direct sequencing methodologies. No statistical differences were observed between cases and controls for all genes analyzed. However, the comparison between clinical and laboratorial data with the genotypes showed statistical differences ($p < 0,05$). The grouped polymorphisms analysis performed by NeoGene Analysis software defined genotypic classes that can be associated with pathophysiology of the PCOS. These data shows that *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2*, and *PAI-1* genes polymorphisms can modulate the insulin and steroid actions in Polycystic Ovary Syndrome patients.

17 α -OHP₄: DEZESSETE ALPHA HIDROXIPROGESTERONA.

AFD: ANTECEDENTE FAMILIAR DE DIABETES.

AN: ACANTHOSIS NIGRICANS.

CG: CÉLULAS DA GRANULOSA.

CIT: CÉLULAS INTERSTICIAIS DA TECA.

DAG: DIACILGLICEROL.

DHEA-s: SULFATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA.

ER- α : ESTROGEN RECEPTOR-ALPHA.

ER- β : ESTROGEN RECEPTOR-BETA.

FSH: HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE.

HAIR-AN: HIPERANDROGENISMO, RESISTÊNCIA INSULÍNICA e *ACANTHOSIS NIGRICANS*.

HOMA: MODELO DE CÁLCULO DE HOMEOSTASE.

IFG: ÍNDICE DE FERRIMAN E GALLWEY.

IGF2: INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR TYPE 2.

IMC: ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA.

ins/del: INSERÇÃO/DELEÇÃO.

INSR: INSULIN RECEPTOR.

LDL: LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE.

LH: HORMÔNIO LUTEINIZANTE.

NIDDM: DIABETES MELITOS NÃO-INSULINO DEPENDENTE.

OGTT: TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE ORAL.

PAI-1: PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1.

PCR: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

PKC: PROTEÍNA C QUINASE.

PP: PUBERDADE PRECOCE.

QUICKI: ÍNDICE QUANTITATIVO DE AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE.

RFLP: POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO.

SHBG: PROTEÍNA CARREADORA DE HORMÔNIOS SEXUAIS.

SNP: POLIMORFISMO DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO.

SOP: SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO.

SRM: SÍNDROME DE RABSON & MENDENHALL.

SSCP: POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES.

STRs: REPETIÇÕES CURTAS EM TANDEM.

t-PA: Ativador de plasminogênio *type* tecidual.

T livre: TESTOSTERONA LIVRE.

T total: TESTOSTERONA TOTAL.

VLDL: LIPOPROTEÍNA COM MUITA BAIXA DENSIDADE.

INTRODUÇÃO

1. SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO	01
1.1 HIPERANDROGENISMO	03
1.2 HIPERINSULINEMIA	07
1.3 SISTEMA FIBRINOLÍTICO	11
2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS E SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS	13
3. GENÉTICA DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO	16
3.1 GENES DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO – $ER-\alpha$ e $ER-\beta$	23
3.2 GENE DO RECEPTOR DE INSULINA – <i>INSR</i>	26
3.3 GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO LIKE INSULINA TIPO 2 – <i>IGF2</i>	29
3.4 GENE DO INIBIDOR DE ATIVAÇÃO DO PLASMINOGÊNIO TIPO-1 – <i>PAI-1</i>	30

OBJETIVOS

33

MATERIAL E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA	34
2. TÉCNICAS MOLECULARES	35
2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	35
2.2 GENOTIPAGEM DOS GENES $ER-\alpha$, $ER-\beta$, <i>INSR</i>, <i>IGF2</i> E <i>PAI-1</i>	36
2.3 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES – $ER-\alpha$ E $ER-\beta$	42
2.4 POLIMORFISMOS AVALIADOS POR PCR-RFLP – <i>INSR</i> E <i>IGF2</i>	43
2.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE ins/del (5G/4G) – <i>PAI-1</i>	46
3. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA	47
4. AGRUPAMENTOS GENOTÍPICOS – SOFTWARE NEOGENE ANALYSIS	49
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53

RESULTADOS

1. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS	54
2. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO [TA] _n DO GENE <i>ER-α</i>	59
3. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO [CA] _n DO GENE <i>ER-β</i>	66
4. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (C/T) DO GENE <i>INSR</i>	73
5. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (A/G) DO GENE <i>IGF2</i>	77
6. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (5G/4G) DO GENE <i>PAI-1</i>	80
7. RESULTADOS DA ANÁLISE DE GENÓTIPOS-SOP E HAIR-AN	85
8. RESULTADOS DA ANÁLISE DE GENÓTIPOS-HAIR-AN E CONTROLES	85
9. RESULTADOS DA ANÁLISE DO PROGRAMA NEOGENE ANALYSIS	88

DISCUSSÃO

1. SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO	91
2. SÍNDROME HAIR-AN E SOP	93
3. ALTERAÇÕES NOS GENES DA VIA DE ESTERÓIDES – HIPERANDROGENISMO	94
4. ALTERAÇÕES NOS GENES DA VIA DA INSULINA – HIPERINSULINEMIA	100

CONCLUSÃO	109
------------------	------------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
-----------------------------------	------------

ANEXOS	135
---------------	------------

1. SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é considerada a doença endócrina mais comum entre mulheres em idade reprodutiva e integrantes de sociedades ocidentais. Ainda com a etiologia incerta e manifestações clínicas heterogêneas, esta síndrome tem prevalência estimada em torno de 5-10% entre as mulheres (Azzis et al., 2004; Urbanek et al., 2005; Lam et al., 2006). A heterogeneidade da morfologia ovariana e dos achados clínicos em mulheres com ovários policísticos tem sido bem reconhecida desde que Stein & Leventhal descreveram esta síndrome em 1935. O termo “doença do ovário policístico” é muitas vezes utilizado como sinônimo, porém é considerado incorreto, na descrição desta síndrome (Xita et al., 2002).

A definição da SOP é um assunto controverso. Em 1990, foi realizada a *National Institute of Health Conference* com o objetivo de padronizar os critérios para o diagnóstico da SOP. Devido à discrepância ainda persistente entre os especialistas, estes critérios foram revisados no *The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group* em 2003 sendo sugerido que a definição da SOP deve incluir pelo menos dois dos três seguintes critérios: (a) oligo e/ou anovulação, (b) sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo e (c) ovários policísticos na ultra-sonografia e exclusão de doenças relacionadas (Rotterdam, 2003).

Matalliotakis et al. (2006), após uma revisão bibliográfica refinada, relataram três hipóteses fisiopatológicas principais para explicar a relação das

características clínicas da SOP aos três achados laboratoriais: (a) a hipótese relacionada aos níveis elevados do LH (hormônio luteinizante) resultando no hiperandrogenismo e anovulação; (b) um defeito único na ação da insulina que leva a hiperinsulinemia resultando em anovulação e aumento da secreção de andrógeno e (c) uma alteração primária da síntese de hormônios esteróides sexuais ou do seu metabolismo resultando na secreção aumentada de andrógenos ovarianos e anovulação.

Manifestações clínicas como irregularidades menstruais, obesidade, resistência à insulina, altos níveis séricos de LH, risco aumentado no desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 e anormalidades cardiovasculares, também estão associadas a SOP (Westberg et al., 2001; Legro et al., 2004).

Algumas mulheres apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma endometrial, câncer de mama e ovário. Alguns autores sugerem que estes fenótipos são decorrentes da exposição destes tecidos aos níveis elevados de estrógenos (Marinho et al., 1999; Balen, 2001; Hardiman et al., 2003). Soran et al. (2005) observaram que não havia risco aumentado de desenvolvimento de doença benigna de mama em pacientes SOP quando comparadas com um grupo livre da doença, entretanto a proporção de mulheres com história familiar de câncer de mama foi significativamente maior em pacientes portadores da SOP do que em controles.

Algumas mulheres apresentam resistência insulínica associada com anormalidades reprodutivas. Muitos estudos têm demonstrado que a insulina estimula a esteroidogênese *in vitro* e em concentrações fisiológicas induz um

significativo aumento da secreção de andrógenos em culturas de células ovarianas de pacientes SOP (Willis et al., 1996; Nestler et al., 1998).

O tratamento da SOP consiste na perda de peso em mulheres obesas, indução da ovulação e técnicas de reprodução assistida para aquelas que desejam engravidar, uso de contraceptivo hormonal, progestágenos ou anti-androgênicos. Tais esquemas terapêuticos aliviam os sintomas clínicos desta afecção, mas não atuam sobre o problema básico, a resistência aumentada à insulina (Marinho et al., 1999).

1.1 HIPERANDROGENISMO

O ovário é a fonte primária do hiperandrogenismo na SOP. O hiperandrogenismo é um distúrbio endócrino reprodutivo de mulheres portadoras desta síndrome, caracterizado clinicamente por excesso de virilização, irregularidade menstrual, infertilidade e, bioquimicamente, por níveis elevados de andrógenos (Ibáñez et al., 2003).

A biossíntese dos hormônios sexuais esteróides (andrógeno e estrógeno) é de fundamental importância na fisiopatologia da SOP (Clemons & Goss, 2001). O andrógeno representa o “mal necessário” no ovário, porque se por um lado, ele é o substrato essencial para produção de estrógenos, por outro, seu excesso parece interferir no processo de seleção do folículo ovariano principal. O aumento da produção de andrógenos pelo ovário, principalmente da testosterona, é a anormalidade fundamental da SOP (Vague, 1956; Marinho et al., 1999) (Figura 1). Westberg et al. (2001) sugeriram que o estrógeno

pode influenciar nos níveis séricos de andrógeno, pois mulheres que receberam terapia de reposição de estrógeno durante a menopausa apresentaram redução dos níveis de andrógenos ovarianos e da adrenal.

Os primeiros locais de produção de andrógenos no ovário são nas CIT (células intersticiais da teca) e nas áreas do estroma folicular. Em condições normais, parte do andrógeno produzido nas células da teca é exportado para as células da granulosa onde o processo de aromatização leva a produção de estrógenos. A produção excessiva de andrógenos ou falhas na aromatização leva a consequências clínicas, como o hiperandrogenismo característico em pacientes com SOP (Norman, 2002). A produção excessiva de estrógeno pode estar ligada a uma estimulação anormal do ovário ou a um defeito intrínseco da biossíntese de esteróides, ou ainda, ao aumento da conversão extra-ovariana de andrógenos no tecido adiposo (Crosignani & Nicolosi, 2001). A *up*-regulação da esteroidogênese nas CIT sugere a presença de um defeito intrínseco nas vias metabólicas das células responsáveis pela produção de andrógeno, independente de fatores ambientais e neuroregulatórios. Entretanto, estudos com CIT têm sido realizados apenas na SOP clássica com hiperandrogenemia e não há informações se todos os subtipos de CIT apresentam um defeito esteroidogênico. Análises adicionais com CIT isoladas de diferentes fenótipos SOP fornecerão informações mais valiosas (Diamanti-Kandarakis, 2005).

O hiperandrogenismo pode estar presente em mulheres SOP sem qualquer expressão clínica, em virtude das diferenças individuais no número de receptores androgênicos e na sensibilidade dos órgãos, que são alvos para a

ação dos andrógenos (Dunaif, 1995). Mulheres que desenvolvem sinais clínicos de excesso de andrógeno na pós-menarca apresentam puberdade precoce (PP). Assim como mulheres com SOP, adolescentes com PP, apresentam resistência insulínica e dislipidemia, sugerindo que a PP pode anteceder a SOP (Ibáñez et al., 1998; Petry et al., 2005). Na maioria dos casos, a atividade androgênica aumentada nestas pacientes, tem como consequência uma maior quantidade de andrógeno livre, ou seja, a fração ativa que irá atuar sobre os diversos órgãos ou tecidos, como a unidade pilossebácea, determinando o hirsutismo, alopecia frontal, seborréia e acne (Halbe, 2000).

Embora disfunções da adrenal possam causar o hiperandrogenismo, fatores ovarianos podem atuar na produção exagerada de andrógenos pela adrenal (Azziz et al., 1998). Estudos de Legro (1998) indicaram que a maioria das pacientes com SOP apresenta hiperandrogenismo de origem ovariana e que existe uma minoria com secreção androgênica supra-renal aumentada. Zhou et al. (2005) relataram que em fêmeas *Macaca macaca* tratadas com andrógenos no período pré-natal, havia um aumento basal significativo dos níveis séricos androgênicos da adrenal, semelhante ao que acontece em mulheres SOP. Esses achados sugerem que o excesso de andrógenos na fase fetal pode levar a reprogramação adrenocortical, ocasionando disfunções hormonais na fase pré-púbere.

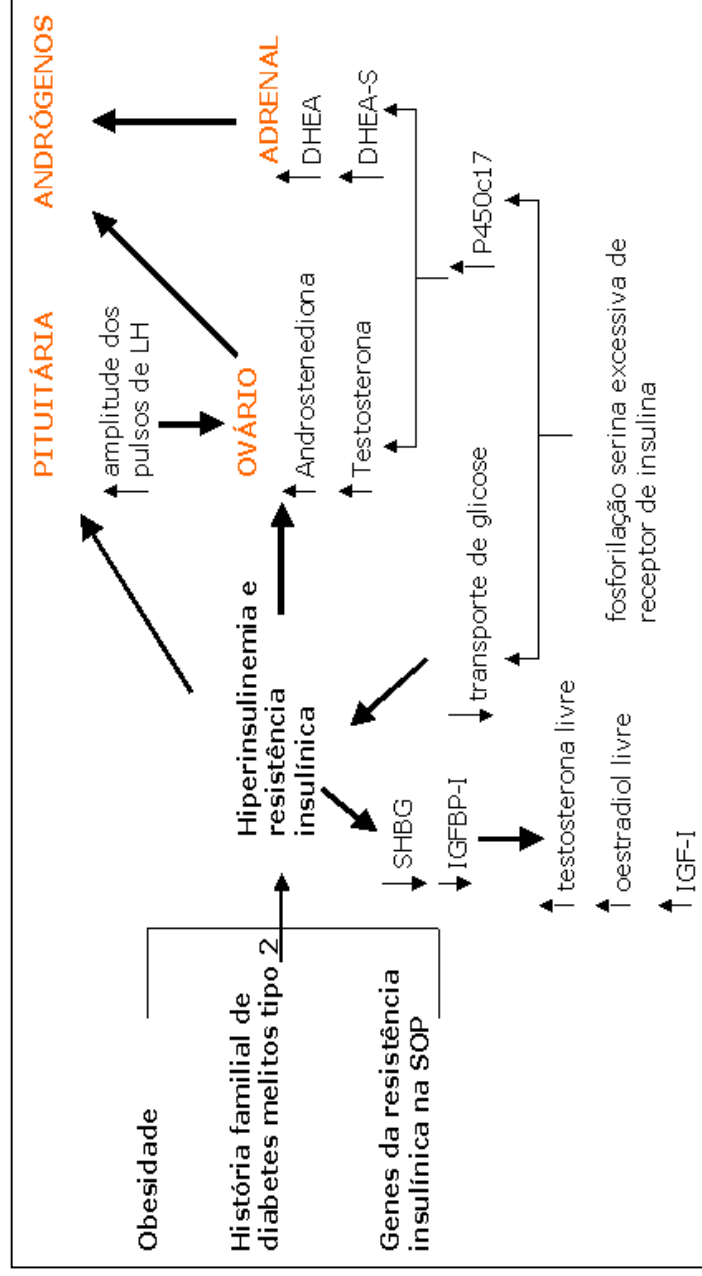


Figura 1. Vias que levam ao excesso de andrógeno na Síndrome do Ovário Policístico (Adaptado de Tsilchorozidou et al., 2004).

1.2 HIPERINSULINEMIA

Outra característica da SOP é a hiperinsulinemia, que é consequência da resistência periférica à insulina aumentada. A hiperinsulinemia pode ser o fator determinante da ocorrência de ciclos menstruais irregulares em mulheres com SOP (Robinson et al., 1993). A hiperinsulinemia é acompanhada pela resistência insulínica e pacientes SOP com este fenótipo possuem risco aumentado no desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2. Legro (1998) sugeriu que a resistência insulínica e consequente hiperinsulinemia pode ser o mecanismo primário patogênico da SOP. Num estudo posterior, Legro et al. (2004) relataram que aproximadamente 50% a 70% das mulheres SOP têm algum grau de resistência insulínica e esta insensibilidade hormonal pode contribuir para o hiperandrogenismo que é responsável pelas características e sintomas da SOP.

A resistência insulínica ocorre nas pacientes com anovulação e hiperandrogenismo, mas não em mulheres com hiperandrogenismo, ovários policísticos e menstruações normais, exceto se obesas. É preciso ressaltar que nem todas as mulheres com resistência insulínica têm hiperandrogenismo e nem todas as pacientes com SOP têm defeitos genéticos do receptor de insulina (Dunaif, 1995).

Já foram identificadas síndromes congênitas de resistência insulínica com características fenotípicas distintas, resultantes da hiperinsulinemia compensatória associada a mutações em genes receptores de insulina

(Barroso, 2005). Estes grupos heterogêneos têm em comum a resistência aos efeitos metabólicos da insulina nos músculos, tecido adiposo e fígado. Em 1976, Kahn et al. estudaram seis pacientes com extrema resistência insulínica que compreendia duas síndromes distintas: as síndromes do tipo A e B. A síndrome do tipo A, inclui geralmente pacientes não obesas com extrema resistência insulínica, *Acanthosis nigricans*, hirsutismo e ovário policístico. Estudos posteriores demonstraram a predominância desta síndrome associada a mutações no gene receptor de insulina (Kahn et al., 1976; Musso et al., 2004).

A síndrome do tipo B é caracterizada pela presença de um auto-anticorpo contra o receptor de insulina (Kahn et al., 1976; DeClue et al., 1991). Num estudo prospectivo realizado por Arioglu et al. (2002), as pacientes foram caracterizadas pela presença de auto-anticorpo no sangue. No entanto, ainda não há marcador sérico que possibilite a distinção entre as duas formas (tipo A e B) da síndrome.

A síndrome de Rabson-Mendenhall (SRM) (Rabson & Mendenhall, 1956) é uma outra manifestação de resistência insulínica. Essa síndrome é similar a forma tipo A, onde a principal anormalidade está provavelmente no receptor de insulina (West, 1980). Musso et al. (2005) demonstraram que as síndromes do tipo A e SRM representam as primeiras manifestações descritas que apresentam defeito monogênico na ação da insulina, fornecendo a base para o entendimento da etiologia dos defeitos desta via.

Outras doenças caracterizadas pela presença de mutações no gene receptor de insulina levando a resistência insulínica são Leprecheunismo e as

lipodistrofias, que apresentam diminuição de gordura no tecido adiposo e armazenamento em outros tecidos, que primariamente não armazenam gordura, como fígado e tecido muscular (Barroso, 2005).

Essas síndromes caracterizadas por extrema resistência insulínica foram as primeiras a mostrarem a ligação entre resistência insulínica e estados hiperandrogênicos que são manifestações características da SOP.

Provavelmente existe uma alteração genética relacionada à ação da insulina que determine um papel permissivo necessário no desenvolvimento do hiperandrogenismo e na anovulação crônica de mulheres com ovários policísticos (Dunaif, 1995). É improvável que a anovulação seja causa da diminuição da sensibilidade à insulina (Franks, 1995). Resistência à ação glicoreguladora da insulina leva a um quadro clínico de hiperinsulinemia para manter a concentração normal de glicose. Dunaif et al. (1992) realizaram testes de tolerância à glicose em pacientes SOP, mulheres hiperandrogênicas ovulatórias e mulheres normais, e demonstraram que as obesas tendem a apresentar hiperinsulinemia, que foi mais acentuada em pacientes com SOP. Na ausência de obesidade, somente as pacientes com SOP possuem hiperinsulinemia. Apenas 20% das obesas com SOP mostraram intolerância à glicose.

Dunaif (1995) relatou que pacientes com SOP portadoras de diabetes melitos não-insulino dependente (NIDDM) apresentaram relação com os mecanismos celulares de resistência insulínica e demonstrou que em monócitos e eritrócitos havia uma diminuição do número de receptores de insulina, já nos adipócitos havia uma notável diminuição da sensibilidade à

insulina, mas sem alterações da sua ligação, independentemente da presença de obesidade. Estes resultados sugerem que existe um defeito na transdução de sinal mediada pelo receptor de insulina. As pacientes SOP tendem a apresentar níveis menores de SHBG (*Sex Hormone Binding Protein* - proteína carreadora de hormônios sexuais), o que também é fator de risco para o desenvolvimento de NIDDM (Lindstedt et al., 1991).

Os mecanismos pelos quais a hiperinsulinemia causa o excesso de andrógenos e ovários policísticos são ainda desconhecidos. A presença de receptores de insulina detectados por imuno-histoquímica em tecido ovariano e estudos *in vitro* demonstrou que a insulina estimula a biossíntese de estrógenos (Poretsky et al., 1984). Foi também observado *in vitro* e *in vivo* que a insulina estimula o crescimento ovariano e a formação de cistos (Siegel et al., 2002). As CIT iniciam um papel crítico no controle da função ovariana, incluindo a integridade e regulação da função folicular. Particularmente, as CIT fornecem substratos esteróides essenciais para a esteroidogênese e modulação da função das CG (células da granulosa). Na SOP, o tamanho excessivo do compartimento das CIT pode ser responsável pelas disfunções ovarianas observadas nesta síndrome (Clement et al., 1987). Muitos argumentos apontam a insulina e os IGFs (*insulin growth factors* - IGF-I e IGF-2) como potenciais reguladores da proliferação e diferenciação das CIT (Duleba et al., 1997). A insulina e os IGFs modulam a proliferação e a diferenciação de outros tecidos (Jones et al., 1995). No ovário, a insulina e os IGFs parecem modular a esteroidogênese nas CIT e CG em várias espécies como, murinos, suínos e humanos (Cara & Rosenfield, 1988; Hernandez et al., 1988; Caubo et al.,

1989). Nas CG, a insulina e os IGFs estimulam a esteroidogênese durante a síntese de progestinas e na atividade da aromatase (Erickson et al., 1989). Nas CIT, a insulina e IGFs estimulam a produção de andrógenos (Hernandez et al., 1988).

1.3 SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Uma outra característica da SOP é o defeito na via fibrinolítica predispondo mulheres a doenças cardiovasculares e abortos recorrentes (Glueck et al., 2000). Acredita-se que o sistema ativador de plasminogênio possa estar envolvido neste processo (Atiomo et al., 1998). A insulina estimula a síntese hepática e endotelial do fator anti-fibrinolítico, inibidor de ativação do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), e defeitos na via de estimulação insulina/PAI-1, podem levar a conseqüências vasculares graves, como eventos tromboembólicos (Després & Marette, 1994; Berga, 1998;). A ativação do plasminogênio produz plasmina, uma enzima proteolítica que é importante na lise de coágulos, ovulação e implantação do embrião no endométrio. A relação entre os níveis de PAI-1 e o risco de alterações cardiovasculares não está clara. Além disso, alguns estudos especulam que a produção aumentada de PAI-1 leva a alterações na via plasminogênio-plasmina ovariana e anovulação em mulheres com SOP (Tarkun et al., 2004). Altos níveis séricos das glicoproteínas PAI-1 e fibrinogênio estão associados com resistência insulínica em vários subgrupos incluindo pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2, indivíduos não diabéticos e mulheres com SOP (Atiomo et al., 1998).

A resistência insulínica correlaciona-se positivamente com os níveis de PAI-1 (Juhan-Vague et al., 1989; Avellone et al., 1994). Anderson et al. (1995) demonstraram que os altos níveis séricos de PAI-1 em pacientes portadoras de SOP foram reduzidos por dieta e devido a esta redução, as mulheres voltaram a ter menstruações regulares e algumas puderam engravidar. Atiomo et al. (1998) sugeriram que a insulina mediando a elevação do nível de PAI-1 pode contribuir para a infertilidade anovulatória e abortos recorrentes pela limitação de plasmina necessária para estes processos.

Segundo McCarty (2005), o aumento do fluxo de ácidos graxos livre aumenta a síntese *de novo* de diacilglicerol (DAG) e a ativação de proteína C quinase (PKC) no endotélio vascular, e isso pode ser o grande responsável pelas endoteliopatias e risco vascular aumentado, associado com resistência insulínica, inclusive em mulheres SOP. Este mecanismo pode também mediar, em grande parte, o aumento de PAI-1 observado nesta síndrome. A PKC ativa promotores de transcrição em células endoteliais e em outros tecidos, aparentemente por auxiliar a atividade de fatores de transcrição que se ligam na região promotora do gene PAI-1. O PAI-1 plasmático correlaciona-se inversamente com a habilidade da insulina suprimir níveis de ácidos graxos livre. Além disso, a infusão de triglicérides com heparina, induzindo um aumento de ácidos graxos livre, leva a um rápido aumento de PAI-1 plasmático. Alternativamente alguns estudos sugerem que o quadro clínico de hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia pode ser mediador do excesso de PAI-1 na resistência insulínica, pois a insulina e os LDLs (*Low Density Lipoproteins*) podem estimular a produção de PAI-1 em culturas celulares (Schneider et al.,

1996; Eriksson et al., 1998). De qualquer forma, PAI-1 plasmático tende a diminuir em resposta ao *clamp* hiperinsulinêmico e ao tratamento com insulina em pacientes com *diabetes mellitus* do tipo 2. Os níveis de PAI-1 não diminuem no tratamento de hipertrigliceridemia com gemfibrozil, sugerindo que o aumento dos níveis de insulina ou triglicérides parece mediar o excesso de PAI-1 *in vivo* (Landin et al., 1991; Bastard et al., 1995).

Hipertrofia da massa adiposa pode secretar PAI-1 e parece contribuir com a quantidade de PAI-1 plasmático em indivíduos obesos insulino-resistentes, mas evidências atuais sugerem que isto não parece ser a fonte primária dos níveis plasmáticos elevados de PAI-1 na síndrome de resistência insulínica. O PAI-1 plasmático pode ser diminuído em indivíduos insulino-resistentes pela melhora da sensibilidade à insulina em adipócitos (com perda de peso e tratamento com tiazolidinediona), ingestão de uma dieta com baixas calorias (que minimiza o fluxo de ácidos graxos livre pós-prandial) e por fornecer ativadores de AMP quinase-ativados, como a metformina, o qual pode moderar a síntese tecidual de DAG.

2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS E SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS

Os polimorfismos constituem o sistema biológico mais informativo nos estudos dos efeitos fenotípicos determinados por um único gene. Polimorfismo é definido como a ocorrência, em uma população, de duas ou mais variantes descontínuas de um determinado fenótipo em tal proporção que o mais raro

deles não é mantido por mutação recorrente. Pode ser qualquer variante de sequência presente na população em uma frequência >1% ou qualquer variante de sequência não-patogênica, independente da frequência. Genes são considerados funcionalmente polimórficos quando as variantes alélicas existentes de forma estável na população alteram a atividade da proteína codificada em relação à proteína selvagem. Em muitos casos, o polimorfismo genético está associado com atividade protéica reduzida, mas há exemplos de variantes com atividade aumentada (Strachan & Read, 1999; Canevari & Rogatto, 2004).

Os genes que predisõem os indivíduos à determinada doença podem ser separados em duas categorias: os de alta e os de baixa penetrância. Mutações em genes de suscetibilidade de alta penetrância aumentam o risco de desenvolver uma patologia e, isoladamente, os polimorfismos em genes de baixa penetrância, levam a um aumento modesto deste risco. Estes polimorfismos genéticos podem explicar as variações de risco no desenvolvimento de doenças entre os diferentes grupos étnicos ou em áreas geográficas (Elo & Visakorpi, 2001).

Os polimorfismos nos genes dos receptores hormonais envolvidos nas principais alterações da SOP podem estar associados com a etiologia da doença, considerando a diversificada sintomatologia entre as pacientes e a ineficácia de vários tratamentos (Marshall, 1997). Estes polimorfismos podem alterar a atividade da proteína codificada em relação ao tipo selvagem. Desta forma, algumas pessoas não respondem ao tratamento devido ao seu processamento ineficiente provocado pelas variantes alélicas existentes na

população (Emilien et al., 2000). Isoladamente, os polimorfismos genéticos possuem um efeito muito pequeno na determinação do fenótipo. Entretanto, variantes alélicas de múltiplos genes que atuam nas vias de biossíntese de hormônios podem, em conjunto com fatores ambientais, modular a eficiência de vias metabólicas e determinar diferentes graus de severidade das doenças endócrinas (Rosa, 2003).

Polimorfismos de comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Length Fragment Polymorphisms*, RFLPs) são geralmente causados por alterações, relativamente comuns, em um único par de base em seqüências de DNA não-codificantes herdadas por transmissão mendeliana. Geralmente estas alterações levam à remoção ou à introdução de um sítio de reconhecimento em diferentes áreas do genoma para uma enzima de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos (Vogel & Mostulsky, 2000).

Polimorfismos de inserção/deleção (ins/del) fazem parte de um grupo de polimorfismos comuns, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que são menos informativos do que os microssatélites, porém são importantes para avaliação de uma variação de um único nucleotídeo. Neste caso, há uma substituição de base do tipo *missense* que resulta na troca de um aminoácido por outro que possui uma cadeia lateral diferente. Se este evento acontece em algumas regiões gênicas críticas, como a região promotora, a matriz de leitura é alterada gerando um RNAm alterado e como consequência disso, a proteína codificada terá ganho ou perda de função (Strachan & Read, 2002).

As alterações de microssatélites (repetições curtas em tandem, *STR - Short Tandem Repeats*) foram relatadas inicialmente por Weber & May (1989).

Estas podem compreender repetições variadas de dois a cinco pares de base. As repetições de duas bases $[CA]_n$, por exemplo, podem estar poucas a muitas vezes repetidas. Pode haver cerca de até 30 alelos diferentes em uma população para apenas um polimorfismo (Vogel & Mostulsky, 2000). A importância funcional destes polimorfismos ainda não está bem esclarecida, entretanto, estas seqüências repetitivas, mesmo quando situadas em regiões não codificadoras podem influenciar a expressão gênica (Comings, 1999; Westberg et al., 2001).

3. GENÉTICA DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO

As evidências das bases genéticas da SOP são muito amplas, tornando um grande desafio o entendimento das bases moleculares da doença. Embora a corrida científica em busca de um ou vários genes candidatos tenha ocorrido nos últimos anos, ainda não foi possível estabelecer o papel de quaisquer regiões genômicas associadas com a SOP (Diamanti-Kandarakis & Piperi, 2005).

Muitos estudos consideram que a SOP segue um padrão de herança autossômico dominante, entretanto, outros mecanismos propostos incluem herança autossômica ligada ao cromossomo X dominante e multifatorial (Franks, 1997; Goving et al., 1999; Medeiros & Yamamoto, 2001).

O primeiro estudo genético da SOP foi realizado por Cooper et al. (1968) no qual avaliaram dezoito pacientes com a Síndrome de Stein-Leventhal. Os autores relataram que oligomenorréia, hirsutismo e o aumento do volume

ovariano eram muito mais comum em irmãs de mulheres SOP do que em irmãs de mulheres do grupo controle.

Embora parentes em primeiro grau de mulheres com SOP apresentem um risco aumentado para desenvolver a síndrome, a base genética permanece controversa principalmente devido às suas características heterogêneas (Hague et al., 1988; Carey et al., 1993; Xita et al., 2002; Diamanti-Kandarakis & Piperi, 2005). Segundo Legro et al. (1998), irmãs de mulheres SOP têm aumento da concentração sérica de testosterona. Vink et al. (2005) analisaram dados clínicos de mais de três mil mulheres, as quais metade eram gêmeas monozigóticas e a outra metade, gêmeas dizigóticas ou irmãs de gêmeas portadoras de SOP e confirmaram que existe um forte componente familiar na herdabilidade da SOP.

Provavelmente, mais de um gene participa da patogênese desta síndrome (Figura 2). Já foram testados genes candidatos incluindo os envolvidos na biossíntese e metabolismo de andrógenos, os que afetam a secreção ou a ação da insulina e aqueles envolvidos na obesidade. Em particular, os genes que codificam proteínas que participam da biossíntese e transporte de esteróides, os envolvidos na secreção e na ação da insulina e os participantes das vias da obesidade e resistência insulínica parecem ser os mais importantes para o desenvolvimento da SOP, segundo a revisão de Diamanti-Kandarakis & Piperi em 2005 (Tabela 1).

Atualmente a SOP tem sido considerada como uma doença poligênica, o que pode ser o resultado da interação entre a suscetibilidade e as variantes genômicas sob a influência de fatores ambientais. Genes “críticos” que atuam

em outras vias e que podem estar associados com a SOP estão sob intensa investigação, como os envolvidos na ação e regulação das gonadotrofinas, receptores de dopamina, folistatina e inflamação crônica (Diamanti-Kandarakis & Piperi, 2005).

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, Rosa (2003) analisou os genes *AR*, *CYP17* e *CYP19* que atuam na via de esteróides. Não foi possível demonstrar qualquer correlação entre a dosagem de andrógenos e o genótipo receptor de andrógeno (*AR*), entretanto, o grupo constituído de pacientes com SOP mostrou uma tendência a apresentar repetições muito curtas do gene *AR* (média bialélica <18 repetições [CAG]_n). Westberg et al. (2001) não encontraram correlação significativa entre o polimorfismo [CAG]_n do gene *AR* e dosagens de testosterona livre utilizando 19 repetições como limite entre alelos longos e curtos, porém quando os autores analisaram o polimorfismo considerando somente o alelo menor (<17 repetições [CAG]_n), encontraram associação significativa com níveis de testosterona total e livre.

Para o gene *CYP17*, Rosa (2003) não encontrou uma diferença significativa entre os três genótipos (A1A1; A1A2; A2A2) entre casos e controles. Diamanti-Kandakaris et al. (1999) encontraram correlação entre o genótipo A2 e a SOP. No entanto, a casuística compreendia 4/50 mulheres com SOP e 0/50 controles com o genótipo A2A2. As dosagens hormonais de testosterona livre e total não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos. Estes dados foram concordantes aos de Gharani et al. (1996) e Diamanti-Kandarakis et al. (1999 b).

Para o gene *CYP19*, Rosa (2003) relatou que o alelo com 12 repetições [TTTA]_n apresentava uma maior frequência em casos do que nos controles sugerindo uma possível associação deste alelo com mulheres portadoras de SOP. Kristensen et al. (1998) relataram uma associação significativa entre o risco de desenvolver câncer de mama em mulheres portadoras de repetições [TTTA]_n longas.

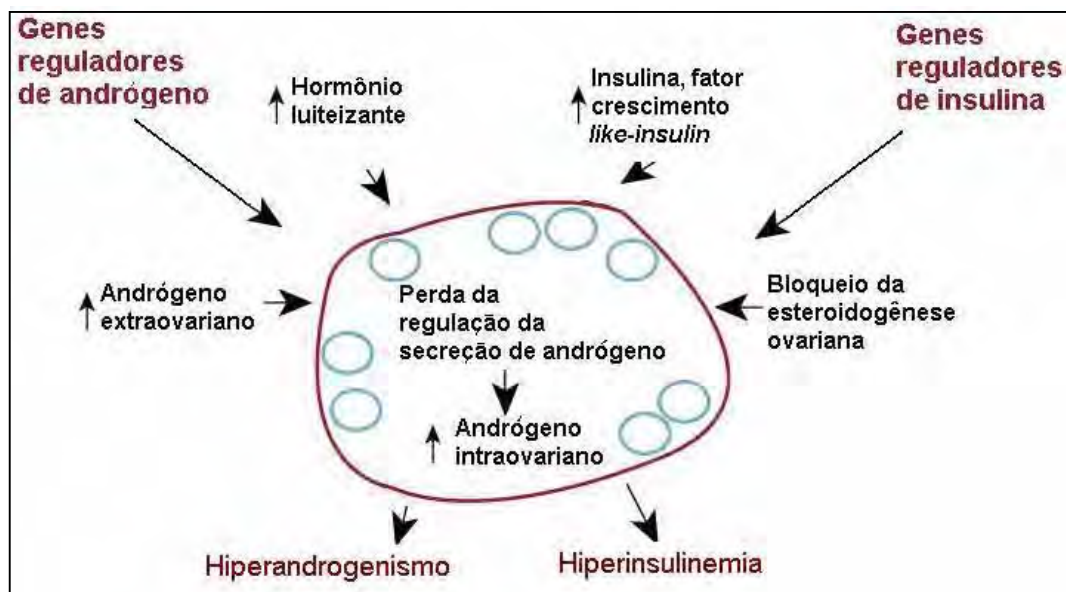


Figura 2. Defeitos genéticos que podem estar envolvidos na caracterização do fenótipo SOP. ■ ovário; □ cistos ovarianos.

Modificado de (http://www.mja.com.au/public/issues/180_03_020204/nor10314_fm.html).

Tabela 1. Genes candidatos investigados por suas possíveis associações com a Síndrome do Ovário Policístico (Revisado e modificado de Diamanti-Kandarakis & Piperi, 2005).

Mecanismos fisiopatológicos	Genes candidatos	Comentários	Referências
Genes envolvidos na biossíntese e metabolismo de andrógenos	<i>LH</i> e seu receptor	Estudo multicêntrico, mutação do receptor de <i>LH</i> , sem associação ou ligação.	Tapanainen et al. (1999)
	<i>CYP11α</i>	Estudo clínico randomizado, dados contraditórios.	Gharani et al. (1996), Urbanek et al. (1999), Kahsar-Miller et al. (2000)
	<i>CYP17α</i> hidroxilase/ <i>17,20 liase*</i>	Sem associação ou ligação.	Carey et al. (1994), Witchel et al. (1998), Diamanti-Kandarakis et al. (1999b)
	<i>CYP21-</i> <i>citocromo P450</i> <i>21-hidroxilase</i>	Mutação, sem associação.	Escobar-Morreale et al. (1999), Witchel and Aston (2000)
	<i>AR*</i>	Estudo familiar, sem associação.	Urbanek et al. (1999), Mifsud et al. (2000)
	<i>SHBG</i>	Polimorfismo, sem associação.	Hogeveen et al. (2002), Xita et al. (2003)
	Outros genes esteroideogênicos	Estudo familiar, sem associação.	Urbanek et al. (1999)
Genes envolvidos na secreção e ação da insulina	<i>INS-VNTR</i>	Presença de associação com a SOP. Estudos em famílias não demonstraram associação.	Urbanek et al. (1999), Bennett et al. (1995), Waterworth et al. (1997), Calvo et al. (2002), Vankova et al. (2002)
	<i>INSR⁺</i>	Polimorfismo no exón 17 mostrou associação com a SOP. Estudos com famílias caucasianas demonstraram associação e ligação com o marcador D19S884 próximo ao gene <i>INSR</i> . Sem associação deste polimorfismo com a SOP em mulheres coreanas. Descrito um novo SNP (T/C) no exón 17 associado a SOP	Dunaif et al. (1995), Moran et al. (2001), Tucci et al. (2001), Siegel et al. (2002), Ukkola et al. (2002), Urbanek et al. (2005), Lee et al. (2006), Jin et al. (2006)
	<i>IRS</i>	Polimorfismos nos genes <i>IRS1</i> e <i>IRS2</i> , sem associação.	Ehrmann et al. (2002a), Ibáñez et al. (2002)
	<i>IGF2⁺</i>	Associação fisiológica com mulheres SOP até 1995. Estudos genéticos mostraram evidências da associação deste polimorfismo com níveis elevados de andrógeno.	Conover et al. (1992), Buyalos et al. (1995), Urbanek et al. (1999), Cataldo et al. (2003), San Millan et al. (2004)

	<i>Calpaina-10</i>	Dados contraditórios, associação com população espanhola.	Ehrmann et al. (2002b), Gonzalez et al. (2002, 2003), Haddad et al. (2002)
Genes envolvidos na ação e regulação das gonadotrofinas	Genes receptores de dopamina	Polimorfismos, sem associação.	Kahsar-Miller et al. (1999)
	Gene da folistatina	Estudos familiares, sem associação ou ligação clara.	Urbanek et al. (1999, 2000)
Genes envolvidos com obesidade e resistência insulínica	<i>PPARγ</i>	Polimorfismo, sem associação em mulheres americanas e espanholas.	Witchel et al. (2001), Hara et al. (2002), San Millan et al. (2004)
	<i>SORBS1</i>	Estudo europeu multicêntrico, sem associação.	Lin et al. (2001), Nieters et al. (2002), Witchel et al. (2003)
	<i>PON1</i>	Polimorfismo, sem associação.	Leviev et al. (2001), San Millan et al. (2004),
	Genes que codificam outras moléculas relacionadas a resistência insulínica	Sem associação ou ligação.	Rajkhowa et al. (1996), Oksanen et al. (2000), Urbanek et al. (2003), San Millan et al. (2004)
Genes envolvidos na inflamação crônica	<i>PAI-1^t</i>	Associação do polimorfismo em mulheres com SOP (gregas e americanas). Sem associação em mulheres italianas.	Diamanti-Kandarakis et al. (2004b), Glueck et al. (2006).
	<i>TNFα</i>	Sem associação.	Walch et al. (2005), Hotamisligil et al. (1996, 1999), Milner et al. (1999), Escobar-Morreale et al. (2001)
	<i>Gene receptor TNF tipo 2</i>	Sem associação.	Fernandez-Real et al. (1998), Peral et al. (2002)
	<i>IL-6</i>	Sem associação ou ligação.	Villuendas et al. (2002), Escobar-Morreale et al. (2003a)
	<i>IL-6ST</i>	Sem associação.	Escobar-Morreale et al. (2003b)

A identificação de vias que estão anormais na SOP pode contribuir para o entendimento de sua fisiopatologia e a identificação de fatores moleculares que causam esta síndrome pode redirecionar novas condutas terapêuticas. Jansen et al. (2004) realizaram um estudo inédito que descreveu o primeiro transcriptoma dos ovários de mulheres normovulatórias, pacientes SOP e indivíduos transexuais utilizando a técnica de *cDNA Array* seguida de validação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real. Os resultados demonstraram que existem diferenças modestas, porém distintas e consistentes entre os perfis de expressão de ovários SOP e normais e também revelaram genes *up* ou *down*-regulados associados com proliferação celular e processos periovulatórios regulados por LH, o que não era esperado, pois a parada do desenvolvimento folicular induz um estado anovulatório nos ovários SOP.

3.1 GENES DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO – *ER- α* e *ER- β*

O ovário é a principal fonte da biossíntese de estrógeno, todavia, o papel do estrógeno na regulação do desenvolvimento folicular nos ovários permanece desconhecido. Durante o desenvolvimento folicular normal, um único folículo é selecionado para a ovulação quando atingem 7-9 mm de diâmetro (Gougeon, 1996; Jakimiuk, 2002).

Os estrógenos são hormônios esteróides que apresentam efeitos cruciais tanto no sistema reprodutivo feminino como no masculino, sendo importantes no sistema cardiovascular e na manutenção do tecido ósseo. Estes efeitos são

mediados pelo receptor de estrógeno, no qual este hormônio se liga (Enmark et al., 1997). Os efeitos biológicos dos estrógenos são mediados por quatro diferentes vias de receptores de estrógeno: (1) dependente do ligante clássica; (2) independente do ligante; (3) independente de ligação ao DNA e (4) sinalização não genômica de superfície celular (Curtis et al. 1996; Uht et al., 1997; McKenna et al., 1999; Kousteni et al., 2001).

Até o momento, dois receptores de estrógeno foram identificados, o subtipo alfa (ER- α) e o subtipo beta (ER- β) (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Westberg et al., 2001). Os receptores ativam a transcrição de genes alvos pela ativação de ligantes e ligação direta ao DNA palindrômico localizado na seqüência regulatória *upstream* destes genes (Estrogen Receptor, 2004).

A ativação dos genes *ER* seguida da ligação de diferentes compostos leva a uma atividade agonista ou antagonista dependendo do tipo do ligante. Caso a resposta seja antagonista o receptor será incapaz de se comunicar com a maquinaria transcricional celular (Brzozowski, 1997).

Os genes *ER- α* e *ER- β* apresentam expressão tecido-específica durante o desenvolvimento humano. O gene *ER- α* se expressa predominantemente no útero e apresenta menor expressão na pele, cólon, estômago, timo e ovário. O gene *ER- β* se expressa predominantemente no ovário, testículos, baço, cérebro e pele e é menos expresso no rim, timo e glândula adrenal (Brandenberger et al., 1997). A expressão do gene *ER- α* parece ser predominante nos órgãos reprodutivos feminino e o *ER- β* predominante em órgãos não reprodutivos e responsável pelas características reprodutivas masculinas (Couse et al., 1997; Poola et al., 2002).

O gene *ER- α* está mapeado em 6q25.1. Sua região promotora contém uma repetição polimórfica [TA]_n que foi associada a doenças coronarianas, densidade mineral óssea, disfunção ovariana prematura familiar, endometriose em mulheres e ansiedade em homens (del Senno et al., 1992; Comings et al., 1999; Georgiou et al., 1999; Syrrou et al., 1999; Becherini et al., 2000; Kunnas et al., 2000; Langdahl et al., 2000; Westberg et al., 2001). Temos conhecimento de apenas um relato em literatura que associa o gene *ER- α* com a SOP (Aradhana et al., 2004).

O gene *ER- β* está mapeado em 14q23-24.1. Este gene possui uma repetição polimórfica CA na região não codificadora 3', que foi associada com densidade mineral óssea em mulheres, alterações no IMC (índice de massa corpórea) pós terapia adjuvante com tamoxifeno e com Alzheimer (Tsukamoto et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Forsell et al., 2001; Yoneda et al., 2002). Outros estudos demonstraram possíveis associações entre alguns *SNPs* com alto IMC, endometriose, bulimia, disfunções ovulatórias incluindo a síndrome do ovário policístico (Sundarrajan et al., 2001; Nilsson et al., 2004; Shearman et al., 2004; Wang et al., 2004). Esse gene também foi relacionado com manifestações neoplásicas, porém Setiawan et al. (2004) não demonstraram diferença significativa entre a repetição polimórfica [CA]_n no gene *ER- β* e câncer endometrial.

O efeito principal do estrógeno parece ser a redução na síntese dos andrógenos, atividade direta nos órgãos alvos e indução da síntese de SHBG. O aumento da SHBG reduz a porcentagem de andrógenos livres circulante, o qual, associado à diminuição da síntese de andrógenos, resulta na queda da

concentração total dos andrógenos, pois a SHBG funciona como modulador da entrega dos andrógenos para os tecidos (Halbe, 2000).

Westberg et al. (2001) demonstraram que a repetição intrônica do dinucleotídeo $[CA]_n$ do gene *ER- β* estava associada aos níveis de andrógeno e SHBG séricos em mulheres pré-menopáusicas. Neste estudo, foi observada uma associação entre o baixo número de repetições $[CA]_n$ no gene *ER- β* e os baixos níveis séricos de SHBG e isto poderia explicar o aumento dos níveis de testosterona livre em pacientes portadoras de SOP.

3.2 GENE DO RECEPTOR DE INSULINA – *INSR*

A insulina é um hormônio protéico com peso molecular de 5kDa composta por 50 aminoácidos secretada pelas células β nas Ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas. A função principal da insulina é promover o transporte de glicose para o interior de todas as células, em especial para as células musculares, adiposas e hepáticas (Guyton, 1988).

O gene do receptor de insulina (*INSR*) está mapeado em 19p13.2 e apresenta um polimorfismo C/T na extremidade 3' do éxon 17 (posição 10923-His1058). Este polimorfismo está localizado no domínio tirosina quinase do gene *INSR* (Siegel et al., 2002). Mutações neste gene parecem ser a principal causa de resistência à insulina em mulheres com SOP (Franks et al., 2001; Tusié, 2005). Jin et al. (2006) descreveram um novo *SNP* no éxon 17 do *INSR* (T/C códon 3128-Cys1008), com maior frequência em casos do que nos

controles numa população de mulheres chinesas. Os autores não encontraram o polimorfismo C/T (posição 10923- His1058) nas amostras destas pacientes.

Diabetes lipoatrófica, obesidade, algumas endocrinopatias e hiperandrogenismo ovariano parecem estar relacionadas a mutações do gene *INSR* (Kadowaki et al., 1994).

Mais de sessenta tipos de mutações foram associados com resistência insulínica e outras manifestações como *Acanthosis nigricans* (Whitehead et al., 1998). A maioria dessas mutações tem padrão de herança autossômico dominante e afeta a fosforilação do receptor de insulina. Pacientes portadores de mutações homozigotas ou heterozigotas neste receptor são acometidos pela Síndrome de Rabson-Mendelhall e como já citado, essas pacientes apresentam a forma extrema de resistência insulínica (Krook & O'Rahilly, 1996).

Dunaif (1995) sugeriu que em quase 50% das mulheres com SOP, o defeito da ação insulínica heterogênea parece ocorrer nas primeiras etapas da sinalização do receptor de insulina e essa alteração não parece resultar de mutação gênica. Estudos de Talbott et al. (1996) com pacientes SOP, não forneceram evidências de variantes genômicas ou mutações no gene *INSR*. Porém, outros estudos permitiram a identificação de novos marcadores que provavelmente estariam envolvidos com a SOP.

O marcador de microssatélite D19S884, mapeado próximo ao gene *INSR*, foi associado com a etiologia da SOP, mas nenhuma associação foi relatada com os outros nove marcadores adicionais desta região (Krege et al., 1998). Urbanek et al. (1999) analisaram esta mesma região localizada *upstream* ao gene da insulina e encontraram associação desta variante genômica com a

SOP. Tucci et al. (2001) sugeriram que o gene de suscetibilidade para a SOP está localizado na região cromossômica do *INSR* e a identificação deste gene poderá esclarecer a participação da insulina e seu receptor na patogênese da SOP.

Siegel et al. (2002) encontraram evidências de que o gene *INSR* pode ser o gene de suscetibilidade da SOP, dado a ampla variabilidade do quadro de resistência à insulina nas pacientes com SOP. É improvável que uma “mutação principal” no gene *INSR* leve ao desenvolvimento da SOP, mas provavelmente, polimorfismos neste gene induziriam alterações na função deste receptor, contribuindo para a manifestação da SOP. Os autores concluíram que o polimorfismo de um único nucleotídeo (C/T) no domínio tirosina quinase do gene *INSR* estava associado com um subtipo da SOP.

Urbanek et al. (2005), por estudos de *linkage* avaliaram a associação entre uma *STR* localizada em 19p13.2, a aproximadamente 800kb do gene *INSR*, e a SOP em 367 famílias européias. Os autores sugeriram que o *locus* de suscetibilidade a SOP está mapeado no intervalo entre o gene da resistina, localizado a 420 kb telomérico, e o marcador D19S884.

Num novo estudo com mulheres da Coreia do Sul realizado por Lee et al. (2006), os autores avaliaram o polimorfismo C/T no éxon 17 do *INSR* e observaram uma alta frequência do alelo T tanto em casos como em controles, concluindo que este polimorfismo provavelmente não está associado com a suscetibilidade da SOP na população coreana.

3.3 GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO *LIKE* INSULINA TIPO 2 – *IGF2*

O gene do fator de crescimento *like* insulina tipo 2 (*IFG2*) está mapeado em 11p15.5 (Dull et al., 1994). A proteína IGF2, também conhecida como somatomedina A, é de cadeia única e apresenta uma seqüência polipeptídica homóloga à insulina. A regulação da expressão do gene *IGF2* e a função de seu peptídeo são complexas: este gene consiste em nove éxons e o peptídeo final é codificado pelos éxons 7, 8 e 9, transcrito a partir de quatro diferentes promotores (P1-P4) (Schofield, 1991).

Este gene possui um *SNP* A/G na região 3'-não traduzida. Diferentemente do que geralmente observa-se em genes com *SNPs*, nos quais o alelo raro pode estar associado com um determinado fenótipo, no gene *IGF2* o alelo comum (G/G) está associado com algumas características da SOP. Alelos G polimórficos *ApaI* presentes no gene *IGF2*, levam a um aumento de expressão deste gene em leucócitos (Vafiadis et al., 1998) e possivelmente, resulta em um aumento de secreção de IGF2 hepático. O IGF2 estimula a secreção de andrógenos ovarianos e da adrenal e foi sugerido que, a ação conjunta da isoforma IGF1 e receptores de IGFs iniciam e tem papel crucial na patogênese da SOP (Barreca et al., 1996; Mesiano et al., 1997).

Níveis aumentados de IGF2 podem contribuir para o desenvolvimento de hiperandrogenismo e conseqüente aumento do IMC e obesidade, devido a resistência insulínica nas pacientes SOP. A obesidade em adultos é determinante de risco para doenças coronarianas, *diabetes mellitus* tipo 2,

hiperlipidemia, hipertensão e outras doenças de suscetibilidade relacionadas com idade tardia (Larnon-Fava et al., 1996).

San Millán et al. (2004), avaliaram a provável associação de 15 variantes genômicas, dentre elas do gene *IGF2*, associadas com a SOP e observaram que indivíduos homozigotos G/G para a variante *ApaI* eram mais freqüentes em casos do que em controles e que este polimorfismo estava associado com hiperandrogenismo, obesidade e resistência insulínica nas pacientes.

3.4 GENE DO INIBIDOR DE ATIVAÇÃO DO PLASMINOGÊNIO TIPO-1 - PAI-1

O gene *PAI-1* está mapeado em 7q21.3-q22 e é um importante regulador do sistema ativador do plasminogênio (Ibáñez et al., 2002; Walch et al., 2005). Este gene codifica uma glicoproteína fosforilada de 48 kDa (PAI-1), membro da família de proteases serina e é inibidor primário do sistema fibrinolítico endógeno. A proteína PAI-1 é expressa e secretada nos adipócitos, fígado, cardiomiócitos e ovário (Atiomo et al., 1998; Walch et al., 2005). Fatores genéticos e agentes ambientais como mediadores inflamatórios, glicose, insulina e VLDL (*Very-Low Density Lipoprotein*) parecem regular a síntese de PAI-1 (Alessi et al., 1988; Stiko-Rahm et al., 1990; Liu, 1999; Macfelda et al., 2002; Nordt et al., 2003).

Além do seu papel nos eventos tromboembólicos e no infarto do miocárdio, o PAI-1 é um importante elemento chave em vários processos reprodutivos, como implantação do trofoblasto e ovulação (Hamsten et al.,

1987; Ueyama et al., 2002; Liu et al., 2004). Alguns estudos têm mostrado que a proteína PAI-1 está envolvida com a degradação da parede folicular e no controle da proteólise extracelular durante a fase lútea em modelos animais (Smith et al., 1997; Liu et al., 2004).

Dawson et al. (1993) descreveram um polimorfismo específico de ins/del na região promotora do gene *PAI-1*. Este polimorfismo foi caracterizado por um alelo selvagem com cinco guanosinas (5G) e o outro com quatro (4G).

Ensaio *in vitro* da atividade promotora do gene *PAI-1* sugeriram que alelos 4G apresentam maior atividade do que alelos 5G. Anderson et al. (1999) relataram que a deleção do alelo 5G estava associada com a deficiência da ligação da proteína repressora transcricional e conseqüente aumento da expressão do gene *PAI-1*. Observações clínicas indicaram que indivíduos homozigotos para o alelo 4G apresentavam concentrações plasmáticas elevadas de PAI-1 (Ridker et al., 1997). Em estudos epidemiológicos, homozigotos ou heterozigotos portando o alelo 4G foram associados com doenças coronárias familiar, com progressão da síndrome coronariana aguda e com infarto do miocárdio. Diamanti-Kandarakis et al. (2004) demonstraram que a freqüência do genótipo 4G/4G e 5G/4G foi maior em mulheres portadoras de SOP do que no grupo controle e portadoras SOP possuíam níveis séricos elevados de PAI-1. Os autores concluíram que a presença do alelo 4G na região promotora do gene *PAI-1* provavelmente está relacionada com os altos níveis séricos de PAI-1 em mulheres portadoras de SOP. Walch et al. (2005) estudando este polimorfismo não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre pacientes SOP e controles caucasianas.

Glueck et al. (2006) demonstraram que o alelo 4G do gene *PAI-1* foi mais freqüente em mulheres SOP, obesas, hiperinsulinêmicas e com hipertrigliceridemia apresentando abortos no primeiro semestre pós-concepção do que nas mulheres controle.

- Comparar os polimorfismos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* em pacientes portadoras da SOP a um grupo controle;
- Associar as variantes polimórficas por análise combinatória utilizando o *software NeoGene Analysis* para agrupamento dos genótipos e correlação com haplótipos fenótipo-específicos;
- Associar os resultados moleculares de polimorfismos individuais e agrupados a características clínicas e achados bioquímicos.

1. CASUÍSTICA

Este estudo compreendeu uma amostra de 57 pacientes, com ausência de hiperplasia adrenal congênita, tumores secretores de andrógeno e Síndrome de Cushing admitidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP, São Paulo. Dentre as pacientes, 16/57 apresentaram hiperandrogenismo, resistência insulínica e *Acanthosis nigricans*, compondo o subgrupo HAIR-AN. As demais pacientes 41/57 preencheram o critério diagnóstico da Síndrome do Ovário Policístico, de acordo com o *National Institute of Health* (1990). Todas as pacientes autorizaram o estudo por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido rubricado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (544/2004 – CEP).

As amostras do grupo controle foram obtidas de 49 mulheres encaminhadas ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu para a realização de laparoscopia por indicação médica. Todas as pacientes foram avaliadas por procedimentos clínicos e bioquímicos e por análise de imagem em ultra-sonografia para exclusão de SOP e de tumores ou qualquer outro distúrbio endocrinológico. Amostras de sangue periférico foram coletadas de todas as pacientes após Consentimento Livre e Esclarecido. Foram obtidos os dados clínicos das pacientes e controles (Anexos 1 e 2, respectivamente) e as dosagens séricas hormonais foram realizadas por técnicas bioquímicas (imuno-histoquímica e radioimunoensaio)

(Anexos 3 e 4, respectivamente). Estas amostras fazem parte de uma pesquisa anterior (291/98 – CEP) realizada em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob a colaboração da Dra. Anaglória Pontes.

Dentre o grupo de casos (SOP e HAIR-AN), foram agrupadas as pacientes que relataram história familiar de câncer de mama, endométrio e/ou ovário para comparação dos dados bioquímicos entre os casos sem história familiar de câncer (Anexo 5). Esses casos não foram confirmados por estudos anátomo-patológicos e não foram investigados em outros membros da família.

2. TÉCNICAS MOLECULARES

2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir das amostras de sangue periférico (5mL) contendo solução de EDTA 6%. Foi adicionado tampão de lise de células vermelhas - *RCLB* (pH 7,6 1X: 10mM de Tris; 5mM de $MgCl_2$ e 10mM de NaCl). As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Quando necessário esta etapa foi repetida. Posteriormente, a papa leucocitária foi isolada e o sedimento foi ressuspenso em 470 μ L de tampão de lise de células brancas (75mM de NaCl; 24mM de EDTA pH 8,0 e 2% de SDS). Foi adicionada proteinase K (SIGMA) a uma concentração final de 200 μ L/mL. As amostras foram incubadas a 37°C por 12 horas para lise dos leucócitos.

Para purificação do DNA e remoção de proteínas e ácidos graxos foi utilizada uma solução contendo os solventes orgânicos fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e em seguida, acrescentado clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. Quando necessário, este processo foi repetido.

O sobrenadante foi isolado e adicionado 1/10 do volume da amostra de acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. As amostras permaneceram a -20°C por 12 horas e depois foram centrifugadas a 13000 rpm para a precipitação do DNA seguida do descarte de etanol.

O DNA foi ressuspendido em volume adequado de água ultra-pura estéril. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro com comprimento de onda a 260nm. Após a quantificação, uma alíquota do DNA genômico foi utilizada na reação em cadeia da polimerase para amplificação do fragmento específico de cada gene.

2.2 GENOTIPAGEM DOS GENES *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* E *PAI-1*

Para a amplificação dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* foram utilizados 100ng de DNA genômico; 125 μM de cada dNTP; 20mM de Tris-HCl pH 8.3; 50mM de KCl; 1,5mM de MgCl_2 , 1U de *Taq DNA polimerase* e 10 μM de cada iniciador num volume final de 10 μL ou 25 μL .

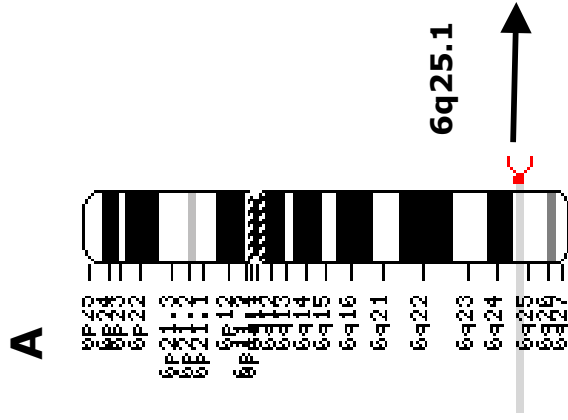
As seqüências foram amplificadas no termociclador *Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems)*. As condições de reação e os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

O produto amplificado foi observado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) após corrida eletroforética a 120V.

A localização cromossômica, seqüência amplificada e região polimórfica dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* estão apresentadas na Figura 3 - A a E.

Tabela 2. Seqüências iniciadoras e condições de reação para a análise dos genes *ER- α* (Comings et al. 1999), *ER- β* (Tsukamoto et al., 1998), *INSR* (Siegel et al., 2002), *IGF2* (Ogawa et al., 1993) e *PAI-1* (Ridker et al., 1997).

GENES	SEQÜÊNCIAS INICIADORAS	CONDIÇÕES DA REAÇÃO
<i>ER-α</i>	5'-6FAMAGACGCATGATATACTTCACC-3' 5'-GTTCACTTGGGCTAGGATAT-3'	35 ciclos (95°C / 30 seg, 60°C / 30 seg e 72°C / 30 seg)
<i>ER-β</i>	5'-HEXGGTAAACCATGGTCTGTACC-3' 5'-AACAAAATGTTGAATGAGTGGG-3'	30 ciclos (94°C / 1min, 58°C / 1 min e 72°C / 1 min)
<i>INSR</i>	5'-CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG-3' 5'-TCAGGAAAGCCAGCCCATGTC-3'	20 ciclos (92°C / 15 seg, 65°C (-0,5°C / ciclo) / 20 seg e 72°C / 30 seg)
<i>IGF2</i>	5'-CTTGACTTTGAGTCAAATTG-3'' 5'-GGTCGTGCCAATTACATTTCA-3'	35 ciclos (94° / 1 min, 55°C / 2 min e 72°C / 3 min)
<i>PAI-1</i>	5'-TAACCCCTGGTCCCGTTC-3' 5'-CAGAGGACTCTTGGTCTTTCC-3'	25 ciclos (92°C / 15 seg, 55°C / 20 seg e 72°C / 30 seg)

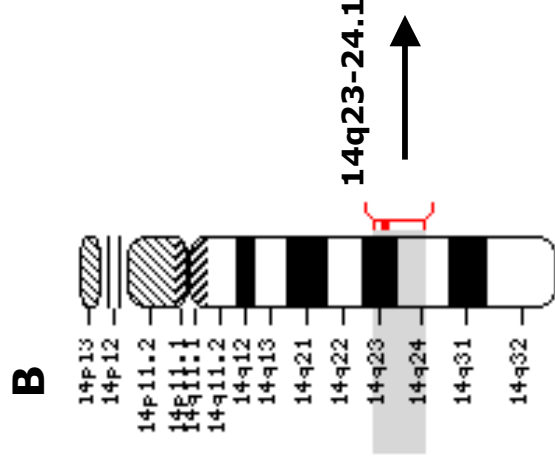


Cromossomo 6

```

AGACGCATGATATACT
TCACCTATTTTGTCT
CCTTAATATGTATATA
TATATATATATATA
TATATACACATATATG
TGTGTGTGTATGTGCG
TGTGCATGTTTAACTT
TTAATTCAGTTAAAAA
CTTTTTCTATTTGTT
TTCATCTGGATATTG
ATTCTGCATATCCTAG
CCCAAGTGAAC

```



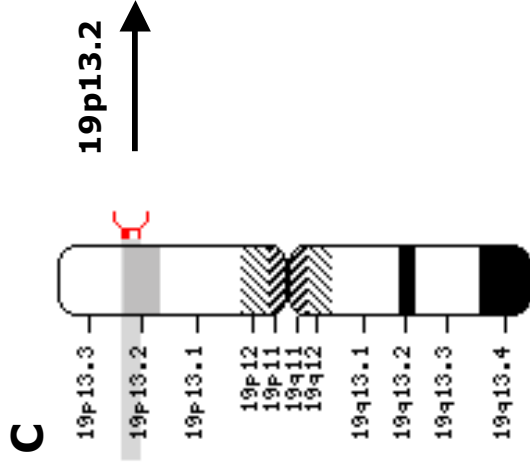
Cromossomo 14

```

GGTAAACCATGGTCT
GTACCCAGGTGTGT
GCTGCGAGCAGAGA
TATATATATATAT
ACACACATACATA
CACACACACACAC
ACACACACACACAA
ATAGTGTAACCCCTAA
GGGAGGCCACTCA
TTCAACATTTTGT

```

Figura 3. A – Ideograma do cromossomo 6, mostrando a localização do gene *ER- α* , a sequência flanqueada pelos iniciadores (verde) e a região polimórfica (vermelho); **B** - Ideograma do cromossomo 14, mostrando a localização do gene *ER- β* , a sequência flanqueada pelos iniciadores (verde) e a região polimórfica (vermelho).



Cromossomo 19

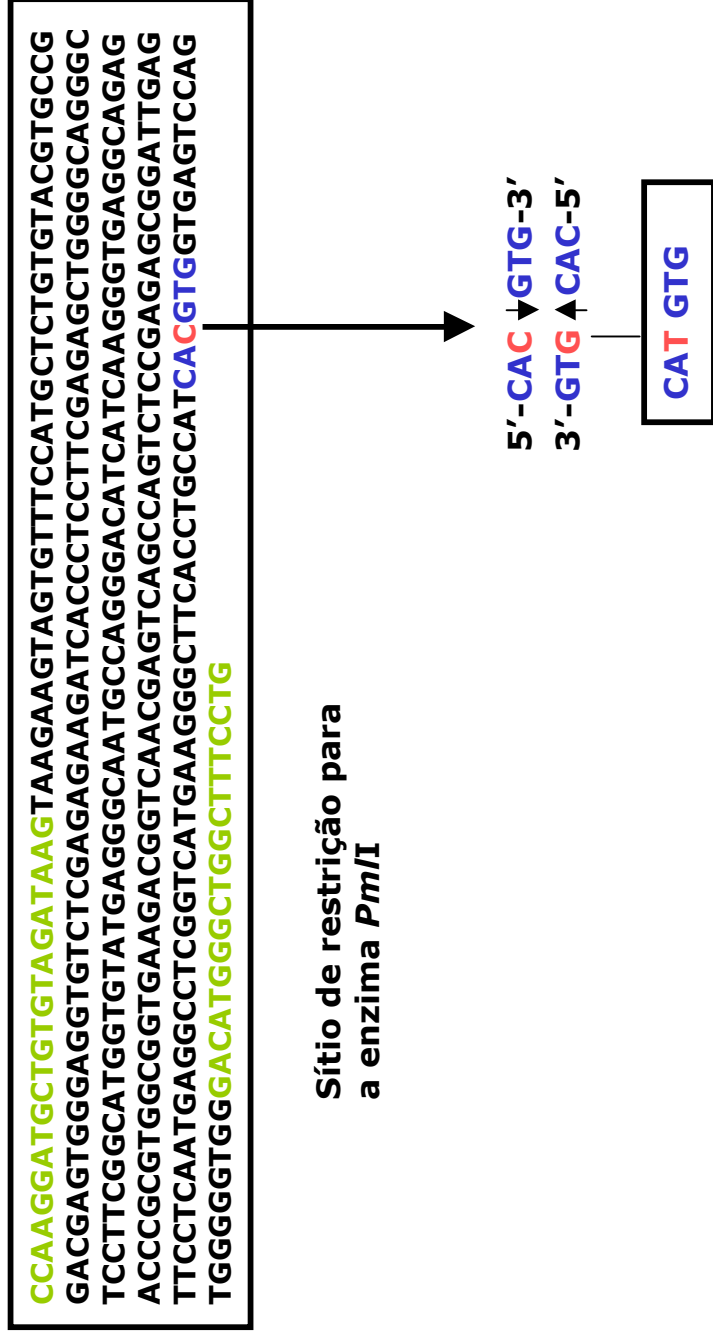


Figura 3. C – Ideograma do cromossomo 19, mostrando a localização do gene *INSR*, a sequência flanqueada pelos iniciadores (verde), a região polimórfica (vermelho) e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Pm*I (azul).

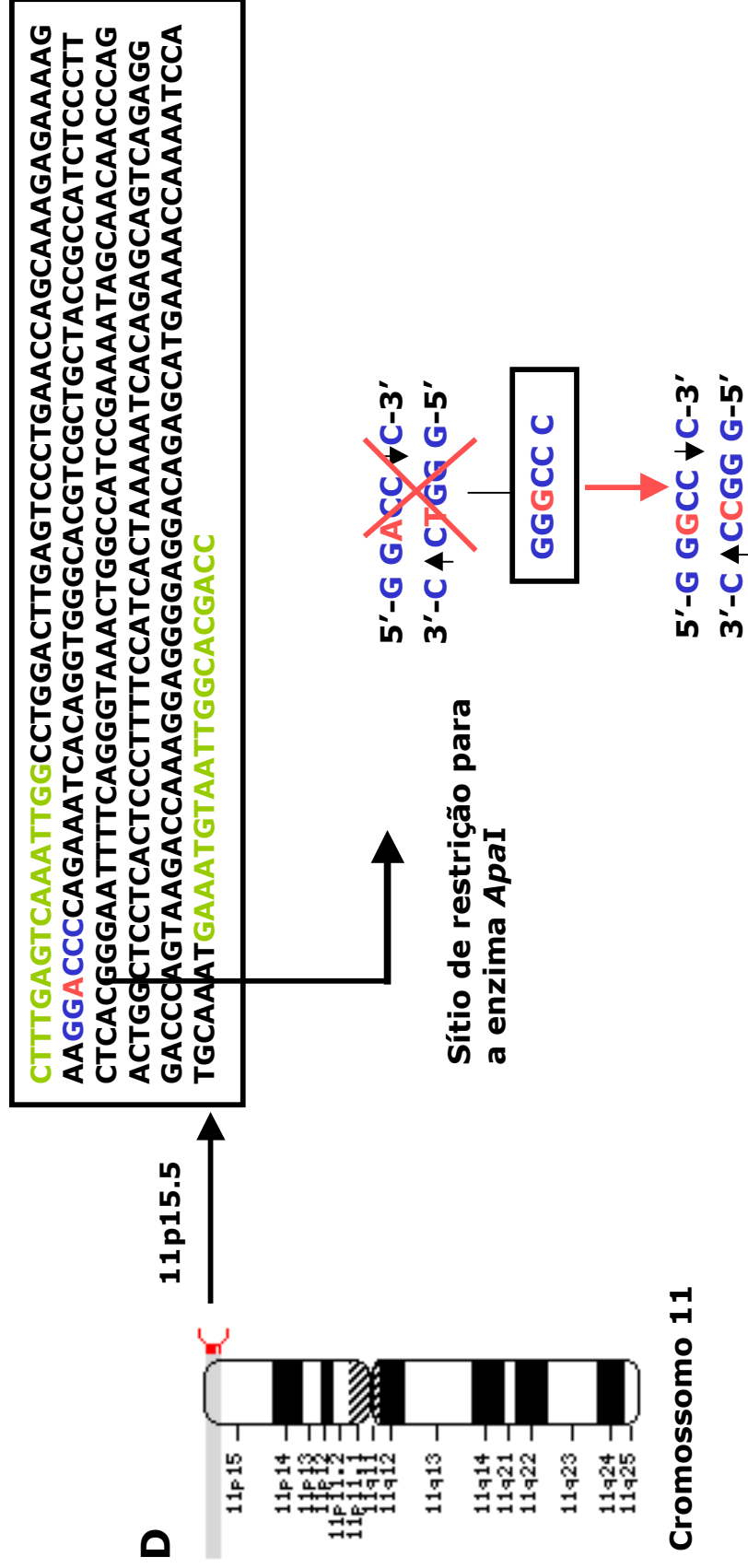


Figura 3. D – Ideograma do cromossomo 11, mostrando a localização do gene *IGF2*, a sequência flanqueada pelos iniciadores (verde), a região polimórfica (vermelho) e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *ApaI* (azul). O alelo raro A é substituído pelo alelo comum G, tornando-se um sítio de reconhecimento para a endonuclease.

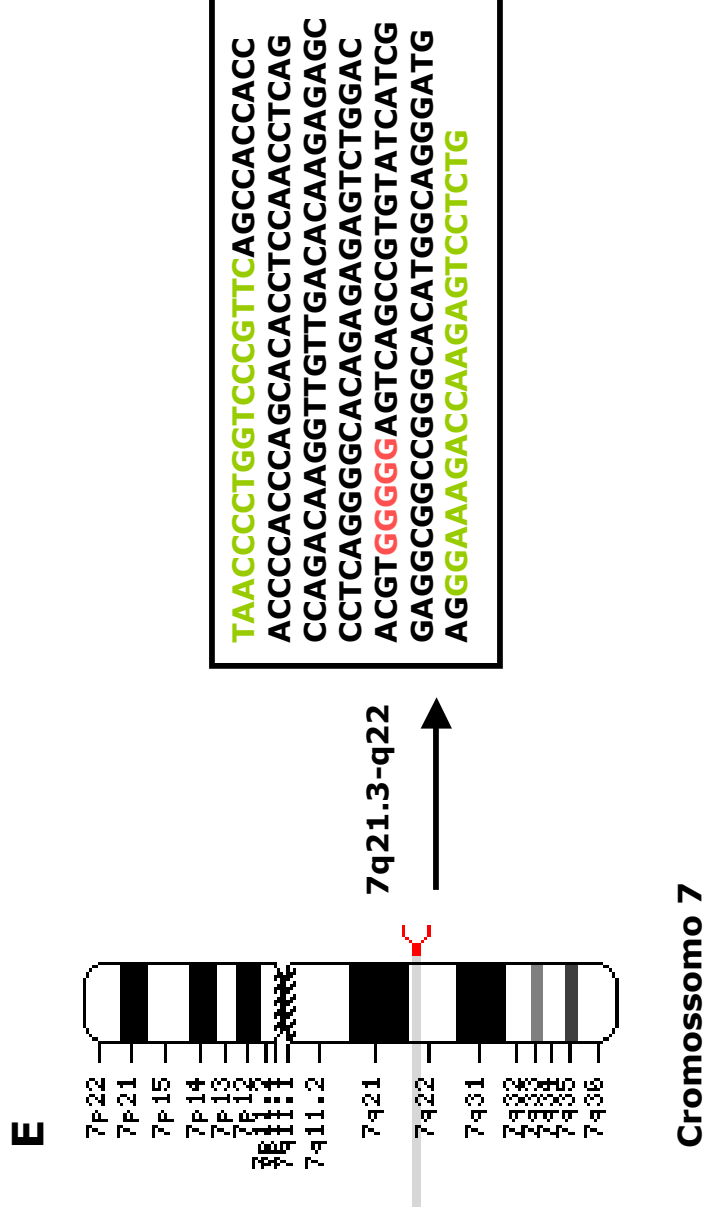


Figura 3. E – Ideograma do cromossomo 7, mostrando a localização do gene *PAI-1*, a sequência flanqueada pelos iniciadores (verde) e a região polimórfica de ins/del (vermelho).

2.3 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES - *ER- α* e *ER- β*

Os seqüenciadores automáticos de DNA possuem um sistema de detecção para quatro marcadores fluorescentes que permitem a detecção de di- ou tri-nucleotídeos para a determinação de perda alélica ou *VNTRs* (Cawkwell et al., 1993). As regiões de interesse localizadas nos genes *ER- α* e *ER- β* foram amplificadas utilizando-se iniciadores marcados com fluorocromos 6-FAM e 6-HEX, respectivamente.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese capilar em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida 5% (*Long Ranger Singel Packs/FMC*) utilizando o seqüenciador automático de DNA *ABI Prism 377 (Applied Biosystems)*.

Um volume de 1 μ L do produto final da PCR foi combinado com 2 μ L de *loading buffer* (50mg/mL de *blue dextran*, 25mM EDTA/formamida, numa concentração 1:8) e 0,5 μ L de marcador fluorescente de tamanho definido (*Size Standard ROX-500, Applied Biosystems*). A reação foi desnaturada à 95°C durante 3 minutos e transferida para uma cuba com gelo. Foram aplicados 2,2 μ L da amostra no gel pré-aquecido.

A corrida eletroforética foi realizada em tampão BTE 1X (0,09M Tris-borato; 0,002M EDTA) durante 3 horas a 200W com temperatura aproximada de 51°C. A voltagem foi fixada em 3000V e o intervalo de tempo para coletar os sinais fluorescentes no seqüenciador foi de 2400 *scans* por hora (Kinoshita et al., 1999).

Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do *laser scanner* foi coletada e analisada pelo *software Data Collection* e *GeneScan*, respectivamente (*Applied Biosystems*). A utilização de detecção fluorescente com a análise *GeneScan* é rápida e tem como resultado uma avaliação mais precisa da instabilidade de microssatélites (Cawkwell et al., 1993). Cada pico fluorescente foi quantificado pelo seu tamanho (em pares de base) e os resultados importados para o *software Genotyper* (*Applied Biosystems*), no qual foi determinado o número de repetições de microssatélites.

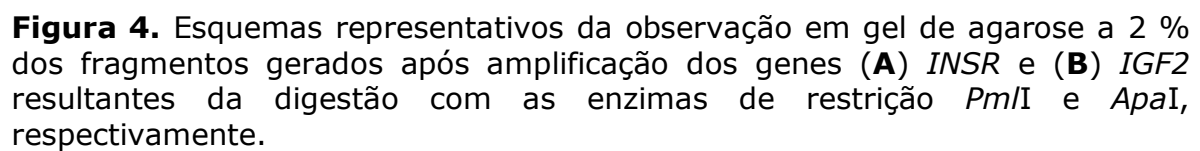
2.4 POLIMORFISMOS AVALIADOS POR PCR-RFLP - *INSR* E *IGF2*

Os produtos amplificados pela *PCR* para o gene *INSR* e *IGF2* foram precipitados com 420µL de etanol absoluto e mantidos a -70°C por uma hora. Em seguida, foram centrifugados a 13000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 10µL de água ultra-pura estéril.

Para o gene *INSR*, as amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas em banho-seco com 10U da enzima de restrição *Pml*I. Para o gene *IGF2*, as amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas em banho-seco com 20U da enzima de restrição *Apa*I.

A observação dos produtos dos genes *INSR* e *IGF2* digeridos com as enzimas *Pml*I e *Apa*I, respectivamente, foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio 0,5mg/mL. Para o gene *INSR*, a presença do alelo C cria um sítio reconhecido pela enzima de restrição *Pml*I e

a clivagem do produto de 317pb gera dois fragmentos de 274pb e 43pb. O alelo T não é reconhecido pela enzima de restrição e o fragmento de 317pb permanece inalterado. A presença do alelo G do gene *IGF2* digerido com a enzima *ApaI* é reconhecida e a clivagem do produto de 292pb gera dois fragmentos de 231pb e 61pb. Na substituição A/G o alelo A não é reconhecido pela enzima de restrição e o fragmento de 292pb permanece inalterado (Figura 4 – A e B, respectivamente).



2.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE *ins/del* (5G/4G) - *PAI-1*

Os produtos da PCR (8µl) foram diluídos em corante (*Stop Solution*) contendo EDTA 10mM pH 8.0; azul de bromofenol 0,025%; xileno cianol 0,025% e formamida 98%. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e colocadas imediatamente em cuba com gelo. Em seguida, foram aplicados em gel de poliacrilamida não-desnaturante 10% e a corrida eletroforética foi realizada em tampão BTE 1X, durante 7 horas a 300V. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por nitrato de prata a 0,2% que permitiu a determinação dos alelos 5G e 4G com 189 e 188 pb, respectivamente.

Em alguns casos o polimorfismo de *ins/del* 5G/4G na região promotora do gene *PAI-1* foi confirmado por seqüenciamento direto desta região. O produto da *PCR* foi purificado com o *kit* de purificação *Rapid PCR Purification Protocol* (Marligen Bioscience, INC) e o produto final da purificação foi utilizado como molde para as reações de seqüenciamento utilizando-se o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems*), com iniciadores que flanqueiam nas direções *forward* (5' - 3') e *reverse* (3' - 5'). As reações foram realizadas em triplicata na tentativa de evitar variação intra-ensaios e permitir a observação do genótipo pelo menos uma vez dentre três possibilidades genotípicas. O seqüenciamento desta região foi realizado no *DNA Sequencer ABI PRISM 377* (*Applied Biosystems*). Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do *laser scanner* foi coletada e estocada pelo *software Data Collection* (*Applied Biosystems*). Os dados foram analisados

pelo software *Sequencing Analysys 3.4 (Applied Biosystems)* no qual cada intensidade de fluorescência foi transformada em picos correspondentes aos nucleotídeos.

3. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA

Modelos matemáticos são utilizados na prática clínica para o cálculo da sensibilidade à insulina, baseando-se nos modelos de Legro et al. (1998; 2004). O OGTT (teste de tolerância a glicose oral) é a primeira etapa para a avaliação de sensibilidade insulínica e intolerância a glicose e o mais utilizado na rotina médica. Neste estudo foi utilizado o teste OGTT na comparação com os valores de G/I (Relação Glicemia/Insulina de jejum), HOMA (Modelo de Cálculo de Homeostase) e QUICKI (Índice Quantitativo de Avaliação de Sensibilidade), para a determinação do modelo mais adequado na avaliação de sensibilidade à insulina.

As medidas de glicemia foram ajustadas em mg/dL e da insulina em μ IU/mL. As dosagens foram feitas após jejum de 10 a 12 horas e o cálculo matemático foi baseado nos índices abaixo:

- Relação Glicemia/Insulina de jejum (G/I). Resultado com sensibilidade < 4,5 (Legro et al., 1998):

$\text{Glicemia} / \text{Insulina} = \text{G/I}$
--

- Modelo de Cálculo de Homeostase (HOMA). Resultado com sensibilidade $\geq 3,8$ (Legro et al., 2004):

$$\text{HOMA} = \frac{\text{G} \times \text{I}}{405}$$

- Índice Quantitativo de Avaliação de Sensibilidade (QUICKI). Resultado com sensibilidade $< 0,34$ (Legro et al., 2004).

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\text{G/I}}$$

4. AGRUPAMENTOS GENOTÍPICOS - *SOFTWARE NEOGENE ANALYSIS*

Nos estudos com polimorfismos genéticos, muitas vezes não se encontram resultados satisfatórios na associação genótipo *versus* fenótipo, pois geralmente as análises comparativas dos genes são realizadas individualmente. O programa *NeoGene Analysis* tem como característica principal permitir o agrupamento de genótipos, formando assim classes genotípicas que podem ser mais informativas do que os polimorfismos individuais. Este programa é um sistema rápido que atende as necessidades do usuário, economizando tempo e evitando processos manuais de análise combinatória. O programa *NeoGene Analysis* foi desenvolvido em Linguagem *Delphi 7.0*, após estruturação modelada em DER (Diagrama de Entidade/Relacionamento) pelo nosso grupo (Marchi F; Rainho CA; Rogatto SR – programa disponibilizado para *download* após solicitação e análise do grupo).

O sistema inicia-se quando o usuário informa quais genes serão analisados, pela opção *Nova Análise*, no qual são selecionadas as opções *SIM* e *NÃO* para definição de quais genes serão habilitados e/ou desabilitados, respectivamente, e qual o tipo de análise combinatória desejada (2x2, 3x3, 4x4 e assim por diante - limite de oito genes) (Figura 5).

Na etapa seguinte, um gerador de classes permite que todas as combinações de genes sejam criadas pelo programa (Figura 6). É possível também, que classes sejam carregadas pelo sistema de um arquivo externo (p.ex., extensão *.xls*). Após ser carregada, a tabela de análise pode então ser

iniciada, com probabilidades e combinações gerando resultados de agrupamentos genotípicos, onde posteriormente avaliam-se quais seqüências combinatórias são mais ou menos freqüentes entre os grupos amostrais analisados (Figura 7).

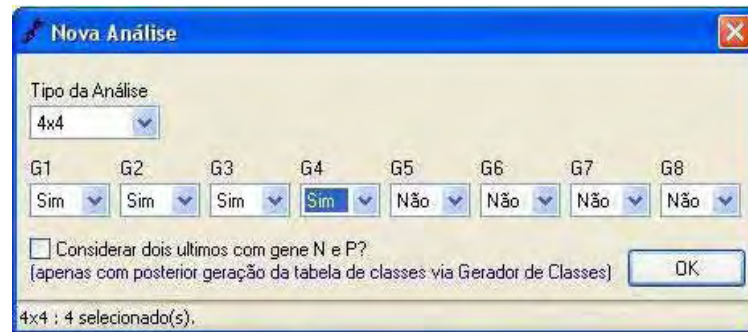


Figura 5. Representação da janela do programa *NeoGene Analysis* na fase de escolha da combinação e dos genes que serão analisados.

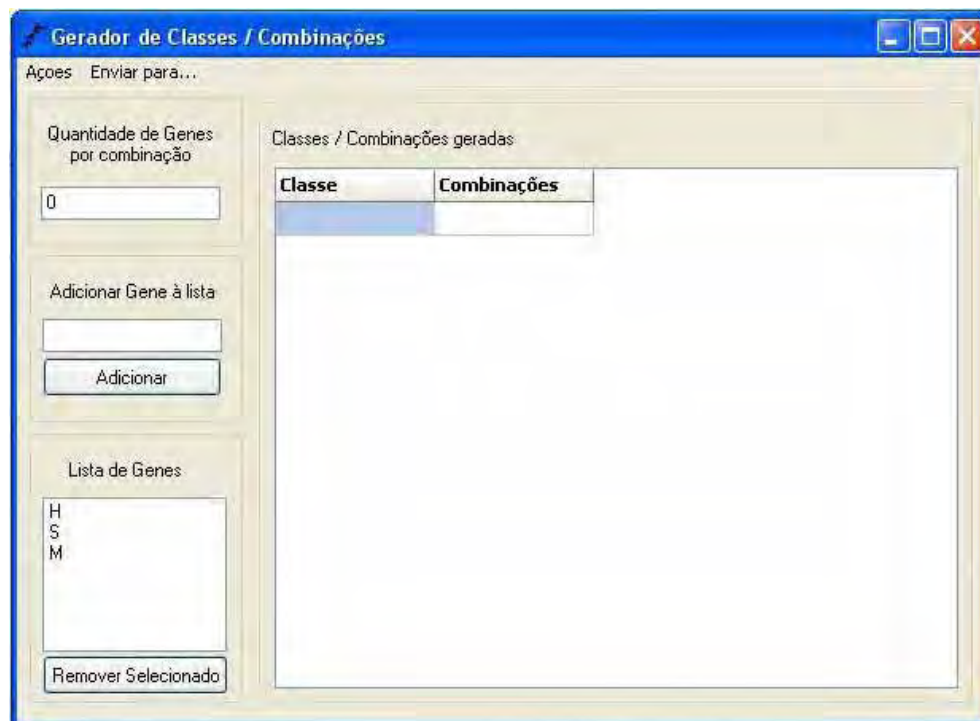


Figura 6. Janela do programa *NeoGene Analysis* na opção *Gerador de Classes* no qual são realizadas todas as combinações possíveis entre os genes.

Gen Analysys v1.5

Arquivo Dados Ajuda

Dados a serem Analisados

IDObs	IDGrupo	sexo	idade	fumante	alcool	local	1a	2a	3a	4a	5a
363	HAIR-AN	F	33	S	S	0.98	H	H	H	H	S
364	HAIR-AN	F	27	S	S	1	H	M	H	M	H
365	HAIR-AN	F	41	S	S	0.92	S	S	S	S	S
366	HAIR-AN	F	41	S	S	0.95	S	M	S		
367	SOP	F	29	S	S	0.84	S	H	S	H	S
368	HAIR-AN	F	38	S	S	0.89	M	S	S	H	S
370	HAIR-AN	F	28	S	S	1	S	H	H	H	S
371	HAIR-AN	F	36	S	S	0.84	S	M	S	H	H
375	SOP	F	20	N	S	0.92	S	H	S	H	H
377	HAIR-AN	F	43	S	S	0.93	S	H	H	S	S
378	HAIR-AN	F	24	S	S	0.95	S	H	S	S	H
382	SOP	F	20	S	S	0.92	S	S	S	H	H
383	HAIR-AN	F	35	S	S	1.05	H	S	S	H	S
611	SOP	F	19	S	S	0.90	S	H	H	H	H
617	SOP	F	30	N	N	0.89	S	M	H	H	S
622	HAIR-AN	F	25	S	S	0.99	S	M	M	H	H

Dados Analisados

Classe	Combinação	HAIR-AN	SOP	controle LU	controle SOP
Classe 20	MH5	1	0	0	0
Classe 23	M55	1	0	0	0
*****	Total	HAIR-AN	SOP	controle LU	controle SOP
Idade Média	30	32	28	36	28
*****	Total	HAIR-AN	SOP	controle LU	controle SOP
Fumantes	57%	88%	61%	32%	54%
Não Fumantes	43%	12%	39%	68%	46%
*****	Total	HAIR-AN	SOP	controle LU	controle SOP
Bebem	48%	100%	49%	--%	0%
Não Bebem	54%	0%	51%	--%	100%
*****	Presença	Maior Presença	Menor Presença		
Total n. qd	3%	HHH	HHH		

Tabela de Análise: CARREGADA

Tabela de Classes: CARREGADA

Figura 7. Última janela gerada pelo programa *NeoGene Analysis* com os resultados obtidos da análise combinatória entre os grupos.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística de variáveis numéricas, utilizamos o Teste de Wilcoxon & Mann-Whitney e o Teste t de Student, para amostras independentes e quando não atendiam para o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a análise de dados categóricos, utilizamos o teste chi-quadrado (χ^2) e o Teste exato de Fisher. Na comparação de três grupos com variáveis numéricas, utilizamos a análise de variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal Wallis, quando a pressuposição de normalidade e igualdade entre as variâncias entre os grupos não foram iguais. Para comparações múltiplas entre os grupos, utilizamos o teste de Dunn. Em todas as análises, consideramos o nível de significância $\leq 0,05$.

Consideramos grupos com poder estatístico aqueles que apresentaram $n > 3$ observações.

Todas as análises foram realizadas pelo *software InStat (GraphPad InStat version 3.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia-USA)* e pelo *software SPSS for Windows XP v.12 (SPSS Inc., Chicago, IL)*.

1. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS

A caracterização das amostras, dados clínicos e bioquímicos estão relacionados no Anexo 1.

Foram analisadas 57 pacientes do grupo de casos (41 pacientes do grupo SOP e 16 do grupo HAIR-AN) e 49 mulheres do grupo controle.

Além da presença de AN (*Acanthosis nigricans*), para o diagnóstico da síndrome HAIR-AN foi considerado o valor da insulina de jejum ($\mu\text{IU/mL}$) >50 e/ou em qualquer tempo durante o OGTT ($75\text{g}>300 \mu\text{IU/mL}$). *Acanthosis nigricans* foi detectada em 100% das pacientes do grupo HAIR-AN e 48,8% pacientes do grupo SOP e em nenhuma das mulheres controle. A diferença entre as pacientes foi significativa pelo teste exato de Fisher ($p<0,001$).

O grupo caso apresentou uma variação de idade de 15 a 44 anos (média $28,96\pm6,97$) e o grupo controle teve uma variação de 17 a 45 anos (média $32,26\pm6,94$). As pacientes não foram pareadas por idade.

A média e o desvio-padrão das variáveis peso, altura, IMC, T total, DHEA-s, IFG, G/I, HOMA, QUICKI e a proporção de AN e AFD foram comparados entre casos e controles e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Não foi possível obter dados clínicos e de dosagens bioquímicas de todas as mulheres do grupo controle. O número de pacientes avaliadas por característica está discriminado nas tabelas. Para a análise de genótipos associados às características clínicas e bioquímicas das pacientes e controles, dividimos os dados por participação em diferentes vias metabólicas.

Sendo assim para os genes que participam da via esteroidogênica (*ER- α* e *ER- β*) as variáveis comparadas foram IMC, IFG, T total e DHEA-s e para os genes que atuam na via insulínica (*INSR*, *IGF2* e *PAI-1*) comparamos com as variáveis AN, AFD, G/I, HOMA e QUICKI.

Ambos os grupos (casos e controles) foram constituídos de pacientes obesas e não-obesas, critério que é definido pelo valor de normalidade do $IMC < 30 \text{ Kg/m}^2$. A frequência de mulheres obesas foi de 68,42% (39/57) nos casos e de 20,41% (10/49) nos controles. A análise pelo teste χ^2 foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Foi observada sensibilidade diminuída à insulina entre as pacientes do grupo de casos (Tabela 5). Os métodos G/I, HOMA e QUICKI foram aplicados entre as mulheres do grupo controle que mostraram sensibilidade normal à insulina.

A análise estatística entre os três modelos matemáticos no grupo de casos com pacientes obesas ($n=39$), revelou que o método QUICKI foi o mais apto a detectar maior sensibilidade à insulina, comparado ao G/I ($p=0,0034$) e ao HOMA ($p=0,001$). Quando comparados os modelos G/I e HOMA no grupo casos com pacientes obesas, observou-se que o método HOMA foi mais eficaz na detecção de sensibilidade à insulina diminuída ($p=0,0003$).

As mulheres foram agrupadas com e sem relato de história familiar de câncer de mama, endométrio e/ou ovário e comparadas com as características de dosagens bioquímicas (T total, DHEA-s, LH e FSH). A presença ou ausência de história familiar foi obtida em entrevista com a paciente. A média, desvio-padrão e o valor de p estão relacionados na Tabela 6. A análise estatística pelo

teste t não pareado revelou uma diferença com tendência significativa somente para a variável T total entre os casos com e sem história de câncer na família ($p=0,0502$).

Os Anexos 6 e 7 apresentam os genótipos de casos e controles, respectivamente, dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1*.

Tabela 3. Média, desvio-padrão e valor de p obtidos a partir da comparação entre casos (SOP+HAIR-AN) e controles em relação às características clínicas e dosagens bioquímicas.

	CASOS			CONTROLES			p
	MÉDIA	DP	n	MÉDIA	DP	n	
Peso	82,96	18,11	57	63,66	12,88	49	<0,001 ⁽¹⁾
Altura	1,60	0,06	57	1,58	0,06	49	0,0901 ⁽¹⁾
IMC	32,30	6,88	57	25,30	4,71	49	<0,001 ⁽¹⁾
IFG	14,16	5,78	57	5,2	0,6	22	<0,001 ⁽²⁾
T total	91,23	50,50	57	45,12	23,31	49	<0,001 ⁽¹⁾
DHEA-s	200,46	104,84	56	144	85,33	20	0,05 ⁽²⁾
G/I	6,75	5,51	57	15,5	7,56	20	<0,001 ⁽²⁾
HOMA	6,88	7,67	57	1,19	0,51	20	<0,001 ⁽²⁾
QUICKI	0,31	0,04	57	0,38	0,03	20	<0,001 ⁽²⁾

(1) Teste-t não pareado ao nível de significância $\alpha=0.05$.

(2) Teste de Wilcoxon-Mann Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha=0.05$.

Tabela 4. Percentual e valor de p obtidos das variáveis categóricas AN e AFD comparadas entre casos (SOP+HAIR-AN) e controles.

Características	Casos % (n)	Controles % (n)	p^*
AN	63,16 (57)	0 (22)	<0,001
AFD	52,63 (57)	30,43 (46)	0,0285

*Teste exato de Fisher ao nível de significância $\alpha=0.05$.

Tabela 5. Cálculo de sensibilidade à insulina com os diferentes modelos matemáticos entre as pacientes do grupo caso (SOP + HAIR-AN).

Casos (n=57)	G/I %	HOMA %	QUICKI %
	54,39	77,19	87,72

Tabela 6. Média, desvio-padrão e valores de *p* obtidos da comparação entre casos (SOP + HAIR-AN) com e sem história de câncer na família.

Características	casos com historia de câncer familiar (n=8)		casos sem história de câncer familiar (n=49)		<i>p</i>*
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
T total	246,87	421,41	108,12	109,25	0,0502
DHEA-s	189,37	140,21	198,18	97,42	0,8248
LH	12,2	11	8,52	7,33	0,2266
FSH	5,86	1,17	5,47	2,06	0,6056

*Teste t não pareado.

2. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO [TA]_n DO GENE *ER-α*

A análise do gene *ER-α* foi realizada em 57 casos e 48 controles. A análise automatizada permite identificar indivíduos homozigotos (visualização de um pico) e heterozigotos (visualização de dois picos). Eletroferogramas de um caso homozigoto e heterozigoto para os alelos do gene *ER-α* podem ser visualizados na Figura 8-A e B, respectivamente.

Foi possível detectar 18 variantes alélicas distribuídas entre casos e controles. O alelo menor (181pb) apresentou 10 repetições e o maior (217pb) mostrou 28 repetições [TA]. A Tabela 7 mostra os alelos do gene *ER-α* com o tamanho do número de repetições [TA] entre casos e controles.

Entre o grupo de casos, observou-se uma variação entre 11 e 26 repetições [TA] e para o grupo controle foi de 10 a 28 repetições. O alelo 1 variou de 10 a 24 repetições [TA] com a repetição [TA]₁₅ mais freqüente nos casos do que nos controles e o alelo 2 variou de 12 a 28 repetições [TA] (Figura 9-A e B, respectivamente). A média do número de repetições do alelo 2 ([TA]₁₅) era bem menor nos casos quando comparada aos controles ([TA]₂₄).

Foram considerados alelos *ER-α* curtos aqueles com <15 repetições e alelos longos os que possuíam ≥15 repetições. As amostras foram agrupadas em três classes: presença de dois alelos <15, presença de um alelo <15 e outro ≥15 e aquelas com os dois alelos ≥15. Estas três classes genotípicas foram utilizadas na comparação entre características clínicas e bioquímicas.

Dois casos (3,51%) e nenhum controle apresentaram os dois alelos <15, 13 casos (22,81%) e 11 controles (22,97%) mostraram um alelo <15 e o outro ≥ 15 e 42 casos (73,69%) e 37 controles (77,08%) apresentaram os dois alelos ≥ 15 . Não foi observada diferença estatisticamente significativa pelo teste χ^2 entre casos e controles ($p=0.4222$; $\chi^2=1.724$).

A média bialélica foi comparada entre casos e controles somando-se o número de repetições $[TA]_n$ dos dois alelos e dividindo por dois. A média bialélica curta (<15 repetições) foi observada em 10/57 casos (17,54%) e 4/48 controles (8,33%) e a média bialélica longa (≥ 15 repetições) em 47/57 casos (82,45%) e 44/48 controles (91,67%). A comparação entre a média bialélica $[TA]_n$ entre casos e controles mostrou uma predominância de alelos curtos para o alelo 2 entre os casos (Figura 10), porém a análise estatística pelo teste exato de Fisher não pareado mostrou-se não significativa ($p=0,2497$).

Foram também comparados os valores de IMC, IFG, T total e DHEA-s entre casos e controles, em relação às três classes genótípicas. Os dados estão apresentados pelo valor de p , média e desvio padrão das amostras. A Tabela 8 mostra a média e o desvio padrão dos casos e controles para os genótipos do gene *ER- α* . Não foi realizado teste estatístico para os genótipos curto e heterozigoto devido ao tamanho amostral observado (≤ 3). Todas as características apresentaram diferença estatística significativa entre casos e controles portadores de alelos longos (≥ 15).

Foi verificada uma tendência dos indivíduos com repetições $[TA]_n$ <15 apresentarem IMC e o nível de T total elevados, porém não houve poder

estatístico. Todas as pacientes do grupo de casos apresentaram IMC elevado ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$), porém o IMC era menor nas pacientes com alelos longos ($p < 0,0001$).

A quantificação de $17\alpha\text{-OHP}_4$, LH, FSH e T livre foi realizada somente nos casos ($n=57$). As médias e o desvio padrão das dosagens foram comparados com os genótipos do gene *ER- α* dentro do grupo (Tabela 9). Não foram observadas diferenças significativas na comparação dessas variáveis.

O genótipo longo (≥ 15) do gene *ER- α* no grupo de pacientes com história familiar de câncer de mama e/ou endométrio foi comparado com o grupo sem história de câncer. Este genótipo também foi comparado com as variáveis T total, DHEA-s, LH e FSH. Não foi possível comparar as variáveis com os demais genótipos do gene *ER- α* , devido ao pequeno tamanho amostral (≤ 3) (Tabela 10). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis testadas pelo teste t não pareado.

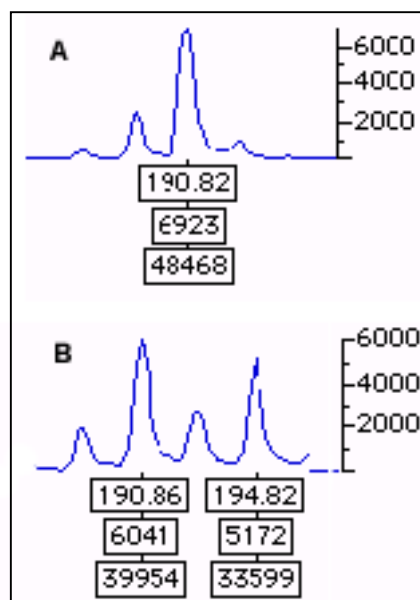
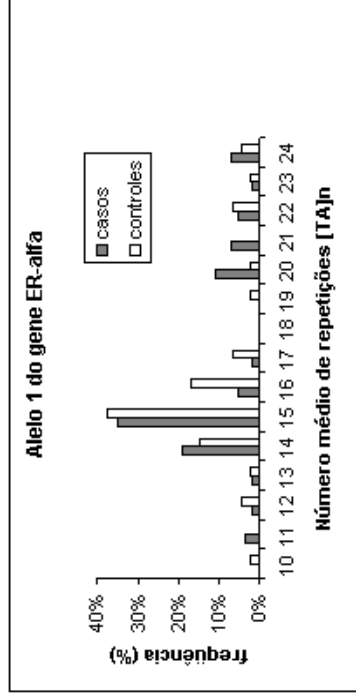


Figura 8. Eletroferogramas do produto amplificado do gene *ER-α* mostrando um caso homozigoto (**A**) e um caso heterozigoto (**B**), onde são apresentados os tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de base, a altura do pico e sua área (retângulo abaixo de cada pico, respectivamente).

Tabela 7. Associação entre os alelos do gene *ER-α* e o tamanho do fragmento correspondente (em pares de base) entre casos e controles.

Fragmentos	181	183	185	187	189	191	193	195	197	199	201	203	205	207	209	211	213	215	217
Alelos	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Casos	0%	2%	2%	1%	11%	28%	7%	5%	3%	1%	6%	8%	7%	5%	8%	6%	1%	0%	0%
Controles	1%	0%	2%	1%	8%	23%	14%	5%	0%	1%	3%	2%	11%	7%	14%	4%	2%	0%	1%

A



B

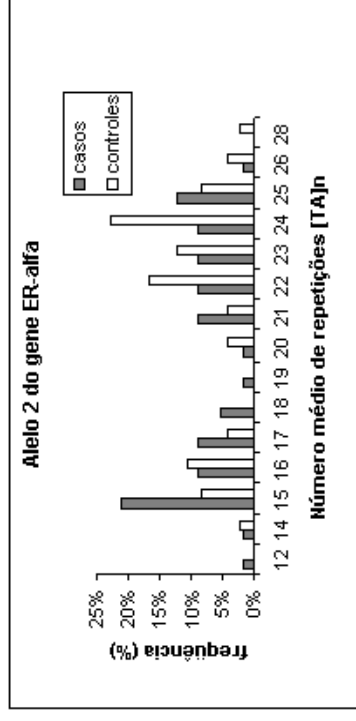


Figura 9. Distribuição da frequência do número de repetições do gene *ER-α* para cada alelo, nos casos e controles. **A** - Alelo1, **B** - Alelo2.

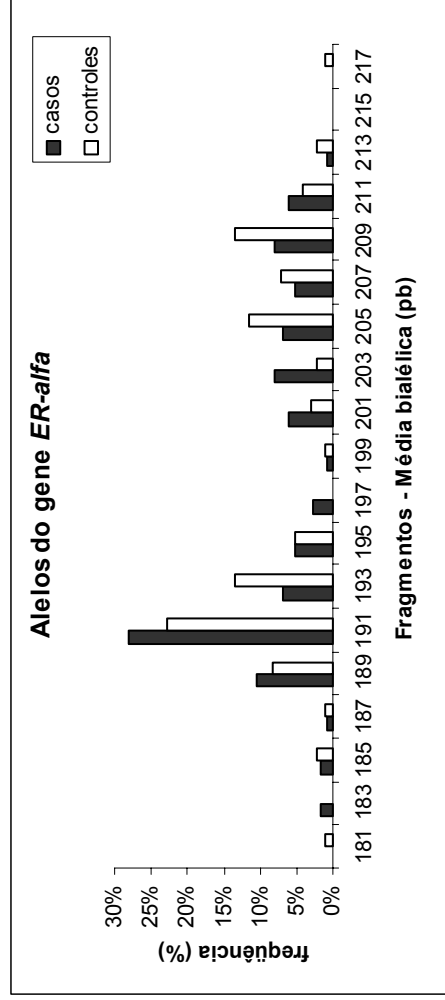


Figura 10. Frequência dos polimorfismos (média bialélica) do gene *ER-α* entre casos e controles.

Tabela 8. Média, desvio-padrão e tamanho amostral referentes aos casos e controles com relação ao IMC, IFG, T total e DHEA-s e genótipos homozigoto curto, heterozigoto e homozigoto longo do gene *ER-α*.

Genótipo – <i>ER-α</i>	Característica	Casos (n)	Controles (n)	p
Homozigoto curto (<15 repetições)	IMC	38,54±3,47 (2)	22,4±0 (1)	Nd
	IFG	13,5±7,78 (2)	Nd	Nd
	T total	136±164,04 (2)	Nd	Nd
	DHEA-s	197±94,75 (2)	Nd	Nd
Heterozigoto (<15 e ≥15 repetições)	IMC	32,06±7,56 (13)	26.58±4.83 (10)	0,0592 ⁽¹⁾
	IFG	14,46±8,15 (12)	5,67±1,15 (3)	Nd
	T total	207,93±345,56 (12)	46,15±47,52 (2)	Nd
	DHEA-s	204,35±106,47 (14)	187±48,08 (2)	Nd
Homozigoto longo (≥15 repetições)	IMC	32,07±6,76 (42)	24,79±4,53 (37)	<0,0001 ⁽¹⁾
	IFG	14,10±4,97 (42)	5,11±0,459 (19)	<0,001 ⁽¹⁾
	T total	99,45±88,28 (42)	47,56±23,39 (18)	<0,0001 ⁽²⁾
	DHEA-s	199,29±108,41 (42)	139,48±88,11 (18)	0,039 ⁽²⁾

Nd – Não definido.

(1) Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância α=0.05.

(2) Teste de Wilcoxon-Mann Whitney para amostras independentes ao nível de significância α=0.05.

Tabela 9. Média, desvio-padrão e valores de *p* referentes a comparação entre as características clínicas e bioquímicas aos genótipos do gene *ER-α* somente no grupo caso.

Características	Longo (≥15)*			Heterozigoto (<15 e ≥15)*			Curto (<15)*			<i>p</i>
	<i>n</i>	Média	DP	<i>n</i>	Média	DP	<i>n</i>	Média	DP	
17α - OHP ₄ - 0min	38	1,95	1,76	12	1,85	0,91	2	1,72	0,90	0,388 ⁽¹⁾
17α - OHP ₄ - 60min	37	3,83	2,32	10	5,23	2,57	2	3,93	3,53	0,048 ⁽¹⁾
LH	42	8,66	7,46	13	10,80	10,22	2	5,30	5,52	0,552 ⁽²⁾
FSH	42	5,54	1,93	13	5,86	1,99	2	3,15	1,91	0,605 ⁽¹⁾
T Livre	42	4,60	3,01	13	4,59	2,67	2	7,40	6,65	0,797 ⁽¹⁾

*Número de repetições polimórficas.
(1) Longo x Heterozigoto - Teste de Wilcoxon & Mann-Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha=0,05$.
(2) Longo x Heterozigoto - Teste t de Student para amostras independentes com nível de significância $\alpha=0,05$.

Tabela 10. Média, desvio-padrão e valores de *p* obtidos a partir da comparação entre casos (SOP + HAIR-AN) com e sem história de câncer familiar (relato das pacientes) associados ao genótipo longo do gene *ER-α*.

Genótipo <i>ER-α</i>	Característica	casos com história de câncer familiar (n=4)	casos sem história de câncer familiar (n=36)	<i>p</i> *
Homozigoto longo (≥15)	T total	86,68±34,03	101,43±94,73	0,7343
	DHEA-s	225,60±186,63	195,75±98,37	0,5753
	LH	9,3±3,92	8,65±7,9	0,8585
	FSH	6,31±1,36	5,48±1,99	0,3743

*Teste t não pareado.

3. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO [CA]_n DO GENE *ER-β*

Para o polimorfismo do gene *ER-β*, foram avaliados 57 casos e 48 controles. Os eletroferogramas obtidos pela análise automatizada do polimorfismo [CA] do gene *ER-β* revelaram que 27/ 57 casos (47,37%) eram homozigotos e 30/57 (52,63%) eram heterozigotos. Entre as pacientes do grupo controle, 22/48 (45,83%) eram homozigotas e 26/48 (54,17%) heterozigotas. Exemplos representativos de eletroferogramas de um caso homozigoto e heterozigoto para os alelos do gene *ER-β* podem ser visualizados na Figura 11-A e B, respectivamente.

A Tabela 11 mostra os alelos do gene *ER-β* com o número de repetições [CA] observado nos casos e controles. Foi possível detectar 14 variantes alélicas distribuídas entre casos e controles. O alelo menor apresentou 16 (149pb) repetições e o maior, 30 (177pb) repetições [CA]. O alelo 1 variou de 16 a 24 repetições sendo o alelo [CA]₂₂ mais freqüente em casos e controles e o alelo 2 variou de 19 a 30 repetições com o alelo [CA]₂₃ mais freqüente para casos e controles (Figura 12-A e B, respectivamente).

Para o gene *ER-β* foram considerados alelos curtos aqueles com ≤22 repetições e alelos longos os que possuíam >22 repetições [CA]. Os casos e controles foram agrupados em três classes: presença de dois alelos ≤22, presença de um alelo ≤22 e outro >22 e aqueles com os dois alelos >22. Estas três classes genotípicas foram utilizadas para a comparação de várias características clínicas e de dosagens bioquímicas. Quinze casos (26,3%) e 10

controles (20,8%) apresentaram os dois alelos ≤ 22 , 29 casos (50,9%) e 25 controles (52,1%) tinham um alelo ≤ 22 e o outro > 22 e 13 casos (22,81%) e 13 controles (27,1%) apresentaram os dois alelos > 22 . Não foi observada diferença estatisticamente significativa pelo teste χ^2 entre casos e controles ($p=0,768$; $\chi^2=0.529$).

Para o gene *ER- β* foi realizada a comparação entre a média bialélica do tamanho dos fragmentos em casos e controles (Figura 13). Utilizando o mesmo limite de corte da análise monoalélica, observou-se média bialélica curta (≤ 22 repetições) em 25 casos (43,86%) e 26 controles (54,17%) e média bialélica longa (> 22 repetições) 32 casos (56,14%) e 22 controles (45,83%). Foi verificada uma frequência elevada do alelo 2 com 24 repetições em casos quando comparada aos controles, porém a análise estatística pelo teste exato de Fisher não foi significativa ($p=0,3308$).

Calculou-se a média e o desvio padrão das características IMC, IFG, T total e DHEA-s e comparou-se entre os grupos de casos ($n=57$) e controles ($n=48$), em relação às três classes genotípicas do gene *ER- β* . A Tabela 12 mostra essa comparação. No grupo homozigoto curto não foi realizado teste estatístico para as características DHEA-s e T total, pois apresentaram tamanho amostral ≤ 3 .

Foi observada uma predominância de indivíduos com repetições $[CA]_n > 22$ e nível sérico elevado de T total nos casos ($n=57$) em relação aos controles ($n=20$) ($p<0,019$). Nos controles, os indivíduos com T total elevada apresentaram repetições $[CA]_n \leq 22$.

Os valores de 17α - OHP₄, LH, FSH e T livre foram comparados somente entre os casos, em relação às três classes genotípicas. Obteve-se o valor de p , a média, o desvio padrão das amostras (Tabela 13). Pacientes com alelos curtos mostraram dosagens menores de [17α - OHP₄ - 60min] ($p=0,025$).

A comparação entre o genótipo longo (>22) do gene *ER- β* e história familiar positiva ou negativa de câncer de mama e/ou endométrio não mostrou significância estatística. A comparação entre o genótipo e as variáveis T total, DHEA-s, LH e FSH também não se mostrou estatisticamente significativa pelo teste t não pareado (Tabela 14).

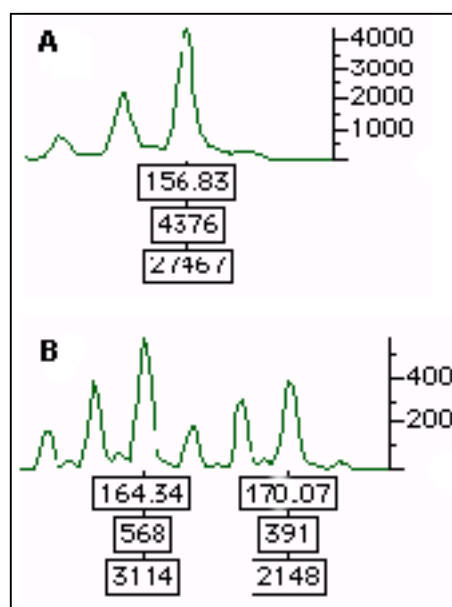
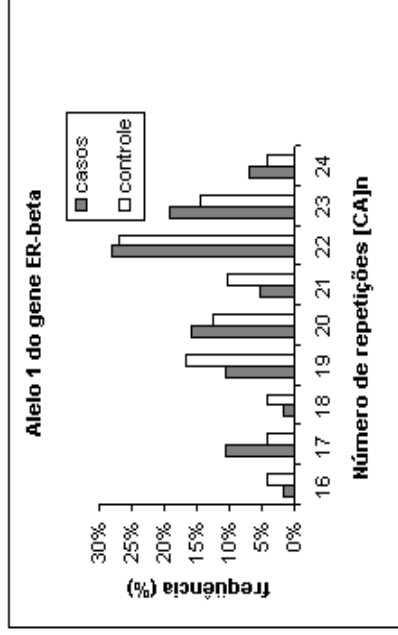


Figura 11. Eletroferogramas do produto amplificado do gene *ER-β*, mostrando um caso homozigoto (**A**) e um caso heterozigoto (**B**), onde são apresentados os tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de base, a altura do pico e sua área (retângulo abaixo de cada pico, respectivamente).

Tabela 11. Associação entre os alelos do gene *ER-β* e tamanho do fragmento correspondente em pb entre casos e controles.

Fragmentos	149	151	153	155	157	159	161	163	165	167	169	171	173	175	177
Alelos	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Casos	1%	5%	1%	6%	11%	4%	20%	28%	19%	0%	4%	1%	0%	0%	0%
Controles	2%	2%	2%	8%	6%	8%	24%	27%	7%	4%	2%	3%	2%	0%	1%

A



B

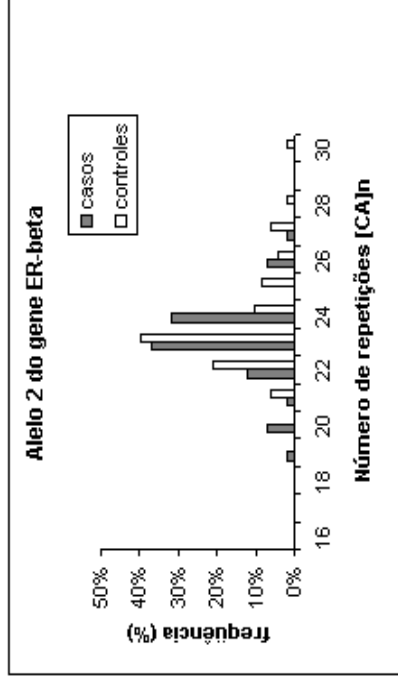


Figura 12. Distribuição da frequência do número de repetições para cada alelo, nos casos e controles. A - Alelo1, B - Alelo 2.

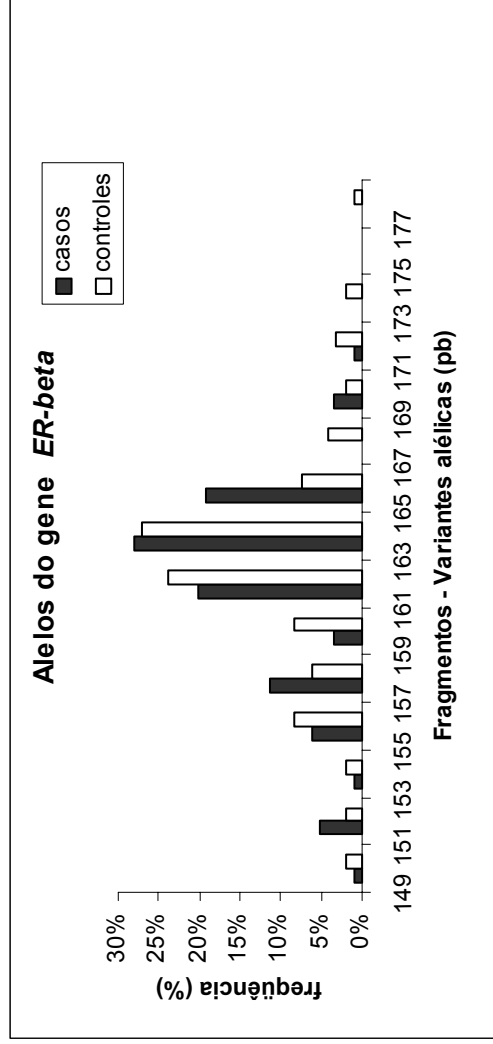


Figura 13. Frequência dos polimorfismos (média bialélica) do gene *ER-β* entre casos e controles.

Tabela 12. Média e desvio-padrão, tamanho amostral e valores de p estimados referentes à comparação entre casos e controles com relação ao IMC, IFG, T total e DHEA-s aos genótipos do gene $ER-\beta$.

Genótipo $ER-\beta$	Característica	Casos (n)	Controles (n)	p
Longo (>22 repetições)	IMC	33,29±5,65 (15)	21,94±1,82 (10)	<0.001 ⁽¹⁾
	IFG	13,27±6,9 (15)	5,6±09 (5)	0.001 ⁽¹⁾
	T total	207,44±344,37 (15)	44±18,77 (5)	0,019 ⁽²⁾
	DHEA-s	188,53±98 (15)	115,7±84,54 (5)	0,230 ⁽²⁾
Heterozigoto (≤22 e >22 repetições)	IMC	31,38±7,87 (29)	26,33±5,14 (25)	0.007 ⁽¹⁾
	IFG	14,76±6,9 (29)	5±0,4 (12)	<0.001 ⁽²⁾
	T total	97,24±105,15 (29)	46,17±26,3 (12)	0.023 ⁽²⁾
	DHEA-s	220±105,77 (29)	143,68±92 (12)	0.035 ⁽¹⁾
Curto (≤22 repetições)	IMC	33,19±5,95 (13)	25,22±3,9 (13)	<0.001 ⁽¹⁾
	IFG	13,85±3,9 (13)	5,2±0,5 (5)	0.001 ⁽²⁾
	T total	103,43±46,55 (13)	58,13±20,91 (3)	Nd
	DHEA-s	168,17±109,21 (12)	194,0±50,76 (3)	Nd

Nd - Não definido.

(1) Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $\alpha=0.05$.

(2) Teste de Wilcoxon-Mann Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha=0.05$.

Tabela 13. Média, desvio-padrão e valores de p referentes à comparação entre as características clínicas e dosagens bioquímicas e os genótipos do gene $ER-\beta$ somente no grupo de casos.

Características	Longo (>22)*			Heterozigoto (≤22 e >22)**			Curto (≤22)* [‡]			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
17 α - OHP ₄ - 0min	13	1.77	0.89	27	1.94	1.36	12	2.05	2.46	0.335 ⁽¹⁾
17 α - OHP ₄ - 60min	11	4.79	3.15	27	4.41	2.32	11	2.73	1.19	0.025 ⁽¹⁾
LH	15	8.79	4.92	29	10.04	10.28	13	7.05	4.62	0.603 ⁽¹⁾
FSH	15	5.86	1.99	29	5.42	2.17	13	5.39	1.48	0.754 ⁽²⁾
T Livre	15	4.35	2.63	29	4.96	3.52	13	4.49	2.39	0.940 ⁽¹⁾

*Número de repetições polimórficas.

[‡]Comparações Múltiplas: Heterozigoto $\neq$ Curto ($p < 0,005$ - Teste de Dunn).

(1) Teste de Kruskal – Wallis.

(2) Análise de Variância.

Tabela 14. Média, desvio-padrão e valores de p obtidos a partir da comparação entre casos (SOP + HAIR-AN) com e sem história de câncer familiar associados ao genótipo longo do gene $ER-\beta$.

Genótipo $ER-\beta$	Característica	casos com câncer familiar (n=4)		casos sem câncer familiar (n=11)		p^*
		n	Média	n	Média	
Homozigoto longo (>22)	T total	400	35±640,45	137	16±150,56	0,2012
	DHEA-s	135	75±76,11	207	78±100,90	0,2201
	LH	7	17±2,97	9	39±5,47	0,4610
	FSH	5	28±1,06	6	07±2,24	0,5166

*Teste t não pareado.

4. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (C/T) DO GENE *INSR*

Entre os 57 casos analisados para o polimorfismo *Pml*I (C/T) do gene *INSR*, 34 (59,65%) casos eram homozigotos para o alelo selvagem (C/C), 20 (35,01%) eram heterozigotos (C/T) e 3 (5,26%) eram homozigotos para o alelo raro (T/T). No grupo de 49 controles, 29 (59,18%) eram homozigotos selvagens, 15 (30,61%) heterozigotos e 5 (10,20%) homozigotos para o alelo raro (Figura 14). Não foram observadas diferenças estatísticas entre as freqüências genotípicas pelo teste χ^2 ($\chi^2=1.013$; $p=0.6026$).

Os padrões de banda referentes à digestão com a enzima *Pml*I podem ser observados na Figura 15.

Os genótipos do gene *INSR* (T/T, C/T e C/C) foram comparados com as manifestações clínicas de AN, AFD, G/I, HOMA e QUICKI. Os dados estão acompanhados dos valores da média, desvio padrão e valor de p para as características G/I, HOMA e QUICKI e mostraram-se estatisticamente significativos na comparação entre casos e controles. A presença do alelo C mostrou significância estatística na comparação entre casos e controles para a variável AN e AFD (Tabela 15).

Observou-se um discreto aumento da G/I nos controles em relação aos casos entre os indivíduos com a presença do alelo C. Os valores de HOMA foram maiores em casos do que em controles e principalmente nos casos com a presença de dois alelos C. O contrário foi observado para o teste QUICKI, no qual os valores foram mais elevados em controles do que em casos com a

presença do alelo C. Não foi possível a comparação destas características (HOMA e QUICKI) para o genótipo T/T, pois o tamanho amostral observado (≤ 3) não teve poder estatístico.

	<i>INSR</i>			Total
	C/C	C/T	T/T	
CASOS	34 59.6%	20 35.1%	3 5.3%	57 100.0%
CONTROLES	29 59.2%	15 30.6%	5 10.2%	49 100.0%

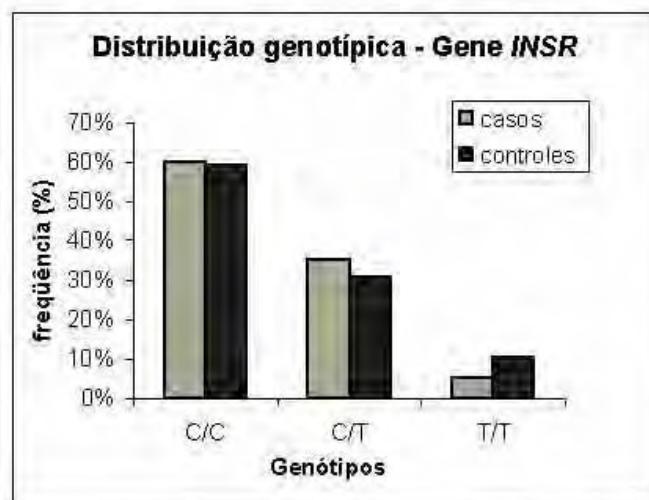


Figura 14. Distribuição genotípica do polimorfismo *Pm/I-INSR* entre casos e controles: (C/C) - homozigoto selvagem; (C/T) - heterozigoto; (T/T).- homozigoto com alelo raro.

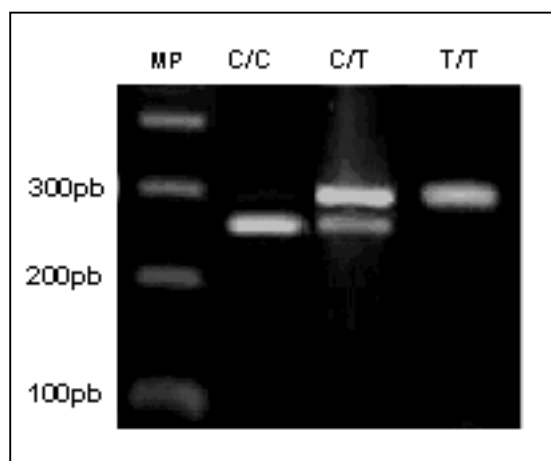


Figura 15. *PCR-RFLP* - Gel de agarose a 2% mostrando os três possíveis genótipos do polimorfismo *Pm/I-INSR*: MP: marcador de pares de base; (C/C) - homozigoto selvagem; (C/T) - heterozigoto; (T/T) - homozigoto raro.

Tabela 15. Média e desvio-padrão, tamanho amostral e valores de *p* estimados referentes à comparação entre casos e controles quanto às características G/I, HOMA, QUICKI, AN e AFD e os genótipos do gene *INSR*.

Genótipo <i>INSR</i>	Característica	Casos (n)	Controles (n)	<i>p</i>
Homozigoto selvagem (C/C)	G/I	6,47±5,82 (34)	15,57±9,8 (9)	<0,001 ⁽²⁾
	HOMA	7,57±8,32 (34)	1,27±0,65 (9)	<0,001 ⁽²⁾
	QUICKI	0,31±0,04 (34)	0,38±0,03 (9)	<0,001 ⁽¹⁾
	AN%	64,71 (34)	0 (9)	0,001 ⁽¹⁾
	AFD%	47,01 (34)	26,92 (26)	0,112 ⁽²⁾
Heterozigoto (C/T)	G/I	7,68±5,3 (20)	14,08±4,18 (9)	0,003 ⁽¹⁾
	HOMA	5,79±7,13 (20)	1,20±0,4 (9)	0,001 ⁽²⁾
	QUICKI	0,32±0,04 (20)	0,38±0,02 (9)	<0,001 ⁽¹⁾
	AN%	65,0 (20)	0 (10)	0,001 ⁽³⁾
	AFD%	60,0 (20)	40,0 (15)	0,241 ⁽⁴⁾
Homozigoto raro (T/T)	AN%	33,33 (3)	0 (3)	1,000 ⁽²⁾
	AF%	66,67 (3)	20,0 (5)	0,187 ⁽²⁾

(1) Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $\alpha=0.05$.
(2) Teste de Wilcoxon-Mann Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha=0.05$.
(3) Teste exato de Fisher.
(4) Teste de χ^2 para associação entre amostras.

5. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (A/G) DO GENE *IGF2*

O polimorfismo do gene *IGF2* foi avaliado em 56 casos e 49 controles. Os indivíduos foram divididos de acordo com os genótipos (G/G, A/G e A/A). Entre os casos, 48,21% (27/56) eram homozigotos para o alelo selvagem (G/G), 42,85% (24/56) heterozigotos (A/G) e 8,93% (5/56) eram homozigotos para alelo raro (A/A). Entre os controles, 48,98% (24/49) eram homozigotos para o alelo selvagem (G/G), 38,77% (19/49) eram heterozigotos (A/G) e 12,24% (6/49) eram homozigotos para alelo raro (A/A). A análise estatística pelo teste χ^2 não foi significativa ($\chi^2=0.3838$; $p=0.8254$) (Figura 16).

Na Figura 17 observa-se o padrão de bandas que permite classificar os indivíduos nos três grupos genotípicos.

Foram comparados os genótipos dos casos e controles com os parâmetros clínicos IMC e AFD. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 16 seguidos de desvio padrão, χ^2 e valor de P . Entre os casos, os indivíduos portadores dos alelos G/G tiveram a média do IMC elevada e entre os controles, os que apresentaram esta característica foram aqueles que tinham o alelo raro (A/A). Os casos e controles mostraram um número maior de indivíduos com a presença de AFD e portadores do alelo G ($\chi^2=1.812$; $p=0.4042$).

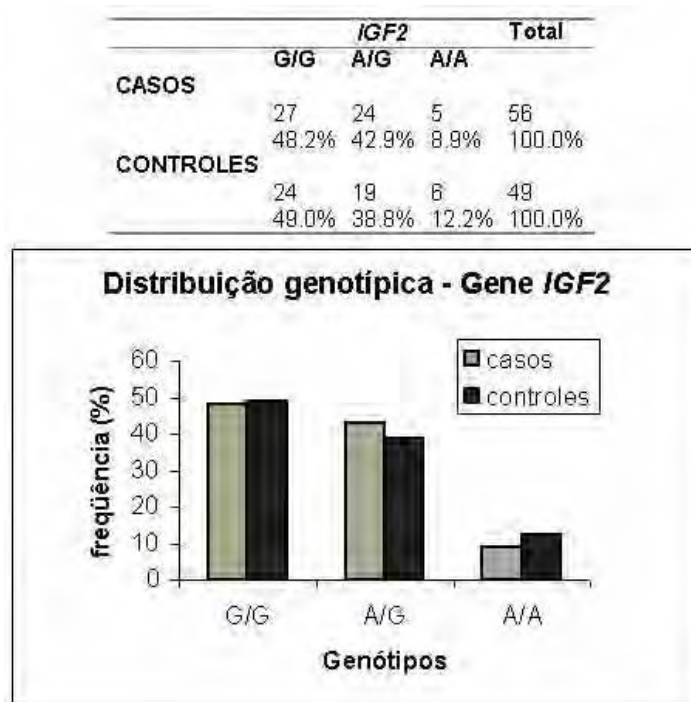


Figura 16. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene *IGF2*. G/G: homozigoto selvagem; A/G: heterozigoto e A/A: homozigoto com o alelo raro.

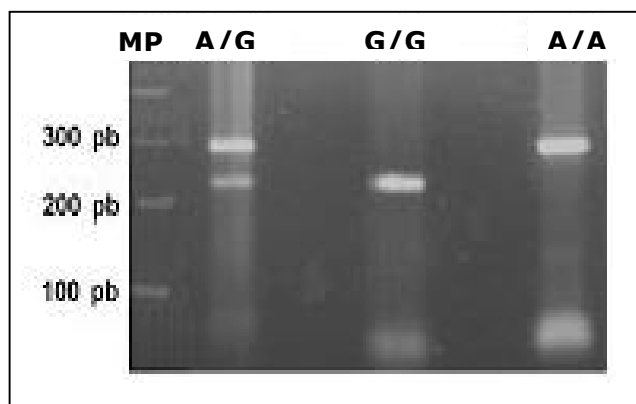


Figura 17. PCR-RFLP: Gel agarose 2% mostrando os três possíveis genótipos do polimorfismo *ApaI-IGF2*: MP: marcador de pares de base; G/G - homozigoto selvagem; A/G - heterozigoto; A/A.- homozigoto com alelo raro.

Tabela 16. Média e desvio-padrão, tamanho amostral e valores de *p* estimados referentes à comparação entre casos e controles com relação ao IMC e AFD e genótipos do gene *IGF2*.

Genótipo <i>IGF2</i>	Característica	Casos (n)	Controles (n)	<i>p</i> *
Homozigoto selvagem (G/G)	IMC	33,68±6,02 (27)	25,56±4,6 (24)	<0,001*
	AFD%	55,55 (27)	26,01 (23)	0,035 ⁽²⁾
Heterozigoto (A/G)	IMC	31,9±7,5 (24)	23,72±3,4 (19)	<0,001*
	AFD%	58,33 (24)	33,33 (18)	0,108 ⁽²⁾
Homozigoto raro (A/A)	IMC	25,9±5,9 (5)	29,29±6,7 (6)	0,408
	AFD%	20,0 (5)	40,0 (5)	1,000 ⁽¹⁾

*Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $\alpha=0.05$.

(1) Teste exato de Fisher.

(2) Teste de χ^2 para associação entre amostras.

6. RESULTADOS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO (5G/4G) DO GENE *PAI-1*

Para o polimorfismo ins/del (5G/4G) do gene *PAI-1* foram analisados 56 casos e 48 controles. Os indivíduos foram agrupados de acordo com os diferentes genótipos (5G/5G, 5G/4G e 4G/4G). Entre os casos, observou-se 27,79% (15/56) indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (5G/5G), 60,71% (34/56) heterozigotos (5G/4G) e 12,5% (7/56) homozigotos para o alelo raro (4G/4G) e nos controles, 33,33% (16/48) eram homozigotos selvagem (5G/5G), 50% (24/48) heterozigotos (5G/4G) e 16,67% (8/48) homozigotos para o alelo raro. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste χ^2 entre casos e controles ($\chi^2=1.215$; $P=0.5447$) (Figura 18).

Um gel de poliacrilamida 10% que permite a observação do padrão de bandas e a classificação dos indivíduos de acordo com o genótipo está apresentado na figura 19. A figura 20-A e B representam os cromatogramas virtuais, no qual cada nucleotídeo na região promotora do gene *PAI-1* é identificado por um pico em diferentes cores. As setas indicam o alelo com cinco ou quatro guanossinas, respectivamente.

Os genótipos dos casos e controles foram comparados com os seguintes parâmetros: AFD, IMC e G/I. Os valores da média, desvio-padrão e valores de p estão relacionados na Tabela 17. Os parâmetros IMC e G/I mostraram-se estatisticamente significativos na comparação entre casos e controles. A média de IMC estava elevada nos casos em relação aos controles em indivíduos

homozigotos para o alelo selvagem (5G/5G) e heterozigotos (5G/4G). Para o parâmetro AFD, observou-se que os casos (5G/4G), mostraram AFD maior do que os controles ($P= 0,004$).

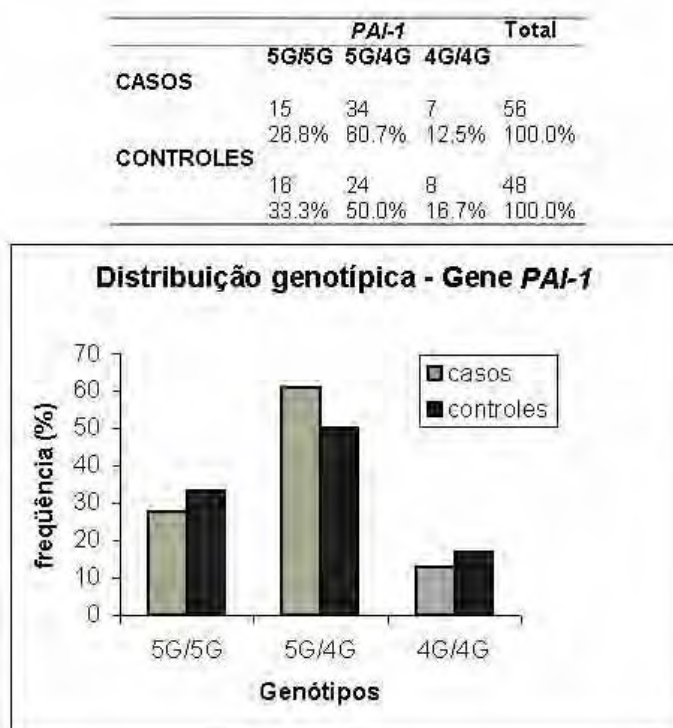


Figura 18. Distribuição genotípica do polimorfismo de ins/del no gene *PAI-1*. 5G/5G: homozigoto selvagem; 5G/4G: heterozigoto e 4G/4G: homozigoto com alelo raro.



Figura 19. Gel poliacrilamida 10% mostrando os genótipos referente ao polimorfismo ins/del 5G/4G: Homozigoto selvagem (5G/5G), Heterozigoto (5G/4G) e Homozigoto com o alelo raro (4G/4G).

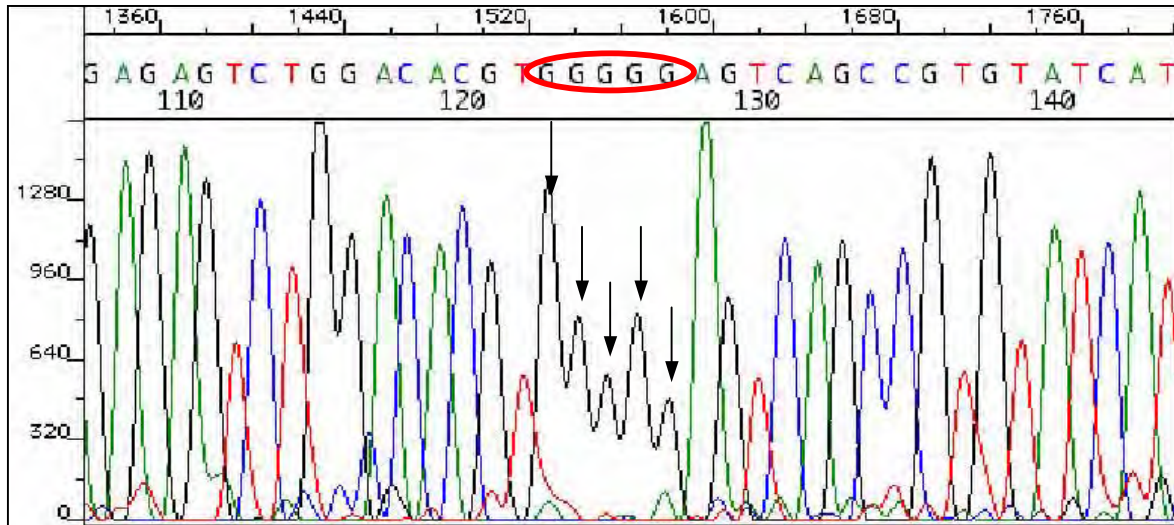
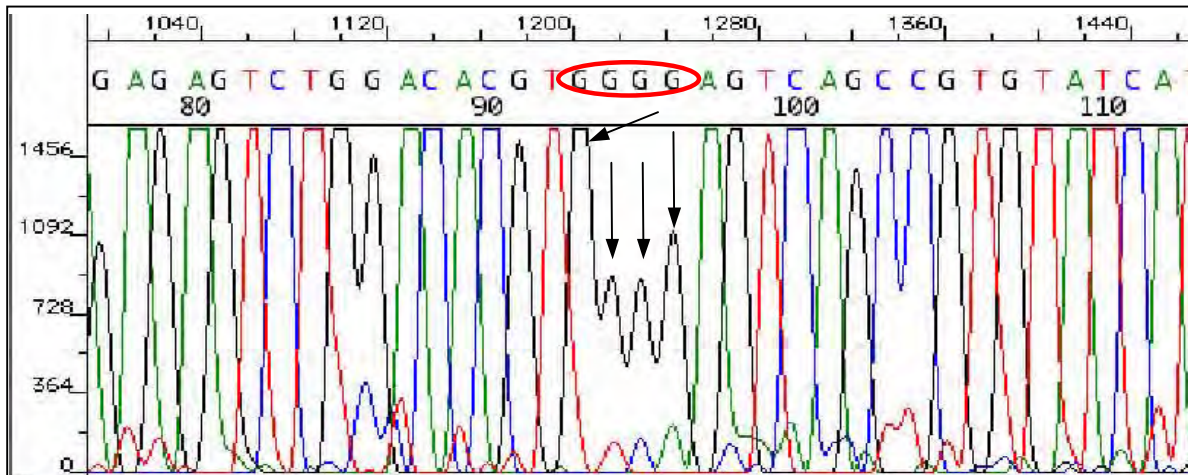
A**B**

Figura 20. Cromatogramas obtidos após seqüenciamento direto da região polimórfica do gene *PAI-1*. As setas indicam o polimorfismo de ins/del 5G/4G na região promotora deste gene. **(A)**-cinco guanossinas (5G); **(B)**-quatro guanossinas (4G).

Tabela 17. Média e desvio-padrão, tamanho amostral e valores de *p* estimados referentes à comparação entre casos e controles com relação às características IMC, G/I e AF e os genótipos do gene *PAI-1*.

Genótipo <i>PAI-1</i>	Característica	Casos (n)	Controles (n)	<i>p</i>
Homozigoto selvagem (5G/5G)	IMC	31,73±6,1 (15)	24,8±3,4 (16)	0,001 ⁽¹⁾
	G/I	4,94±3,2 (15)	19,56±11,8 (6)	0,029 ⁽¹⁾
	AFD%	33,33 (15)	37,5 (16)	0,809 ⁽³⁾
Heterozigoto (5G/4G)	IMC	32,91±7,2 (34)	26,17±5,3 (24)	<0,001 ⁽¹⁾
	G/I	7,70±6,1 (34)	13,81±4,9 (11)	0,001 ⁽¹⁾
	AFD%	58,82 (34)	19,05 (21)	0,004 ⁽³⁾
Homozigoto raro (4G/4G)	AFD%	71,43 (7)	37,5 (8)	0,315 ⁽²⁾

(1) Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $\alpha=0.05$.

(2) Teste exato de Fisher.

(3) Teste de χ^2 para associação entre amostras.

7. RESULTADOS DA ANÁLISE DE GENÓTIPOS – SOP E HAIR-AN

Foi realizada a comparação entre os genótipos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* entre os grupos HAIR-AN (n=16) e SOP (n=41) (Tabela 18). O genótipo *M* (mutado) para o gene *ER- α* foi observado somente no grupo HAIR-AN (2/16). Observou-se diferença estatística marginalmente significativa ($p=0,0624$). O genótipo *M* para o gene *IGF2* foi freqüente apenas no grupo SOP (5/41) ($p=0,3066$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os demais polimorfismos.

8. RESULTADOS DA ANÁLISE DE GENÓTIPOS–HAIR-AN E CONTROLES

Obteve-se a freqüência genotípica dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* dos grupos HAIR-AN (n=13) e controle (n=49) (Tabela 19). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Foram comparados os genótipos com as características clínicas e bioquímicas entre os grupos HAIR-AN e controles (Anexos 9 a 10, respectivamente). Foram observados diferentes valores de G/I em indivíduos HAIR-AN heterozigotos em relação aos selvagens ($p=0,0526$). Para a variável HOMA, observou-se valores elevados nos indivíduos HAIR-AN portadores de alelos selvagens em relação aos heterozigotos ($p=0,0359$).

Tabela 18. Frequência genotípica entre os grupos SOP e HAIR-AN para os genes *ER-α*, *ER-β*, *INSR*, *IGF2* e *PAI-1*.

HAIR-AN		SOP				
	S% (n)	H% (n)	M% (n)	S% (n)	H% (n)	M% (n)
<i>ER-α</i>	62,5 (10)	25,0 (4)	12,5 (2)	78,01 (32)	21,95 (9)	0,00
<i>ER-β</i>	31,25 (5)	37,5 (6)	31,25 (5)	24,39 (10)	56,10 (23)	19,51 (8)
<i>INSR</i>	56,25 (9)	37,5 (6)	6,25 (1)	60,98 (25)	34,15 (14)	4,88 (2)
<i>IGF2</i>	46,67 (7)	53,33 (8)	0,00	48,78 (20)	39,02 (16)	12,20 (5)
<i>PAI-1</i>	40,0 (6)	53,33 (8)	6,67 (1)	21,95 (9)	63,41 (26)	14,63 (6)

S – selvagem; H – heterozigoto; M – mutado.

*Teste χ^2 para amostras independentes.

Tabela 19. Média, desvio-padrão e valor de *p* da frequência genotípica entre os grupos HAIR-AN e controle.

HAIR-AN		CONTROLES					
GENES	S% (n)	H% (n)	M% (n)	S% (n)	H% (n)	M% (n)	<i>p</i> *
<i>ER-α</i>	62,5 (10)	25,0 (4)	12,5 (2)	77,08 (37)	20,83 (10)	2,08 (1)	0,1198
<i>ER-β</i>	31,25 (5)	37,5 (6)	31,25 (5)	20,83 (10)	52,08 (25)	27,08 (13)	0,5609
<i>INSR</i>	56,25 (9)	37,5 (6)	6,25 (1)	59,18 (29)	30,61 (15)	10,2 (5)	0,8191
<i>IGF2</i>	46,67 (7)	53,33 (8)	0,00	48,98 (24)	38,78 (19)	12,24 (6)	0,2973
<i>PAI-1</i>	40,0 (6)	53,33 (8)	6,67 (1)	33,33 (16)	50 (24)	16,67 (8)	0,6156

S – selvagem; H – heterozigoto; M – mutado.

*Teste χ^2 para amostras independentes.

9. RESULTADOS DA ANÁLISE DO PROGRAMA *NEOGENE ANALYSIS*

A análise dos dados realizada pelo programa *NeoGene Analysis* permitiu a observação de combinações genotípicas predominantes tanto em casos como em controles. A Tabela 20 mostra os genes e as combinações geradas seguida do código das amostras e a comparação entre casos, SOP e HAIR-AN, e controles.

A combinação *MH* (mutado+heterozigoto) para os genes *ER- β* e *IGF2* foi mais predominante nos controles (8/47) do que nos casos SOP (1/41). Observou-se a predominância de um indivíduo do grupo controle (1061) nas combinações *HS* (heterozigoto+selvagem) para os genes *PAI-1* e *IGF2* resultante da comparação entre o grupo de caso (HAIR-AN) (4/15) e controle (1/48), nesta mesma combinação e mesmos genes para o grupo SOP (13/41) e controle (1/48) e na combinação *SHS* (selvagem+heterozigoto+selvagem) para os genes *ER- α* , *PAI-1* e *IGF2* entre o grupo SOP (8/41) e controle (1/47). A análise estatística foi realizada entre estas combinações e os diferentes grupos.

Outra combinação observada foi a *HHH* (heterozigotos) para os genes *ER- β* , *PAI-1* e *IGF2* com predominância nos casos SOP (8/41) em relação aos controles (2/47). A Tabela 21 mostra média, desvio padrão e o valor de *p* das características observadas entre casos e controles.

Tabela 20. Genes avaliados, combinações e códigos das amostras resultantes da análise combinatória do programa *NeoGene Analysis*.

Genes	Combinação	SOP (n)	Código	Controle (n)	Código
<i>ER-β</i> e <i>IGF2</i>	MH	1 (41)	791	8 (47)	32,668,720,723, 764,052,1074,1088
<i>PAI-1</i> e <i>IGF2</i>	HS	13 (41)	367,617,652,654,655, 660,732,738,739,742, 775,796,864	1 (48)	1061
<i>ER-α</i>, <i>PAI-1</i> e <i>IGF2</i>	SHS	8 (41)	367,617,654,655, 660,739,775,796	1 (47)	1061
<i>ER-β</i>, <i>PAI-1</i> e <i>IGF2</i>	HHH	8 (41)	375,611,646,653, 751,770,781,870	2 (47)	763,1066
<i>PAI-1</i> e <i>IGF2</i>	HS	HAIR-AN (n) 4 (15)	363,368,370,383	1 (48)	1061

S – selvagem; H – heterozigoto; M – mutado.

Tabela 21. Média e desvio-padrão, tamanho amostral e valores de p estimados referentes à comparação entre as características idade, peso, altura, IMC, AFD e G jejum nos casos e controles obtidos da combinação *HHH* para os genes *ER- β* , *PAI-1* e *IGF2*.

Características Casos-SOP (n=8) Controles (n=2)					
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	p
Idade	22,75	5,28	29,00	2,90	0,7620 ⁽¹⁾
Peso	80,19	21,80	80,35	10,67	0,9925 ⁽¹⁾
Altura	1,62	0,07	1,63	0,02	0,8525 ⁽¹⁾
IMC	30,12	7,52	30,08	4,83	0,9945 ⁽¹⁾
AFD*	7 (8)	-	0/2	-	0,0667 ⁽²⁾
G jejum	96,75	8,34	95,50	4,83	0,8480 ⁽¹⁾

*Valores categóricos – presença de AFD (antecedente familiar de diabetes).

(1) Teste t não pareado.

(2) Teste exato de Fisher.

1. SÍNDROME DO OVÁRIO POLCÍSTICO

A Síndrome do Ovário Policístico é a endocrinopatia reprodutiva mais comum na sociedade atual, afetando entre 5 a 10% das mulheres, prevalência que é variável dependendo do critério adotado para o diagnóstico e a população estudada (caucasianas, negras, asiáticas, etc.) (Goodarzi & Azzis, 2006). Não há dados epidemiológicos sobre a incidência da SOP no Brasil, o que seria de grande importância em estudos de associação do tipo caso controle. A definição e o diagnóstico da SOP ainda é assunto controverso entre os pesquisadores. Desde que foi descrita, a SOP tem como característica principal sua heterogeneidade. Um exemplo clássico de sua manifestação heterogênea foi a observação inicial de Stein & Leventhal em 1935 de sete pacientes que tinham ovários policísticos bilaterais e oligo/amenorréia: quatro eram obesas, cinco eram hirsutas (uma com obesidade) e uma era magra e com acne.

Ao longo dos anos, a comunidade científica tem se atentado para o diagnóstico preciso da SOP e como resultado disso, duas maiores conferências sobre o diagnóstico da SOP já foram realizadas: em 1990, o critério da *National Institute of Health Conference* que compreendia (a) hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia; (b) anovulação crônica e (c) exclusão de doenças relacionadas como, hiperprolactinemia, doenças da tireóide e hiperplasia adrenal congênita e o mais recente, o critério de Rotterdam de 2003 (ver página 1). Este último consenso foi uma adaptação do

critério de 1990, pois não possuía a opção “ovários policísticos observados por ultra-sonografia” e que atualmente os especialistas consideram crucial para o diagnóstico diferencial da SOP.

Ante a essas observações, o interesse pelo entendimento da fisiopatologia da SOP também tem aumentado nos últimos anos. A atenção tem sido voltada principalmente para a ação dos mecanismos neuroendócrinos, dos esteróides e da insulina no ovário, que é a principal via alterada na SOP. Entretanto, os mecanismos alterados no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano ainda permanecem desconhecidos (Doi et al., 2005).

A SOP tem alta complexidade abrangendo problemas metabólicos e cardiovasculares em adição às disfunções ginecológicas e endócrinas. Resistência insulínica, particularmente, afeta em torno de 70% das mulheres com SOP e é um fator de risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 (Carmina et al., 2005).

Até o presente, não foi observada associação entre a SOP e neoplasias reprodutivas, (Spritzer et al., 2005) exceto em um estudo que demonstrou a associação da SOP com carcinoma endometrial em mulheres com <50 anos (Pillay et al., 2005).

A busca por genes que possam estar envolvidos nestes processos tem trazido contribuições para o conhecimento da heterogeneidade desta síndrome, que poderá ser utilizado, em longo prazo, para o desenvolvimento de terapias direcionadas (Hughes et al., 2006).

Genes que atuam na via das gonadotrofinas, metabolismo energético e sistema fibrinolítico têm sido estudados (Diamanti-Kandarakis & Piperoni,

2004), porém os genes candidatos potenciais parecem ser aqueles envolvidos na biossíntese de esteróides e da insulina, que provavelmente contribuem para as manifestações características da SOP: o hiperandrogenismo e a hiperinsulinemia.

Diferentes abordagens metodológicas têm sido empregadas para a identificação de genes que atuam nessas vias e que possam estar diretamente associados com as manifestações da SOP: estudos de *RFLP* nos genes *ER- α* , *IGF2* e *INSR* (Aradhana et al., 2004; San Millán et al., 2004; Jin et al., 2006; Lee et al., 2006); análise de microssatélites nos genes *ER- α* , *ER- β* e *INSR* (Tucci et al., 2001; Westberg et al., 2001); análise de *linkage* para o marcador D19S884 (Urbanek et al., 2000; Urbanek et al., 2005; Stewart et al., 2006); análise epigenética no gene *AR* (Hickey et al., 2006); estudos de expressão gênica semi-quantitativa nos genes *ER- α* e *ER- β* (Jakimiuk et al., 2002; Maliqueo et al., 2003), estudos de expressão gênica em larga escala - *cDNA array* (Wood et al., 2003; Diao et al., 2004; Hu et al., 2004; Jansen et al., 2004; Oksjoki et al., 2005) e técnicas de proteômica (Cortón et al., 2004; Zhao et al., 2005a).

2. SÍNDROME HAIR-AN E SOP

Atualmente a síndrome de hiperandrogenismo, resistência insulínica e *acanthosis nigricans* (HAIR-AN) compõe um sub-grupo heterogêneo da SOP e é utilizada como diagnóstico diferencial (Rotterdam, 2003). Na rotina, as

pacientes HAIR-AN, muitas vezes, são diagnosticadas como portadoras da SOP. Esse desvio pode ser causado por vários motivos, mas principalmente pela falta de consenso sobre o critério diagnóstico adotado ou pela falta de informação dos mecanismos etiopatogênicos das duas condições. Neste estudo, observou-se a presença de 16 mulheres com HAIR-AN e 49 pacientes SOP, cujo critério diagnóstico adotado foi hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico e resistência insulínica pelo OGTT.

A comparação entre as frequências genotípicas dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* entre os grupos HAIR-AN e SOP mostrou que alelos raros do gene *IGF2* é exclusivo do grupo SOP estudado, porém sem diferença estatística significativa ($p=0,3066$). O pequeno número amostral observado não permite fazer maiores conclusões, no entanto, as diferenças observadas sugerem que os polimorfismos funcionais detectados na SOP e HAIR-AN estão também relacionados com as características diferenciais destas duas patologias.

3. ALTERAÇÕES NOS GENES DA VIA DE ESTERÓIDES – HIPERANDROGENISMO

Este estudo propôs analisar o microsatélite [TA]_n do gene *ER- α* e sua associação com uma das manifestações características da SOP, o hiperandrogenismo. Foram avaliados 57 casos e 48 controles para este polimorfismo e observou-se uma associação estatisticamente significativa entre alelos longos e as características IMC, IFG, T total e DHEA-s ($p<0,0001$

para as três primeiras e $p=0,039$ para a última). Estas características apresentaram valores elevados nos casos quando comparados aos controles (ver Tabela 8). Foi verificada uma diferença estatisticamente significativa na comparação entre os pacientes SOP portadores de alelos longos e heterozigotos ($p=0,048$) para a característica $17\alpha\text{-OHP}_4\text{-60min}$, sendo mais elevada nos pacientes heterozigotos (ver Tabela 9). Os achados do presente estudo sugerem que repetições [TA] longas do gene *ER- α* estão associadas com as manifestações clínicas e bioquímicas de hiperandrogenismo na população avaliada. Ao contrário do observado neste estudo, Westberg et al. (2001) não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo [TA]₁₉₁ e níveis de andrógeno em mulheres do presente estudo.

Na análise de agrupamento de haplótipos realizada pelo programa *NeoGene Analysis* observou-se uma diferença significativa entre casos SOP (8/41) e controles (1/47) para a combinação *SHS* (selvagem+heterozigoto+selvagem) para os genes *ER- α* , *PAI-1* e *IGF2*, respectivamente. A observação de apenas um indivíduo no grupo controle, não permitiu a análise estatística. Estes genes atuam em diferentes vias metabólicas e este achado, embora significativo, foi encontrado em um número pequeno de pacientes (19,5% dos casos).

Foi observado que alelos *ER- α* longos estavam associados ao fenótipo de risco, de acordo com os dados da população estudada, juntamente com as variantes dos genes *PAI-1* e *IGF2* já descritas em associação com as manifestações da SOP (Diamanti-Kandarakis et al., 2004; San Millán et al., 2004).

Não foi observado um agrupamento com significância estatística entre os genes *ER- α* e *ER- β* que atuam nos ovários e na mesma via androgênica. Possivelmente o polimorfismo [TA] na região promotora do gene *ER- α* não é um evento primário neste processo. O número de relatos e pacientes para este polimorfismo é muito limitado e não permite conclusões definitivas, entretanto, neste estudo foi observada uma associação entre alelos longos e variáveis bioquímicas que levam ao hiperandrogenismo e, concordante a estes achados, uma correlação entre alelos longos e o fenótipo de risco (SOP).

O microssatélite [TA]_n na região promotora do gene *ER- α* tem sido amplamente investigado em outras doenças como, densidade mineral óssea (Chen et al., 2001; Yim et al., 2005), ansiedade em crianças e adolescentes (Prichard et al., 2002), regulação fibrinolítica e ulceração venosa (Ashworth et al., 2005; Hoetzer et al., 2005) e endometriose (Kim et al., 2005). A maioria dos resultados destes trabalhos mostra a associação de repetições [TA] curtas com o fenótipo alterado, exceto em dois estudos. Chen et al. (2001), encontraram uma associação entre alelos longos [TA]₂₀ e risco aumentado para o desenvolvimento de osteoporose em mulheres pós-menopáusicas e Hoetzer et al. (2005), demonstraram a associação entre alelos longos [TA]₁₈ e a falha na regulação fibrinolítica em mulheres menopausadas.

Para o gene *ER- β* foram avaliados 57 casos e 48 controles e comparados o número de repetições [CA]_n com as características IMC, IFG, T total e DHEA-s entre os grupos. De acordo com resultados, todas estas características mostraram diferença estatística significativa dentre os diferentes genótipos (≤ 22 -curto, ≤ 22 e > 22 -heterozigoto e > 22 -longo), no qual todas estavam

elevadas no grupo de casos, exceto a DHEA-s em indivíduos com alelos longos (ver Tabela 12). Uma característica que se manteve diferente entre os grupos genotípicos foi a T total: os indivíduos do grupo de casos com alelos longos (>22) tiveram os maiores índices de T total ($207,44 \pm 344,37$) quando comparados aos indivíduos do grupo de casos heterozigotos (≤ 22 e >22) ($97,24 \pm 105,15$), já as pacientes do grupo controle homozigotas ou heterozigotas para alelos longos tiveram praticamente a mesma concentração de T total ($44 \pm 18,77$ e $46,17 \pm 26,3$, respectivamente). Na comparação dos genótipos entre o grupo caso, observou-se uma diferença estatística significativa entre os indivíduos heterozigotos (≤ 22 e >22) e homozigotos para alelos curtos (≤ 22) em relação a característica 17α - OHP₄ - 60min ($p=0,025$), no qual os indivíduos heterozigotos tiveram maior concentração de 17α - OHP₄ - 60min em relação ao grupo com alelos curtos ($4,41 \pm 2,32$ e $2,73 \pm 1,19$, respectivamente).

Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, Westberg et al. (2001) demonstraram que os alelos curtos (<21 repetições [CA]), do gene *ER- β* estavam associados com os níveis aumentados de T total em mulheres. Quando foi alterado o limite de corte dos dados deste estudo para <21 repetições [CA], não houve alteração, ou seja, observou-se a prevalência de altas concentrações de T total nos indivíduos do grupo de casos com alelos longos (>21) em relação aos controles ($p=0,0051$) (dados não mostrados).

Estes resultados sugerem que na população estudada, alelos longos (>22 repetições [CA]) do gene *ER- β* estão associados com os níveis elevados de andrógenos em mulheres hiperandrogênicas com SOP.

A comparação entre as frequências genotípicas dos genes *ER-α* e *ER-β* dos indivíduos HAIR-AN e controles com as características clínicas e bioquímicas (ver anexos 8 e 9) mostrou o mesmo resultado da comparação entre o grupo caso (SOP+HAIR-AN) e controles (ver Tabela 8). Essa observação sugere que nos grupos estudados as pacientes SOP e HAIR-AN possuíram o mesmo comportamento clínico, pelo menos para as características associadas com os genes *ER-α* e *ER-β*. Embora sem poder estatístico, as duas únicas pacientes com fenótipo raro para o gene *ER-α* estavam presentes no grupo de pacientes com HAIR-AN.

Na análise realizada pelo programa *NeoGene Analysis* observou-se uma combinação genotípica com a presença dos haplótipos mutado e heterozigoto (*MH*) para os genes *ER-β* e *IGF2*, respectivamente, mais freqüente em controles (8/47) do que em casos (1/47). A baixa freqüência de indivíduos no grupo de casos (um caso) não permitiu a análise estatística dos dados. Os achados dessa análise sugerem que homozigose para alelos curtos do gene *ER-β* e heterozigose para o polimorfismo do *IGF2* poderiam ser um haplótipo protetor considerando os achados para o gene *ER-β* em nossa população, no qual os alelos longos e não os alelos curtos mostraram associação com níveis elevados de andrógenos em pacientes SOP. O mesmo é válido para o gene *IGF2*, no qual alelos comuns G e não o alelo raro A podem estar associados com a SOP (San Millán et al., 2004). Entretanto, o pequeno tamanho amostral não permite maiores conclusões.

Outra combinação gerada foi a *HHH* (heterozigotos) para os genes *ER-β*, *PAI-1* e *IGF2*, no qual observou-se um número maior de indivíduos SOP

portadores deste haplótipo (8/41) em relação aos controles (2/47). Esses genes não atuam diretamente na mesma via, porém vários autores sugerem que a produção aumentada de andrógenos na SOP é resultante das alterações das sinalizações mediadas pela insulina gerando resistência insulínica nos ovários (Wickenheisser et al., 2006). Como consequência disso, existe a hipótese de que a hiperinsulinemia, resultante do estado de resistência à insulina dos ovários, produz hiperandrogenismo ovariano pela ocupação e ativação generalizada da insulina nos receptores de IGFs (Barbieri et al., 1986). Estudos de Nestler (1998) demonstraram que a biossíntese de andrógenos insulina-dependente é mais sensível à insulina nas células da teca em ovários SOP.

A importância funcional dos polimorfismos nos genes *ER- α* e *ER- β* ainda não está clara, no entanto, acredita-se que seqüências de nucleotídeos repetidas em *tandem* (micro/minisatélites) mesmo quando situadas em regiões não-traduzidas, *per se* podem influenciar a expressão gênica (Comings, 1998).

Até o momento o único relato em literatura sobre a expressão anormal dos genes *ER- α* e *ER- β* em CG e CIT em ovários de mulheres SOP é o de Jakimiuk et al. (2002). Os autores demonstraram que estes genes possuem um equilíbrio transcricional: ambos são expressos nas CG e CIT tanto em ovários normais como de pacientes SOP, porém os níveis de expressão do gene *ER- α* são maiores na CG do que nas CIT. O gene *ER- β* apresentou níveis similares de expressão nos dois tipos celulares. O desequilíbrio destes mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento folicular anormal e falha ovulatória nas pacientes SOP.

Este estudo caso-controle demonstrou uma associação entre os polimorfismos dos genes *ER-α* e *ER-β* com o fenótipo SOP.

4. ALTERAÇÕES NOS GENES DA VIA DA INSULINA – HIPERINSULINEMIA

Para análise do polimorfismo C/T do gene *INSR* comparou-se as pacientes e o grupo controle de acordo com os genótipos e não foi observada uma diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0.6026$).

A distribuição dos genótipos homozigotos selvagens (C/C) e os heterozigotos (C/T) entre as variáveis clínicas estudadas (G/I, HOMA e QUICKI) apresentou frequências semelhantes (ver Tabela 15). Um achado significativo e esperado foi a prevalência dos valores de HOMA e QUICKI, que diferiram entre casos e controles independentemente dos genótipos C/C ($p<0,001$ e $<0,001$, respectivamente) ou C/T ($p=0,001$ e $<0,001$, respectivamente).

Nossos resultados mostraram que o polimorfismo C/T no éxon 17 do gene *INSR*, não teve efeito direto na resistência insulínica em pacientes hiperinsulinêmicas com SOP. Siegel et al. (2002) demonstraram que alelos raros T/T estavam associados com índice de massa corpórea reduzido em pacientes SOP ($\leq 27 \text{ kg/m}^2$) em relação as mulheres controle não obesas. Os achados do presente estudo contrastam com estes dados. Utilizando a mesma abordagem dos autores (agrupamento C/C e C/T+T/T) observou-se uma associação estatisticamente significativa entre casos e controles ($p<0,0001$ e $0,0004$, respectivamente), porém não houve uma predominância de genótipos

em relação ao IMC. A média manteve-se semelhante para os genótipos C/C e C/T+T/T nos casos e controles (dados não mostrados).

Conway et al. (1994) relataram que 11/22 mulheres com SOP apresentaram o alelo raro do gene *INSR*, detectado pela técnica de PCR-SSCP, porém, nenhuma estava associada com quadro de resistência insulínica na SOP. Outro estudo realizado por Sorbara et al. (1994) também revelou a não associação de mutações ao longo dos 22 éxons do gene *INSR* e quadro de resistência insulínica em três mulheres com SOP. Lee et al. (2006) investigaram 174 mulheres coreanas com SOP e 93 mulheres livres da doença utilizando a mesma metodologia do nosso estudo. Os autores também não encontraram associação do polimorfismo C/T do gene *INSR* no sub-grupo estudado.

Outros sítios do gene *INSR* (Talbot et al., 1996; Jin et al., 2006) e outros genes da via insulínica têm sido estudados, como os *VNTRs I, II e III* no gene *INS* (Huxtable et al., 2000; Calvo et al., 2002; Vanková et al., 2002) e os *IRS1* e *IRS2* (Ehrmann et al., 2002a; Ibáñez et al., 2002; Witchel et al., 2005) para desvendar o provável defeito chave da ação insulínica nas pacientes SOP. Entretanto, até o presente, os estudos em polimorfismos genéticos tem sido desapontadores. Estudos de ligação, como por exemplo, usando o marcador D19S884 mapeado a 1cM telomérico do gene *INSR*, sugerem a existência de genes candidatos neste *locus*.

Tucci et al. (2001) foram os primeiros autores a descreverem esta associação. Foram avaliadas 85 mulheres caucasianas com SOP e 87 mulheres livres da doença para os marcadores próximos aos genes da folistatina, *CYP17*,

CYP19 e o marcador D19S884 próximo ao *INSR*. Os resultados foram estatisticamente significativos apenas para o marcador D19S884. Os autores não encontraram associação de nenhum marcador localizado em regiões codificadoras do gene *INSR*. Urbanek et al. (2005) utilizaram a abordagem de *linkage* em 367 famílias européias com pelo menos uma mulher afetada por família. Até o momento é o maior estudo de *linkage* já realizado para estudos genéticos da SOP. Utilizando seqüenciamento direto os autores demonstraram fortes evidências de ligação deste marcador com a SOP, principalmente pelo achado de alguns genes que codificam fatores de transcrição na região flanqueada pelo marcador D19S884. Num estudo subsequente, os autores utilizaram além da metodologia de *linkage* o Teste para Atividade Regulatória que avalia a função deste marcador em linhagens celulares de CIT (Stewart et al., 2006). Os autores demonstraram a associação do marcador D19S884 com a SOP e definiram que algumas seqüências deste marcador conferiram atividade promotora *in vitro* nas linhagens celulares.

Disfunções nas vias da insulina podem afetar também a via de esteróides em pacientes SOP, considerando-se os efeitos diretos da insulina sobre os ovários: (1) estimulação da produção e secreção de andrógenos ovariano; (2) potencialização da resposta esteroideogênica ao LH e FSH e (3) supressão da apoptose nos folículos ovarianos que reduz as taxas de atresia levando a formação de cistos (Poretsky et al., 1999).

A etiologia dessa anormalidade metabólica ainda está sob intensa pesquisa e achados clínicos e moleculares têm focado nas anormalidades do receptor de insulina. Dunaif et al. (1997; 2001) relataram que a SOP clássica é

determinada por uma forma distinta de resistência insulínica com defeito no receptor de insulina, no entanto, este defeito molecular não está presente universalmente.

Provavelmente, em nossa população, a variante alélica C/T no éxon 17 do gene *INSR* não está diretamente associada com a hiperinsulenemia e conseqüente hiperandrogenismo observado nas pacientes SOP.

Foram observadas diferenças estatísticas significativas na comparação entre os genótipos dos genes *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* entre os indivíduos HAIR-AN e controle (ver Anexos 10 a 12), semelhante às diferenças detectadas na análise entre o grupo de casos (SOP+HAIR-AN) e controles (ver Tabelas 15, 16 e 17). Porém, observou-se que, a variável G/I associada aos genótipos selvagem e heterozigoto do gene *INSR* era mais elevada nos indivíduos HAIR-AN heterozigotos ($p=0,0526$). Essa diferença não foi observada na comparação entre casos (SOP+HAIR-AN) e controles conjuntamente. Outro achado interessante, que também não foi observado na análise conjunta entre os casos e controles, foi o valor elevado do HOMA nos indivíduos HAIR-AN selvagens em relação aos heterozigotos para o gene *INSR* ($p=0,0359$).

Esses achados, embora observados em uma pequena parcela de indivíduos (HAIR-AN- $n=16$) pode auxiliar no entendimento do mecanismo de resistência insulínica severa observado nas pacientes HAIR-AN, que já foi associada com mutações e/ou polimorfismo nos gene *INSR* (Musso et al., 2004).

Para a análise do gene *IGF2*, casos e controles foram agrupados segundo os genótipos (G/G, A/G e A/A) e não foi observada uma diferença

estatística significativa entre os genótipos ($p=0,8254$). Na comparação entre casos e controles com relação aos parâmetros clínicos detectou-se IMC elevado nos indivíduos com alelos G/G, já nos controles os indivíduos que apresentaram IMC elevado foram aqueles portadores de alelos A/A. O polimorfismo *ApaI* do gene *IGF2* tem sido associado com resistência insulínica, obesidade e *diabetes mellitus tipo 2*, porém há somente um relato em literatura que avaliou a variante G/A do gene *IGF2* associada com estas características clínicas em mulheres com níveis séricos elevados de andrógenos. San Millán et al. (2004) investigaram 72 mulheres com SOP e 42 mulheres sem a doença para 15 variantes alélicas, entre elas a variante *ApaI* do gene *IGF2*. Os autores demonstraram que as pacientes portadoras do alelo G/G da variante *ApaI* tiveram o IMC elevado em relação aos controles, assim como em nossos achados.

Na análise de combinações genotípicas realizada pelo programa *NeoGene Analysis*, o gene *IGF2* foi o mais freqüente em todas combinações. A combinação *HS* (heterozigoto+selvagem) para os genes *PAI-1* e *IGF2*, respectivamente, foi observada em 13/41 indivíduos com SOP e 1/48 controles. Observou-se também nas pacientes com HAIR-AN 4/15 e 1/48 controles portando o haplótipo *HS*. Alguns trabalhos têm mostrado que mulheres SOP portadoras de alelos 4G ou heterozigotas para o gene *PAI-1* (5G/4G) geralmente possuem níveis elevados de PAI-1 circulante e são mais propensas ao desenvolvimento de doenças cardíacas e endoteliais (Diamanti-Kandarakis et al., 2004; Zhao et al., 2005; Glueck et al., 2006). Para o gene

IGF2, provavelmente a presença do alelo comum G parece estar associada com aumento de IMC e hiperandrogenismo (San Millán et al., 2004).

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato que investigou a variante *ApaI* do gene *IGF2* na SOP. Previamente, nosso grupo demonstrou uma associação entre a variante *ApaI* do gene *IGF2* e o IMC em mulheres com leiomioma uterino (LU) e não foi observado um aumento no risco de desenvolvimento desta neoplasia (Rainho et al., 2005).

Alguns relatos associaram este polimorfismo com obesidade em homens (O`Dell et al., 1997 e 1999) e obesidade em adultos com peso alto ao nascimento (Gomes et al., 2005). A presença do alelo G na variante *ApaI* do gene *IGF2* foi associada com aumento de IMC nos indivíduos.

O IGF2 estimula a secreção de andrógenos da adrenal (I`Allemand et al., 1996; Mesiano et al., 1997) e dos ovários (Cara, 1994), juntamente com IGF1 e proteínas de ligação aos IGFs e sugere-se que ele desempenhe um papel na patogênese da SOP (Cara, 1994; Barreca et al., 1996; Mesiano et al., 1997). A presença do alelo G (variante *ApaI/IGF2*) levaria a níveis aumentados de IGF2 contribuindo para o hiperandrogenismo e hiperinsulinemia associados com a SOP.

Para a determinação dos genótipos do gene *PAI-1* utilizou-se a técnica de seqüenciamento direto para validação dos achados obtidos pela técnica de SSCP. O polimorfismo estudado (5G/4G) encontra-se na região promotora do gene *PAI-1* que é rica em dinucleotídeos CpG (Bird, 1992). A análise *in silico* da seqüência amplificada que contém o polimorfismo está contida em um

segmento de 1000pb com conteúdo de CG de 55,6%. A proporção de CpG observada pela esperada foi de 0,656. Estes dois parâmetros definem uma ilha de CpG (<http://www.cpgisland.com>). A compressão GC que pode estar presente em ilhas de CpG, exibe alta interação base-base, formando super estruturas e, conseqüentemente, regiões com altas temperaturas de *melting*, impedindo a amplificação correta pelas sequenases (*Taq DNA polimerase*) (Jung et al., 2002). Este artefato da técnica de seqüenciamento baseada no sistema dideoxi ocorre porque a *Taq DNA polimerase* presente nos *kits* de amplificação (*Big Dye Terminator – Applied Biosystems*), é incapaz de estender as fitas no DNA molde muito além desta região, gerando sobreposição de bases e seqüências ambíguas (baixa qualidade). Por esta razão foi utilizada inicialmente a técnica de PCR-SSCP. Apenas em casos com padrão de migração ambíguo ou para confirmação dos dados de genotipagem de casos homozigotos utilizou-se a técnica de sequenciamento. Outro aspecto a ser considerado é que a detecção de seqüências contendo 5G após seqüenciamento direto não permite a diferenciação entre homozigotos 5G/5G e heterozigotos 5G/4G.

Na análise das freqüências genotípicas para o gene *PAI-1*, não foram observadas diferenças significativas entre casos e controles após o agrupamento dos genótipos – 5G/5G, 5G/4G e 4G/4G ($p=0,5447$). Entretanto, diferenças estatísticas significativas foram observadas entre todas as variáveis clínicas e o genótipo *PAI-1*.

Os indivíduos heterozigotos (5G/4G), sejam eles casos ou controles, apresentavam a média do IMC elevada. Esse achado está de acordo com a

maioria dos relatos em literatura para este polimorfismo (Diamanti-Kandarakis et al., 2004; San Millán et al., 2004; Zhao et al., 2005; Glueck et al., 2006). A maioria dos estudos sugere que indivíduos portadores do genótipo 5G/4G têm níveis elevados de PAI-1 circulante e apresentam maior risco para a ocorrência de eventos tromboembólicos do que indivíduos portadores dos dois alelos raros (4G/4G) (Sampson et al., 1996; Velazquez et al., 1997; Atiomo, et al., 1998). Mulheres com SOP portadores do genótipo 5G/4G relataram um maior número de AFD do que as mulheres controle ($p=0,004$). Este gene têm sido associado também com aumento do risco de *diabetes mellitus* tipo 2, obesidade e doenças coronarianas em mulheres SOP (Dahlgren et al., 1994; Eriksson et al., 1995; Atiomo et al., 1998; Diamanti-Kandarakis et al., 2002).

Walch et al. (2005) não encontraram correlação com o polimorfismo 5G/4G e manifestações da SOP. Os autores avaliaram este polimorfismo em 106 mulheres caucasianas e 102 mulheres controle por *PCR* alelo-específica e não encontraram qualquer relação entre os três possíveis genótipos do polimorfismo do gene *PAI-1* e características clínicas (IMC, IFG e G/I) e bioquímicas (T total, LH e FSH). Este polimorfismo está localizado na região promotora do gene *PAI-1* e pode modular o nível de expressão gênica. A expressão anormal intra-ovariana do gene *PAI-1* diminui a secreção da glicoproteína PAI-1 (Jansen et al., 2004) levando a diminuição da degradação da parede folicular e proteólise extra-celular, que são características morfológicas de ovários policísticos (Walch et al., 2006). Tem sido sugerido que a insulina medeia a elevação de PAI-1 podendo contribuir para

anovulação, infertilidade e abortos recorrentes pela limitação de plasmina necessária para proteólise nestes processos (Atiomo et al., 1998).

A combinação do polimorfismo 5G/4G do gene *PAI-1* encontrada em associação com a variante G/G do gene *IGF2* pelo programa *NeoGene Analysis* foi discutida acima. A frequência observada dos indivíduos portadores dessa combinação foi baixa e sem poder estatístico (SOP-13/14 e controle-1/48; HAIR-AN-4/15 e controle 1/48), mas considerando-se os dados escassos em literatura acerca de combinações genotípicas (Diamanti-Kandarakis & Piperi, 2005), a descrição deste evento foi informativa e futuramente poderá auxiliar na busca por haplótipos de risco associados com a SOP.

Mesmo com um número pequeno de indivíduos (57 casos e 49 controles), o critério de seleção utilizado para a definição de casos (SOP e HAIR-AN) e do grupo controle foi rigorosamente baseado nos critérios atuais de diagnóstico da SOP. Este é o primeiro relato de polimorfismos genéticos estudados em mulheres brasileiras com SOP do tipo caso-controle. A característica de miscigenação da nossa população é única e requer estudos específicos de polimorfismos para avaliação de grupos de risco.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os genótipos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* entre casos e controles. Entretanto, quando os genótipos foram comparados com as características clínicas e bioquímicas, a maioria mostrou diferença estatística significativa.

Para o gene *ER- α* observou-se uma associação estatisticamente significativa entre alelos longos e as características IMC, IFG, T total e DHEA-s ($p < 0,0001$ para as três primeiras e $p = 0,039$ para a última). A comparação somente entre os casos SOP homozigotos com alelos longos e heterozigotos à característica 17α -OHP₄-60min foi estatisticamente significativa ($p = 0,048$). Estes dados sugerem que repetições [TA] longas do gene *ER- α* estão associadas com as manifestações clínicas e bioquímicas de hiperandrogenismo na população avaliada.

As características IMC, IFG, T total e DHEA-s mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os diferentes genótipos (≤ 22 -curto, ≤ 22 e > 22 -heterozigoto e > 22 -longo) do gene *ER- β* . Observou-se a prevalência de altas concentrações de T total nos indivíduos do grupo de casos

com alelos longos em relação aos controles. Estes resultados sugerem que na população estudada, alelos longos do gene *ER-β* estão associados com os níveis elevados de andrógenos em mulheres SOP.

O polimorfismo C/T no éxon 17 do gene *INSR* não teve efeito direto na resistência insulínica em pacientes com SOP. Na comparação com o IMC, observou-se no agrupamento C/C e C/T+T/T uma associação estatisticamente significativa entre casos e controles ($p < 0,0001$ e $0,0004$, respectivamente), porém não houve uma predominância de genótipos. A média manteve-se semelhante para os genótipos C/C e C/T+T/T nos casos e controles.

Não foi observada uma diferença estatística significativa na comparação entre os genótipos do gene *IGF2* em casos e controles ($p = 0,8254$). Com relação aos parâmetros clínicos, detectou-se IMC elevado nos casos com alelos G/G. A presença do alelo G (variante *ApaI/IGF2*) poderia elevar os níveis de IGF2 contribuindo para o hiperandrogenismo e hiperinsulinemia associados com a SOP.

Para o gene *PAI-1* não foram observadas diferenças significativas entre casos e controles após o agrupamento dos genótipos (5G/5G, 5G/4G e 4G/4G) ($p = 0,5447$). Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre todas as variáveis clínicas e o genótipo *PAI-1*. Nos indivíduos portadores dos alelos heterozigotos (5G/4G), o IMC encontrava-se mais elevado nos casos em relação aos controles ($p < 0,001$) e em relação a média e desvio padrão dentro do grupo. Esse achado está de acordo com a maioria dos relatos em literatura para este polimorfismo.

A análise agrupada dos polimorfismos estudados pelo programa *NeoGene Analysis* auxiliou na definição de classes genotípicas de risco possivelmente associadas com a etiologia da SOP. O pequeno tamanho amostral não permitiu análise com poder estatístico, entretanto, foram observados haplótipos mais freqüentes em casos do que em controles.

Embora um grande número de estudos do tipo caso-controle ainda seja obviamente necessário para a geração de resultados com significados clínicos, pode-se concluir, de forma geral, que os polimorfismos genéticos permitiram uma associação com as características envolvidas na esteroidogênese e na ação insulínica em pacientes SOP.

ALESSI, MC; JUHAN-VAGUE, I; KOOISTRA, T; DECLERCK, PJ; COLLEN, D. Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. *Thromb Haemost.*, v60, p491-4, 1988.

ANDERSON, P; SELJEFLO, I; ABDELNOOR, M; ARNESEN, H; DALE, PO; LOVIK, A. Increased insulin sensitivity and fibrinolytic capacity after dietary intervention in obese women with polycystic ovary syndrome. *Metabol Clin Exp.*, v44, p611-6, 1995.

ANDERSON, JL; MUHLESTEIN, JB; HABASHI, J; CARLQUIST, JF; BAISNR, TL; ELMER, SP; DAVIS, BP. Lack of association of a common polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene with coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiology*, v34, p1778-83, 1999.

ARADHANA, R; RAJASHEKHAR, G; ROY, AC; ANNAPOORNA, V; DRAMUSIC, V; CHOOLANI, M; WONG, PC. Estrogen receptor alpha gene PvuII polymorphism and polycystic ovary syndrome. *Ann Acad Med Singapore.*, v33, p89-90, 2004.

ARIOGLU, E; ROTHER, KI; REITMAN, ML; PREMKUMAR, A AND TAYLOR S. Lipoatrophy syndromes: When too little fat is a clinical problem. *Pediatr Diabetes.*, v1, p155-68, 2000.

ARIOGLU, E; ANDEWELT, A; DIABO, C; BELL, M; TAYLOR, SI; GORDEN, P. Clinical course of the syndrome of autoantibodies to the insulin receptor (type B insulin resistance). *Medicine*, v81, p87-100, 2002.

ASHWORTH, JJ; SMYTH, JV; PENDLETON, N; HORAN, M; PAYTON, A; WORTHINGTON, J; OLLIER, WE; ASHCROFT, GS. The dinucleotide (CA) repeat polymorphism of estrogen receptor beta but not the dinucleotide (TA) repeat polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with venous ulceration. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, v97(3), p266-70, 2005.

ATIOMO, WU; BATES, AS; CONDON, JE; SHAW, S; WEST, JH; PRENTICE, AG. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v69, p 236-41, 1998.

AVELLONE, G; DI GARBO, V; CORDOVA, R, ROTOLO, G; ABRUZZESE, G; RANELI, G. Blood coagulation and fibrinolysis in obese NIDDM patients. *Diabetes Res.*, v25, p85-92, 1994.

AZZIZ, R.; RITTMASER, RS.; FOX, LM.; BRADLEY, EL.; POTTER, D.; BOOTS, LR. Role of the ovary in the adrenal androgen excess of hyperandrogenic women. *Fertil Steril.*, v69(5), p851-9, 1998.

AZZIZ, R; EHRLMANN, DA; NORMAN, RJ; STRAUSS, JF; SPIELMAN, RS; DUNAIF, A. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v96, p8573-8, 1999.

AZZIS, R; WOODS, KS; REYNA, R; KEY, TJ; KNOCHENHAUER, ES AND YILDIZ, BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab.*, v89(6), p2745-9, 2004.

BALEN, A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Human Reproduction*, v7(6), p522-5, 2001.

BARBIERI, RL; MAKRI, A; RANDALL, RW; DANIELS, G; KISTNER, RW; RYAN, KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.*, v62(5), p904-10, 1986.

BARRECA, A; DEL MONTE, P; PONZANI, P; ARTINI, PG; GENAZZANI AR; MINUTO, F. Intrafollicular insulin-like growth factor-II levels in normally ovulating women and in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, v65, p739-45, 1996.

BARROSO, I. Genetics of type 2 diabetes. *Diabet Med.*, 517-35, 2005.

BASTARD, JP; BRUCKERT, E; ROBERT, JJ; ANKRI, A; GRIMALDI, A; JARDEL, C; ET AL. Are free fatty acids related to plasma plasminogen activator inhibitor 1 in android obesity? *Int Obes Relat Metab Disord.*, v19, p836-8, 1995.

BECHERINI, L; GENNARI, L; MASI, L; Et AL. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and the relationship to bone mass variation in postmenopausal italian women. *Hum Mol Genet.*, v9, p2043-50, 2000.

BERGA, SL. The OG's role in the practical management of PCOS. *Am J Obstet Gynecol.*, v179, p109-13, 1998.

BIRD, A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, v70, p5-8, 1992.

BRANDENBERGER, AW; TEE, MK; LEE, JY; CHAO, V; JAFFE, RB. Tissue distribution of estrogen receptors (ER- α) and (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.*, v82, p3509-12, 1997.

BRESLOW, NE; DAY, NE. Statistical methods in cancer research: the analysis of case-control studies. Lyon: Iarc Scientific Publications, v32, 1980.

BRZOZOWSKI, AM; PIKE, ACW; DAUTER, Z. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, v189, p753-58, 1997.

BUYALOS, RP; PEKONEN, F; HALME, JK; JUDD, HL; RUTANEN, EM. The relationship between circulating androgens, obesity; and hyperinsulinemia on serum insulin-like growth factor binding protein-1 in the polycystic ovarian syndrome. *Am J Obstet Gynecol.*, v172(3), p932-9, 1995.

CALVO, RM; TELLERIA, D; SANCHO, J; SAN MILLÁN, JL AND ESCOBAR-MORREALE, HF. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. *Fertil Steril.*, v77, p666-8, 2002.

CANEVARI, RA AND ROGATTO, SR. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: Oncologia Molecular, Ed. Atheneu, p189-201, 2004.

CARA, JE & ROSENFELD, RL. Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology*, v123, p733-9, 1988.

CARA, JF. Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and ovarian androgen production. *Horm Res.*, v42, p49-54, 1994.

CAREY, AH; CHAN, KL; SHORT, F; WHITE, D; WILLIANSO, R; FRANKS, S. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol.*, v38, p653-8, 1993.

CARMINA, E; CHU, MC; LONGO, RA; RINI, GB AND LOBO, RA. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab.*, v90(5), p2545-9, 2005.

CAUBO, B; DEVINNA, RS; TONETTA SA. Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinology*, v125, p321-6, 1989.

CAWKWELL, L.; BELSL, SM.; LEWIS, FA.; DIXON, MF.; TAYLOR, GR.; QUISNRKE, P. Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J Cancer*, v 67, p1262-7, 1993.

CHEN, HUEY-YI; CHEN, WEN-CHI; TSAI, HORNG-DER; HSU, CHENG-DER; TSAI, FUU-JEN; TSAI, CHANG-HAI. Relation of the estrogen receptor alpha gene microsatellite polymorphism to bone mineral density and the susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *Maturitas*, v40, p143-50, 2003.

CLEMENT, PB. Nonneoplastic lesions of the ovary. In: *Kurman RJ (ed.), Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. New York: Springer-Verlag*, p471-515, 1987.

CLEMONS, M; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, v344 (4), p276-85, 2001.

COMINGS, DE; MUHLEMAN, D; JOHNSON, P; MACMURRAY, JP. Potential role of the estrogen receptor gene (ESR1) in anxiety. *Mol Psychiatry*, v4, p374-7, 1999.

CONOVER, CA; LEE, PD; KANALEY, JA; CLARKSON, JT; JENSEN, MD. Insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in obese and nonobese humans. *J Clin Endocrinol Metab*, v74 (6), p1355-60, 1992.

CONWAY, GS; AVEY, C; RUMSBY, G. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, v9(9), p1681-3, 1994.

COOPER, HE; SPELLACY, WN, PREM, KA; COHEN, WD. Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, v100, p371-87, 1968.

CORTÓN, M; VILLUENDAS, G; BOTELLA, JI; SAN MILLÁN, JL; ESCOBAR-MORREALE, HF AND PERAL, B. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics*, v4, p438-41, 2004.

COUSE, JF; LINDZEY, J; GRANDIEN, K; GUSTAFSSON, JA; KORACH, KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. v138(11), p4613-21, 1997.

CROSIGNANI, PG; NICOLOSI, AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod.*, v(1), p3-7, 2001.

CURTIS, SW; WASHBURN, T; SEWALL, C; DIAUGUSTINE, R; LINDZEY, J; COUSE, J; KORACH, KS. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v93(22), p12626-30, 1996.

DAHLGREN, E; JANSEN, O.P; JOHANSSON, S; LAPIDUS, L; LINDSTEDT, G. AND TENGBORN, L. Haemostatic and metabolic variables in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v61, p455-9, 1994.

DAWSON, SJ; WIMAN, B; HAMSTEN, A; GREEN, F; HUMPHRIES, S; HENNEY, AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem.*, v268, p10739-45, 1993.

DECLUE, TJ; SHAH, SC; MARCHESE, M; MALONE, JI. Insulin resistance and hyperinsulinemia induce hyperandrogenism in a young type B insulin-resistant female. *J Clin Endocrinol Metab.*, v72(6), p1308-11, 1991.

DEL SENNO, L; AGUIARI, GL; PIVA, R. Dinucleotide repeat polymorphism in the human estrogen receptor (ESR) gene. *Hum Mol Genet.*, v1, p354, 1992.

DESPRÉS, JP; MARETTE, A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol.*, v5, p274-89, 1994.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E; BARTIZS, MI; ZAPANTI, ED; SPINA, GG; FILANDRA, FA; TSIANATELI, TC; BERGIELE, AT; KOULI, CR. Polymorphism T→C (-34bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v71 (3), p431-435, 1999.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E; KOULI, CR; BERGIELE, AT. ET AL. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.*, v84, p4006-11, 1999.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E; PALIONIKO, G; ALEXANDRAKI, K; BERGIELE, A; KOUTSOUBA, T; BARTIZIS M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol.*, v150 (6), p793-98, 2004.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E & PIPERI, C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *H Repr.*, p1-13, 2005.

DIAO FY, XU M, HU Y, LI J, XU Z, LIN M, WANG L, ZHOU Y, ZHOU Z, LIU J ET AL. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol.*, v33, p59-72, 2004.

DULEBA, A; SPACZYNSKI, RZ; OLIVE, DL AND BEHRMAN, HR. Effects of Insulin and Insulin-Like Growth Factors on Proliferation of Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells. *Biology of Reproduction*, v56, p891-7, 1997.

DOI, SAR; TOWERS, PA; SCOTT, CJ AND AL-SHOUMER, KAS. PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol.*, v118, p4-16, 2005.

DULL, TJ; GRAY, A; HAYFLICK, JR; ULLRICH, A. Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature*, v310, p777-781, 1994.

DUNAIF, A. ET AL. The Polycystic Ovary Syndrome. *Cambridge, BlackWeel Scientific*, 1992.

DUNAIF, A. Hyperandrogenic anovulation (PCOS) – A unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med.*, v98 (1A), p335-95, 1995.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.*, v18, p774-800, 1997.

DUNAIF, A; WU, X; LEE, A AND DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the PCOS. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v281, p392-99, 2001.

EHRMANN, DA; TANG, X; YOSHIUCHI, I; COX, NJ AND BELL, GI. Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, v87, p4297-4300, 2002a.

EHRMANN, DA; SCHWARZ, PE; HARA, M; TANG, X; HORIKAWA, Y; IMPERIAL, J; BELL, GI AND COX, NJ. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, v87, p1669-73, 2002b.

ELO, JP; VISAKORPI, T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med.*, v33(2), p130-41, 2001.

EMILIEN, G; PONCHON, M; CALDAS, C; ISACSON, O; MALOTEAUX, JM. Impact of genomics on drug discovery and clinical medicine. *QJM.*, v93(7), p391-423, 2000.

ENMARK, E; PELTO-HUIKKO, M; GRANDIEN, K; LAGERCRANTZ, S; LAGERCRANTZ, J; FRIED, G; NORDENSKJOLD, M; GUSTAFSSON, J. Human estrogen receptor alpha gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.*, v82(12), p4258-65, 1997.

ERICKSON, GF; GARZO, VG; MAGOFFIN; DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol & Metab.*, v69, p716-24, 1989.

ERIKSSON, P; KALLIN, B; VAN'T HOOFT, FM; BAVENHOLM, P; HAMSTEN, A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v92(6), p1851-5, 1995.

ERIKSSON, P; NILSSON, L; KARPE, F; HAMSTEN, A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v18, p20-6, 1998.

ESCOBAR-MORREALE, HF; SAN MILLAN, JL; SMITH, RR; SANCHO, J; WITCHEL, SF. The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril.*, v72(4), p629-38, 1999.

ESCOBAR-MORREALE, HF; CALVO, RM; SANCHO, J; SAN MILLAN, JL. TNF-alpha and hyperandrogenism: a clinical; biochemical; and molecular genetic study. *J Clin Endocrinol Metab.*, v86 (8), p3761-7, 2001.

ESCOBAR-MORREALE, HF; CALVO, RM; VILLUENDAS, G; SANCHO, J; SAN MILLAN, JL. Association of polymorphisms in the interleukin 6 receptor complex with obesity and hyperandrogenism. *Obes Res.*, v11 (8), p987-96, 2003.

ESCOBAR-MORREALE, HF; VILLUENDAS, G; BOTELLA-CARRETERO, JI; SANCHO, J; SAN MILLAN, JL. Obesity; and not insulin resistance; is the major determinant of serum

inflammatory cardiovascular risk markers in pre-menopausal women. *Diabetologia*, v46(5), p625-33, 2003.

ESTROGEN RECEPTOR. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 10 jul. 2004.

FERNANDEZ-REAL, JM; BROCH, M; RICART, W; CASAMITJANA, R; GUTIERREZ, C; VENDRELL, J; RICHART, C. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes*, v47(11), p1757-62, 1998.

FORSELL, C; ENMARK, E; AXELMAN, K; ET AL. Investigations of a CA repeat in the oestrogen receptor beta gene in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet.*, v9, p802-4, 2001.

FRANKS, S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.*, v333, p853-61, 1995.

FRANKS, S. The 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase gene (CYP17) and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*, v46, p135-6, 1997.

FRANKS, S; GHARANI, N; MCCARTHY, M. Candidates genes in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*. v7(4), p405-10, 2001.

GEORGIU, I; SYRROU, M; BOUBA, I; ET AL. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril.*, v72, p164-6, 1999.

GHARANI, N; WATERWORTH, DM; WILLIAMSON, R; FRANKS, S. 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.*, v81, p4174, 1996.

GLOBERMAN H, KARNIELI E. Analysis of the insulin receptor gene tyrosine kinase domain in obese patients with hyperandrogenism, insulin resistance and acanthosis nigricans (type C insulin resistance). *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v22(4), p349-53, 1998.

GLUECK, CJ; AWADALLA, SG; PHILLIPS, H; CAMERON, D; WANG, P; FONTAINE, RN. Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage. *Fertil Steril.*, v74, p394-7, 2000.

GLUECK, CJ; SIEVE, L; ZHU, B; WANG, P. Plasminogen activator inhibitor activity, 4G5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene, and first-trimester miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 55(3), p345-52, 2006.

GOMES, MV; SOARES, MR; PASQUALIM-NETO, A; MARCONDES, CR; LOBO, RB; RAMOS, ES. Association between birth weight, body mass index and IGF2/ApaI polymorphism. *Growth Horm IGF Res.*, v15(5), p360-2, 2005.

GOODARZI, MO; AZZIZ, R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, v20(2), p193-205, 2006.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.*, v17, p121-55, 1996.

GOVING, A; OBHRAI, MS; CLAYTON, RN. Polycystic ovaries are inherited as no autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab*, v84, p38-43, 1999.

GUSELLA, JF. Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Annu Rev Biochem.*, v55, p801-30, 1986.

GUYTON, AC. Endocrinologia e Reprodução. In: Fisiologia Humana. 6ª Ed. *Guanabara Koogan*, p457-83, 1988.

HAGUE, WM; ADAMS, J; REEDERS, ST; PETO, TE; JACOBS, HS. Familial polycystic ovaries: a genetic disease? *Clin Endocrinol (Oxf.)*, v29, p593-605, 1998.

HALBE, HW. Síndrome dos Ovários Policísticos. In: Tratado de Ginecologia. 3ª Ed. *Roca*. p.1620-37, 2000.

HAMSTEN, A; DE FAIRE, U; WALLDIUS, G; DAHLEN, G; SZAMOSI, A; LANDOU, C; BLOMBACK, M; WIMAN, B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet.*, v42, p3-9, 1987.

HARDIMAN P, PILLAY OC, ATIOMO W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.*, v24(361), p1810-2, 2003.

HERNANDEZ, ER; RESNICK, CE; SVOBODA, ME; VAN WYK, JJ; PAYNE, DW; ADASHI EY. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology*, v122, p1603-12, 1988.

HICKEY, TE; LEGRO, RS; NORMAN RJ. Epigenetic modification of the X chromosome influences susceptibility to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, v91(7), p2789-91, 2006.

HOETZER, GL, IRMIGER, HM; STAUFFER, BL; DESOUZA, CA. Estrogen receptor-alpha thymidine and adenine repeat polymorphism and endothelial fibrinolytic regulation in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.*, v193(2), p366-70, 2005.

HOGVEEN, KN; COUSIN, P; PUGET, M; DEWAILLY, D; SOUDAN, B; HAMMOND, GL. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest.*, v109 (7), p973-81, 2002.

HOTAMISLIGIL, GS; PERALDI, P; BUDAVARI, A; ELLIS, R; WHITE, MF; SPIEGELMAN, BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, v271(5249), p665-8, 1996.

HOTAMISLIGIL, GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, v107(2), p119-25, 1999.

HU, ZX; QIAO, J; LI, MZ; ZHANG, XW; CHEN, YJ; LI, R AND SUN, CL. The differential expression profile of polycystic ovary syndrome associated genes. *Beijing Da Xue Xue Bao*, v6(6), p600-4, 2004.

HUGHES, C; ELGASIM, M; LAYFIELD, R AND ATIOMO W. Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome—progress so far: Mini Review. *Hum Reprod.*, In Press. 2006.

IBÁÑEZ, L.; AULESA, C.; POTAU, N.; ONG, K.; DUNGER, DB.; DE ZEGHER, F. Plasminogen activator inhibitor-1 in girls with precocious pubarche: a premenarcheal marker for polycystic ovary syndrome? *Pediatr Res.*, v51, p244-28, 2002.

IBÁÑEZ, L.; ONG, KK.; MONGAN, N.; JÄÄSKELÄINEN, J.; MARCOS, MV.; HUGHES, IA.; DE ZEGHER, F.; DUNGER, DB. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *The J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v88, n7, p3333-38, 2003.

IBÁÑEZ, L; DE ZEGHER, F; FRANCOIS, I AND POTAU, N. Precocious pubarche, hyperinsulinism and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.*, v83, p3558-62, 1998.

IBÁÑEZ, L; MARCOS, MV; POTAU, N; WHITE, C; ASTON, CE AND WITCHEL, SF. Increased frequency of the G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene among girls with a history of precocious pubarche. *Fertil Steril.*, v78, p1288-93, 2002.

JAKIMIUK, AJ; WEITSMAN, SR; HUI-WEN YEN; BOGUSIEWICZ, M AND MAGOFFIN, DA. Estrogen Receptor α and β Expression in Theca and Granulosa Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v87(12), p5532-38, 2002.

JANSEN, E; LAVEN, JSE; DOMMERHOLT, HBR, et al. Abnormal gene expression profile in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol.*, v18, p3050-63, 2004.

JIN, L; ZHU, XM; LUO, Q; QIAN, Y; JIN, F; HUANG1, HF. A novel SNP at exon 17 of *INSR* is associated with decreased insulin sensitivity in Chinese women with PCOS. *Molecular Human Reproduction* v12(3), p151-155, 2006.

JONES, JJ & CLEMMONS, DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.*, v16(3), p24-34, 1995.

JUHAN-VAGUE, C; ROUL, MC; ALESI, JP; ARDISSONE ,M; HEIM, M; VAGUE, P. Increased plasminogen activator inhibitor activity is no insulin dependent diabetes-relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost.*, v61(3), p370-73, 1989.

JUNG, A; RUCKERT, S; FRANK, P; BRABLETZ, T; KIRCHNER, T. 7-Deaza-2 ϕ -deoxyguanosine allows PCR and sequencing reactions from CpG islands. *J Clin Pathol: Mol Pathol.*, v55, p55-7, 2002.

L'ALLEMAND, D; PENHOAT, A; LEBRETHON, MC; ARDEVOL, R; BAEHR, V; OELKERS, W; SAEZ, JM. Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.*, v81, p3892-7, 1996.

KADOWAKI, H; KADOWAKI, T. HAIR-AN syndrome. *Nippon Rinsho.*, v5(10), p2648-52, 1994.

KAHN, CR; FLIER, JS; BAR, RS; ARCHER, JA; GORDEN, P; MALCOLM, MM; ROTH, J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. *N Engl J Med.*, v294, p739-45, 1976.

KAHSAR-MILLER, M; BOOTS, LR; AZZIZ, R. Dopamine D3 receptor polymorphism is not associated with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v71(3), p436-8, 1999.

KAHSAR-MILLER, M; AZZIZ, R; FEINGOLD, E; WITCHEL, SF. A variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with adrenal androgen excess in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v74(6), p1237-40, 2000.

KINOSHITA, M.; NAKAMURA, J.; KUSAKA, H.; HADAMA, T.; BAGO, K.; KITAJIMA, M.; BABA, S. Automated and simultaneous identification of microsatellite instability by fluorescence-based polymerase chain reaction (PCR) in four loci. *Clinica Chimica Acta.*, v279(1-2), p15-23, 1999.

KOUSTENI, S; BELLIDO, T; PLOTKIN, LI; O'BRIEN, CA; BODENNER, DL; HAN, L; HAN, K; DIGREGORIO, GB; et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, v104(5), p719-30, 2001.

KREGE, JH; HODGIN, JB; COUSE, JF. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Nat Acad Sci.*, v95, p15677-82, 1998.

KRISTENSEN, VN; ANDERSEN, TI; LINDBLOM, A; ERIKSTEIN, B; MAGNUS, P; BORRESEN-DALE AL. A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics*, v8(1), p43-8, 1998.

KROOK, A & O'RAHILLY, S. Homozygous mutation in the insulin receptor. *Clin Endocrinol (Oxf.)*, v645, p237-8, 1996.

KUIPER, GG; ENMARK, E; PELTO-HUIKKO, M; NILSSON, S; GUSTAFSSON, JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, v93, p5925-30, 1996.

KUNNAS, TA; LAIPPALA, P; PENTTILA, A; LEHTIMAKI, T; KARHUNEN, PJ. Association of polymorphism of human alpha oestrogen receptor gene with coronary artery disease in men: a necropsy study. *Br Med J.*, v321, p273-4, 2000.

LANDIN, K; TENGBORN, L; CHMIELEWSKA, J; VON SCHENCK, H; SMITH, U. The acute effect of insulin on tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in man. *Thromb Haemost.*, v65, p130-3, 1991.

LANGDAHL, BL; LOKKE, E; CARSTENS, M; STENKJAER, LL; ERIKSEN, EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res.*, v15, p2222-30, 2000.

LARNON-FAVA, S; WILSON, PWF AND SCHAEFER, EJ. Impact of body mass index on coronary heart disease risk factors in men and women: the Framingham offspring study. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.*, v16, p1509-15, 1996.

LEE, EJ; YOO, KJ; KIM, SJ; LEE, SH; CHA, KY; BAEK, KH. Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. *Fertil Steril.*, v86(2), p380-4, 2006.

LEGRO, RS. Polycystic ovarie syndrome: current and future treatment paradigms. *Am J Obstet. Gynecol.*, v179, p101, 1998.

LEGRO, RS; DRISCOLL, D; STRAUSS, JF 3RD; FOX, J AND DUNAIF, A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v95, p14956-60, 1998.

LEGRO RS, CASTRACANE VD AND KAUFFMAN RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv.*, v59, p141-154, 2004.

LEVIEV, I; KALIX, B; BRULHART MEYNET, MC; JAMES, RW. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia.*, v44(9), p1177-83, 2001.

LINDSTEDT, G ET AL. Low SHBG concentration as independent risk factor for development of NIDDM. *Diabetes*, v40, p123-8, 1991.

LIU, YX. Regulation of plasminogen activator system in the ovary. *Biol Signals Recept.*, v8, p160-77, 1999.

LIU, YX; LIU, K; FENG, Q, et al. Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen inhibitor type-1 are coordinately expressed during ovulation in rhesus monkey. *Endocrinology*. v145, p1767-75, 2004.

MACFELDA, K; WEISS, TW; KAUN, C, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by inflammatory mediators interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-1 alpha,

transforming growth factor-beta and oncostatin M in human cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.*, v34, p1681-91, 2002.

MALIQUEO, M; CLEMENTI, M; GABLER, F; JOHNSON, MC; PALOMINO, A; SIR-PETERMANN, T AND VEGA, M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v80(2), p812-9, 2003.

MARINHO, RM; SABINO, SM; MELO, MAB. Uso do Metformin no tratamento da Síndrome dos Ovários Policísticos. *Femina*, v27(2), p153-8, 1999.

MARSHALL, A. Laying the foundations for personalized medicines. *Nature Biotech.*, v15, p954-7, 1997.

MATALLIOTAKIS I, KOURTIS A, KOUKOURA O, PANIDIS D. Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. *Arch Gynecol Obstet.*, v274(4), p187-97, 2006.

MCCARTY, MF. De novo synthesis of diacylglycerol in endothelium may mediate the association between PAI-1 and the insulin resistance syndrome. *Med Hypothese.*, v64 (2), 388-93, 2005.

MCKENNA, NJ; XU, J; NAWAZ, Z; TSAI, SY; TSAI, MJ; O'MALLEY, BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, v69(1-6), p3-12, 1999.

MEDEIROS, SF & YAMAMOTO, MMW. Anovulação hiperandrogênica. *Reprod Clin.*, v16(2), p85-91, 2001.

MESIANO, S; KATZ, SL; LEE, JY, JAFFE, RB. Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J Clin Endocrinol Metab.*, v82, p1390-6, 1997.

MIFSUD, A; RAMIREZ, S; YONG, EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.*, v85(9), p3484-8, 2000.

MILNER, CR; CRAIG, JE; HUSSEY, ND; NORMAN, RJ. No association between the -308 polymorphism in the tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) promoter region and polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod.*, v5(1), p5-9, 1999.

MOSSELMAN, S; POHLMAN, J; DIJKEMA, R. ER-alpha: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters.*, v392, p49-53, 1996.

MUSSO, C; COCHRAN, E; MORAN, SA; SKARULIS, MC; ORAL, TAYLOR, S AND GORDEN, P. Clinical Course of Genetic Diseases of the Insulin Receptor (Type A and Rabson-Mendenhall Syndromes) A 30-Year Prospective. *Medicine*, v83(4), p209-22, 2004.

NELSON, VLD; MCALLISTER, JM AND WICKENHEISSER, JK. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol Metab.*, v17(2), p65-71, 2006.

NESTLER, JE; JAKUBOWICZ, DJ; DE VARGAS, AF; BRIK C; QUINTERO, N; MEDINA, F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab.*, v83, p2001-5, 1998.

NIETERS, A; BECKER, N; LINSEISEN, J. Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort. *Eur J Nutr.*, v41(5), p210-21, 2002.

NILSSON, M; NAESSEN, S; DAHLMAN, I; ET AL. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with bulimic disease in women. *Mol Psychiatry*, v9, p28-34, 2004.

NORDT, TK; KLASSEN, KJ; SCHNEIDER, DJ; SOBEL, BE. Augmentatin of syntesis of plasminogen activator inhibitor type-1 in arterial endothelial cells by glucose and its implications for local fibrinolysis. *Arterioscler Trhomb.*, v13, p1822-8, 2003.

NORMAN, RJ. Hyperandrogenaemia and the ovary. *Mol Cell Endocrinol.*, v191(1), p113-9, 2002.

O'DELL, SD; MILLER, GJ; COOPER, JA; HINDMARSH, PC; PRINGLE, PJ; FORD, H; HUMPHRIES, SE; DAY, IN. Apal polymorphism in insulin-like growth factor II (IGF2) gene and weight in middle-aged males. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v21, p822-5, 1997.

OGAWA, O; ECCLES, MR; SZETO, J; MCNOE, LA; YUN, K; MAW, MA; SMITH, PJ; ET AL. *Nature*, v362, p749-51, 1993.

OGAWA, S; HOSOI, T; SHISNRAKI, M; ET AL. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun.*, v269, p537-41, 2000.

OKSANEN, L; TIITINEN, A; KAPRIO, J; KOISTINEN, HA; KARONEN, S; KONTULA, K. No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome.

Mol Hum Reprod., v6(10), p873-6, 2000.

OKSJOKI, S; SODERSTROM, M; INKI, P; VUORIO E AND ANTTILA, L. Molecular profiling of polycystic ovaries for markers of cell invasion and matrix turnover. *Fertil Steril.*, v83(4), p937-944, 2005.

PERAL, B; SAN MILLAN, JL; CASTELLO, R; MOGHETTI, P; ESCOBAR-MORREALE, HF. Comment: the methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.*, v87(8), p3977-83, 2002.

PETRY, CJ; ONG, KK; MICHELMORE, KF; ARTIGAS, S; WINGATE, DL; BALEN, AH; F, DE ZEGHER; IBÁÑEZ, L AND DUNGER, DB. Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. *Human Reproduction*, v20 (7), p1837-43, 2005.

PILLAY, OC; WONG, LF; FONG, TE; CROW, JC; BENJAMIN, E; MOULD, T; ATIOMO, W. ET AL. The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod.*, v21(4), p924-9, 2006.

POOLA, I; ABRAHAM, J; BALDWIN, K. Identification of ten exon deleted ERbeta mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett.*, v516(1-3), p133-8, 2002.

PORETSKY, L; SMITH, D; SEIBEL, M; PAZIANOS A; MOSES AC; FLIER, JS. Specific insulin binding sites human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.*, v59(4), p809-11, 1984.

PORETSKY, L; CATALDO, NA; ROSENWAKS, Z; GIUDICE, LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.*, v20(4), p535-82, 1999.

PREMOLI, AC; SANTANA, LF; FERRIANI, RA; MOURA, DE MD; DE SÁ, MFS; REIS, RM. Growth hormone secretion and insulin-like growth factor-1 are related to hyperandrogenism in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v83, p1852-5, 2005.

PRICHARD, Z; JORM, AF; PRIOR, M; SANSON, A; SMART, D; ZHANG, Y; HUTTLEY, G AND EASTEAL, S. Association of polymorphisms of the estrogen receptor gene with anxiety-related traits in children and adolescents: a longitudinal study. *Am J Med Genet.*, v114(2), p169-76, 2002.

RABSON, SM & MENDENHALL, EN. Familial hypertrophy of pineal body, hyperplasia of adrenal cortex and diabetes mellitus. *Am J Clin Pathol.*, v26, p283-90, 1956.

RAINHO, CA; ROSA, FE; PONTES, A AND ROGATTO, SR. The 3'-untranslated ApaI-Insulin-like Growth Factor II gene (IGF2) polymorphism in women with uterine leiomyomas. *Applied Cancer Research*, v25(2), p58-64, 2005.

RAJKHOWA, M; TALBOT, JA; JONES, PW; CLAYTON, RN. Polymorphism of glycogen synthetase gene in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v44(1), p85-90, 1996.

RIDKER, PM; HENNEKENS, CH; LINDPAINTNER, K; STAMPFER, MJ; MILETICH, JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation*, v95, p59-62, 1997.

ROBINSON, S; KIDDY, D; GELDING, SV; WILLIS, D; NITHITHYANANTHAN, R; BUSH, A; ET AL. The relationship of insulin insensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol.*, v39, p351-5, 1993.

ROSA, FE. *Genotipagem dos Genes AR, CYP17 e CYP19 em pacientes portadoras da Síndrome do Ovário Policístico: Estudo caso-controle*. 2003. 98p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SAN MILLÁN, JL; CORTÓN, M; VILLUENDAS, G; SANCHÓ, J; PERAL, B; ESCOBAR-MORREALE, HF. Association of the Polycystic Ovary Syndrome with Genomic Variants Related to Insulin Resistance, Type 2 Diabetes Mellitus, and Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.*, v86 (6), p2640-6, 2004.

SAMPSON, M; KONG, C; PATEL, A; UNWIN, R. AND JACOBS, H.S. Ambulatory blood pressure profile and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.*, v45, p623-29, 1996.

SCARIANO, J K. ET AL. Estrogen Receptor beta Dinucleotide (CA) Repeat Polymorphism is Significantly Associated with Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int.*, v74, p501-8, 2004.

SCHNEIDER, DJ; SOBEL, BE. Synergistic augmentation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 induced by insulin, very-low-density lipoproteins, and fatty acids. *Coron Artery Dis.*, v7, p813-7, 1996.

SCHOFIELD, PN. Molecular biology of the insulin-like growth factors: gene structure and expression. *Acta Pediatric Scand.*, v372, p83-90, 1991.

SETIAWAN, VW; HANKINSON, SE; COLDITZ, GA; HUNTER, DJ; DE VIVO, I. Estrogen receptor β (ESR2) polymorphisms and endometrial cancer (United States). *Cancer Causes and Control*, v15, p627-33, 2004.

SHEARMAN, AM; KARASIK, D; GRUENTHAL, KM; ET AL. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: The Framingham Study. *J Bone Miner Res.*, v19, p773-81, 2004.

SHIN, A. ET AL. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Research and Treatment*, v80, p127-31, 2004.

SHIN, JGK AND MOON, Y. Estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism is associated with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril.*, v84, p774 -7, 2005.

SIEGEL, S; FUTTERWEIT, W; DAVIES, TF; CONCEPCION, ES; GREENBERG, DA; VILLANUEVA, R; TOMER, Y. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v78, p1240-43, 2002.

SMITH, GW; GENTRY, PC; BAO, B; LONG, DK; ROBERTS, RM, SMITH, MF. Control of extracellular matrix remodeling within ovarian tissues: localization and regulation of gene expression of plasminogen activator inhibitor type-1 within the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil.*, v110, p107-14, 1997.

SORAN, A; TALBOTT, EO; ZBOROWSKI JV, WILSON JW. The prevalence of benign breast disease 3in women with polycystic ovary syndrome: a review of a 12-year follow-up. *Int J Clin Pract.* v59 (7), p795-7, 2005.

SORBARA, LR; TANG, Z; CAMA, A; XIA, J; SCHENKER, E; KOHANSKI, RA; PORETSKY, L; KOLLER, E; TAYLOR, SI; DUNAIF, A. Absence of insulin receptor gene mutations in three

insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, v43(12), p1568-74, 1994.

SPRITZER, PM; MORSCH, DM; WILTGEN, D. Neoplasias associadas à Síndrome dos Ovários Policísticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v49(5), 805-10, 2005.

STEIN, IF; LEVENTHAL ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.*, v1, p181-91, 1934.

STEWART, DR; DOMBROSKI, B; URBANEK, M; ANKENER, W; EWENS, KG; WOOD, JR; LEGRO, RS; STRAUSS, JF 3RD; DUNAIF, A; SPIELMAN, RS. Fine Mapping of Genetic Susceptibility to Polycystic Ovary Syndrome on Chromosome 19p13.2 and Tests for Regulatory Activity. *J Clin Endocrinol Metab.*, In Press. 2006.

STIKO-RAHM, A; WIMAN, B; HAMSTEN, A; NILSSON, J. Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low-density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, v10, p1067-73, 1990.

STRACHAN, T; READ, AP. Genética molecular humana. 2.ed. São Paulo: Artmed, 2002.

STUNKARD, AJ; HARRIS, JR; PEDERSEN, NL AND MCCLEARN, GE. The body mass index of twins who have been reared apart . *N Engl J Med.*, v322, p1483-7, 1990.

SUNDARRAJAN, C; LIAO, WX; ROY, AC; NG, SC. Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab.*, v86, p135-9, 2001.

SYRROU, M; GEORGIU, I; PATSALIS, PC; BOUBA, I; ADONAKIS, G; PAGOULATOS, GN. Fragile X premutations and (TA)_n estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction. *Am J Med Genet.*, v84, p306-8, 1999.

TALBOTT, TA; BICKELL, EJ; RAJKHOWA, M; KROOK, A; ORAHILLY, S; CLAYTON, RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v81, p1979-83, 1996.

TAPANAINEN, JS; KOIVUNEN, R; FAUSER, BC; TAYLOR, AE; CLAYTON, RN; RAJKOWA, M; WHITE, D; FRANKS, S; ANTTILA, L; PETTERSSON, KS; HUHTANIEMI IT. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.*, v84(5), p1711-5, 1999.

TARKUN, I; CANTÜRK, Z; ARSLAN, BÇ; TÜREMEN, E; TARKUN, P. The Plasminogen Activator System in Young and Lean Women with Polycystic Ovary Syndrome. *End J.*, v51(5), p467-72, 2004.

THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM - SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, v19(1), p41-7, 2004.

TSILCHOROSIDOU T, OVERTON C, CONWAY GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.*, v60(1), p1-17, 2004.

TSUKAMOTO, K; WATANABE, I; SHIBA, T; EMI, M. Isolation and radiation hybrid mapping of a dinucleotide repeat polymorphism at the human calcium-sensing receptor (CASR) locus. *J Hum Genet.*, v43(4), p280-2, 1998.

TUCCI, S; FUTTERWEIT, W; CONCEPCION, ES; GREENBERG, DA; VILLANUEVA, R; DAVIES, TF; TOMER, AY. Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endoc Metab.*, v86, p446-9, 2001.

TUSIÉ, MTL. Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*, v36, p210-22, 2005.

URBANEK, M; LEGRO, RS; DRISCOLL, DA; AZZIZ, R; EHRMANN, DA; NORMAN, RJ; STRAUSS, JF; SPIELMAN, RS; DUNAIF, A. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v96, p8573-8, 1999.

URBANEK, M; WU, X; VICKERY, KR; KAO, LC; CHRISTENSON, LK; SCHNEYER, A; LEGRO, RS; DRISCOLL, DA; STRAUSS, JF 3RD; DUNAIF, A; SPIELMAN, RS. Allelic variants of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, v85 (12), p4455-61, 2000.

URBANEK, M; DU, Y; SILANDER, K; COLLINS, FS; STEPPAN, CM; STRAUSS, JF 3RD; DUNAIF, A; SPIELMAN, RS; LEGRO, RS. Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. *Diabetes.*, v52(1), p214-7, 2003.

URBANEK, M; WOODROFFE, A; EWENS, KG; DIAMANTI-KANDARAKIS, E; LEGRO, RS; STRAUSS III, JF; DUNAIF, A; SPIELMAN, RS. Candidate Gene Region for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) on Chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metabol.*, v90(12), p6623-9, 2005.

UHT, RM; ANDERSON, CM; WEBB, P; KUSHNER, PJ. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology*. v138(7), p2900-8, 1997.

VAFIADIS, P; BENNETT, ST; TODD, JA; GRABS, R; POLYCHRONAKOS, C. Divergence between genetics ceterminants of IGF2 transcription levels in leukocytes and IDDM2-encoded susceptibility to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, v83, p2933-9, 1998.

VAGUE, J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr.*, v4, p20-34, 1956.

VANKOVÁ, M; VRBIKOVA, J; HILL, M; CINEK, O AND BENDLOVA, B. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci.*, v967, p558-65, 2002.

VELAZQUEZ, EM; MENDOZA, SG; WANG, P AND GLUECK, CJ. Metformin therapy is associated with a decrease in plasminogen activator inhibitor-1, lipoprotein (a), and immunoreactive insulin levels in patients with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism: Clin Experi.*, v46, p454-7, 1997.

VILLUENDAS, G; ESCOBAR-MORREALE, HF; TOSI, F; SANCHO, J; MOGHETTI, P; SAN MILLAN, JL. Association between the D19S884 marker at the insulin receptor gene locus and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, v79(1), p219-20, 2003.

VINK, JM; SADRZADEH, S; LAMBALK, CB; DI, BOOMSMA. Heritability of polycystic ovary syndrome (PCOS) in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol MetaboL.*, v91(6), p2100-4, 2005.

VOGEL, F.; MOTULSKY, AG. Genética de Populações: descrição e dinâmica. In: Genética Humana: problemas e abordagens. 2000. 3ª ed, Ed. Guanabara Koogan. 684pp.

WALCH, K; GRIMM, C; HUBER, JC; NAGELE, F; KOLBUS, A; HEFLER, LA. A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v123(1), p77-81, 2005.

WALCH, K; GRIMM, C; NAGELE, F; HUBER, J; WOLFLER, M; VYTISKA-BINSTORFER, E; UNFRIED, G; HEFLER, L. Impaired glucose tolerance is associated with changes in clinical and

biochemical parameters in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, v85(7), p869-73, 2006.

WANG, Z; YOSHIDA, S; NEGORO, K; ET AL. Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene but not estrogen receptor alpha gene affect the risk of related peptide. *Maturitas*, v30, p289-294, 1998.

WATERWORTH, DM; BENNETT, ST; GHARANI, N; MCCARTHY, MI; HAGUE, S; BATTY, S; CONWAY, GS; WHITE, D; TODD, JA; FRANKS, S; WILLIAMSON, R. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet.*, v349 (9057), p986-90, 1997.

WEBER, JL; MAY, PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be type using the polymerase chain reaction. *Am J Genet.*, v44, p388-96, 1989.

WEDRÉN, S. ET AL. Oestrogen receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res.*, v6, p437-49, 2004.

WEST, R & LEONARD, J. Familial insulin resistance with pineal hyperplasia: Metabolic studies and effect of hypophysectomy. *Arch Dis Child.*, v55, p619-21, 1980.

WESTBERG, L; BAGHAEI, F; ROSMOND, R; HELLSTRAND, M; LANDEN, M; JANSSON, M; HOLM, G; BJORNTRP, P; ERKSSON, E. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab.*, v86 (6), p2562-8, 2001.

WHITEHEAD, JP; HUMPHREYS, P; KROOK, A; JACKSON, R; HAYWARD, A; LEWIS, H; SIDDLE, K; O'RAHILLY, S. Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif. *Diabetes*, v47, p837-9, 1998.

WILLIS, D; MASON, H; GILLING-SMITH C; FRANKS S. Modulation by insulin of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.*, v81, p302-9, 1996.

WITCHEL, SF; LEE, PA; SUDA-HARTMAN, M; SMITH, R; HOFFMAN, EP. 17 α -hydroxylase/17 β -lyase dysregulation is not caused by mutations in the coding regions of CYP17. *J Pediatr Adolesc Gynecol.*, v11(3), p133-7, 1998.

WITCHEL, SF; ASTON, CE. The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, v13(5), p1315-7, 2000.

WITCHEL, SF; WHITE, C; SIEGEL, ME; ASTON, CE. Inconsistent effects of the proline12 -- alanine variant of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on body mass index in children and adolescent girls. *Fertil Steril.*, v76(4), p741-7, 2001.

WITCHEL, SF; TRIVEDI, RN; KAMMERER, C. Frequency of the T228A polymorphism in the SORBS1 gene in children with premature pubarche and in adolescent girls with hyperandrogenism. *Fertil Steril.*, v80(1), p128-32, 2003.

WITCHEL, SF; KAHSAR-MILLER, M; ASTON, CE; WHITE, C AND AZZIS, R. Prevalence of CYP11 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess. *Fertil Steril.*, v83, p371-5, 2005.

WOOD, JR; NELSON, VL; HO, C; JANSEN, E; WANG, CY; URBANEK, M; MCALLISTER, JM; MOSSELMAN, S AND STRAUSS, JF 3RD. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem.*, v278(29), p26380-90, 2003.

XITA, N; GEORGIOU, I; TSATSOULIS, A. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Euro J Endocrinology*, v147, p717-25, 2002.

XITA, N; TSATSOULIS, A; CHATZIKYRIAKIDOU, A; GEORGIOU, I. Association of the (TAAAA)n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab.*, v88(12), p5976-80, 2003.

YIM, CH; CHOI, JT; KANG, HACYS; IN GUL, M; HAN, HKYIK; KANG, DH; HAN, KO. Association of estrogen receptor a gene microsatellite polymorphism with annual changes in bone mineral density in Korean women with hormone replacement therapy. *J Bone Miner Metab.*, v23, p395-400, 2005.

YONEDA, K; TANJI, Y; IKEDA, N; ET AL. Influence of adjuvant tamoxifen treatment on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal breast cancer patients in Japan. *Cancer Lett.*, v186, p223-30, 2002.

ZHAO; SY, QIAO J AND LI, MZ. Protein expression profilings of polycystic ovary syndrome. *Beijing Da Xue Xue Bao*, v37(4), p362-5, 2005a.

ZHOU, R ; BIRD, IM; DUMESIC, DA ; ABBOTT, DH. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, v90(12), p6630-7, 2005.

Anexo 1. Características clínicas das pacientes portadoras da síndrome de hiperandrogenismo, resistência insulínica e *Acanthosis nigricans* (HAIR-AN) e da síndrome do ovário policístico (SOP).

Casos	Diagnóstico	Idade	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Cintura (cm)	Quadril (cm)	RCQ	CM	IFG	AN	AFD	HOMA	QUICK I
363	HAIR-AN	33	115,8	1,56	47,59	124	126	0,98	AM	21	+	-	12,83	0,27
364	HAIR-AN	27	77,5	1,52	33,11	103	102	1	OM	16	+	-	33,13	0,24
365	HAIR-AN	41	90,5	1,61	34,91	97	107	0,92	OM	18	+	-	10,44	0,28
366	HAIR-AN	41	84,6	1,52	36,6	108	113	0,95	OM	15	+	-	6,49	0,29
367	SOP	29	78	1,57	31,7	93	110	0,84	AM	16	+	-	2,95	0,32
368	HAIR-AN	38	87,7	1,56	36,09	100	112	0,89	AM	8	+	-	1,27	0,37
370	HAIR-AN	28	75,8	1,60	37,42	112	111	1,009	AM	14	+	+	4,42	0,31
371	HAIR-AN	36	91,1	1,54	38,43	95	113	0,84	AM	18	+	+	0,55	0,43
375	SOP	20	78,7	1,63	26,69	92	102	0,9	OM/AM	21	+	+	2,09	0,34
377	HAIR-AN	43	88,1	1,57	35,81	102	109	0,93	AM	12	+	-	6,98	0,29
378	HAIR-AN	24	99,5	1,59	39,48	109	114	0,95	OM/AM	25	+	-	2,58	0,33
382	SOP	20	81,1	1,64	30,26	94	102	0,92	AM	15	+	-	10,9	0,27
383	HAIR-AN	35	120	1,64	44,77	127	120	1,05	AM	27	+	-	14,85	0,26
611	SOP	19	110	1,73	36,75	111	117	0,904	OM	12	+	+	4,68	0,31
617	SOP	30	68	1,58	27,3	85	95	0,89	OM	14	-	+	1,43	0,36
622	HAIR-AN	25	139,7	1,72	47,22	129	130	0,99	Nd	6	+	+	6,97	0,29
623	SOP	26	68,1	1,58	27,27	81	102	0,79	OM	12	-	+	0,82	0,4
646	SOP	27	72,5	1,62	27,67	89	97	0,9	OM	9	-	+	4,59	0,31
652	SOP	27	84,1	1,60	32	89	109	0,81	AM	11	-	-	1,29	0,37
653	SOP	15	49,6	1,50	22,04	72,5	95	0,79	OM	11	+	+	2,86	0,33
654	SOP	30	90	1,50	40	109	117,5	0,92	AM	9	+	-	4,29	0,31
655	SOP	35	83,8	1,63	31,5	99	99	1	AM	22	+	+	2,82	0,33
660	SOP	34	108	1,79	33,72	99	120	0,82	AM	19	+	+	1,53	0,36
676	SOP	25	90,7	1,56	34,7	127	121	1,04	Nd	21	+	+	2,95	0,32
732	SOP	31	58,1	1,54	24,49	80	96	0,83	OM/AM	14	-	+	1,1	0,38
738	SOP	24	82	1,58	32,84	97	107	0,92	AM	6	+	+	7,86	0,29
739	SOP	38	113	1,62	43,59	134	150	0,89	Nd	14	+	+	4,74	0,3
742	SOP	20	69	1,76	22,27	76	93	0,81	OM	3	-	+	9,28	0,28
743	SOP	19	50,8	1,60	19,84	68	90	0,75	OM	16	-	-	4,1	0,31

748	HAIR-AN	29	88,6	1,63	32,51	108	110	0,98	AM	9	+	+	+	27,13	0,25
751	SOP	28	97,2	1,59	39	113	117	0,9	OM/AM	9	+	+	+	4,41	0,31
756	HAIR-AN	32	87,4	1,63	32,75	92	109	0,84	AM	12	+	+	+	6,67	0,29
770	SOP	19	91,2	1,56	37,47	104	116	0,89	AM	21	+	+	+	3,48	0,32
775	SOP	36	84,5	1,55	35,21	95	113	0,84	OM	13	+	+	+	4,76	0,3
781	SOP	24	50,3	1,64	18,7	66	89	0,74	OM/AM	8	-	-	+	1,38	0,36
782	SOP	27	72,3	1,67	25,92	92	103	0,89	AM	0	-	-	-	0,78	0,4
783	SOP	36	73,4	1,56	30,16	89	102	0,87	OM	19	+	+	+	8,63	0,28
784	SOP	27	83	1,57	33,7	106	108	0,98	OM	8	-	-	+	6,79	0,29
791	SOP	37	83,2	1,55	34,67	91,5	120	0,76	AM	10	+	+	-	8,05	0,28
792	HAIR-AN	24	95,4	1,52	41	112	119	0,94	AM	19	+	+	-	6,94	0,29
796	SOP	28	92,5	1,62	35,3	92	112	0,82	AM	14	+	+	-	1,95	0,35
800	SOP	22	61,1	1,68	21,66	71	94	0,75	OM	14	-	-	-	23,54	0,25
802	SOP	30	81,1	1,52	35,1	110	107	1,02	OM	11	-	-	-	7,13	0,29
817	SOP	29	65,7	1,57	26,65	91	94,5	0,96	OM/AM	11	+	+	+	27,85	0,25
831	SOP	44	79,6	1,52	34,45	102	115	0,86	AM	25	+	+	+	3,14	0,32
843	SOP	36	95	1,63	35,8	97	112	0,79	OM/AM	25	-	+	+	6,36	0,29
862	SOP	33	66,3	1,6	25,73	84	98	0,95	AM	14	-	-	-	33,83	0,24
864	SOP	30	85,2	1,61	32,73	108	104	1,03	AM	22	-	-	-	4,62	0,31
870	SOP	30	92	1,68	32,59	102	99	1,03	AM	11	-	-	-	3,51	0,32
871	SOP	16	62	1,70	21,45	73	101	0,86	OM	11	-	-	-	3,56	0,32
873	SOP	24	48,1	1,62	18,82	60	80,5	0,74	AM	7	-	-	-	1,37	0,36
880	SOP	25	105,2	1,63	39,59	100,5	129	0,77	AM	9	+	+	+	3,87	0,31
887	HAIR-AN	37	67,6	1,59	26,9	82	93	0,88	OM/AM	14	+	+	-	2,17	0,34
891	HAIR-AN	15	63,6	1,57	25,8	85	107	0,79	AM	19	+	+	-	3,98	0,31
893	SOP	29	98	1,64	36,5	97	122	0,79	AM	15	-	+	+	7,33	0,29
896	SOP	33	71,9	1,74	23,75	86	98	0,9	OM	21	-	+	+	4,06	0,31
938	SOP	31	81,6	1,62	31,1	89	108	0,82	AM	11	-	-	-	3,9	0,31

IMC: índice de massa corpórea; **RCQ:** relação cintura/quadril; **CM:** ciclos menstruais; **IFG:** índice Ferriman e Gallwey; **AN:** *Acanthosis nigricans*; **AFD:** antecedente familiar de diabetes; **HOMA:** *homeostasis model assessment*; **QUICKI:** *quantitative sensitivity check index*; **AM:** amenorréia; **OM:** oligomenorréia; **Nd:** não determinado; **(+):** presença; **(-):** ausência.

Anexo 2. Características clínicas das mulheres controle.

Controles	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	Cintura (cm)	Quadril (cm)	RCQ	IFG	AN	AFD	HOMA	QUICKI
8	37	98,5	1,68	34,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
28	34	55	1,58	22	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
31	37	69	1,59	27,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
32	35	54,3	1,49	24,5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
36	35	58	1,50	25,8	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
40	34	70	1,65	25,7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
41	30	88,1	1,60	34,4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
650	31	75	1,46	25,7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
651	38	67,8	1,50	30,1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
668	36	60	1,58	24	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
669	45	90	1,61	34,7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
674	35	59,7	1,65	21,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
716	40	67	1,52	29	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
720	35	64	1,59	25,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
721	43	69	1,49	31,1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
723	37	50,3	1,50	22,4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
745	30	52,8	1,60	20,6	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd	Nd
746	38	51	1,50	22,7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
763	31	87,9	1,62	33,5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
764	38	54	1,57	21,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
766	38	75,4	1,53	32,2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
777	33	47	1,56	19,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
795	40	59,9	1,57	24,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
815	37	62,2	1,67	22,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
823	35	70	1,43	34,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
1045	24	51	1,59	20,6	65,5	91,5	0,71	5	-	-	1,0	0,38
1046	19	65,3	1,64	24,4	77,4	98	0,78	5	-	+	Nd	Nd
1048	42	75,8	1,58	30,4	91,5	107,8	0,84	5	-	-	2,03	0,34
1050	36	49,6	1,54	20,9	67,5	90	0,75	5	-	-	1,07	0,38

1051	19	62,7	1,54	26,4	81	101	0,8	4	-	Nd	1,31	0,37
1052	23	63,9	1,63	23,9	76,5	100,5	0,76	5	-	-	1,84	0,35
1055	20	48,8	1,63	18,4	70	92	0,76	Nd	Nd	Nd	0,85	0,39
1060	35	54,1	1,54	22,7	73	94	0,77	5	-	-	0,99	0,38
1061	17	63,2	1,62	24,1	74	94	0,78	5	-	+	0,81	0,4
1066	27	72,8	1,65	26,7	89	109,7	0,81	5	-	-	1,14	0,38
1067	41	53,4	1,58	21,4	75	97	0,77	5	-	-	2,37	0,34
1069	28	103,5	1,68	36,7	111,5	123,5	0,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1070	35	61,2	1,51	26,8	83	97,5	0,85	6	-	+	0,73	0,41
1074	26	57	1,63	21,5	68	94,5	0,71	5	-	+	Nd	Nd
1076	25	53	1,63	19,8	66	94,7	0,69	5	-	-	0,84	0,4
1077	23	56,5	1,58	22,5	72,5	97,5	0,74	5	-	-	Nd	Nd
1079	27	64	1,67	23,5	75	98	0,76	7	-	-	0,88	0,39
1080	41	55,2	1,52	23,8	68	94,5	0,71	5	-	-	0,54	0,43
1085	30	60,3	1,59	23,7	72	95,5	0,75	5	-	+	1,71	0,35
1088	22	71,7	1,70	24,7	85	103	0,82	6	-	-	1,78	0,35
1093	29	59	1,59	23,4	72	100	0,72	5	-	-	1,33	0,37
1094	27	49,7	1,65	18,2	78	97	0,8	5	-	-	1,08	0,38
1096	26	49,7	1,56	20,4	67	85	0,78	6	-	+	1,1	0,38
1097	37	62,1	1,58	24,9	72	100	0,72	5	-	-	0,39	0,45

Característica clínica+padrão refererência normal - IMC: índice de massa corpórea (<30kg/m²); **RCQ:** relação cintura/quadril (<1); **CM:** ciclos menstruais; **IFG:** índice Ferriman e Gallwey (<8); **AN:** *Acanthosis nigricans*; **AFD:** antecedente familiar de diabetes; **HOMA:** *homeostasis model assessment* (<3,8); **QUICKI:** *quantitative sensitivity check index* (≥ 0,34); **(+):** presença; **(-):** ausência; **Nd:** não determinado.

Anexo 3. Dados bioquímicos de amostras de sangue periférico das pacientes portadoras da síndrome de hiperandrogenismo, resistência insulínica e *Acanthosis nigricans* (HAIR-AN) e da síndrome do ovário policístico (SOP).

Casos	Diagnóstico	T total	T livre	DHEA-S	17 α -OHP4	LH	FSH	G 60	G 90	G 120	I 0	I 30	I 60	I 90	I 120	Gj	Ij	Gj/Ij
363	HAIR-AN	572	10,9 ^g	183	2,55/3,21	6,4	3,1	161	136	153	131,6	771,6	6382,9	675,3	888,3	207	25,1	8,24
364	HAIR-AN	48,9	3,2 ^a	Nd	0,45/2,34	1,0	3,5	192	168	150	96,3	181,9	540,5	2002,5	4354,6	102	131,6	0,78
365	HAIR-AN	555	6,5 ^a	170	1,72/2,20	2,2	5,3	217	217	212	38,4	118,7	249,2	300,2	272,4	94	45	2,09
366	HAIR-AN	176	4,8 ^a	426	0,58/2,42	5,9	5,1	177	173	161	45	783	810	309,8	392	98	26,8	3,65
367	SOP	168	10,4 ^g	431	2,58/3,49	2,6	2,1	150	140	139	16,8	125	199,1	159,2	125,8	86	13,9	6,19
368	HAIR-AN	20	2,7 ^a	130	1,08/1,43	1,4	1,8	170	238	216	123,5	109,4	146,1	142,1	602,7	79	6,5	12,17
370	HAIR-AN	73,23	6,6 ^c	150	0,23/2,60	1,3	2,2	187	193	181	27	99,1	156,1	255,1	341,3	106	16,9	6,27
371	HAIR-AN	90	10,9 ^a	195	0,83/1,73	5,7	3,9	116	98	118	35,2	360,9	438	362,2	283,5	82	2,7	30,04
375	SOP	20	12,5 ^a	330	1,99/4,14	2,4	0,7	145	130	123	30,0	264,6	199,2	241,5	172,9	101	8,4	12,02
377	HAIR-AN	240	1,0 ^f	69	0,62/9,12	44,8	9,6	302	309	270	78,9	334,3	408,1	558,7	343,8	91	31	2,93
378	HAIR-AN	158	9,4 ^b	214	1,25/3,46	2,6	2,1	219	216	183	62	217,8	629,9	2188,1	663,8	92	11,4	8,1
382	SOP	40,8	1,9 ^d	238	0,34/0,5	9,2	6,8	91	117	132	31,1	209,2	125,7	133,6	206,4	97	45,5	2,13
383	HAIR-AN	1360	7,3 ^a	137	1,03/Nd	2,8	4,5	302	323	331	54,7	Nd	Nd	Nd	Nd	97	62	1,56
611	SOP	21,04	4,0 ^a	68	0,92/1,89	1,8	3,5	102	101	113	33,2	131,9	127,4	140,9	164,8	92	20,6	4,47
617	SOP	139	4,9 ^a	198	0,58/2,06	12,3	7,7	131	102	119	11,4	49,7	100,4	90,4	271,3	79	7,3	10,78
622	HAIR-AN	107	6,0 ^a	114	1,41/2,69	5,8	5,2	117	83	70	35,3	259,3	385,2	393,1	89,1	85	33,2	2,56
623	SOP	51,8	3,6 ^d	145	Nd	9,8	6,3	141	121	108	7,3	52,9	53,1	45,5	42,9	80	4,2	19,23
646	SOP	93	1,5 ^a	138	1,57/7,93	39,8	5,6	123	105	96	15	130	182	139	80	94	19,8	4,75
652	SOP	48	2,4 ^d	159	2,10/4,75	14	7,4	71	80	76	9,6	35	29,9	25,1	20,4	91	5,7	15,91
653	SOP	36	4,2 ^a	86	1,02/3,61	22,6	6,2	112	110	82	8,4	90,4	63,4	89,3	49,7	116	10	11,62
654	SOP	75	3,2 ^a	175	Nd	8,8	5,9	143	124	110	26,8	131,5	153,5	121,7	96	97	17,9	5,42
655	SOP	100	6,3 ^a	127	0,98/3,12	4,1	4,5	180	171	139	27,3	146	237	191	168	87	12,2	7,13
660	SOP	35,5	2,1 ^b	336	1,31/3,52	6,3	7,6	148	131	116	7,6	51,5	56,8	51,7	41,1	81	7,6	10,59
676	SOP	84	3,3 ^b	254	5,97/9,72	9,8	5,7	119	118	114	45,5	143,9	181	182,1	147,5	94	12,7	7,4
732	SOP	65	2,4 ^b	190	1,27/Nd	18,6	11	99	94	84	6	44,8	38,2	36,5	29,5	86	5,2	16,54
738	SOP	92	4,6 ^b	184	Nd	8,2	6,2	90	91	94	28,6	131	61,4	69,8	78,3	90	35,3	2,55
739	SOP	65	2,4 ^a	194	2,32/2,82	8,4	7,1	183	141	107	176,1	177,7	223,5	204,2	223,7	109	17,6	6,19
742	SOP	90	4,7 ^a	305	1,39/6,53	10,6	4,9	98	101	86	9,7	138,6	113,9	66,8	59,6	107	35,1	3,05
743	SOP	89	12,7 ^a	296	1,98/4,49	11,1	6,0	86	81	77	5,7	221	124	96,1	69,6	99	16,8	5,9
748	HAIR-AN	112	4,5 ^a	56	2,39/8,34	8,5	4,6	153	135	101	20,6	177,4	601	182,5	76,7	201	54,7	3,68

751	SOP	27,5	2,8 ^b	221	1,87/7,18	6,3	7,6	133	158	126	35,1	56,5	164,7	298,7	137,5	91	19,6	4,64
756	HAIR-AN	35	2,7 ^d	166	2,83/6,70	4,5	4,4	204	163	Nd	25,1	198,6	364,7	375,4	Nd	90	30	3
770	SOP	120	4,9 ^a	178	2,47/5,23	9,9	6,1	99	88	64	19,6	213,5	125,2	115,6	18,2	94	15	6,27
775	SOP	50	2,4 ^b	32	8,63/Nd	3,8	3,7	150	149	138	17,5	86,9	77,7	64,9	73,3	92	20,9	4,39
781	SOP	65	3,8 ^a	192	Nd	16,2	5,9	63	84	71	17,9	71,1	24,3	21,9	22,5	93	6	15,5
782	SOP	96	3,0 ^b	271	1,49/3,72	15,2	6,1	135	108	105	5,2	57,8	50,7	60,1	58,2	78	4,1	19,21
783	SOP	103	2,9 ^a	473	1,73/3,17	3,4	5,4	135	120	113	13,8	61,8	113,3	66,1	65,2	91	38,4	2,37
784	SOP	40	3,7 ^a	216	1,26/2,67	7,9	7,3	115	93	101	4,1	103	52,5	60,9	66,2	78	35,2	2,21
791	SOP	38	2,2 ^a	235	0,95/2,54	2,8	6,9	96	124	112	19,8	1070,7	80,8	147,5	104,4	95	34,3	2,77
792	HAIR-AN	252	12,1 ^e	264	2,35/6,42	9,2	4,5	183	124	98	33	358,1	1614,6	549,5	371,5	103	27,3	3,77
796	SOP	92	4,1 ^a	317	0,79/1,73	3,1	5,8	117	112	123	18	215,1	79,5	104,3	175,9	82	9,6	8,51
800	SOP	74,7	2,9 ^a	219	2,13/3,63	18,9	6,9	79	67	74	6,8	60,5	53,8	29,8	62,2	99	96,3	1,03
802	SOP	121	3,2 ^a	105	2,04/3,97	11,6	7,6	198	202	162	2,7	57,8	73,7	138,5	107,2	107	27	3,97
817	SOP	81,8	4,8 ^b	164	1,41/7,42	10,6	5,6	118	100	80	15,3	71,5	93,3	101	64,3	143	78,9	1,81
831	SOP	75	10,3 ^d	158	1,31/0,8	5,7	3,4	2238	212	178	10	40,7	71,8	119,9	112	92	13,8	6,65
843	SOP	26	1,2 ^a	300	1,83/3,01	6,2	4,1	134	94	110	81,4	40,2	66,6	34,8	57,2	90	28,6	3,15
862	SOP	168	5,1 ^b	287	3,86/3,11	13,5	5,4	96	84	111	16,9	56,5	76,1	39,2	65,7	111	123,4	0,9
864	SOP	88,6	3,8 ^a	112	4,00/10,83	8,2	5,2	179	122	124	20,9	183,7	246,8	98,1	91,4	90	20,8	4,33
870	SOP	131	3,0 ^a	175	0,81/3,61	6,7	5,4	180	132	124	12,7	52,6	103	103	85,7	93	15,3	6,08
871	SOP	54,7	1,1 ^a	90	Nd	9,3	9,8	132	98	96	16,2	71,3	141	122	115	89	16,2	5,49
873	SOP	163	4,1 ^b	236	5,96/7,62	6,5	5,0	124	103	101	4,2	40,2	85,5	58,7	49,3	82	6,8	12,13
880	SOP	91,6	3,4 ^a	534	2,61/2,43	4,8	5,2	96	113	118	12,2	82	31,4	44,2	29,9	87	18	4,83
887	HAIR-AN	147	4,1 ^b	68	0,81/2,24	2,2	4,1	157	132	83	34,3	452,4	629,4	335,7	266,6	91	9,7	9,41
891	HAIR-AN	50	8,0 ^a	132	2,19/4,59	2,3	7,2	145	112	Nd	20,8	89,2	273,9	301	Nd	89	18,1	4,91
893	SOP	124	1,9 ^b	106	1,01/1,78	15,6	7,9	179	62	47	6,5	114	240	42,1	20,1	90	33	2,73
896	SOP	28	2,1 ^b	192	0,51/3,39	12,4	6,6	110	119	103	13,9	121	90,3	151	117	94	17,5	5,38
938	SOP	105	2,8 ^a	85	4,52/6,04	9,1	6,0	142	115	103	76,8	14,4	114	117	95,7	94	16,8	5,6

Característica bioquímica+valor de referência normal - T total: testosterona total (20 a 81ng/dL); **T livre:** testosterona livre (^a 0,04 a 3,9; ^b 0,06 a 2,57 pg/mL; ^c 0,63 a 1,20 pg/mL; ^d 0,45 a 3,17 pg/mL; ^e até 5,5 pg/mL; ^f 0,04 a 2,03 pg/mL); **DHEA-s:** sulfato de dehidroepiandrosterona (35 a 430µg/dL); **17α-OHP:** 17α-hidroxiprogesterona (< 4ng/mL); **LH** - hormônio luteinizante (1,0 a 18,0 mUI/mL); **FSH** - hormônio folículo-estimulante (4,0 a 13,0 mUI/mL); **G:** glicose (intolerância a glicose 110 a 125mg/dL jejum e/ou 140 a 199mg/dL aos 120 min; diabetes ≥126 jejum e/ou ≥200mg/dL aos 120 min.); **I:** insulina (HAIR-AN >50µIU/mL jejum e/ou >300µIU/mL); **Gj:** glicemia de jejum (mg/dL); **Ij:** insulina de jejum (µIU/mL); **Nd:** não determinado.

Anexo 4. Dados bioquímicos de amostras de sangue periférico das mulheres do grupo controle.

Controles	T total	DHEA-S	G 30	G 60	G 90	G 120	Gj	I 30	I 60	I 90	I 120	Ij	Gj/Ij
8	Nd	Nd	147	181	162	140	93	20,0	84,1	90,7	102,8	17,5	Nd
28	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	77	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
31	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	91	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
32	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	83	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
36	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	93	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
40	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	97	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
41	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	103,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
650	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	84	108	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
651	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	88	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
668	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	97	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
669	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
674	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	86,9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
716	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	88	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
720	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	105	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
721	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	79	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
723	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	95	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
745	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	73	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
746	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	81	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
763	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	110	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
764	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
766	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	123	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
777	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	89	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
795	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
815	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	88	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
823	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	113	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1045	108	310	141	110	95	77	70	Nd	Nd	Nd	Nd	5,99	11,7
1046	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1048	52,1	154	124	104	102	96	86	Nd	Nd	Nd	Nd	9,56	9
1050	20	85,8	113	103	100	89	75	Nd	Nd	Nd	6,13	4,76	16,3

1051	79	293	126	116	110	104	77	Nd	Nd	Nd	9,01	12,3
1052	75,2	207	108	84	83	76	81	Nd	Nd	Nd	9,2	8,8
1055	52,3	188	135	128	112	107	79	Nd	Nd	Nd	4,36	18,1
1060	34,8	138	98	93	88	86	75	Nd	Nd	2	5,33	14,1
1061	33,9	71,6	108	115	78	83	81	Nd	Nd	3,75	6,57	21
1066	20	37,1	95	74	77	78	81	Nd	Nd	Nd	5,41	17,6
1067	41,9	193	132	114	92	72	84	Nd	Nd	Nd	5,15	6,7
1069	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1070	27,6	103	108	82	88	99	72	Nd	Nd	Nd	4,08	17,6
1074	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1076	62,8	187	132	85	80	78	82	Nd	Nd	6,9	6,59	17,9
1077	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
1079	68,2	221	108	94	82	70	79	Nd	Nd	Nd	2	15,8
1080	48,5	57,2	88	96	93	83	77	Nd	Nd	Nd	2,86	26,9
1085	27,6	41,1	126	96	85	81	90	Nd	Nd	Nd	5,12	8,5
1088	64,4	237	80	78	73	72	70	Nd	Nd	Nd	10,3	6,8
1093	24,1	153	151	119	102	92	81	Nd	Nd	9,6	23,4	12,4
1094	27	44,3	118	93	78	73	78	Nd	Nd	Nd	4,36	15
1096	31,4	26,5	112	98	87	83	79	Nd	Nd	Nd	5,62	14,1
1097	48,8	137	105	99	94	83	83	Nd	Nd	Nd	3,96	39,5

Característica bioquímica+padrão de referência normal - **T total:** testosterona total (< 81ng/dL); **DHEA-S:** sulfato de dehidroepiandrosterona (35 a 430mcg/dL); **G:** glicose (intolerância a glicose 110 a 125mg/dL jejum e/ou 140 a 199mg/dL aos 120 min; diabetes ≥126 jejum e/ou ≥200mg/dL aos 120 min.); **I:** insulina (HAIR-AN >50μIU/mL jejum e/ou >300μIU/mL); **Gj:** glicemia de jejum (mg/dL); **Ij:** insulina de jejum (μIU/mL); **Nd:** não determinado.

Anexo 5. Pacientes do grupo caso (SOP + HAIR-AN) com história familiar de câncer de mama e endométrio.

Diagnóstico	Casos	Testo T	DHEA-s	LH	FSH	AF câncer
SOP	382	40,8	238	9,2	6,8	LU - avó materna
SOP	383	1360	137	2,8	4,5	LU - três irmãs
SOP	646	93	138	39,8	5,6	fibroadenoma
SOP	739	65	194	8,4	7,1	mama - avó
SOP	864	88,6	112	8,2	5,2	LU
SOP	880	91,6	534	4,8	5,2	LU
SOP	893	124	106	15,6	7,87	LU e mama
HAIR-AN	748	112	56	8,5	4,6	mama

AF: antecedente familiar; LU: leiomioma uterino.

Anexo 6. Análise polimorfismos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* em amostras de mulheres portadoras da síndrome de hiperandrogenismo, resistência insulínica e *Acanthosis nigricans* (HAIR-AN) e da síndrome do ovário policístico (SOP).

Casos	Diagnóstico	<i>ER-α</i>	<i>ER-β</i>	<i>INSR</i>	<i>IGF2</i>	<i>PAI-1</i>
363	HAIR-AN	14/15	22/24	C/T	G/G	5G/4G
364	HAIR-AN	14/15	20/22	C/T	A/G	5G/5G
365	HAIR-AN	20/21	23/23	C/C	G/G	5G/5G
366	HAIR-AN	15/15	21/22	C/C	Nd	Nd
367	SOP	24/25	22/24	C/C	G/G	5G/4G
368	HAIR-AN	12/12	23/23	C/C	G/G	5G/4G
370	HAIR-AN	23/24	22/24	C/T	G/G	5G/4G
371	HAIR-AN	17/22	20/20	C/C	A/G	5G/4G
375	SOP	15/17	22/23	C/C	A/G	5G/4G
377	HAIR-AN	15/17	20/24	C/T	G/G	5G/5G
378	HAIR-AN	15/15	21/24	C/C	A/G	5G/5G
382	SOP	20/21	23/23	C/C	A/G	5G/4G
383	HAIR-AN	13/20	23/23	C/C	G/G	5G/4G
611	SOP	21/22	22/24	C/T	A/G	5G/4G
617	SOP	16/16	20/21	C/T	G/G	5G/4G
622	HAIR-AN	15/16	17/20	T/T	A/G	5G/4G
623	SOP	15/19	19/22	C/C	A/A	4G/4G
646	SOP	14/17	20/23	T/T	A/G	5G/4G
652	SOP	14/24	23/26	C/C	G/G	5G/4G
653	SOP	15/18	22/23	C/T	A/G	5G/4G
654	SOP	15/21	24/26	C/C	G/G	5G/4G
655	SOP	21/22	20/22	C/C	G/G	5G/4G
660	SOP	15/16	22/23	C/T	G/G	5G/4G
676	SOP	15/15	16/23	C/T	G/G	5G/5G
732	SOP	14/16	24/24	C/T	G/G	5G/4G
738	SOP	14/15	24/26	C/T	G/G	5G/4G
739	SOP	20/21	22/23	C/C	G/G	5G/4G
742	SOP	14/15	19/24	C/C	G/G	5G/4G
743	SOP	15/17	17/24	C/C	A/A	4G/4G
748	HAIR-AN	24/25	23/24	C/C	A/G	5G/4G
751	SOP	22/25	22/23	C/C	A/G	5G/4G
756	HAIR-AN	15/24	22/23	C/T	A/G	5G/4G
770	SOP	11/17	22/23	C/T	A/G	5G/4G
775	SOP	16/22	19/19	C/C	G/G	5G/4G
781	SOP	15/18	21/24	C/T	A/G	5G/4G
782	SOP	14/15	23/24	C/T	A/G	5G/4G
783	SOP	11/16	23/23	C/C	G/G	5G/5G
784	SOP	15/23	22/24	C/T	G/G	5G/5G
791	SOP	22/23	19/22	C/T	A/G	5G/5G
792	HAIR-AN	14/14	23/27	C/C	A/G	4G/4G
796	SOP	21/25	20/24	C/C	G/G	5G/4G
800	SOP	20/23	22/23	C/C	A/A	5G/4G
802	SOP	15/24	23/23	T/T	A/A	5G/4G
817	SOP	21/23	23/23	C/C	A/G	4G/4G
831	SOP	20/24	19/24	C/C	G/G	4G/4G
843	SOP	16/26	22/23	C/C	A/G	5G/5G

862	SOP	15/18	22/22	C/C	A/A	5G/4G
864	SOP	14/22	24/26	C/C	G/G	5G/4G
870	SOP	22/23	20/23	C/C	A/G	5G/4G
871	SOP	15/25	17/23	C/T	A/G	5G/5G
873	SOP	15/15	18/24	C/T	A/G	5G/5G
880	SOP	24/25	19/24	C/C	A/G	5G/5G
887	HAIR-AN	24/25	17/22	C/C	A/G	5G/5G
891	HAIR-AN	14/15	22/23	C/T	G/G	5G/5G
893	SOP	20/21	20/20	C/C	G/G	4G/4G
896	SOP	15/15	17/24	C/C	G/G	4G/4G
938	SOP	15/15	17/20	C/C	G/G	5G/5G

Nd: não determinado.

Anexo 7. Análise dos polimorfismos dos genes *ER- α* , *ER- β* , *INSR*, *IGF2* e *PAI-1* nas amostras do grupo controle.

Controles	<i>ER-α</i>	<i>ER-β</i>	<i>INSR</i>	<i>IGF2</i>	<i>PAI-1</i>
8	15/22	21/24	C/C	A/A	4G/4G
28	22/22	19/23	C/T	G/G	5G/5G
31	16/24	22/23	C/C	G/G	4G/4G
32	24/24	21/21	C/C	A/G	4G/4G
36	14/26	19/25	C/C	G/G	5G/4G
40	15/25	22/23	C/C	A/A	4G/4G
41	Nd	Nd	T/T	G/G	5G/4G
650	15/23	19/22	C/C	G/G	5G/4G
651	14/24	16/27	C/C	G/G	5G/5G
668	10/24	20/22	C/T	A/G	5G/4G
669	16/16	19/22	T/T	G/G	5G/4G
674	22/24	19/23	C/C	G/G	5G/5G
716	23/24	22/25	C/C	G/G	5G/4G
720	14/23	18/21	C/T	A/G	5G/5G
721	15/17	22/23	C/T	G/G	5G/4G
723	13/14	22/22	C/C	A/G	5G/4G
745	16/22	24/24	C/C	A/G	5G/5G
746	15/16	23/23	C/C	A/A	5G/5G
763	15/22	22/30	C/C	A/G	5G/4G
764	17/26	19/22	C/C	A/G	5G/5G
766	14/24	20/22	C/C	G/G	5G/5G
777	16/25	20/23	C/T	A/G	4G/4G
795	15/23	23/24	C/C	A/G	4G/4G
815	12/15	28/28	C/C	A/G	5G/4G
823	24/28	22/27	C/C	A/A	5G/4G
1045	16/21	22/26	C/T	A/G	4G/4G
1046	15/24	19/22	C/C	G/G	5G/5G
1048	15/22	17/23	C/C	G/G	5G/5G
1050	15/16	23/25	T/T	G/G	5G/4G
1051	15/25	20/23	C/C	A/G	5G/4G
1052	16/23	20/21	C/T	A/G	5G/4G
1055	19/20	24/25	C/C	G/G	5G/4G
1060	15/16	22/22	C/C	G/G	5G/4G
1061	15/22	18/23	C/T	G/G	5G/4G
1066	22/23	22/23	C/T	A/G	5G/4G
1067	16/22	19/23	C/C	A/A	5G/4G
1069	14/15	22/24	C/C	A/A	5G/4G
1070	16/20	21/23	C/T	A/G	5G/5G
1074	15/24	22/22	T/T	A/G	5G/4G
1076	15/23	17/26	C/C	G/G	5G/4G
1077	12/21	23/23	C/T	G/G	5G/5G
1079	14/15	23/23	C/C	G/G	5G/5G
1080	15/16	23/23	T/T	G/G	5G/5G

1085	15/25	21/23	C/T	A/G	5G/5G
1088	17/24	21/22	C/C	A/G	5G/4G
1093	14/22	22/23	C/T	G/G	5G/4G
1094	20/24	16/24	C/T	A/G	4G/4G
1096	17/17	23/23	C/T	G/G	Nd
1097	15/15	20/27	C/C	G/G	5G/5G

Nd: não determinado.

Anexo 8. Média e o desvio padrão dos grupos HAIR-AN e controles e o valor de *p* obtido da comparação entre os genótipos do gene *ER-α* e os dados clínicos e bioquímicos.

Genótipos <i>ER-α</i>	Característica	HAIR-AN (n)	Controles (n)	<i>p</i> *
Homozigoto longo ≥15 repetições	IMC	36,79±6,12 (10)	24,79±4,54 (37)	<0,0001
	IFG	15,7±6,93 (10)	5,1±0,46 (19)	<0,0001
	T total	266±413,73 (10)	47,52±23,45 (18)	0,0318
	DHEA-s	169,9±104,96 (9)	139,48±88,11 (18)	0,4346
Heterozigoto <15 e ≥15 repetições	IMC	34,77±6,28 (4)	26,58±4,83 (10)	0,0213
	IFG	15,75±3,3 (4)	5,67±1,15 (3)	Nd
	T total	131±92,72 (4)	46,15±31,18 (2)	Nd
	DHEA-s	173,25±81,32 (4)	187±48,08 (2)	Nd
Homozigoto curto <15 repetições	IMC	41,70±8,33 (2)	22,4 (1)	Nd
	IFG	16,50±6,37 (2)	0	Nd
	T total	406±234,76 (2)	0	Nd
	DHEA-s	126±80,61 (2)	0	Nd

*Teste t não pareado.
Nd – não definido.

Anexo 9. Média e o desvio padrão dos grupos HAIR-AN e controles e o valor de *p* obtido da comparação entre os genótipos do gene *ER-β* e os dados clínicos e bioquímicos.

Genótipos <i>ER-β</i>	Característica	HAIR-AN (n)	Controles (n)	<i>p</i> *
Homozigoto longo >22 repetições	IMC	36,54±8,23 (5)	21,95±1,83 (10)	<0,0001
	IFG	16±5,19 (5)	5,6±0,89 (5)	0,0022
	T total	245,2±201,69 (5)	44,08±18,77 (5)	0,0572
	DHEA-s	140,8±85,7 (5)	115,7±84,54 (5)	0,6535
Heterozigoto ≤22 e >22 repetições	IMC	36,79±2,33 (6)	26,33±5,14 (25)	<0,0001
	IFG	15,33±5,78 (6)	5±0,43 (12)	<0,0001
	T total	92,03±63,56 (6)	46,07±26,32 (12)	0,0424
	DHEA-s	213,5±108,4 (6)	143,67±92 (12)	0,1710
Homozigoto curto ≤22 repetições	IMC	37,38±8,45 (5)	25,22±3,9 (13)	0,0006
	IFG	16,2±7,56 (5)	5,2±0,45 (5)	0,0117
	T total	443,6±549,83 (5)	58,13±20,91 (3)	Nd
	DHEA-s	122,25±42,85 (4)	194±50,76 (3)	Nd

*Teste t não pareado.
Nd – não definido.

Anexo 10. Média e o desvio padrão dos grupos HAIR-AN e controles e o valor de *p* obtido da comparação entre os genótipos do gene *INSR* e os dados clínicos e bioquímicos.

Genótipos <i>INSR</i>	Característica	HAIR-AN (n)	Controles (n)	<i>p</i>
Homozigoto selvagem (C/C)	G/I	3,81±2,37 (9)	15,57±9,98 (9)	0,0034 ⁽¹⁾
	HOMA	13,41±10,26 (9)	1,27±0,65 (9)	0,0027 ⁽¹⁾
	QUICKI	0,28±0,03 (9)	0,39±0,04 (9)	<0,0001 ⁽¹⁾
	AN%	100 (9)	0 (9)	0,0116 ⁽²⁾
	AFD%	22,22 (9)	26,92 (26)	1,000 ⁽²⁾
Heterozigoto (C/T)	G/I	11,06±9,93 (6)	14,08±4,18 (9)	0,4263 ⁽¹⁾
	HOMA	3,28±2,65 (6)	1,2±0,37 (9)	0,0343 ⁽¹⁾
	QUICKI	0,34±0,05 (6)	0,38±0,02 (9)	0,0479 ⁽¹⁾
	AN%	100 (6)	0 (10)	0,0152 ⁽²⁾
	AFD%	33,33 (6)	40 (15)	1,000 ⁽²⁾
Homozigoto raro (T/T)	G/I	2,56 (1)	21,61±7,5 (2)	Nd
	HOMA	6,97 (1)	0,8±0,38 (2)	Nd
	QUICKI	0,29 (1)	0,4±0,03 (2)	Nd
	AN%	100 (1)	0 (3)	0,4000
	AFD%	100 (1)	20 (5)	0,4643

(1) Teste t não pareado.

(2) Teste exato de Fisher para amostras independentes.

Nd – não definido.

Anexo 11. Média e o desvio padrão dos grupos HAIR-AN e controles e o valor de *p* obtido da comparação entre os genótipos do gene *IGF2* e os dados clínicos e bioquímicos.

Genótipos <i>IGF2</i>	Característica	HAIR-AN (n)	Controles (n)	<i>p</i>
Homozigoto selvagem (G/G)	IMC	36,65±3,24 (7)	25,56±4,6 (24)	<0,0001 ⁽¹⁾
	AFD%	42,86 (7)	26,01 (23)	0,6686 ⁽²⁾
Heterozigoto (A/G)	IMC	37,36±8,62 (8)	23,72±3,4 (19)	<0,0001 ⁽¹⁾
	AFD%	2 (8)	6 (18)	1,000 ⁽²⁾
Homozigoto raro (A/A)	IMC	0 (0)	29,3±6,7 (6)	Nd

(1) Teste t não pareado.

(2) Teste exato de Fisher para amostras independentes.

Nd – não definido.

Anexo 12. Média e o desvio padrão dos grupos HAIR-AN e controles e o valor de *p* obtido da comparação entre os genótipos do gene *PAI-1* e os dados clínicos e bioquímicos.

Genótipos <i>PAI-1</i>	Característica	HAIR-AN (n)	Controles (n)	<i>p</i>
Homozigoto selvagem (5G/5G)	IMC	34,17±4,27 (6)	24,8±3,42 (16)	<0,0001 ⁽¹⁾
	G/I	8,98±10,72 (6)	19,56±11,85 (6)	0,1359 ⁽¹⁾
	AFD%	50 (6)	37,5 (16)	1,000 ⁽²⁾
Heterozigoto (5G/4G)	IMC	37,86±6,83 (8)	26,17±5,3 (24)	<0,0001
	G/I	4,87±3,55 (8)	13,81±4,86 (11)	0,0004
	AFD%	25 (8)	19,05 (21)	1,000 ⁽²⁾
Homozigoto raro (4G/4G)	IMC	47,59 (1)	24,34±5,34 (8)	Nd
	G/I	8,24 (1)	13,33±2,32 (2)	Nd
	AFD%	0 (1)	37,5 (8)	1,000 ⁽²⁾

(1) Teste t não pareado.

(2) Teste exato de Fisher para amostras independentes.

Nd – não definido.