

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**POLIMORFISMOS DO GENE DA ADIPONECTINA E VARIÁVEIS CLÍNICAS,
METABÓLICAS E HORMONAIAS EM MULHERES COM OU SEM A SÍNDROME
DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (PCOS) E INVESTIGAÇÃO DE UM MODELO
ANIMAL PARA O ESTUDO DA PCOS**

Simone Radavelli Bagatini

**Porto Alegre
Julho de 2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**POLIMORFISMOS DO GENE DA ADIPONECTINA E VARIÁVEIS CLÍNICAS,
METABÓLICAS E HORMONAIAS EM MULHERES COM OU SEM A SÍNDROME
DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (PCOS) E INVESTIGAÇÃO DE UM MODELO
ANIMAL PARA O ESTUDO DA PCOS**

"Tese apresentada ao
Programa de Pós-graduação como
requisito parcial para a obtenção do
título de doutor em Ciências
Biológicas: Fisiologia".

Simone Radavelli Bagatini

Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer

**Porto Alegre
Julho de 2010**

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de dois estudos, o primeiro realizado com humanos, no Laboratório de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas, Brasil e intitulado “Polimorfismos do gene da adiponectina e variáveis clínicas, metabólicas e hormonais em mulheres com ou sem a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)”, sob a orientação da Professora Dra. Poli Mara Spritzer; o segundo, apresentado na forma de artigo, foi realizado com camundongos obesos através de um estudo colaborativo internacional (Doutorado-Sanduiche: Estágio no Exterior PDEE) no Laboratório de Medicina da Universidade de Melbourne (*The University of Melbourne*), Austrália e tem como título “*The New Zealand Obese mouse: a model of Polycystic Ovary Syndrome with insulin resistance*”, sob a supervisão dos Professores Dr. Joseph Proietto e Dr. Sofianos Andrikopoulos.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pai Arcélio, mãe Marinês, irmão Guilherme, irmã Sibebe e cunhado Sidarta, por terem compartilhado comigo os momentos mais importantes, pela compreensão, incentivo, amor, dedicação e companheirismo ao longo dos anos. Ao Rodrigo, meu marido, pelo companheirismo e incentivo constantes, e por sempre me mostrar a maneira mais simples e mais bonita de ver as coisas; e à sua família pelo carinho e apoio constantes.

A Professora Dra. Poli Mara Spritzer pelas incansáveis leituras, valiosas sugestões e correções deste manuscrito, e pelo incentivo e determinação com que me ajudou a conduzir o trabalho.

A Professora Débora Martinho Morsch, pelo incentivo, apoio e pelos ensinamentos de laboratório, além do carinho, dos conselhos e da amizade.

A Professora Isabel Oliveira de Oliveira pela cooperação, apoio e carinho.

A Dr^a. Denusa Wiltgen pela disponibilidade, amizade, incentivo e carinho para comigo e minha família.

A Professora Maria Beatriz Kohek pela colaboração na confecção deste projeto e na pesquisa laboratorial.

Aos Professores Joseph Proietto e Sofianos Andrikopoulos, pela compreensão, apoio, incentivo, dedicação e orientação durante o doutorado sanduíche.

A amiga, Sheila B. Lecke, pelas palavras de carinho e consolo, companheirismo, amizade e colaboração no trabalho.

Aos amigos Polyana Maier Sartori e Ramon Bossardi Ramos pela colaboração no trabalho, carinho, amizade e disponibilidade.

A amiga Mariana K. Toscani, pelo carinho, colaboração, disponibilidade, amizade e incentivo constantes.

Ao querido amigo Vanderlei Biolchi, pelo incentivo e amizade.

À Daisy Crispim Moreira pela disponibilidade e ensinamentos laboratoriais.

À Miriam Sant`Helena e à Natália Goulart pelo auxílio e disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia e Unidade de Endocrinologia Ginecológica do HCPA e do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, Dep. Fisiologia – UFRGS, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia da UFRGS, pelo auxílio e agradável convivência.

Aos amigos e colegas da Universidade de Melbourne, pela amizade, carinho, compreensão e incentivo.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS e à Universidade de Melbourne, pela oportunidade de ter estudado nestas Instituições.

A Capes, pelas bolsas de estudos no Brasil e Exterior.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
SIGLAS E ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
1 INTRODUÇÃO	15
2 ESTUDO 1	25
Polimorfismos do gene da adiponectina e variáveis clínicas, metabólicas e hormonais em mulheres com ou sem a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)	25
2.1 OBJETIVOS	26
2.1.1 Objetivo Geral	26
2.1.2 Objetivos Específicos	26
2.2 METODOLOGIA	27
2.2.1 Delineamento do estudo	27
2.2.2 Pacientes	27
2.2.3 Avaliação clínica, antropométrica, hormonal e metabólica	28
2.2.4 Análise genotípica	32
2.2.5 Análise estatística	38
2.2.6 Cálculo do tamanho amostral	39
2.2.7 Considerações Éticas	39
2.3 RESULTADOS	40
2.3.1 Resultados dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina	41
2.3.2 Resultados dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina	45
2.4 DISCUSSÃO	48
2.4.1 Discussão dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina	48
2.4.2 Discussão dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina	50
2.5 CONCLUSÕES	54
2.6 FINANCIAMENTO	55
2.7 PERSPECTIVAS FUTURAS	56
2.8 TERMO DE CONSENTIMENTO	57
3 ESTUDO 2	58
The New Zealand Obese mouse: A model of Polycystic Ovary Syndrome with insulin resistance .	58
4 DISCUSSÃO CONCLUSIVA	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e o papel da Insulina.
- Figura 2 Modelo do mecanismo de ação da adiponectina no fígado e músculo.
- Figura 3 Cromossomo 3 (região de interesse: 3q27).
- Figura 4 Localização dos SNPs no gene humano da adiponectina.
- Figura 5 Seleção de Pacientes com PCOS e Controles.
- Figura 6 PCR Convencional em gel de agarose a 1,5%, onde o DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação por PCR do fragmento de DNA de 518pb, contendo os SNPs T45G e G276T do gene da adiponectina.
- Figura 7 Gel de agarose a 2% demonstrando a digestão enzimática do SNP G276T pela enzima BsmI, a qual cliva o fragmento de 518pb em dois fragmentos menores de 401 e 117pb.
- Figura 8 Gel de agarose a 2% demonstrando a digestão enzimática do SNP T45G pela enzima Aval, a qual cliva o fragmento de 518pb em dois fragmentos menores de 349 e 169pb.
- Figura 9 RT-PCR do SNP C11377G.
- Figura 10 RT-PCR do SNP G11391A.
- Figura 11 Fluxograma do estudo.
- Figura 12 Subdivisão dos grupos em estudo.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Valores de referência hormonais.
- Tabela 2 Pré-desenho para confecção de sondas dos SNPs do gene da adiponectina.
- Tabela 3 Dados clínicos, antropométricos, metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles.
- Tabela 4 Frequência genotípica dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina em mulheres com PCOS e controles.
- Tabela 5 Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G276T do gene da adiponectina.
- Tabela 6 Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G276T do gene da adiponectina.
- Tabela 7 Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP T45G do gene da adiponectina.
- Tabela 8 Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP T45G do gene da adiponectina.
- Tabela 9 Frequência genotípica dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina em mulheres com PCOS e controles.
- Tabela 10 Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP C11377G do gene da adiponectina.
- Tabela 11 Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP C11377G do gene da adiponectina.
- Tabela 12 Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G11391A do gene da adiponectina.
- Tabela 13 Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G11391A do gene da adiponectina.
- Tabela 14 Distribuição genotípica dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina em mulheres com PCOS.

SIGLAS E ABREVIATURAS

17 HP	17 Hidroxi-progesterona
ACC	AcetilCoa Carboxilase
ACRP30	<i>Adipocyte complement-related protein of 30 kDa</i>
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AMPK	Kinase dependente de AMP
APM1	<i>Adipose most abundant gene transcript 1</i>
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Circunferência da cintura
cm	Centímetros
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
CT	Colesterol total
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes Melito
DM2	Diabetes Melito tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIPE	Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GBP28	<i>Gelatin binding protein of 28 kDa</i>
Glucose-6-Pase	Glicose 6 fosfatase
GLUT4	Transportador de glicose 4
HAC-NC	Hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
IAL	Índice de androgênios livres
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato receptor de insulina 1
Kg	Quilogramas
LAP	Produto de acumulação lipídica
LDL	Lipoproteína de baixa Densidade
LH	Hormônio luteinizante
m	Metros

NZO	<i>New Zealand obese</i> ou Neo-Zelandeses obesos
PA	Pressão arterial
p38MAPK	Proteína kinase ativada por mitogênio
PCOS	Síndrome dos ovários policísticos
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxilase
PI-3 Kinase	Fosfatidil inositol 3 kinase
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
RCQ	Relação cintura/quadril
RI	Resistência insulínica
rpm	Rotações por minutos
SHBG	Globulina carreadora de hormônios sexuais
SM	Síndrome metabólica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
T	Testosterona
TG	Triglicerídeos
TPO	Anticorpo tireoperoxidase
TSH	Hormônio tireotrófico ou tireotrofina
TTG	Teste de tolerância à glicose

RESUMO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma endocrinopatia freqüente em mulheres em idade reprodutiva, sendo caracterizada por uma variedade de manifestações clínicas, incluindo resistência à insulina (RI). A adiponectina está associada com a sensibilidade à insulina e as variantes do gene desta adipocina podem estar envolvidas com aspectos fisiopatológicos da RI.

No estudo 1, o objetivo foi verificar possíveis associações entre polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do gene da adiponectina (SNPs G276T, T45G, C11377G e G11391A) e a composição corporal, presença de comorbidades relacionadas à obesidade, bem como perfil hormonal e metabólico, em 80 mulheres com PCOS e 37 controles da região sul do Brasil. A análise genotípica foi avaliada por PCR convencional e digestão enzimática para os SNPs T45G e G276T, localizados no éxon 2 e íntron 2, respectivamente, e PCR em tempo real para os SNPs da região promotora, C11377G e G11391A. As pacientes com PCOS eram mais jovens do que as participantes do grupo controle ($21,30 \pm 6,01$ e $29,86 \pm 5,15$ anos, $p=0,0001$). Pressão arterial sistólica e diastólica ($p<0,03$), escore de Ferriman para hirsutismo ($p=0,0001$) e relação cintura/quadril ($p=0,002$) foram mais elevados nas mulheres com PCOS, bem como triglicerídeos, colesterol total e LDLc comparado às controles ($p<0,02$). Os níveis de insulina em jejum, HOMA, testosterona e IAL foram também significativamente maiores em mulheres com PCOS e a concentração de SHBG mostrou-se significativamente menor do que nas controles ($p=0,0001$). A freqüência dos genótipos do SNP G276T para mulheres com PCOS foi de 52,6% G/G, 33,3% G/T, 14,1% T/T e para controles foi de 27% G/G, 62,2% G/T, 10,8% T/T. Para o SNP T45G a freqüência dos genótipos T/T, T/G e G/G foi de 79,5%, 17,9% e 2,6%, respectivamente, em mulheres com PCOS, e de 62,2%, 37,8% e 0%, respectivamente, nas controles. Ambos os SNPs foram associados à PCOS, sendo o genótipo polimórfico G/T+T/T do SNP G276T menos freqüente em mulheres com PCOS ($p=0,010$; *Odds ratio*: 2,992; 95% Intervalo de Confiança: 1,278-7,006) comparado a controles, enquanto que para o SNP T45G o genótipo selvagem mostrou-se mais freqüente em mulheres com PCOS ($p=0,048$). Na amostra estudada as freqüências dos SNPs foram similares às freqüências observadas em outras populações. Em relação aos polimorfismos da região promotora, para o SNP C11377G a freqüência genotípica foi de 52,2% para C/C, 36,2% para C/G e 11,6% para G/G em pacientes com PCOS, e em controles foi de 64,9% para C/C, 32,4 para C/G e 2,7% para G/G. A freqüência dos genótipos do SNP G11391A foi G/G 89%, G/A 9,6% e A/A 1,4% em mulheres com PCOS; e G/G 75,7%, G/A 24,3% e A/A 0% em mulheres sem a síndrome.

Foram consideradas alterações polimórficas a presença de genótipos C/G+G/G para o SNP C11377G e o genótipo C/C como ausência de polimorfismo. Para o SNP G11391A considerou-se G/A+A/A a presença de polimorfismo e G/G a ausência de alteração polimórfica. Todos os SNPs estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os SNPs da região promotora do gene da adiponectina não mostraram associação com a PCOS, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos nas variáveis clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais em ambos os grupos.

Para o estudo 2, foi utilizada uma linhagem de camundongos obesos Neo-Zelandeses (*New Zealand Obese mouse* ou *NZO mouse*), modelo poligênico de obesidade, RI e hiperinsulinemia. As fêmeas apresentam também fertilidade reduzida. Por apresentarem características similares às observadas em pacientes com PCOS, estabeleceu-se a hipótese que estes camundongos poderiam ser um modelo promissor para o estudo da síndrome, que pudesse expressar tanto as características reprodutivas quanto metabólicas da PCOS. Os objetivos deste estudo foram caracterizar as alterações metabólicas relacionadas com resistência insulínica, os aspectos morfológicos da estrutura ovariana e os níveis de hormônios reprodutivos em fêmeas de camundongos obesos, em três diferentes etapas da vida: jovens, adultos e de meia idade, e em animais controles. As fêmeas de camundongos foram pesadas e submetidas ao teste de tolerância à insulina, e à coleta de sangue para dosagens hormonais. Os ovários foram removidos para a análise histológica. Como esperado, as fêmeas NZO apresentaram maior peso corporal ($p=0,001$), aumento dos níveis de glicose ($p=0,007$) e insulina ($p=0,001$) basais, bem como RI, comparado a controles. Nas NZO observou-se também um aumento no volume ovariano, menor número de corpus lúteos e número mais elevados de folículos totais ($p=0,0001$), representados principalmente por folículos atresicos ($p=0,03$), e associados com níveis diminuídos de LH e aumentados de Estradiol, em relação as controle. Concluímos que fêmeas de camundongos obesos apresentaram ambas as características, ovariana e metabólica da PCOS humana, sugerindo ser um modelo adequado na investigação de mecanismos patofisiológicos ligados a alterações metabólicas com anormalidades reprodutivas.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive age. It is characterized by many clinic manifestations, including insulin resistance (IR). Adiponectin is associated to insulin sensitivity and adiponectin polymorphisms might be related to pathophysiological aspects of IR in PCOS.

In study 1, we aimed to verify the association between Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the adiponectin gene (SNPs G276T, T45G, C11377G and G11391A) and the body composition, obesity-associated comorbidities and the hormonal and clinical profile, in 80 women with PCOS and 37 controls from south of Brazil. Genotypic analyses were evaluated by Conventional PCR and Cleavage for the G276T and T45G polymorphisms and Real Time PCR for the SNPs C11377G and G11391A. PCOS patients were younger than controls (21.30 ± 6.01 and 29.86 ± 5.15 years old, $p=0.0001$). Systolic and diastolic blood pressure ($p<0.03$), Ferriman score for hirsutism ($p=0.0001$) and waist/hip ratio ($p=0.002$) were higher in PCOS group as well as TG, CT and LDLc compared to control group ($p<0.02$). Fasting insulin levels, HOMA-IR index, testosterone concentrations and FAI were also significantly greater in PCOS women, but SHBG concentration was lower ($p=0.0001$). Genotype frequency for SNP G276T in women with PCOS was 52.6% G/G, 33.3% G/T, 14.1% T/T and for controls was 27% G/G, 62.2% G/T, 10.8% T/T. In SNP T45G the frequency for genotypes T/T, T/G and G/G was 79.5%, 17.9% and 2.6%, respectively, in PCOS women, and 62.2%, 37.8% e 0%, respectively, in controls. Both SNPs G276T and T45G were associated to PCOS, being less frequent in this group compared to controls ($p=0.010$ and $p=0.048$, respectively). Our study showed similar genotypic frequency distribution compared to other populations. For the SNP C11377G, genotypic frequency distribution was 52.2% for C/C, 36.2% for C/G and 11.6% for G/G in women with PCOS, and in controls it was 64.9% for C/C, 32.4 for C/G and 2.7% for G/G. Genotypic frequency distribution of SNP G11391A was G/G 89%, G/A 9.6% and A/A 1.4% in women with PCOS; and G/G 75.7%, G/A 24.3% and A/A 0% in healthy women. Polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. SNPs C11377G and G11391A of the adiponectin gene were not associated to PCOS or other clinical, anthropometric, metabolic and hormonal variables in both groups.

In the study 2, we studied New Zealand Obese (NZO) mice, a polygenic model of obesity, IR and hyperinsulinemia. Importantly NZO mice are poor breeders; Since they display similar metabolic features of human PCOS we hypothesized they might be a suitable model to study PCOS further. The aim of this study was to assess sex hormone

levels and ovarian structure in female NZO and lean C57BL/6J control mice in three different ages: young, adult and middle age. Twenty-five NZO and twenty female control mice at three different ages (young, adult and aged) were studied. The animals were weighed, an insulin tolerance test (ITT) was carried out and the blood was collected for hormonal level measurement. The ovaries were removed for histological analysis. As expected, NZO mice presented higher BW ($p=0.001$), increased basal plasma glucose ($p=0.007$) and insulin levels ($p=0.001$), as well as insulin resistance compared with control mice. NZO mice showed an increased ovarian volume, reduced numbers of corpora lutea, higher total follicles numbers ($p=0.0001$), but an increased amount of atretic follicles ($p=0.03$) associated with reduced plasma luteinising hormone levels and increased estradiol levels. In conclusion, NZO mice presented both the ovarian and metabolic features of human PCOS suggesting that they are suitable for investigating pathophysiological mechanisms linking metabolic alterations with reproductive defects.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma condição clínica heterogênea que acomete de 7 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Carmina and Lobo, 1999; Gambineri et al., 2002; Legro, 2001; Salehi et al., 2004). Caracteriza-se pela presença de: 1) oligo- ou amenorréia (9 ou menos menstruações ao ano); 2) níveis elevados de androgênios circulantes e/ou manifestações clínicas de excesso de androgênios (hirsutismo, acne, alopecia) (Lobo and Carmina, 2000; Norman, 2002); 3) Cistos ovarianos; e exclusão de outras causas de anovulação e hiperandrogenismo (como Síndrome de Cushing's, hiperprolactinemia e Hiperplasia Adrenal Congênita) (Azziz, 2006; Azziz et al., 2006; Rotterdam, 2004) e secreção inapropriada de LH (hormônio luteinizante) (Ehrmann, 2005; Marx and Mehta, 2003; Norman et al., 2004; Waldstreicher et al., 1988).

Cerca de 50% das mulheres com PCOS apresentam obesidade (Carmina et al., 1999; Gambineri et al., 2002; Pasquali et al., 1993), principalmente central (Marx and Mehta, 2003), tendo sido associada com maior prevalência de fatores de risco para doença cardiovascular (DCV) (Carr, 2003; Ehrmann et al., 2006; Essah and Nestler, 2006) e diabetes melito tipo 2 (DM2) (Dunaif, 2006; Legro, 2006; Spritzer et al., 2001). O ganho de peso nestas mulheres está relacionado com o aumento dos níveis de insulina, resistência insulínica (RI) e intolerância à glicose. Além disso, independentemente do peso corporal, muitas mulheres com PCOS têm predisposição à RI e hiperinsulinemia (Dunaif, 1997; Ehrmann et al., 1999; Spritzer et al., 2005), alterações no perfil lipídico como níveis elevados de colesterol total (CT), LDL-colesterol e triglicédeos (TG) e níveis diminuídos de HDL-colesterol, além de aumento da pressão arterial (Dunaif, 1997; Holte et al., 1996; Spritzer et al., 2001). Todos esses achados coincidem com os critérios para a síndrome metabólica

(SM), sendo esta evidente em muitas pacientes com PCOS (Carr, 2003). Na população de 91 mulheres com idades entre 14 e 35 anos que consultavam por hirsutismo na Unidade de Endocrinologia Ginecológica/Serviço de Endocrinologia do HCPA, a prevalência de SM (NCEP, 2001) foi de 27,9% nas pacientes com PCOS (Spritzer and Wiltgen, 2007).

O aumento dos níveis séricos de insulina resultante da obesidade e RI, pode tornar mais grave a hipersecreção de androgênios pelos ovários e adrenais em pacientes com PCOS (Dunaif, 1997). A insulina atua direta- e indiretamente na patogênese da hiperandrogenemia (figura 1), exacerbando o aumento da produção de androgênios nas células da teca provocado pelo LH (hormônio luteinizante) e inibindo a síntese hepática de SHBG (globulina carreadora de hormônios sexuais), proteína circulante que se liga a testosterona, e assim aumenta a proporção de testosterona que circula livre, em seu estado biologicamente disponível (Ehrmann, 2005).

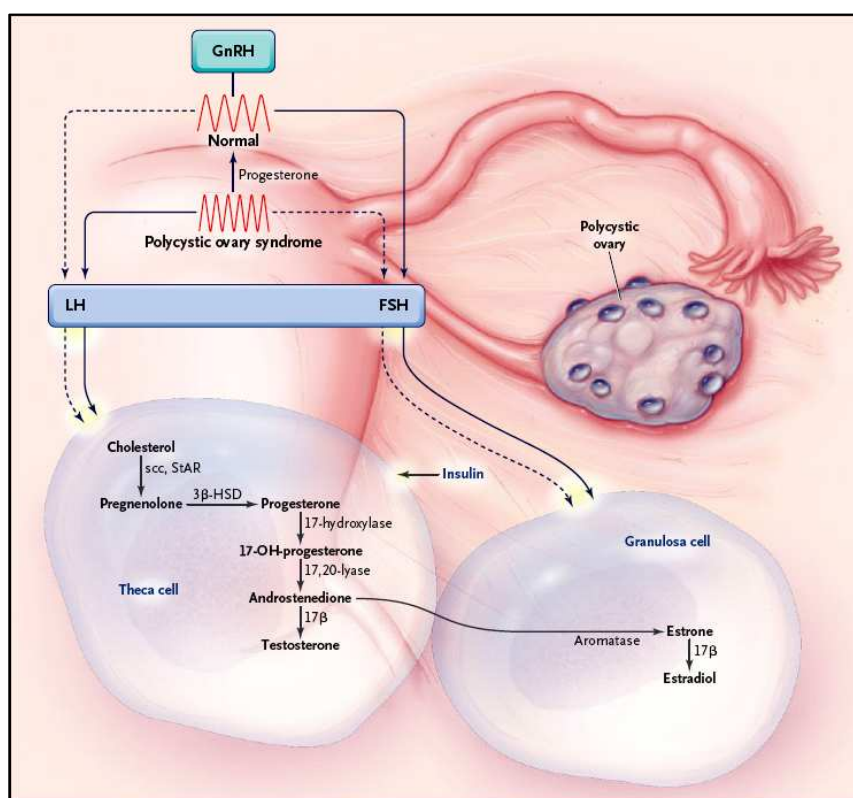


Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e o papel da Insulina (Ehrmann, 2005).

A redução de peso em pacientes com PCOS tem sido vigorosamente recomendada (Hoeger, 2001), pois leva à melhora do perfil clínico (Kiddy et al., 1992), diminuição da gordura abdominal, hiperandrogenismo (Gambineri et al., 2002), RI, perfil lipídico, regularização do ciclo menstrual e melhora da fertilidade (Huber-Buchholz et al., 1999).

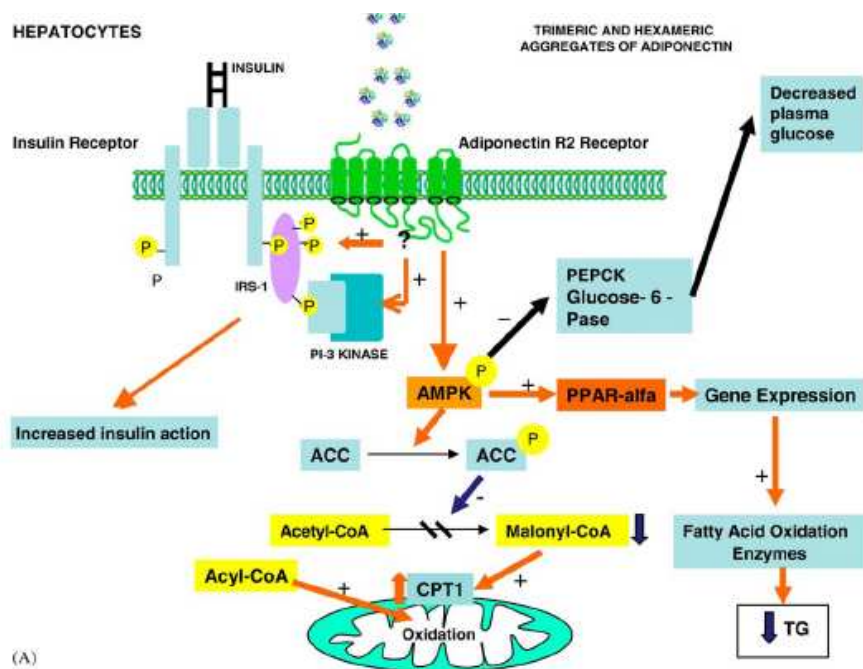
Desde a descoberta da leptina o tecido adiposo passou a ser conhecido, não somente como uma reserva inerte de triglicerídeos, mas principalmente como um órgão endócrino ativo, que secreta uma variedade de proteínas (adipocinas) que influenciam notavelmente no metabolismo corporal e afetam a homeostase de energia e glicose, tendo um papel importante na síndrome metabólica (Matsuzawa et al., 2002; Wolf, 2003) e sensibilidade à insulina (Ahima and Flier, 2000; Vernon et al., 2001; Wolf, 2003).

A participação destas adipocinas no mecanismo de RI tem sido investigada nos últimos anos, estando a Adiponectina entre as que vêm sendo mais estudadas (Fruebis et al., 2001; Vasseur et al., 2002; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2001), identificada primeiramente em 1995 por Scherer et al (Scherer et al., 1995), tendo sido nomeada como ACRP30 (*adipocyte complement-related protein of 30 kDa*) (Scherer et al., 1995), adipoQ (Hu et al., 1996), APM1 (*adipose most abundant gene transcript 1*) (Maeda et al., 1996), e GBP28 (*gelatin binding protein of 28 kDa*) (Nakano et al., 1996). É uma proteína de 244 aminoácidos, com peso molecular de 30 kDa (Wong et al., 2004), constituída em sua porção N-terminal por um domínio semelhante ao colágeno, e um domínio globular na porção C-terminal. Encontra-se em abundância no tecido adiposo e sua concentração plasmática corresponde a 0,01% do total de proteínas plasmáticas humanas (Arita et al., 1999), sendo dependente do sexo, ou seja, é maior nas mulheres (Nishizawa et al., 2002). Ao contrário das outras adipocinas, sua concentração está diminuída na obesidade (Arita et al., 1999), DM2 (Despres, 1998; Hotta et al., 2000), DCV (Despres, 1998) e RI (Hotta et al., 2000), sendo aumentada pela restrição calórica (Arita et al., 1999; Maeda et al., 2001; Yang et al., 2001).

Em modelos animais de obesidade e diabetes, a administração da adiponectina leva a perda de peso e melhora a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (Berg et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001).

Embora tenha havido um avanço na compreensão do papel fisiológico da adiponectina, seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Existem 2 receptores para a adiponectina: AdipoR1 o qual é encontrado preferencialmente no músculo esquelético; e AdipoR2, que está presente predominantemente no fígado (Saltiel and Kahn, 2001). A Figura 2 mostra como a adiponectina leva ao aumento da sensibilidade à insulina nas células do fígado (A) e músculo (B) (Gil-Campos et al., 2004). Esta proteína possui atividade redutora sobre ácidos graxos livres (AGL) e TG no músculo e no fígado (Fruebis et

al., 2001; Wong et al., 2004) devido ao aumento da expressão dos genes envolvidos com a β -oxidação e a dissipação de energia. No músculo esquelético, a adiponectina aumenta a ativação das proteínas sinalizadoras estimuladas pela insulina, através da fosforilação (Yamauchi et al., 2001). Além disso, a adiponectina aumenta a captação de glicose, a produção de lactato, e a oxidação dos ácidos graxos (AGs) em miócitos devido a estimulação de uma proteína-quinase ativada pelo 5'-AMP. Também aumenta a fosforilação da acetil-CoA carboxilase e reduz o número de moléculas envolvidas na gliconeogênese no fígado (Wong et al., 2004; Yamauchi et al., 2002). Em conjunto, esses efeitos biológicos são importantes para explicar o aumento da sensibilidade à insulina induzido pela adiponectina.



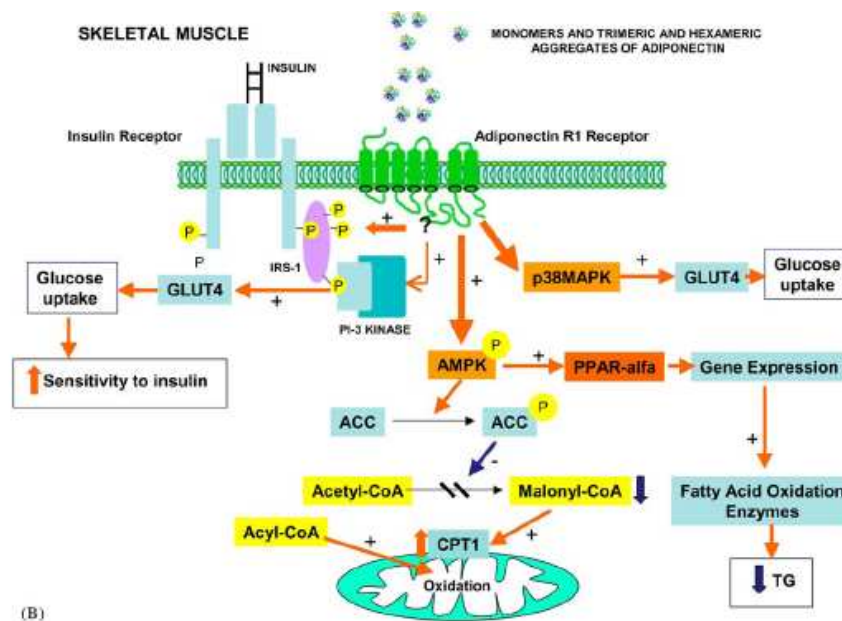


Figura 2. Modelo do mecanismo de ação da adiponectina no fígado (A) e músculo (B). ACC: AcetilCoa Carboxilase; AMPK: Kinase dependente de AMP; CPT1: Carnitina palmitoil transferase 1; Glucose-6-Pase: Glicose 6 fosfatase; GLUT4: Transportador de glicose 4; IRS-1: Substrato receptor de insulina 1; PI-3 Kinase: fosfatidil inositol 3 kinase; p38MAPK: Proteína kinase ativada por mitogênio; PEPCCK: Fosfoenol piruvato carboxilase; PPAR: Receptor ativado por proliferador de peroxissomo; TG: Triglicerídeos (Gil-Campos et al., 2004).

A obesidade é caracterizada por uma combinação de hipertrofia aumentada dos adipócitos e a uma, menos importante, hiperplasia destas células. As células hipertróficas secretam mais leptina e menos adiponectina, sendo que a relação leptina/adiponectina (LAR) tem sido proposta como um potencial marcador de RI e risco vascular (Finucane et al., 2009). Na obesidade, o predomínio de células hipertrofiadas reduz o fluxo sanguíneo, o que pode levar a hipóxia tecidual, a inflamação e a infiltração de macrófagos. Adipócitos hipertrofiados são produtores importantes de citocinas pró-inflamatórias, mas ao mesmo tempo, a hipertrofia provoca diminuição de síntese e liberação da adiponectina (adipocina anti-inflamatória) por estas células (Goossens, 2008).

A hipoadiponectinemia tem sido associada com a incidência de morte cardiovascular (Hotta et al., 2000; Panidis et al., 2004; Zoccali et al., 2002), e os níveis elevados desta proteína têm um efeito inibitório sobre a resposta inflamatória endotelial (Wong et al., 2004; Yang et al., 2001). Além de possuir anti-inflamatória e anti-aterogênica, a adiponectina possui outros efeitos benéficos ao metabolismo (Yang et al., 2001).

Pouco se sabe sobre as diferenças étnicas das populações em relação a presença ou ausência dos polimorfismos do gene da adiponectina. Em mulheres japonesas a concentração de adiponectina foi negativamente correlacionada ao índice de massa corporal

(IMC), às pressões sistólica e diastólica, à glicemia de jejum, à insulinemia, à RI, e à concentração plasmática de colesterol total, LDLc e TG e de ácido úrico. Também foi positivamente correlacionada à concentração de HDL-colesterol (Yamamoto et al., 2002). Devido a seus efeitos no metabolismo, a variabilidade genética na adiponectina pode ser um determinante da RI (Menzaghi et al., 2002), conforme trabalho com indivíduos caucasianos não diabéticos.

Considerando a alta prevalência de resistência insulínica em pacientes com PCOS e comorbidades associadas (Ehrmann, 2005), há grande interesse em estudos que avaliem sua influência nos mecanismos fisiopatológicos da síndrome (Carmina et al., 2005). Entre estes estudos, a análise da associação de variantes genéticas da adiponectina com as alterações metabólicas na PCOS parece relevante.

O gene da adiponectina está localizado na região cromossômica 3q27 (figura 3) e é composto por 3 éxons e 2 íntrons com 16kb (kilobases). Esta região contém genes responsáveis pela susceptibilidade à insulina, risco de obesidade, DM2 e altos níveis de LDL colesterol (Hara et al., 2002; Stumvoll et al., 2002; Ukkola et al., 2003; Yang et al., 2003).

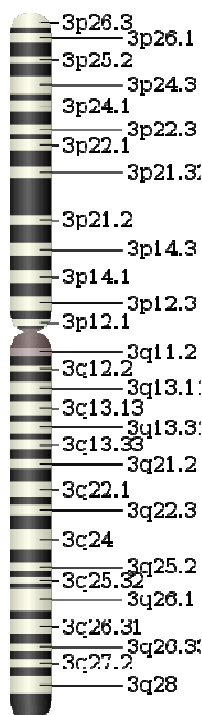


Figura 3. Cromossomo 3. O gene da adiponectina está localizado na região 3q27, lócus indicado por conter genes relacionados com o aumento da susceptibilidade à insulina, obesidade e DM.

As alterações do gene da adiponectina podem modular a sensibilidade à insulina por diferentes mecanismos, por isso, achamos interessante investigar o papel destas variações genéticas na fisiopatologia da PCOS.

No presente trabalho, investigamos se os SNPs T45G e G276T, localizados respectivamente no éxon 2 e intron 2, e os SNPs da região promotora C11377G e G11391A do gene da adiponectina, estariam envolvidos com a susceptibilidade à PCOS, já que os polimorfismos deste gene parecem modular a expressão e/ou função da adiponectina, afetando a sensibilidade à insulina.

Em relação aos SNPs localizados no éxon e íntron 2, ambos parecem estar associados com a RI na PCOS e influenciar a produção dos níveis de adiponectina (Xita et al., 2005). O SNP T45G em mulheres com PCOS está associado com maior índice HOMA, níveis de glicose e insulina de jejum (Demirci et al., 2010; Yoshihara et al., 2009) e RI (Demirci et al., 2010). Os genótipos GG ou GT na posição G276T estão relacionados com maior IMC e maior área sob a curva para insulina, e menores níveis de adiponectina do que aqueles com genótipo TT (Xita et al., 2005; Xita et al., 2004; Zhang et al., 2008), além de níveis aumentados de insulina de jejum, HOMA, e área sob a curva para glicose, e diminuição da concentração de glicose e relação glicose/insulina (Zhang et al., 2008).

Em indivíduos japoneses sem diabetes ambos os SNPs T45G e G276T foram associados com diminuição da concentração de adiponectina plasmática, RI e aumento do risco de DM2 (Hara et al., 2002), bem como obesidade em indivíduos caucasianos americanos (Menzaghi et al., 2002), alemães (Stumvoll et al., 2002) e taiwaneses (Yang et al., 2003) normoglicêmicos.

Os polimorfismos T45G e G276T do gene da adiponectina têm sido bastante estudados nos últimos anos, inclusive em pacientes com PCOS. No entanto, estudos prévios com os SNPs C11377G e G11391A, localizados na região promotora do gene da adiponectina, além de serem escassos, mostraram discrepâncias nos dados encontrados, que diferem de acordo com o tipo de estudo e a etnia das populações (Chung et al., 2009). Os estudos existentes até hoje mostram resultados conflitantes em relação a associação destes polimorfismos e suas características (Vozarova de Courten et al., 2005).

Após ampla revisão da literatura, apenas um estudo foi encontrado, que tenha investigado a associação do SNP C11377G da região promotora com a PCOS (Baba et al., 2009), não havendo estudos com pacientes com o SNP G11391A e a síndrome.

Ambos os SNPs da região promotora têm sido relacionados com à obesidade e doenças associadas. Dados da literatura mostram a associação dos SNPs C11377G e G11391A com a RI em uma população de crianças italianas com sobrepeso e obesas (Petroni et al., 2006), com diminuição da concentração de adiponectina circulante e aumento do risco de DM2 em franceses caucasianos (Vasseur et al., 2005) e com níveis aumentados de glicose e IMC e níveis diminuídos de adiponectina plasmática em indivíduos suecos caucasianos (Gu et al., 2004).

Outros estudos também encontraram forte associação dos SNPs 11377C/G e 11391G/A com níveis diminuídos de adiponectina (Bouatia-Naji et al., 2006; Hoefle et al., 2007; Pollin et al., 2005; Vasseur et al., 2002; Vasseur et al., 2005), estando o SNP 11377C/G associado com a presença de aterosclerose coronariana, sendo um fator preditivo de risco vascular em homens submetidos à angiografia coronária (Hoefle et al., 2007).

A localização dos SNPs do gene da adiponectina está mostrada na Figura 4, juntamente com os SNPs de interesse (G11391A, C11377G, T45G, G276T).

Considerando que são escassas as informações sobre a presença dos polimorfismos do gene da adiponectina em mulheres brasileiras com PCOS, bem como, pouco se sabe em relação às diferenças existentes entre as diversas populações quanto à associação entre polimorfismos do gene da adiponectina e o fenótipo de pacientes com PCOS, julgou-se relevante estudar uma amostra da população do sul do Brasil com a síndrome. A hipótese para o estudo é de que os SNPs do gene da adiponectina em mulheres com PCOS podem estar associados com RI, pior perfil clínico e metabólico, e presença de síndrome metabólica e fatores de risco para doenças cardiovasculares. Os resultados deste trabalho estão mostrados no estudo 1.

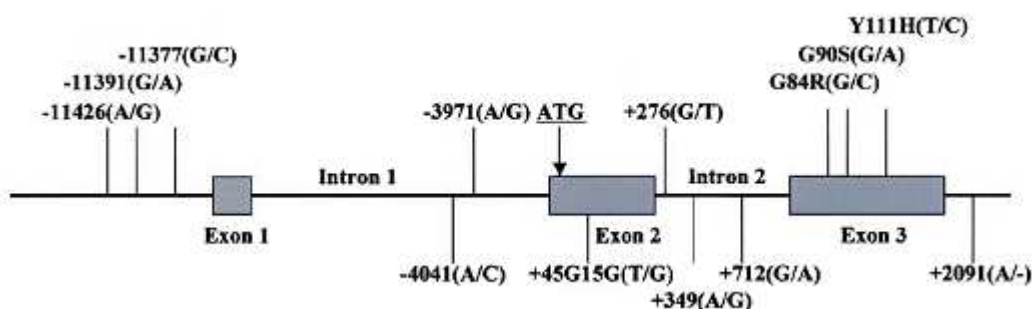


Figura 4. Localização dos SNPs no gene humano da adiponectina (Gu et al., 2004).

Como mencionado anteriormente, a PCOS é uma condição clínica bastante heterogênea e sua etiologia ainda não está esclarecida, embora evidências sugiram que seja uma doença ovariana geneticamente determinada, na qual a exposição precoce ao excesso de androgênios pode levar ao desenvolvimento de PCOS na vida adulta (Crosignani and Nicolosi, 2001; Franks et al., 2006).

A descoberta de um modelo animal de PCOS poderia ajudar a elucidar as causas da doença, já que, devido à heterogeneidade da síndrome, ainda não existe um único modelo animal que expresse todas as suas principais características. Os modelos de PCOS existentes incluem ratas expostas à testosterona (Beloosesky et al., 2004) ou ao letrozole inibidor da aromatase (Kafali et al., 2004; Manneras et al., 2007), que levam a formação de cistos ovarianos e ao desenvolvimento de características endócrinas similares à PCOS humana. No entanto, estes modelos não apresentam todas as alterações metabólicas (deposição de gordura abdominal e RI) presentes na síndrome.

Por isso, investigamos os camundongos obesos Neo-Zelandeses (NZO mouse), como um possível modelo de PCOS. A origem destes camundongos teve início por volta de 1930, quando uma colônia mista original de camundongos foi criada e mantida em Londres. Em 1940 esta colônia foi levada para a Nova Zelândia onde os animais da mesma raça foram cruzados de acordo com a cor da sua pelagem. A procriação contínua levou ao surgimento de camundongos obesos, e baseando-se neste fenótipo, uma nova raça de camundongos foi desenvolvida, os NZO/B1 (Fam and Andrikopoulos, 2006).

Os camundongos obesos Neo-Zelandeses são um modelo poligênico de obesidade, RI e hiperinsulinemia (Fam et al., 2007; Veroni et al., 1991) apresentando características representativas destas doenças (Thorburn et al., 2000). Existem também evidências de que os camundongos apresentem defeitos adicionais que são característicos da síndrome metabólica humana, como dislipidemia, hipercolesterolemia e hipertensão (Ortlepp et al., 2000). Ao contrário de outros modelos animais de obesidade e intolerância à glicose, como ratos *ob/ob* e *db/db*, os quais apresentam mutação em um único gene, a síndrome nos camundongos NZO parece ser o resultado de alterações em múltiplos genes (Fam and Andrikopoulos, 2006).

Os primeiros estudos com estes animais observaram a baixa fertilidade da espécie, tanto que havia a preocupação de que esta linhagem poderia ser extinta. De 161 fêmeas de camundongos NZO cruzadas com 8 semanas, 94% produziram ninhadas (Bielschowsky et al., 1956). No entanto, somente 32% destas fêmeas tiveram sua segunda ninhada com 19-

25 dias após a primeira, o que é um percentual extremamente baixo, se comparado às fêmeas de camundongos controle, cujo percentual é de 90% para o mesmo intervalo de tempo (Bielschowsky et al., 1956).

Por isso, acreditamos que os camundongos NZO podem ser um excelente modelo para o estudo da obesidade humana e doenças associadas. Neste sentido, parece pertinente investigar as fêmeas de camundongos NZO como um modelo promissor de PCOS, através da investigação dos níveis hormonais e avaliação das estruturas ovarianas destes animais, a fim de comparar os achados em roedores, com àqueles encontrados em mulheres com PCOS. Os resultados deste trabalho estão mostrados no estudo 2.

2 ESTUDO 1

Polimorfismos do gene da adiponectina e variáveis clínicas, metabólicas e hormonais em mulheres com ou sem a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

▶ Verificar se os SNPs do gene da adiponectina (T45G, G276T, C11377G e G11391A) estão associados com modificações na composição corporal, presença de fatores de risco e comorbidades relacionadas à obesidade, bem como perfil hormonal e metabólico, em mulheres com PCOS e controles;

2.1.2 Objetivos Específicos

▶ Determinar se há associação na frequência de polimorfismos dos genes da adiponectina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos em relação a controles;

▶ Verificar se a presença de polimorfismos do gene estudado tem associação com variáveis clínicas, hormonais e metabólicas, e com a síndrome metabólica ou seus componentes isolados.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Delineamento do estudo

Este é um estudo caso-controle com mulheres com PCOS e Controles da região sul do Brasil.

2.2.2 Pacientes

Grupo com PCOS:

As pacientes foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios diagnósticos para PCOS (Azziz, 2006; Azziz et al., 2006): 1) oligo ou amenorréia; 2) níveis elevados de androgênios circulantes e/ou manifestações clínicas de excesso de androgênios; 3) Ovários policísticos; exclusão de outras causas de anovulação e hiperandrogenismo (Rotterdam, 2004).

Critérios de inclusão: mulheres com qualquer valor de IMC, idade entre 14 e 35 anos, com presença de hirsutismo, ciclos menstruais irregulares e/ou anovulatórios, função renal e hepática normal; sem uso de medicação hormonal ou outras que interfiram com as dosagens hormonais e metabólicas nos últimos 3 meses.

Critérios de exclusão: tumores produtores de androgênios, hiperplasia adrenal congênita forma não clássica (HAC-NC), hiperprolactinemia, disfunção da tireóide, gestação, diabetes melito (Spritzer et al., 2000; Spritzer et al., 2001).

Grupo controle:

Mulheres com ciclos menstruais regulares (> 10 ciclos/ano) e ovulatórios; níveis de androgênios normais e sem manifestações clínicas de hiperandrogenismo; idade entre 14 e 35 anos; função renal e hepática normal; sem uso de medicação hormonal ou outras que interfiram com as dosagens hormonais e metabólicas nos últimos 3 meses.

A figura 5 mostra como foi realizada a seleção de pacientes com PCOS e Controles.

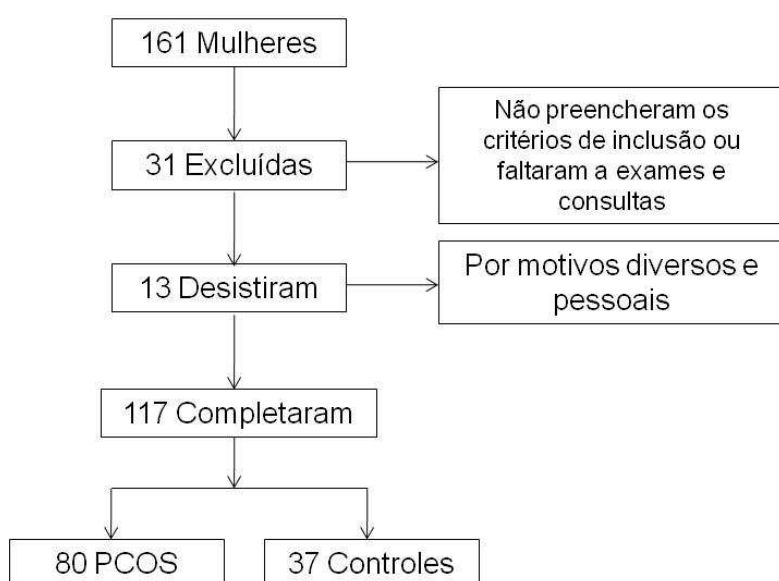


Figura 5. Seleção de Pacientes com PCOS e Controles.

2.2.3 Avaliação clínica, antropométrica, hormonal e metabólica

A avaliação clínica de mulheres com PCOS e controles foi realizada pela equipe médica da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do HCPA conforme protocolo padrão, descrito previamente (Nacul et al., 2007; Spritzer et al., 2000; Spritzer et al., 2001; Toscani et al., 2007; Wiltgen et al., 2009), que inclui a realização de anamnese e exame físico, ecografia ovariana, história e evolução do hirsutismo (para as que forem hirsutas), dos ciclos menstruais, história de infertilidade, método contraceptivo, medida de pressão arterial, presença de comorbidades como diabetes, dislipidemia e hipertensão.

O hirsutismo foi avaliado através do escore semi-quantitativo de Ferriman e Gallwey, o qual pontua determinadas áreas do corpo conforme a quantidade de pêlos (Ferriman and Gallwey, 1961).

A pressão arterial foi medida após um repouso de 10 minutos, com a paciente na posição supina (Wiltgen et al., 2009).

As medidas antropométricas foram realizadas por nutricionistas treinadas, incluindo a autora, conforme descrito abaixo:

▶ **Peso corporal:** medido em quilograma (kg) utilizando-se balança antropométrica eletrônica Filizola com escala de 100 gramas, com capacidade para 150 kg. As pacientes foram pesadas descalças e com roupas leves.

▶ **Altura:** medida em metros (m), verificada no estadiômetro fixo na parede. A paciente estava descalça, de costas para o estadiômetro, com os calcanhares juntos, em posição ereta, olhando para frente e com os braços estendidos ao longo do corpo.

▶ **IMC (índice de massa corporal):** calculado dividindo-se o peso (kg) pela altura (m) elevada ao quadrado (WHO, 1995).

▶ **Circunferência da cintura (CC):** medida com fita métrica inextensível, com a paciente em posição ortostática e com o abdômen relaxado, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca em um plano perpendicular ao eixo longitudinal corporal, com o indivíduo de pé, com ambos os braços suspensos ao lado do corpo (Donato et al., 2006; Toscani et al., 2007; Wiltgen et al., 2009).

▶ **Circunferência do quadril:** medida com fita métrica inextensível, no nível da protusão mais proeminente das nádegas (WHO, 1995).

▶ **Relação Cintura/quadril (RCQ):** Relação que avalia o tipo de distribuição de gordura, calculado através da divisão da circunferência da cintura pela circunferência do quadril, sendo considerada indicativa de obesidade abdominal, uma relação acima de 0,85 (WHO, 1995) para mulheres.

Todas as pacientes realizaram a coleta de sangue para dosagens bioquímicas (colesterol total, HDL-c e TG) e hormonais (glicemia de jejum, insulina de jejum, testosterona total, SHBG e LH) e foram submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) com 75 g de glicose oral e dosagens seriadas de insulina e glicose (nos tempos 0`, 30`, 60`, 90, e 120`). As

coletas de sangue foram realizadas entre 8 e 10h, após jejum noturno de 12 horas, em fase folicular (entre o 1º e 10º dias do ciclo) nas pacientes que ciclam e em qualquer dia naquelas com oligo- ou amenorreia. Os critérios utilizados para o diagnóstico de DM foram os seguintes: (1) glicose de jejum ≥ 126 mg/dl (7 mmol/L); ou (2) glicemia de 2 horas ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L); ou (3) sintomas de hiperglicemia e uma glicemia casual ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L), ou seja, níveis plasmáticos de glicose ≥ 200 mg/dl a qualquer hora do dia indiferente ao horário da última refeição. Os sintomas clássicos para hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada (ADA, 2009).

Os critérios utilizados para a classificação da SM foram, a presença de pelo menos 3, dos 5 parâmetros seguintes: circunferência abdominal elevada (>88 cm para mulheres), aumento de triglicérides (≥ 150 mg/dL), níveis diminuídos de HDL-c (<50 mg/dL para mulheres), glicemia de jejum elevada (≥ 110 mg/dL) ou presença de diabetes, e aumento da pressão arterial (PA sistólica ≥ 130 mmHg e/ou PA diastólica ≥ 85 mmHg, ou uso de anti-hipertensivos) (NCEP, 2001).

Os valores de referência para cada hormônio estão descritos na tabela 1, embora nem todos os hormônios listados nesta tabela estejam mostrados nos resultados, já que alguns deles foram utilizados apenas para confirmação de presença ou ausência de alterações endócrinas, de acordo com os critérios de inclusão e/ou exclusão, utilizados para a seleção de pacientes.

A ausência de tumores produtores de androgênios e hiperplasia adrenal forma não clássica foi confirmada por exames de imagem e pelo teste de ACTH curto (dosagem de 17HP e cortisol nos tempos 0' e 60'), a hiperprolactinemia foi verificada pela dosagem de prolactina plasmática nos tempos 0' e 20', disfunções da tireóide foram avaliadas através das dosagens de TSH (hormônio tireotrófico) e TPO (anticorpo tireoperoxidase).'

Tabela 1. Valores de referência hormonais.

Exame	Metodologia	Valores de referência*
Estradiol (pg/mL)	Eletroquimioluminescência	Fase folicular: 12,5–16,6; Pico ovulatório: 85,8–498,0; Fase lútea: 43,8–211,0; Menopausa: <5,0–54,7
Progesterona (ng/mL)	Eletroquimioluminescência	Fase folicular: 0,2–1,5; Pico ovulatório: 0,8–3,0; Fase lútea: 1,7–27,0; Menopausa: 0,1–0,8
Glicose (mg/dL)	Enzimático colorimétrico - oxidase	70 - 110
Testosterona total (ng/mL)		Fase folicular e lútea: 0,2–0,8; Pós-menopausa: 0,08-0,35; Pré-púbere: 0,1–0,2
Insulina (µUI/mL)	Eletroquimioluminescência	2,6–24,9
Prolactina (ng/mL)	Eletroquimioluminescência	6,0–29,9; se >30,0 realiza-se precipitação por PEG para análise de macroprolactina
LH (µUI/mL)	Eletroquimioluminescência	Fase folicular: 2,4–12,6; Pico ovulatório: 14,0–95,6; Fase lútea: 1,0-11,4; Menopausa: 7,7-58,5
Colesterol total (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	Ótimo: <200; Limítrofe: 200–239; Alto: >240
HDL colesterol (mg/dL)	Enzimático colorimétrico homogêneo	Risco baixo: >60; Risco moderado: 35–60; Risco alto: <35
Triglicerídeos (mg/dL)	Enzimático colorimétrico	Ótimo: <150; Limítrofe: 150–200; Alto: 201–499; Muito alto: >500
SHBG (nmol/L)	Eletroquimioluminescência	26,1–110,0
FSH (mUI/mL)	Eletroquimioluminescência	Fase folicular: 3,5–12; Pico ovulatório: 4,7–21,5; Fase lútea: 1,7–7,7; Pós-menopausa: 25,8–34,8
Fibrinogênio (mg/dL)	Coagulométrico	200–400
Hemograma	Absorbância da luz/ Impedância/Citometria de fluxo	Específico para cada elemento medido
17-HP (ng/mL)	Eletroquimioluminescência	Fase folicular: 0,1–0,8; Fase lútea: 0,27–2,9; Pós-ACTH: <3,2
Cortisol (µg/dL)	Eletroquimioluminescência	6,2-19,4
TPO (UI/mL)	Eletroquimioluminescência	<34,0
TSH (µUI/mL)	Eletroquimioluminescência	0,27–4,2

* Valores fornecidos pelo Departamento de Bioquímica e Patologia do HCPA; LH: Hormônio Luteinizante; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; FSH; Hormônio folículo estimulante; 17-HP: 17 hidroxí-progesterona; TPO: Anticorpo tireoperoxidase; TSH: Hormônio tireotrófico; PEG: Polietilenoglicol.

Foram calculados, LDL-c pela fórmula $LDL = CT - [HDL + (TG/5)]$ (Friedewald et al., 1972), produto de acumulação lipídica ($LAP = \text{Circunferência da cintura (em cm)} - 58 \times TG$ (em mmol/L)) para mulheres (Kahn, 2005). O melhor ponto de corte para LAP, para definir a presença de RI é de 34.5 (sensibilidade: 84%; especificidade: 79%), segundo mostrado em análise de curva ROC em um trabalho anterior (Wiltgen et al., 2009). Para o índice de androgênios livres, a fórmula utilizada foi: $IAL = \text{testosterona (nmol/L)} \times 100 / \text{SHBG (nmol/L)}$; o índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*) foi calculado pela fórmula: $HOMA-IR = \text{glicose (mmol/L)} \times \text{insulina em jejum } (\mu\text{U/mL}) / 22.5$, e avalia a resistência insulínica de acordo com a glicemia e a insulinemia basais (Wallace et al., 2004). O ponto de corte utilizado para determinar a presença de RI é de $HOMA \geq 3,8$ (Toscani et al., 2007). A hiperandrogenemia foi considerada quando níveis de testosterona ≥ 1 ng/mL. As conversões das unidades de medida foram feitas da seguinte forma: para TG em mg/dL $\times 0,0113 = TG$ em mmol/L; Testosterona em ng/mL $\times 3,47 = \text{Testosterona em nmol/L}$; Glicose em mg/dL $\times 0,0555 = \text{Glicose em mmol/L}$.

2.2.4 Análise genotípica

Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

A extração de DNA foi realizada pela técnica de salting-out (Miller et al., 1988). As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico. Foram colhidos 4 mL de sangue venoso em ácido etileno diaminotetracético (EDTA, 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se 2 volumes de sangue em solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) com incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o botão de células brancas suspenso em 2,4 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) com 48 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 40 μL de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 0,96 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6 M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, e em seguida lavado em etanol 70% durante 5 minutos repetindo-se a operação por mais 3 vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco ao ar. Após tal

procedimento, o DNA foi re-suspenso em tampão TE (10:0,1) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0) (Miller et al., 1988).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) Convencional

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação por PCR de fragmentos de DNA contendo 2 polimorfismos do gene humano da adiponectina (GeneBank # NM 004797): SNPs T45G (rs2241766), G276T (rs1501299) localizados no éxon 2 e íntron 2, respectivamente. A reação de amplificação foi constituída por 0,2 µg de DNA genômico, 200 µmol/L de cada trifosfato de nucleosídeo e 0,5 U de Taq polimerase diluída em seu tampão fornecido pelo fabricante, em um volume final de 50 µL. Para ambos os SNPs os mesmos primers *sensi* (5-AGAAAGCAGCTCCTAGAAGT-3) e *anti-sensi* (5-GGCACCATCTACTCATCC-3) foram utilizados. As condições de amplificação para os fragmentos de 518pb foram otimizadas conforme descrito: 1) desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 2) anelamento a 56°C por 30s, 3) alongamento a 72°C por 30 segundos, repetiu-se os 3 primeiros ciclos por 25 vezes, terminando com um passo de extensão de 72°C por 5 minutos, em termociclador (TC-512 Techne Touchgene Gradient PCR Thermal Cycler). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain – Biotium, Hayward CA) e visualizados em luz ultravioleta (figura 6).

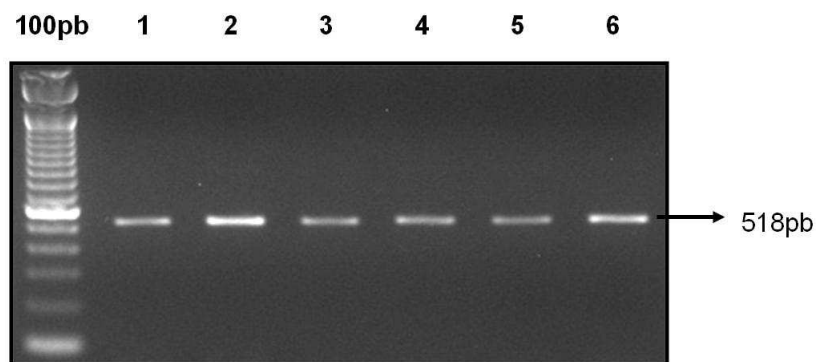


Figura 6. PCR Convencional em gel de agarose a 1,5%, onde o DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação por PCR do fragmento de DNA de 518pb, contendo os SNPs T45G e G276T do gene da adiponectina.

Análise dos polimorfismos por digestão enzimática

Os SNPs G276T e T45G foram avaliados para a presença de sítios de restrição de endonucleases, utilizadas como método de confirmação dos achados na PCR. Os fragmentos amplificados por PCR foram estudados através do programa NEBcutter que

possibilita a investigação dos sítios de restrição enzimática presentes, relacionando as endonucleases e o tamanho dos fragmentos gerados.

A presença dos polimorfismos foi avaliada em todas as pacientes conforme o seguinte protocolo: 5-10 μ L do produto de amplificação foi submetido à digestão com 1-5 U da enzima de restrição (New England Biolabs, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Dois controles de reação (CI e CII) foram incluídos no experimento para verificar a presença de fatores inespecíficos na reação capazes de gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos: CI – controle do produto de PCR, no qual não é adicionada a enzima; e CII – controle da enzima, no qual falta a adição do produto de amplificação. Ambos os controles foram submetidos às mesmas condições das amostras das pacientes. A presença do polimorfismo G276T foi avaliada por digestão enzimática (Overnight a 65°C) pela enzima BsmI (figura 7), a qual cliva o fragmento de 518pb em dois fragmentos menores de 401 e 117pb. Para o polimorfismo T45G foi utilizada a enzima Ava I (figura 8), a qual cliva o fragmento de 518p, em duas partes de 349 e 169pb (Overnight a 37°C).

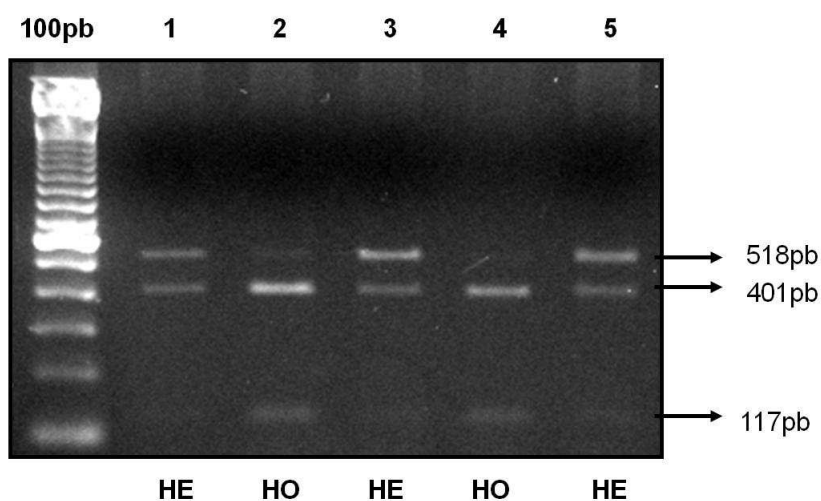


Figura 7. Gel de agarose a 2% demonstrando a digestão enzimática do SNP G276T pela enzima BsmI, a qual cliva o fragmento de 518pb em dois fragmentos menores de 401 e 117pb.

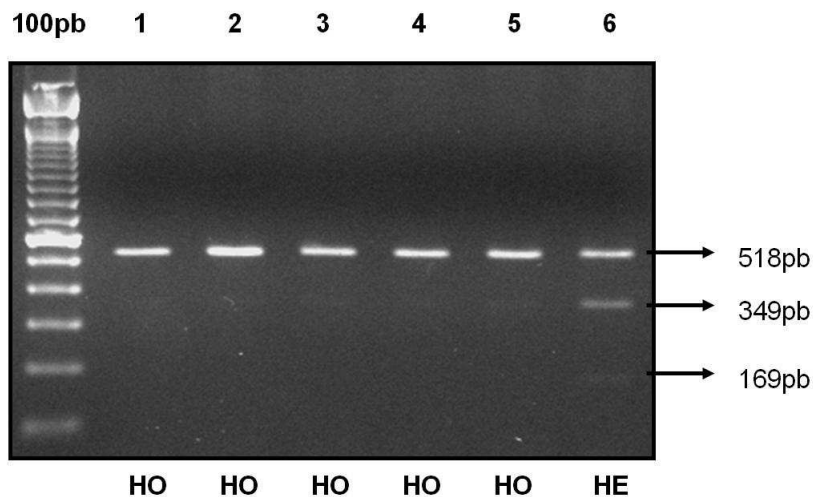


Figura 8. Gel de agarose a 2% demonstrando a digestão enzimática do SNP T45G pela enzima *Ava*I, a qual cliva o fragmento de 518pb em dois fragmentos menores de 349 e 169pb.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE e os fragmentos de DNA visualizados após coloração com GelRed™ (*Nucleic Acid Gel Stain – Biotium, Hayward CA*) em luz ultravioleta.

Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

O DNA genômico foi diluído a 2 ng/mL e genotipado por PCR em Tempo Real (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA), para os SNPs C11377G (rs266729) e G11391A (rs17300539) (região promotora), usando o ensaio de discriminação alélica com *primers* e sondas TaqMan MGB (Applied Biosystems, California, USA) (figuras 8 e 9). As seqüências dos *primers* estão listadas na tabela 2. As mesmas foram desenhadas no Programa File Builder 3.0, com base em informações dos SNPs de interesse, retiradas do banco de dados do Website de Publicações Médicas (PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências foram então desenvolvidas pelas Applied Biosystems. Os gráficos representativos obtidos para os SNPs C11377G e G11391A estão mostrados nas figuras 9 e 10.

Tabela 2. Pré-desenho para confecção de sondas dos SNPs do gene da adiponectina.

Polimorfismos	Sondas
C11377G	CTCTCATCTCAACGGCCTAATGTGACTTCTCTTGAATATTTGGACATTAGCAGGAAGCTGAGGCTTT ACATCAGATCTTTACTTTAATGGTGGACTTGACTTTACTGGTAGATTTTTAGGCTCTGTGTGGACTGTG GAGATGATATCTGGGGGGCAGGCAGACACTTGCCCTGCCTCTGTCTGAGAAAATTCTGTTTTGGATG TCTTGTGAAGTTGGTGTGCTGGCATCCTAAGCCCTTGCTGGGGTCGTANTTTAATTCATCAGAATGTGT GGCTTGCAAGAACCNGCTCAGATCCTGC[C/G]CTTCAAAAACAAAACATGAGCGTGCCAAGAAAGTCC AAGGTGTTGAATGTTGCCACTTCAAGCCTAAACTTTCTAGGAACACCTAAGTGGGTGGCAGCTTCCAG TTCTCCAGGCTGCTTCTAGGCCAGAGCTGGGTTCCACAAGAGACAGAATAGGCATATATATGCTTAAG GAACTGAAAAACAGGCTCTCTCTCTCACAAAACACACACACACACANTACCAAGGTAGCTGTCAAAA TGTTATCCGAAATTTTGAACCAAAAAATCTTGAAAGATGGTATTTCCAATATCACATTTT
G11391A	AATGGTGGACTTGACTTTACTGGTAGATTTTTAGGCTCTGTGTGGACTGTGGAGATGATATCTGGGGG GCAGGCAGACACTTGCCCTGCCTCTGTCTGAGAAAATTCTGTTTTGGATGTCTTGTGAAGTTGGTGC TGGCATCCTAAGCCCTTGCTGGGGTCGTANTTTAATTCATCAGAATGTGTGGCTTGCAGAACC[G/A]G CTCAGATCCTGCNCTTCAAAAACAAAACATGAGCGTGCCAAGAAAGTCCAAGGTGTTGAATGTTGCCAC TTCAAGCCTAAACTTTCTAGGAACACCTAAGTGGGTGGCAGCTTCCAGTTCTCCAGGCTGCTTCTAGGC CAGAGCTGGGTTCCACAAGAGACAGAATAGGCATATATATGCTTAAGGAACTGAAAAACA

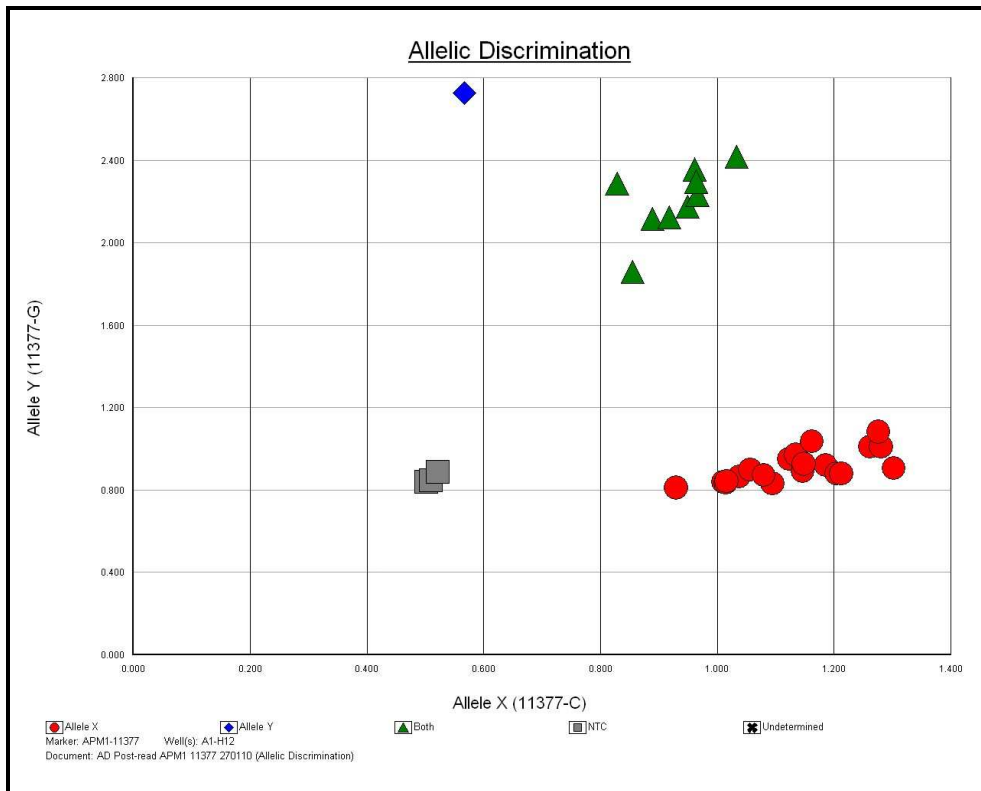


Figura 9. RT-PCR do SNP C11377G.

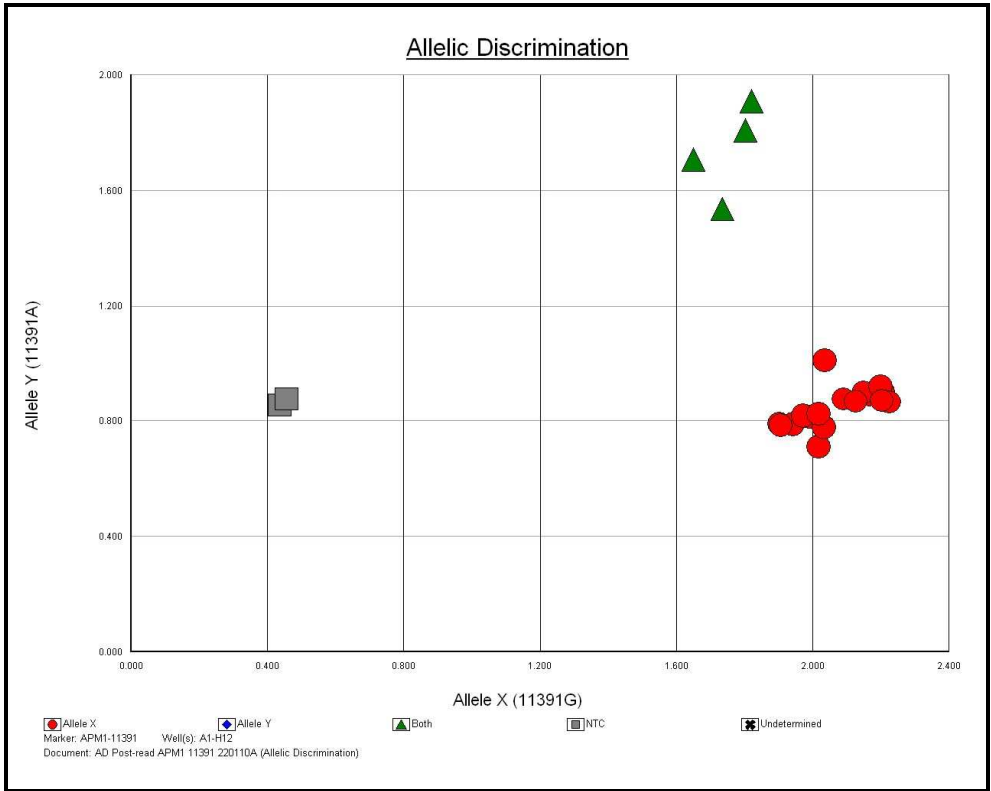


Figura 10. RT-PCR do SNP G11391A.

As figuras 11 e 12 mostram, esquematicamente, o fluxograma e a subdivisão de grupos em estudo, respectivamente.

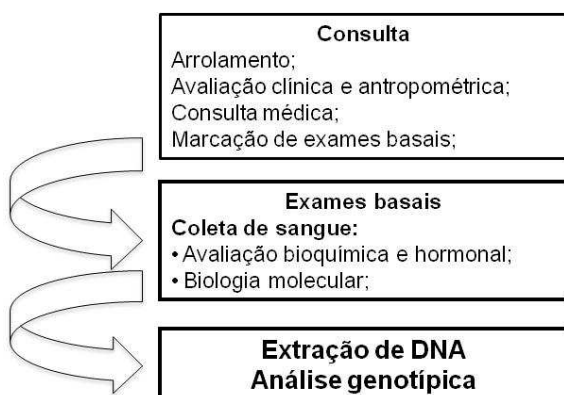


Figura 11. Fluxograma do estudo.

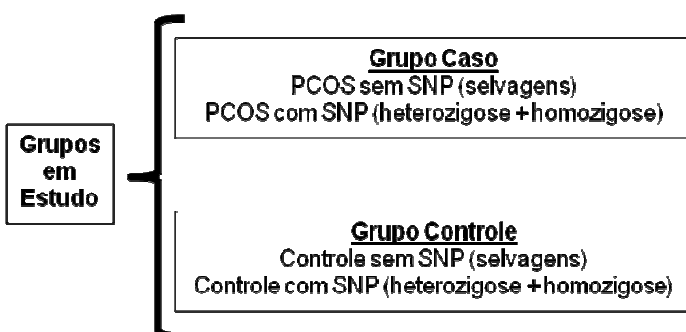


Figura 12. Subdivisão dos grupos em estudo.

2.2.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm dp ou medianas e intervalo interquartil, conforme natureza gaussiana ou não-gaussiana da variável, respectivamente. As variáveis não paramétricas foram transformadas em logaritmo e então, aplicados os testes paramétricos. Comparações entre dois grupos foram analisadas pelo teste "*t*" de Student. As freqüências genotípicas dos grupos teste e controle foram comparadas pelo teste χ^2 com correção de Yates, após ter sido verificado o Equilíbrio de Hardy Weinberg. A análise estatística foi realizada usando-se *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, IL, USA), sendo considerado como significativo um valor de $p < 0,05$.

2.2.6 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi estimado para um estudo de dietogenética em que se buscou verificar se a resposta à dieta diferia de acordo com a presença ou não dos polimorfismos da adiponectina. Este estudo está em andamento, mas os dados no momento do arrolamento, antes da prescrição da dieta são descritos na presente tese.

A análise da distribuição genotípica dos polimorfismos T45G, G276T, C11377G e G11391A do gene da adiponectina na população do sul do Brasil está sendo realizada em estudo paralelo e colaborativo com a UFPel a partir da coorte de indivíduos nascidos em 1982 na cidade de Pelotas. Estes dados, associados aos da presente tese permitirão calcular o tamanho amostral para estudo multicêntrico com pacientes com PCOS de todo o Brasil, programado para iniciar nos próximos meses.

2.2.7 Considerações Éticas

O presente projeto faz parte de um estudo mais amplo, aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde (projeto 04-364), que é reconhecida pela Comissão de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office for Human Research Protection (OHRP)/USDHHS, como *Institucional Review Board*. Foi obtido consentimento pós-informação por escrito de todas as pacientes (item 2.8) o qual incluiu, além dos procedimentos utilizados para a realização do presente trabalho, itens relacionados às demais pesquisas inclusas neste amplo trabalho, que investigam a expressão gênica de adipocinas (justificando a coleta de tecido adiposo) e a intervenção com 2 tipos de dieta (para a realização do estudo de investigação de perda de peso).

2.3 RESULTADOS

O presente estudo analisou a frequência genotípica dos SNPs G276T, T45G, C11377G e G11391A do gene da adiponectina em 80 mulheres com PCOS da região sul do Brasil e 37 controles saudáveis. As pacientes com PCOS eram mais jovens, apresentando idade média de $21,30 \pm 6,01$ anos, do que mulheres controle com idade de $29,86 \pm 5,15$ anos ($p=0,0001$). A Tabela 3 mostra o perfil clínico, antropométrico, metabólico e hormonal de mulheres com PCOS e Controles.

Conforme tabela 3, mulheres com PCOS apresentaram pressões arterial sistólica e diastólica mais elevadas do que as controles ($p=0,002$ e $p=0,028$ respectivamente), bem como maior índice Ferriman ($p=0,0001$) e relação cintura/quadril ($p=0,002$). As mulheres com a síndrome apresentaram também valores mais elevados de triglicérides, colesterol total e LDLc comparado as controle ($p=0,015$, $p=0,009$ e $p=0,005$ respectivamente). Os níveis de insulina em jejum, HOMA, testosterona e IAL foram significativamente maiores em mulheres com PCOS, e a concentração de SHBG mostrou-se significativamente reduzida em relação a pacientes sem a síndrome ($p=0,0001$).

Tabela 3. Dados clínicos, antropométricos, metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles.

Variável	PCOS (n=80)	Controles (n=37)	p
IMC (kg/m ²)	30,97 ± 7,93	29,83 ± 5,17	0,425
PA sistólica (mmHg)	124,64 ± 19,88*	115,58 ± 9,24	0,002
PA diastólica (mmHg)	79,19 ± 12,51*	73,94 ± 9,42	0,028
Escore de Ferriman	14,00 (9,00-21,00)*	2,00 (0-5,00)	0,0001
Circunferência da cintura (cm)	92,25 ± 18,81	85,79 ± 10,19	0,054
Relação cintura/quadril	0,84 ± 0,11*	0,77 ± 0,05	0,002
Triglicerídeos (mg/dL)	98,00 (65,00 – 137,00)*	67,00 (49,00-111,50)	0,015
Colesterol Total (mg/dL)	185,52 ± 45,38*	163,35 ± 31,91	0,009
HDLc (mg/dL)	50,48 ± 10,84	51,57 ± 12,48	0,650
LDLc (mg/dL)	115,41 ± 38,80*	95,01 ± 27,25	0,005
Glicose em jejum (mg/L)	88,50 ± 9,39	89,59 ± 8,02	0,394
Insulina em jejum (µUI/mL)	20,00 (13,05-35,80)*	10,32 (5,97-13,62)	0,0001
HOMA	4,24 (2,81-7,67)*	2,11 (1,29-3,13)	0,0001
Testosterona (ng/mL)	1,08 (0,86-1,45)*	0,63 (0,54-0,75)	0,0001
SHBG (mmol/L)	23,30 (12,75-41,40)*	43,60 (29,55-56,04)	0,0001
IAL	4,87 (2,68-8,94)*	1,32 (1,08-2,23)	0,0001

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste t de student); IMC: Índice de massa corporal; PA: Pressão arterial; HOMA: *Homeostasis model assessment*; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; IAL: Índice de androgênios livres; *p<0,05 significativo.

2.3.1 Resultados dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina

A frequência dos genótipos do SNP G276T para mulheres com PCOS foi de 52,6% G/G, 33,3% G/T, 14,1% T/T e para controles foi de 27% G/G, 62,2% G/T, 10,8% T/T. Para o SNP T45G a frequência dos genótipos T/T, T/G e G/G foi de 79,5%, 17,9% e 2,6%, respectivamente, em mulheres com PCOS, e de 62,2%, 37,8% e 0%, respectivamente, em controles. Conforme tabela 4, a presença de polimorfismos na posição 276 está representada pelos genótipos G/T+T/T (polimorfismo em heterozigose + em homozigose) enquanto a ausência do SNP é representada pelo genótipo selvagem G/G. Da mesma forma, para o SNP 45, considerou-se como presença de polimorfismo os genótipos T/G+G/G (polimorfismo em heterozigose + em homozigose) e o genótipo T/T (selvagem) como ausência de polimorfismo.

Tabela 4. Frequência genotípica dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina em mulheres com PCOS e controles.

Genótipos	PCOS n (%)	Controles n (%)	p
SNP G276T			
G/T+T/T	37 (47,4%)*	27 (73,0%)	p=0,010
G/G	41 (52,6%)	10 (27,0%)	
SNP T45G			
T/G+G/G	16 (20,5%)**	14 (37,8%)	p=0,048
T/T	62 (79,5%)	23 (62,2%)	

Odds ratio*: 2,992; 95% Intervalo de Confiança: 1,278-7,006); *Odds ratio*: 2,359; 95% Intervalo de Confiança: 0,996-5,586); (Qui-quadrado).

O genótipo polimórfico G/T+T/T do SNP G276T mostrou-se menos freqüente em mulheres com PCOS (p=0,010; *Odds ratio*: 2,992; 95% Intervalo de Confiança: 1,278-7,006) comparado a controles (tabela 4). Da mesma forma, o SNP T45G mostrou-se menos freqüente em PCOS em relação a controles (p=0,048). Ambos os SNPs estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os dados de perfil clínico e antropométrico ou metabólico e hormonal de mulheres com PCOS e controles, classificadas por genótipos dos SNPs G276T do gene da adiponectina, estão mostrados nas tabelas 5 e 6, respectivamente, e para o SNP T45G as variáveis estão demonstradas nas tabelas 7 e 8, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os genótipos de mulheres com PCOS e controles.

Tabela 5. Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G276T do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	G/T+T/T	G/G	p	G/T+T/T	G/G	p
n (%)	37 (47,4%)	41 (52,6%)		27 (73,0%)	10 (27,0%)	
PA sistólica (mmHg)	120,89 ± 12,62	128,86 ± 24,40	0,08	115,13 ± 10,13	116,75 ± 6,67	0,64
PA diastólica (mmHg)	78,63 ± 10,86	80,22 ± 13,89	0,60	71,54 ± 9,81*	80,20 ± 4,13	0,001
Escore de Ferriman	13,5 (9,00-20,50)	14,00 (9,50-22,75)	0,75	3,00 (0-5,00)	2,00 (0-4,25)	0,59
Idade (anos)	20,24 ± 5,75	22,17 ± 6,20	0,16	29,44 ± 4,77	31,00 ± 6,18	0,42
Peso (kg)	79,21 ± 22,36	80,99 ± 20,47	0,71	75,22 ± 13,57	83,97 ± 14,14	0,09
IMC (kg/m ²)	30,48 ± 8,11	31,35 ± 7,68	0,63	29,30 ± 5,44	31,28 ± 4,26	0,31
Circunf. Cintura (cm)	93,23 ± 16,78	92,01 ± 20,43	0,78	84,90 ± 10,79	88,2 ± 8,39	0,39
Relação C/Q	0,85 ± 0,08	0,78 ± 0,13	0,62	0,77 ± 0,05	0,76 ± 0,04	0,59

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); PA: Pressão arterial; IMC: Índice de massa corporal; Relação C/Q: Relação cintura/quadril.

Tabela 6. Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G276T do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	G/T+T/T	G/G	p	G/T+T/T	G/G	p
LAP	30,38 (20,25-44,35)	27,47 (19,04-38,05)	0,43	37,79 (18,96-41,20)	33,13 (19,11-44,14)	0,71
Triglicerídeos (mg/dL)	86,50 (65,00-130,75)	109,00 (69,00-141,00)	0,53	63,00 (45,00-110,00)	72,5 (60,75-140,75)	0,19
Colesterol Total (mg/dL)	180,67 ± 43,47	190,64 ± 48,18	0,35	158,96 ± 30,47	175,20 ± 34,29	0,17
HDLc (mg/dL)	50,36 ± 11,99	50,26 ± 10,01	0,97	51,48 ± 12,15	51,80 ± 13,99	0,95
LDLc (mg/dL)	111,91 ± 39,35	119,32 ± 39,33	0,42	92,05 ± 25,71	103,00 ± 30,92	0,28
Glicose (mg/dL)	88,30 ± 8,60	88,42 ± 10,20	0,96	90,04 ± 8,61	88,40 ± 6,41	0,59
Insulina (μUI/mL)	20,00 (11,44-36,65)	23,30 (14,35-36,20)	0,49	9,52 (5,37-13,56)	10,63 (8,31-17,73)	0,11
HOMA	4,64 (2,48-7,95)	4,25 (3,32-7,54)	0,51	1,99 (1,19-3,11)	2,46 (1,68-3,92)	0,15
Testosterona (ng/mL)	1,10 (0,88-1,51)	0,98 (0,85-1,37)	0,57	0,63 (0,52-0,76)	0,64 (0,57-0,77)	0,48
SHBG (mmol/L)	23,40 (12,35-45,60)	22,10 (13,37-39,62)	0,67	37,40 (29,60-63,10)	50,60 (24,95-55,51)	0,90
IAL	4,88 (2,47-12,03)	4,50 (2,70-7,17)	0,94	1,31 (1,04-2,05)	1,56 (1,15-2,62)	0,62
LH (μUI/mL)	8,08 (3,90-14,33)	7,88 (3,40-13,42)	0,86	6,03 (3,86-7,85)	6,20 (3,66-9,10)	0,64

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); LAP (produto de acumulação lipídica); HOMA: *Homeostasis Model Assesment*; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; IAL: Índice de androgênios livres; LH: Hormônio Luteinizante;

Tabela 7. Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP T45G do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	T/G+G/G	T/T	p	T/G+G/G	T/T	p
n (%)	37 (47,4%)	41 (52,6%)		27 (73,0%)	10 (27,0%)	
PA sistólica (mmHg)	122,73 ± 18,24	124,95 ± 20,66	0,71	112,93 ± 5,89	117,27 ± 10,63	0,12
PA diastólica (mmHg)	75,86 ± 10,16	79,88 ± 13,14	0,28	74,32 ± 6,80	73,70 ± 10,88	0,85
Escore de Ferriman	13,00 (5,00-21,25)	14,00 (11,00-20,75)	0,39	3,50 (0-5,00)	2,00 (0-5,00)	0,50
Idade (anos)	23,13 ± 6,08	20,63 ± 5,93	0,14	31,50 ± 5,47	28,87 ± 4,79	0,13
Peso (kg)	81,92 ± 16,69	79,78 ± 22,81	0,73	75,17 ± 14,83	79,05 ± 13,74	0,42
IMC (kg/m ²)	32,57 ± 6,89	30,61 ± 8,29	0,39	29,36 ± 4,94	30,12 ± 5,39	0,67
Circunf. Cintura (cm)	95,15 ± 13,60	91,45 ± 20,24	0,51	83,77 ± 9,61	87,02 ± 10,55	0,35
Relação C/Q	0,86 ± 0,07	0,83 ± 0,12	0,33	0,75 ± 0,04	0,78 ± 0,05	0,06

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); PA: Pressão arterial; IMC: Índice de massa corporal; Relação C/Q: Relação cintura/quadril.

Tabela 8. Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP T45G do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	T/G+G/G	T/T	p	T/G+G/G	T/T	p
LAP	32,48 (19,52-40,17)	28,55 (19,24-39,72)	0,40	33,05 (13,26-45,14)	37,79 (24,28-47,20)	0,44
Triglicerídeos (mg/dL)	97,50 (71,50-134,75)	92,00 (65,00-133,00)	0,84	68,50 (48,75-138,50)	67,00 (47,00-110,00)	0,79
Colesterol Total (mg/dL)	176,75 ± 50,02	187,10 ± 44,82	0,43	165,43 ± 23,95	162,09 ± 36,36	0,76
HDLc (mg/dL)	51,13 ± 10,39	50,41 ± 11,15	0,82	52,30 ± 12,08	51,13 ± 12,96	0,79
LDLc (mg/dL)	104,08 ± 42,80	117,87 ± 38,02	0,21	94,77 ± 21,63	95,16 ± 30,64	0,97
Glicose (mg/dL)	87,81 ± 11,90	88,11 ± 8,82	0,91	89,57 ± 6,83	89,61 ± 88,81	0,98
Insulina (μUI/mL)	16,50 (8,44-38,24)	23,45 (13,65-36,37)	0,37	9,11 (4,64-11,11)	10,69 (7,30-15,43)	0,21
HOMA	3,58 (1,88-8,22)	4,73 (2,98-7,74)	0,37	1,90 (0,98-2,66)	2,25 (1,41-3,17)	0,23
Testosterona (ng/mL)	1,03 (0,82-1,34)	1,10 (0,88-1,46)	0,25	0,72 (0,54-0,89)	0,61 (0,53-0,70)	0,50
SHBG (mmol/L)	30,40 (13,70-41,16)	22,10 (12,05-42,05)	0,70	50,60 (29,43-57,62)	37,40 (29,50-51,60)	0,91
IAL	3,59 (2,45-10,53)	5,06 (2,68-8,57)	0,54	1,31 (1,12-2,82)	1,34 (1,05-2,24)	0,76
LH (μUI/mL)	10,50(3,06-14,90)	7,90 (3,55-13,60)	0,62	6,77 (3,68-9,10)	5,47 (3,86-6,99)	0,26

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); LAP (produto de acumulação lipídica); HOMA: *Homeostasis Model Assesment*; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; IAL: Índice de androgênios livres; LH: Hormônio Luteinizante.

2.3.2 Resultados dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina

Para o SNP C11377G a frequência genotípica foi de 52,2% para C/C, 36,2% para C/G e 11,6% para G/G em pacientes com PCOS, e em controles foi de 64,9% para C/C, 32,4 para C/G e 2,7% para G/G. A frequência dos genótipos do SNP G11391A foi G/G 89%, G/A 9,6% e A/A 1,4% em mulheres com PCOS; e G/G 75,7%, G/A 24,3% e A/A 0% em mulheres sem a síndrome. Foram consideradas alterações polimórficas a presença de genótipos C/G+G/G para o SNP C11377G e o genótipo C/C como ausência de polimorfismo. Para o SNP G11391A considerou-se G/A+A/A a presença de polimorfismo e G/G a ausência de alteração polimórfica. Ambos os SNPs estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9. Frequência genotípica dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina em mulheres com PCOS e controles.

Genótipos	PCOS n (%)	Controles n (%)	p
SNP C11377G			
C/G+G/G	33 (47,8%)	13 (35,1%)	p=0,209
C/C	36 (52,2%)	24 (64,9%)	
SNP G11391A			
G/A+A/A	8 (11,0%)	9 (24,3%)	p=0,067
G/G	65 (89,0%)	28 (75,7%)	

Teste de Qui-quadrado.

Os SNPs da região promotora do gene da adiponectina não mostraram associação com a PCOS, no presente trabalho (tabela 9). As tabelas 10 e 11 mostram que não houve associação entre os genótipos do SNP C11377G e variáveis clínicas e antropométricas ou hormonais e metabólicas seja no grupo com PCOS seja entre as controles. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis clínicas e antropométricas ou metabólicas e hormonais entre os genótipos de mulheres com PCOS e controles, para o polimorfismo do SNP G11391A, conforme mostram as tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 10. Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP C11377G do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	C/G+G/G	C/C	p	C/G+G/G	C/C	p
n (%)	31 (50,8%)	30 (49,2%)		13 (36,1%)	23 (63,9%)	
PA sistólica (mmHg)	122,80 ± 16,47	127,63 ± 23,04	0,34	115,58 ± 9,90	115,59 ± 9,06	0,99
PA diastólica (mmHg)	81,88 ± 10,08	77,02 ± 13,97	0,13	76,03 ± 12,41	72,76 ± 7,28	0,39
Escore de Ferriman	14,00 (11,00-17,75)	13,00 (8,00-22,00)	0,95	3,00 (0-5,00)	2,00 (0-5,00)	0,56
Idade (anos)	20,45 ± 5,14	23,14 ± 6,65	0,06	28,62 ± 6,79	30,54 ± 4,01	0,36
Peso (kg)	80,45 ± 21,40	77,97 ± 19,80	0,56	79,27 ± 14,90	76,67 ± 13,87	0,59
IMC (kg/m ²)	30,85 ± 8,07	30,49 ± 7,29	0,84	29,74 ± 5,61	29,88 ± 5,04	0,94
Circunf. Cintura (cm)	92,18 ± 21,66	92,12 ± 16,44	0,99	86,42 ± 10,30	85,45 ± 10,35	0,77
Relação C/Q	0,82 ± 0,13	0,85 ± 0,09	0,22	0,78 ± 0,04	0,77 ± 0,06	0,59

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); PA: Pressão arterial; IMC: Índice de massa corporal; Relação C/Q: Relação cintura/quadril.

Tabela 11. Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP C11377G do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	C/G+G/G	C/C	p	C/G+G/G	C/C	p
LAP	27,41 (20,30-36,35)	29,53 (19,04-44,92)	0,43	37,79 (23,88-54,83)	35,94 (17,60-46,63)	0,53
Triglicerídeos (mg/dL)	109,00 (71,00-142,00)	81,00 (65,00-136,00)	0,17	63,00 (56,00-97,50)	71,50 (45,50-116,00)	0,68
Colesterol Total (mg/dL)	193,68 ± 49,51	178,37 ± 44,38	0,19	170,62 ± 34,79	159,42 ± 30,27	0,31
HDLc (mg/dL)	49,87 ± 10,85	51,06 ± 10,81	0,66	51,46 ± 14,41	51,63 ± 11,63	0,97
LDLc (mg/dL)	120,36 ± 41,43	107,71 ± 37,06	0,19	104,32 ± 26,99	89,97 ± 26,58	0,13
Glicose (mg/dL)	88,66 ± 11,94	88,66 ± 7,37	0,99	89,07 ± 8,86	89,87 ± 7,71	0,77
Insulina (μUI/mL)	26,16 (14,25-40,25)	19,21 (11,95-30,53)	0,18	10,74 (8,23-14,60)	9,11 (5,15-11,51)	0,14
HOMA	5,28 (3,17-8,27)	4,08 (2,43-7,17)	0,21	2,24 (1,83-3,34)	2,05 (1,09-3,04)	0,17
Testosterona (ng/mL)	1,10 (0,89-1,46)	1,04 (0,85-1,46)	0,98	0,63(0,57-0,71)	0,64 (0,50-0,77)	0,63
SHBG (mmol/L)	39,40 (22,01-54,88)	41,80 (26,00-62,30)	0,82	44,60 (26,03-60,30)	40,50 (32,03-56,57)	0,94
IAL	16,93 (9,32-25,80)	15,70 (8,41-33,14)	0,92	4,67 (3,75-9,27)	4,50 (3,70-7,55)	0,74
LH (μUI/mL)	8,32 (4,40-13,04)	7,05 (3,40-13,42)	0,89	5,47 (4,10-8,26)	6,05 (3,82-7,68)	0,95

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); LAP (produto de acumulação lipídica); HOMA: *Homeostasis Model Assessment*; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; IAL: Índice de androgênios livres; LH: Hormônio Luteinizante.

Tabela 12. Dados clínicos e antropométricos de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G11391A do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	G/A+A/A	G/G	p	G/A+A/A	G/G	p
n (%)	7 (11,1%)	56 (88,9%)		9 (25%)	27 (75%)	
PA sistólica (mmHg)	121,50 ± 18,10	125,28 ± 20,36	0,62	126,25 ± 11,57	115,39 ± 8,70	0,82
PA diastólica (mmHg)	76,12 ± 12,54	79,53 ± 12,41	0,47	72,88 ± 5,46	74,25 ± 10,33	0,72
Escore de Ferriman	10,00 (5,00-15,25)	14,00 (11,00-21,00)	0,11	2,00 (0-5,00)	2,50 (0-5,00)	0,99
Idade (anos)	23,75 ± 6,06	21,62 ± 5,98	0,34	30,44 ± 3,64	29,68 ± 5,59	0,71
Peso (kg)	76,16 ± 19,98	79,76 ± 20,77	0,64	72,35 ± 12,65	79,26 ± 14,32	0,20
IMC (kg/m ²)	30,44 ± 7,72	30,70 ± 7,76	0,93	28,99 ± 5,85	30,10 ± 5,02	0,58
Circunf. Cintura (cm)	91,00 ± 14,77	91,99 ± 19,22	0,89	82,94 ± 11,74	86,71 ± 9,71	0,34
Relação C/Q	0,83 ± 0,07	0,84 ± 0,11	0,88	0,76 ± 0,05	0,78 ± 0,05	0,39

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); PA: Pressão arterial; IMC: Índice de massa corporal; Relação C/Q: Relação cintura/quadril.

Tabela 13. Dados metabólicos e hormonais de mulheres com PCOS e Controles com ou sem o SNP G11391A do gene da adiponectina.

Variável/Grupo	PCOS			Controle		
	G/A+A/A	G/G	p	G/A+A/A	G/G	p
LAP	26,78 (15,36 -32,48)	28,51 (19,45-39,34)	0,81	37,77 (20,36-46,54)	36,01 (19,48-47,17)	0,92
Triglicérides (mg/dL)	76,00 (67,00-160,00)	92,00 (65,00-133,00)	0,75	57,00 (39,00-101,00)	69,00 (55,50-115,25)	0,31
Colesterol Total (mg/dL)	182,57 ± 54,66	185,92 ± 46,46	0,86	157,22 ± 28,76	165,32 ± 33,10	0,51
HDLc (mg/dL)	49,86 ± 14,21	50,60 ± 10,33	0,86	53,78 ± 15,86	50,86 ± 11,44	0,55
LDLc (mg/dL)	108,74 ± 45,17	114,32 ± 38,87	0,72	88,73 ± 25,24	97,03 ± 28,00	0,43
Glicose (mg/dL)	91,87 ± 7,38	87,85 ± 9,84	0,27	86,67 ± 7,09	90,53 ± 8,20	0,21
Insulina (μUI/mL)	15,69 (8,44-32,87)	23,30 (13,49-37,80)	0,40	9,52 (4,51-12,12)	10,44 (6,67-13,75)	0,28
HOMA	3,72 (1,87-7,28)	4,25 (2,91-7,80)	0,51	2,12 (0,93-2,73)	2,13 (1,43-3,14)	0,22
Testosterona (ng/mL)	1,34 (1,03-1,85)	1,06 (0,86-1,38)	0,62	0,60 (0,51-0,70)	0,64 (0,56-0,77)	0,45
SHBG (mmol/L)	16,60 (12,52-51,63)	22,70 (12,77-40,46)	0,99	37,40 (27,35-63,35)	44,10 (30,40-54,13)	0,92
IAL	22,30 (11,97-41,80)	15,70 (9,30-31,22)	0,86	4,03 (3,55-7,50)	4,67 (3,91-7,75)	0,61
LH (μUI/mL)	12,19 (4,48-14,89)	7,25 (3,40-12,31)	0,33	6,08 (3,22-8,65)	5,75 (4,04-7,90)	0,70

Valores expressos como média ± dp ou mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) (Teste *t* de *student* para comparação entre genótipos de cada grupo); LAP (produto de acumulação lipídica); HOMA: *Homeostasis Model Assessment*; SHBG: Globulina carreadora de hormônios sexuais; IAL: Índice de androgênios livres; LH: Hormônio Luteinizante.

2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, confirmou-se que mulheres com PCOS apresentaram maior frequência de RI e hiperinsulinemia (Dunaif, 1997; Ehrmann et al., 1999; Spritzer et al., 2005), obesidade (Carmina et al., 1999; Gambineri et al., 2002; Pasquali et al., 1993) e aumento da pressão arterial (Dunaif, 1997; Holte et al., 1996; Spritzer et al., 2001) do que mulheres saudáveis de mesmo IMC. Como esperado, mulheres com PCOS, independente do genótipo, apresentaram hirsutismo e níveis mais elevados de testosterona e IAL, e níveis diminuídos de SHBG, comparado com controles saudáveis (Azziz, 2006; Azziz et al., 2006; Lobo and Carmina, 2000; Norman, 2002).

2.4.1 Discussão dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina

A distribuição genotípica de ambos os polimorfismos, mas principalmente para o SNP T45G varia amplamente na literatura, portanto no presente trabalho a distribuição dos genótipos foi similar à de alguns trabalhos publicados anteriormente, e diferente de outros, conforme tabela 14.

No presente trabalho, o SNP G276T foi menos freqüente nas pacientes com PCOS, mas não houve associação entre a presença deste polimorfismo e variáveis metabólicas ou fatores de risco cardiovascular.

Uma menor freqüência do genótipo TT do SNP G276T foi observada entre mulheres gregas com sobrepeso e obesas com PCOS em relação a controles magras. Os genótipos GG ou GT foram associados com níveis diminuídos de adiponectina comparado com o

genótipo TT, independente da idade, IMC e concentração de insulina neste grupo de mulheres (Xita et al., 2005). Os genótipos GG ou GT foram também associados com IMC aumentado e área sob a curva para insulina, comparado com o genótipo TT (Xita et al., 2005).

Outro estudo observou maior frequência do alelo G do SNP G276T em mulheres chinesas com PCOS em relação a controles (Zhang et al., 2008), tendo este alelo sido associado com níveis aumentados de insulina, HOMA e área sob a curva para níveis de glicose e diminuída relação glicose / insulina na PCOS (Zhang et al., 2008). No entanto, este estudo foi realizado com mulheres chinesas, que podem diferir geneticamente das brasileiras. Menor frequência do alelo T foi observada em pacientes finlandesas caucasianas com PCOS e controles (Heinonen et al., 2005). O genótipo TT foi associado a um fraco efeito protetor contra a PCOS ($p=0,116$), comparado com genótipo GG+GT (Heinonen et al., 2005).

Outros estudos não encontraram associação dos genótipos do SNP 276 com a PCOS (San Millan et al., 2004; Xita et al., 2005; Yoshihara et al., 2009), ou com as demais variáveis estudadas (Escobar-Morreale et al., 2006; Heinonen et al., 2005; Xita et al., 2005).

Em pacientes sem PCOS, o genótipo GG do SNP 276 associou-se com o aumento de risco para DM2 e RI, comparado com o genótipo TT (Hara et al., 2002).

No que se refere ao SNP T45G, observou-se igualmente no presente trabalho uma menor frequência deste SNP em mulheres com PCOS em relação a controles. Como já referido, dados da literatura são contraditórios em relação a este polimorfismo, sendo que alguns estudos relataram uma maior frequência dos genótipos TG e GG do SNP T45G em mulheres com PCOS comparado a controles (Haap et al., 2005; Panidis et al., 2004). Em contrapartida outros trabalhos (Demirci et al., 2010; San Millan et al., 2004; Yoshihara et al., 2009) não encontraram diferença estatisticamente significativa na frequência e distribuição dos genótipos deste SNP. Um estudo verificou que níveis elevados de androstenediona se correlacionavam com a presença do SNP T45G em um subgrupo de PCOS (Panidis et al., 2004).

Em mulheres com PCOS o SNP T45G se associou com maiores níveis insulina e RI comparadas àquelas com outros genótipos (Demirci et al., 2010), enquanto que outro estudo

mostrou associação do genótipo T/G na posição 45 com hiperinsulinemia em relação às aquelas com genótipo T/T ($p < 0.05$), independente da idade e IMC (Xita et al., 2005).

Em indivíduos sem PCOS, o polimorfismo do SNP T45G foi associado com risco aumentado para DM2 (Hara et al., 2002).

Assim, os dados apresentados nesta tese mostram que as alterações metabólicas e hormonais observadas nas mulheres com PCOS não foram associadas com a presença ou não dos polimorfismos SNPs G276T e T45G, o que permanece como uma incerteza na literatura. Isso se deve, possivelmente, a diferenças étnicas nas populações estudadas e à ausência de estudos brasileiros com este enfoque.

Tabela 14. Distribuição genotípica dos SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina em mulheres com PCOS.

Estudos com SNPs G276T e T45G do gene da adiponectina em mulheres com PCOS	SNP G276T		SNP T45G	
	G/T+T/T	G/G	T/G+G/G	T/T
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Radavelli-Bagatini et al., 2010*	37 (47,4%)	41 (52,6%)	16 (20,5%)	62 (79,5%)
Zhang N et al. (Zhang et al., 2008)	64 (53,3%)	56 (46,7%)	63 (52,5%)	57 (47,5%)
Escobar-Morreale H.F et al. (Escobar-Morreale et al., 2006)	46 (60,4%)	30 (39,6%)	21 (27,6%)	55 (72,4%)
Hainonen S et al. (Heinonen et al., 2005)	66 (46,2%)	77 (53,8%)	18 (12,6%)	125 (87,4%)
Xita N et al. (Xita et al., 2005)	61 (61,0%)	39 (39,0%)	23 (23,0%)	77 (77,0%)
San Millan JL et al. (San Millan et al., 2004)	44 (61,3%)	28 (38,7%)	24 (33,3%)	48 (66,7%)
Panidis D et al. (Panidis et al., 2004)	x	x	40 (30,3%)	92 (69,7%)

* Dados não publicados;

2.4.2 Discussão dos SNPs C11377G e G11391A do gene da adiponectina

No presente trabalho não encontramos associação dos polimorfismos do promotor do gene da adiponectina com a PCOS, resultado que está de acordo com o estudo de Baba et al. que investigaram a relação entre o SNP C11377G e PCOS em 117 mulheres japonesas com a síndrome e 380 controles saudáveis com ciclos ovulatórios (Baba et al., 2009). Até o momento, este foi o único estudo publicado que analisou se havia associação entre este SNP e a PCOS.

A ausência de associação estatisticamente significativa nas variáveis clínicas e antropométricas ou metabólicas e hormonais entre os genótipos de mulheres com PCOS e

controles, observada no presente trabalho, reforça os resultados obtidos em um estudo anterior, com indivíduos caucasianos franceses da coorte de “Dados Epidemiológicos sobre a Síndrome de Resistência à Insulina” (*Epidemiologic Data on the Insulin Resistance Syndrome* ou *DESIR cohort*) (Fumeron et al., 2004). No entanto, em outro estudo de coorte de Suplementação de Vitaminas e Minerais anti-oxidantes (*Supplementation of Vitamins and Minerals Anti-oxidants (SU.VI.MAX) cohort*) também com caucasianos franceses, o SNP G11391A foi associado com maior relação cintura/quadril e circunferência da cintura (Dolley et al., 2008).

Um estudo de coorte com 1852 crianças de origem européia encontrou associação do genótipo GA+AA do SNP G11391A com maior IMC e maior prevalência de obesidade em relação ao genótipo GG (Morandi et al., 2009). Para o SNP C11377G, crianças italianas com sobrepeso e obesidade com genótipos GG e GC apresentaram níveis mais elevados de TG comparado àquelas com genótipo CC (Petrone et al., 2006). Pacientes caucasianos suecos com DM2 e tolerância diminuída à glicose com genótipos CC e CG do SNP G11377C apresentaram maior IMC do que àqueles com genótipo GG (Gu et al., 2004).

Ambos os SNPs G11391A e C11377G foram associados à RI em uma população de crianças Italianas com sobrepeso e obesas (Petrone et al., 2006). Outro trabalho com crianças de origem européia também apontou o SNP G11391A como responsável por aumentar o risco de obesidade e conseqüente RI nesta população (Morandi et al., 2009). O genótipo G/G do SNP 11391 foi associado com níveis aumentados de insulina e HOMA comparado com genótipos G/A+A/A em crianças italianas, o contrário do que mostrou o estudo com crianças européias, onde o genótipo GA+AA foi associado a níveis mais elevados de insulina de jejum e HOMA, mas esta diferença não permaneceu quando ajustada para obesidade (Morandi et al., 2009). Os genótipos GG e GC do SNP C11377G foram associados com níveis mais elevados de glicose, insulina e HOMA (Petrone et al., 2006) comparados ao genótipo C/C.

Os haplótipos dos SNPs G11391A/C11377G mostraram associação com níveis diminuídos de adiponectina e sensibilidade à insulina em crianças italianas com sobrepeso e obesidade (Morandi et al., 2009).

Um estudo de caso-controle com 585 pacientes controles sem diabetes, 278 com intolerância à glicose e 212 com DM2 revelou maior freqüência alélica do SNP C11377G em

pacientes com DM2 em relação a controles, sugerindo o envolvimento deste SNP no desenvolvimento de DM2 em indivíduos de nacionalidade chinesa (Yang et al., 2008).

Crianças italianas com sobrepeso e obesidade com genótipos GG e GC do SNP C11377G apresentaram níveis diminuídos de adiponectina comparado àquelas com genótipo CC. Já os genótipos GA+AA do SNP G11391A foram associados com níveis aumentados de adiponectina comparado aos genótipos GG nesta mesma população (Petroni et al., 2006). Na coorte de 1852 crianças de origem europeia houve associação do genótipo GA+AA do SNP G11391A com níveis mais elevados de adiponectina (Morandi et al., 2009).

Alguns estudos investigaram a relação dos SNPs da região promotora, G11391A (Goyenechea et al., 2009) e C11377G, (Chung et al., 2009) com os efeitos do tratamento com dieta. O genótipo GG do SNP G11391A mostrou associação com maior índice HOMA, níveis de insulina e TG e maior risco de desenvolvimento de RI e manifestações clínicas da SM em um estudo com 180 indivíduos espanhóis, antes da intervenção dietética. Com a dieta de baixa caloria, o aumento do risco em indivíduos GG desapareceu, mas reapareceu com 32 semanas de dieta, quando o genótipo GG foi novamente associado a comorbidades metabólicas. O risco foi ainda maior após 60 semanas de dieta. Estes dados mostram um aumento do risco de desenvolvimento de RI e SM em indivíduos obesos com genótipo GG do SNP G11391A. O risco diminuiu com a restrição calórica, mas não permaneceu. O alelo A teve um efeito protetor contra o ganho de peso e este efeito foi particularmente evidente 32-60 semanas após a intervenção dietética (Goyenechea et al., 2009).

Um estudo com 32 mulheres japonesas obesas observou maior redução da pressão sistólica e glicose de jejum naquelas com genótipo C/G ou G/G para o 11377 comparado às com genótipo C/C, durante intervenção dietética de redução calórica por 8 semanas (Tsuzaki et al., 2009).

Outro estudo randomizado cruzado com 30 homens e 29 mulheres caucasianos da Espanha, que consumiram 3 tipos de dieta, por 3 semanas (cada semana um tipo de dieta: rica em carboidratos, ácidos graxos monoinsaturados e saturados), observou que homens com genótipo CC do SNP C11377G eram menos insulino-resistentes após consumirem dieta com ácidos graxos monoinsaturados e rica em carboidratos comparado com indivíduos com dieta rica em ácidos graxos saturados (Perez-Martinez et al., 2008).

No estudo de Chung et al. não foram encontradas diferenças relacionadas aos genótipos do SNP C11377G e HOMA ou níveis de adiponectina em indivíduos com tolerância diminuída á glicose e DM2, em resposta à intervenção dietética (com aumento da quantidade de fibra) e caminhada, por 12 semanas (Chung et al., 2009).

Em conclusão, os dados deste primeiro estudo com mulheres com PCOS do sul do Brasil indicam que não houve associação entre os polimorfismos G11391A e C11377G e a PCOS.

No que se refere às relações entre os polimorfismos do promotor do gene da adiponectina e variáveis clínicas, antropométricas, hormonais e metabólicas, embora alguns estudos com grupos suscetíveis como indivíduos com obesidade, RI e diabete tenham mostrado associação, esta não foi observada em pacientes com PCOS. Estudos futuros com maior tamanho amostral, como o estudo multicêntrico brasileiro, já programado, poderão aprofundar as informações sobre estes polimorfismos e o fenótipo de pacientes com PCOS.

2.5 CONCLUSÕES

Os dados deste primeiro estudo permitem concluir que:

- Houve associação entre os SNPs T45G e G276T do gene da adiponectina e a PCOS, mas a presença destes polimorfismos não interferiu sobre variáveis clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais;
- Os SNPs G11391A e C11377G da região promotora do gene da adiponectina não se associaram com o diagnóstico de PCOS nem com as variáveis clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais estudadas;
- Estudos futuros como a análise de uma coorte de base populacional e estudo multicêntrico com PCOS brasileiras, entre outros, poderão aprofundar e esclarecer a real influência dos polimorfismos do gene da adiponectina sobre as alterações metabólicas e os fatores de risco cardiovascular observados com maior frequência em mulheres com PCOS.

2.6 FINANCIAMENTO

O estudo com polimorfismos do gene da adiponectina recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FIPE-HCPA e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2.7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar a frequência dos polimorfismos T45G, G276T, C11377G e G11391A do gene da adiponectina, em mulheres da coorte de nascimentos de 1982 na cidade de Pelotas e comparar com os resultados encontrados em mulheres com PCOS e controles;
- Dosar adiponectina circulante em pacientes com PCOS, controles e mulheres da coorte de 1982 e relacionar com a presença dos SNPs T45G, G276T, C11377G e G11391A do gene da adiponectina;
- Verificar se a presença dos polimorfismos do gene da adiponectina T45G, G276T, C11377G e G11391A influencia a redução de peso em mulheres com PCOS e controles após intervenção com dieta hipocalórica.

2.8 TERMO DE CONSENTIMENTO

Unidade de Endocrinologia Ginecológica - Serviço de Endocrinologia

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Termo de consentimento para participação no estudo sobre alterações em genes e em hormônios do tecido adiposo, relacionados com resistência insulínica em mulheres com sobrepeso e obesas, com e sem a Síndrome dos Ovários Policísticos.

Este ambulatório está pesquisando se genes relacionados com alterações da glicose, insulina, lipídeos e androgênios podem influenciar na resposta ao tratamento em mulheres com peso superior ao desejável, na presença ou não da Síndrome dos Ovários Policísticos. Também pretendemos estudar os níveis e função dos hormônios produzidos pela gordura (tecido adiposo). Todas as participantes incluídas na pesquisa serão avaliadas pela equipe médica e coletarão sangue para exames laboratoriais antes e durante o tratamento. Esta avaliação faz parte da rotina de atendimento de casos como o seu. Além disso, uma pequena fração da amostra de sangue será utilizada no laboratório de pesquisa para avaliação das alterações dos genes. As pacientes incluídas na pesquisa também farão ecografia pélvica que faz parte da rotina do atendimento. Após a coleta dos dados para o estudo, as pacientes receberão dieta hipocalórica com alto teor em proteínas ou alto teor em carboidratos, por um período de 2 meses. Durante a avaliação inicial ou ao final do período de dieta, uma pequena amostra de gordura (biópsia de tecido adiposo) será retirada da região em volta do umbigo. Esta amostra será utilizada no laboratório para pesquisar os hormônios produzidos pelo tecido adiposo. O procedimento será realizado em ambulatório, por cirurgião, e pode provocar mínima cicatriz, mancha roxa ou dor local.

Nossa equipe (médico e nutricionista) estará lhe acompanhando regularmente através de consultas ambulatoriais. Seus dados serão mantidos em sigilo e privacidade. Toda informação obtida durante este estudo será guardada e poderá ser utilizada em análise futura bem como em publicações científicas. Você não será identificada em nenhuma publicação ou apresentação dos resultados deste estudo. Caso você queira, por qualquer razão, você poderá desistir de participar do estudo. Caso tenha qualquer dúvida ou pergunta, fique à vontade para fazê-las antes de decidir se aceita participar do nosso estudo.

Declaro que estou ciente do exposto acima e que concordo em participar do estudo.

Nome e Assinatura da Paciente: _____ Data: ___/___/___

Nome e assinatura do Pesquisador: _____ Data: ___/___/___

3 ESTUDO 2

The New Zealand Obese mouse: A model of Polycystic Ovary Syndrome with insulin resistance

Manuscrito submetido à “*Endocrinology*”
Número: EN-10-0761 Version 1

1 **THE NEW ZEALAND OBESE MOUSE: A MODEL OF POLYCYSTIC OVARIAN**
2 **SYNDROME WITH INSULIN RESISTANCE**

3
4
5 Simone Radavelli-Bagatini^{1,2}, Amy R. Blair¹, Joseph Proietto¹, Poli Mara Spritzer^{2,3}, Sofianos
6 Andrikopoulos¹

7
8
9 ¹The University of Melbourne, Department of Medicine (Austin Health/Northern Health), Heidelberg
10 Repatriation Hospital, Melbourne, Victoria, Australia

11 ²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Department of Physiology and ³Hospital de
12 Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology -
13 Porto Alegre - RS, Brasil

14
15
16
17 Abbreviated Title: NZO mouse and PCOS

18
19
20
21
22 Word Count: Text: 2,770
23 Abstract: 248

24
25
26
27
28 Key words: infertility, ovary, corpus luteum, insulin sensitivity, obesity, testosterone, estrogen

29
30
31
32
33 Disclosure Summary: The authors have no conflicts to declare

34
35
36
37 Precip: This study shows that the New Zealand Obese mouse displays increased ovarian volume and
38 increased atretic follicles, which are characteristics of PCOS.

39
40
41
42
43 Address Correspondence and Reprint Requests to:

44
45 A/Professor Sofianos Andrikopoulos, Ph.D.
46 University of Melbourne
47 Department of Medicine (AH/NH)
48 Heidelberg Repatriation Hospital
49 300 Waterdale Road
50 Heidelberg Heights Victoria 3081
51 Australia
52 Ph: +61 3 9496 2403
53 Fax: +61 3 9497 4554
54 Email: sof@unimelb.edu.au

55 **ABSTRACT**

56 Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive
57 age, affecting 5-10% of the female population. It is characterized by oligo/anovulation and
58 hyperandrogenism associated with increased ovarian volume and numerous microcysts and associated
59 with obesity and insulin resistance (IR). Here we suggest that New Zealand Obese (NZO) mice are an
60 appropriate model to study PCOS as they display similar metabolic characteristics such as obesity,
61 leptin insensitivity, glucose intolerance and IR. Importantly NZO mice are poor breeders; however the
62 mechanism for this has never been investigated. The aim of this study was to assess sex hormone
63 levels and ovarian structure in female NZO and lean C57BL/6J control mice. Twenty-five NZO and
64 twenty female control at three different ages (young, adult and aged) mice were studied. The animals
65 were weighed, an insulin tolerance test (ITT) was carried out and the blood was collected for
66 hormonal level measurement. The ovaries were removed for histological analysis. As expected, NZO
67 mice presented higher BW ($p=0.001$), increased basal plasma glucose ($p=0.007$) and insulin levels
68 ($p=0.001$), as well as insulin resistance compared with control mice. NZO mice showed an increased
69 ovarian volume, reduced numbers of corpora lutea, higher total follicles numbers ($p=0.0001$), but an
70 increased amount of atretic follicles ($p=0.03$) associated with reduced plasma luteinising hormone
71 levels and increased estradiol levels. In conclusion, NZO mice presented both the ovarian and
72 metabolic features of human PCOS suggesting that they are suitable for investigating
73 pathophysiological mechanisms linking metabolic alterations with reproductive defects.

74

75 **INTRODUCTION**

76 Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive
77 age affecting 5-10% of the female population and is the major cause of anovulatory infertility,
78 menstrual disturbances and hirsutism (1-6). In its classic form it is characterized by oligo/anovulation
79 and hyperandrogenism. The etiology of PCOS is unclear but evidence suggests that it is a genetically
80 determined ovarian disorder in which excessive androgen production early in life may provide a
81 hormonal insult that leads to PCOS in adulthood (7, 8). The characteristic morphological feature of
82 polycystic ovaries is the accumulation of numerous small antral follicles in the range of 2–8 mm in
83 diameter (9) due to an apparent failure to select a dominant follicle, resulting in an abnormal ovarian
84 endocrine environment (10).

85

86 PCOS is also closely associated with metabolic disturbances, most commonly obesity-associated
87 insulin resistance (11, 12) and compensatory hyperinsulinemia (6, 13). It is reasonable to suggest that
88 the elevated androgen levels characteristic of PCOS contribute to the increased amount of adipose
89 tissue deposition, particularly in the abdominal region in these women (14). These metabolic
90 abnormalities have implications both on reproductive function and for long-term health. Weight loss
91 and treatment with insulin sensitizing drugs (e.g. metformin) can increase the rate of reproduction (15,
92 16).

93

94 The availability of a suitable animal model would provide a useful means to study the etiology of
95 PCOS. Due to the heterogeneity of PCOS, it is difficult to create a single animal model that expresses
96 the main PCOS characteristics. Common models of PCOS include female rats exposed to testosterone
97 (17) or the aromatase inhibitor letrozole (18, 19), to cause cystic follicles and endocrine features
98 similar to human PCOS. However these induced models do not develop many of the metabolic
99 disturbances (e.g. increased plasma testosterone, abdominal fat deposition, insulin resistance) that are
100 integral to the disease process.

101

102 The New Zealand Obese (NZO) mouse is a polygenic model of obesity, insulin resistance and

103 hyperinsulinemia (20, 21). One of the earliest described characteristics of the NZO mouse is poor
104 breeding performance such that there was a real possibility that this line may be lost. Of 161 female
105 NZO mice mated at 8 weeks, 94% produced litters and 80% weaned their first litter (22). However,
106 only 32% of NZO females had their second litter within 19-25 days of their first which is strikingly
107 lower than the control mice with 90% having their second litter within the same interval (22). In light
108 of the obese, insulin resistant and poor breeding performance we were interested in investigating the
109 NZO mouse further as a possible polygenic model of PCOS. The aim of this first study was to
110 characterize the reproductive hormone levels and ovarian structure in young, adult and aged female
111 NZO and C57BL/6J control mice.

112 **METHODS**

113 **Animals**

114 New Zealand Obese (NZO) and C57BL/6J female mice were purchased at 8 weeks of age from the
115 Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (Kew, Victoria, Australia). Pups were raised with
116 their biological mother until weaning (21 days of age) and then housed 2-4 per cage under controlled
117 conditions (temperature of 21°C, humidity of 60%, and kept on an artificial lighting on a 12:12-h
118 light-dark photo-period) and allowed free access to commercial rodent chow (3% fat, 20% protein and
119 77% carbohydrate, Ridley AgriProducts, Pakenham Victoria Australia); and tap water. The study was
120 approved by Austin Health Animal Ethics Committee and all the experiments were in accordance
121 with the guidelines for the care and use of laboratory animals specified by this Committee.

122

123 **Study procedure**

124 Female NZO and C57BL/6J control mice were studied at 12, 24 and 43 weeks of age, and referred to
125 as young, adult and aged (23). The following procedures were conducted.

126

127 **Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ITT)**

128 The insulin tolerance test was performed as previously described (Lamont et al 2006). Briefly, mice
129 were injected intraperitoneally with 1.0 I.U. per kg BW of insulin; (Actrapid MC; Novo, Denmark)
130 and blood samples (~5 µl) were drawn from the tail vein for the measurement of blood glucose levels
131 on a hand held Medisense Optium glucometer at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes after the insulin
132 injection.

133

134 **Hormone Assessments**

135 Animals were anesthetized with sodium pentobarbital and blood samples were obtained by cardiac
136 puncture after a 6-h fast to assess plasma glucose, insulin, testosterone (TT), estradiol and luteinizing
137 hormone (LH) concentrations. Plasma samples were stored at -80 °C on the day of extraction and then
138 submitted for radioimmunoassay. All samples were assayed in duplicate at the Monash Institute of
139 Medical Research (MIMR), Monash University (Clayton, Victoria, Australia). Intra-assay coefficient

140 of variation (CV) for testosterone was 8.2%, 8.4% for estradiol and for LH was 12.2%. Plasma
141 glucose levels were measured using a GM7 Analox Glucose Analyzer (Helena Laboratories, Mount
142 Waverley, Victoria, Australia). Plasma insulin concentrations were determined by a commercially
143 available radioimmunoassay specific for rat insulin (Millipore, St Charles MO, USA).

144

145 **Histology**

146 Ovaries were removed, fixed in Bouin's fixative, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin.
147 Serial sections of 4 µm thickness were stained with haematoxylin-eosin and then evaluated for follicle
148 stages as described before (24) using a Olympus BX50 Phase Pol Darkfield Microscope and MCIDTM
149 Core Software.

150

151 The area of the ovary was determined with the virtual microscope and follicles were also measured
152 and counted. The ovarian follicles and corpora lutea at different stages of development and regression,
153 and the theca and granulosa cell layer were analyzed in detail.

154

155 The follicles were counted and classified as healthy or atretic (25, 26). Preantral follicles were defined
156 as follicles without any antral cavity and with two or more layers of granulosa cells. Antral follicles
157 were counted when the nucleus of the oocyte was visible (27). Follicles presenting normal theca and
158 granulosa cell layers but devoid of an oocyte were considered healthy antral follicles due the
159 limitations histology that does not always allow its visualization. In this study the term "healthy"
160 represented the sum of follicles (preantral, antral and other healthy follicles) presenting normal
161 granulosa and theca cell layers, not showing deformation or pyknotic cells. Atretic follicles were
162 defined as those follicles exhibiting deformation (shrinkage or collapsing) or lacking the oocyte (25,
163 27) or presenting granulosa cells with pyknotic nuclei (25). A cystic follicle was considered to be a
164 large fluid-filled cyst with an attenuated granulosa cell layer and thickened theca interna cell layer
165 (19, 25, 27). Cells facing the cyst were flat and epithelioid, and the cyst fluid invariably contained
166 macrophages (19). Type III follicles were defined as large follicular structures (25, 28) and

167 distinguished from large secondary follicles by virtue of the fact that they did not contain ova. The
168 granulosa membrane was thick and often plicate.

169

170 **Statistical Analysis**

171 Results are expressed as mean \pm SEM. Comparison between groups was evaluated by the Student t-
172 test. HOMA-IR (glucose (mmol/L) * insulin (ng/mL)/22.5) was calculated for all animals as
173 previously reported (29). The area under the curve was calculated using the trapezoidal rule. Data
174 were considered to be significant at $p \leq 0.05$.

175 **RESULTS**

176

177 **Body Weight, Plasma Glucose and Insulin Levels**

178 Female NZO and C57BL/6J control mice were studied at three ages and the basic metabolic data
179 shown in Table 1. As expected both stains of mice increased their body weights with aging, with the
180 NZO being heavier at all three time-points compared with control mice. Plasma glucose levels were
181 higher in NZO at the young and adult but not the aged time-point compared with C57BL/6J. Plasma
182 insulin levels were higher at all ages in NZO compared with C57BL/6J reflective of their insulin
183 resistant state. Consequently, HOMA-IR, an index of insulin resistance, was higher in the NZO
184 compared with C57BL/6J at all ages (Table 1).

185

186 **Insulin Tolerance Test (ITT)**

187 Figure 1A shows plasma glucose levels during an insulin tolerance test and the data depicted as area
188 under the curve (AUC) in Figure 1B. NZO mice were clearly insulin resistant compared with
189 C57BL/6J mice at all three ages tested as indicated by greater AUC for glucose following an insulin
190 bolus.

191

192 **Plasma Testosterone, Luteinizing Hormone (LH) and Estradiol Levels**

193 Plasma testosterone levels were not different between NZO and C57BL/6 mice at the young and adult
194 stages (Table 2). However, at the aged stage there was a significant difference in plasma testosterone
195 with NZO mice being significant lower than the C57BL/6J control. With age, plasma testosterone
196 levels fell in the NZO female mice, while they increased in the C57BL/6J (Table 2).

197

198 Plasma LH levels were significantly reduced in young NZO compared with young C57BL/6J mice
199 (Table 2). Age did not affect plasma LH levels in the C57BL/6J mice, while there was a significant
200 increase in the NZO between young and adult/aged mice (Table 2).

201

202 In contrast, plasma estradiol levels were higher in young NZO compared with young C57BL/6J mice,

203 while there was no difference at any other time-point (Table 2). There was a significant increase in
204 plasma estradiol levels in young compared with aged NZO mice, while this parameter was actually
205 lower in young compared with aged C57BL/6 mice (Table 2).

206

207 **Ovarian Histology**

208 Histological analysis was performed on ovaries from NZO and C57BL/6 mice at the three different
209 ages and the images presented in Figure 2. Strikingly, the NZO mice had larger ovaries particularly at
210 the young stage with the presence of antral follicles compared with young C57BL/6J. Healthy
211 follicles were more prominent in C57BL/6J ovaries, with corpora lutea evident in both strains in all
212 three ages tested. Quantification of these images was performed and the data presented in Figures 3
213 and 4.

214

215 Assessment of ovarian size confirmed the initial histological observations that NZO mice at all three
216 ages had larger ovaries compared with control C57BL/6J mice (Figure 3A). This difference persisted
217 in the young NZO compared with young C57BL/6J mice even when corrected for body weight
218 ($35,102 \pm 5,422$ vs $25,531 \pm 9360$, $n=8-9$, $P=0.019$). Interestingly, the number of corpora lutea were
219 significantly lower in young and adult NZO compared with C57BL/6J mice indicative of a decreased
220 rate of ovulation (Figure 3B). There was no difference in corpora lutea in aged mice between the two
221 strains.

222

223 The total number of follicles was higher in young and aged NZO compared with C57BL/6J mice
224 (Figure 4A). When the number of healthy and atretic (unhealthy) follicles was calculated it was clear
225 that young NZO mice had a higher number of healthy follicles (Figure 4B) but also a higher number
226 of atretic follicles (Figure 4C) compared with C57BL/6 mice. The number of healthy follicles
227 declined with age in NZO mice, while there was a significant decrease only in the aged C57BL/6
228 mice (Figure 4B). Interestingly, there was no difference in atretic follicle numbers in adult and aged
229 NZO and C57BL/6J mice (Figure 4C). When the number of healthy and atretic follicles are
230 expressed as a percentage, it is clear that young NZO mice had a higher percentage of atretic follicles

231 compared with C57BL/6J mice (Figure 4D). There was no difference in the percentage of atretic
232 follicles at the two older ages. Of note, there was a significant increase in the percent atretic follicles
233 in aged C57BL/6J mice compared with younger mice from the same strain (Figure 4D).

234

235 **DISCUSSION**

236 PCOS is a common heterogeneous endocrinological disorder characterized by hyperandrogenism,
237 oligo/anovulation and hirsutism which is associated with metabolic syndrome features of obesity and
238 insulin resistance. We assessed the suitability of the NZO mouse as a model of PCOS as it is
239 characterized by obesity, hyperinsulinemia, glucose intolerance and liver and muscle insulin
240 resistance (21). Furthermore, these mice present with additional defects that are characteristic of the
241 human metabolic syndrome including dyslipidemia, hypercholesterolemia and hypertension (30). In
242 the present study we confirmed the obese and insulin resistant state of the NZO mice by measuring
243 body weights and performing insulin tolerance tests. The metabolic features and the well-known poor
244 reproductive rate of the NZO mouse (22, 31) provided us with reason to study it further.

245

246 We showed that the NZO mice had an increased ovarian size, particularly at the young age. This is a
247 well-known morphological characteristic of women with PCOS and has been shown to correlate with
248 serum insulin and insulin resistance markers and with ovarian blood flow (32, 33). We also found a
249 significant positive correlation between plasma insulin levels and ovarian size in the mice studied in
250 our experiments ($r=0.40$, $p=0.013$). While it is certainly plausible, whether insulin is a significant
251 contributor to increased ovarian size has not been formally tested. The number of follicles was also
252 higher in the young NZO mice compared with controls and this is also a feature of PCOS in humans
253 associated with insulin resistance and serum testosterone levels (34, 35). Interestingly, while the
254 number of healthy follicles was increased, the number of atretic follicles was increased to a greater
255 degree such that the ratio of atretic to healthy follicles was higher in the young NZO compared with
256 control mice. The degree of atresia varied in NZO mice with some follicles showing nuclear pyknosis
257 in only a few periantral cells whereas others exhibited massive degeneration of the central granulosa
258 cell layers into the antrum, and degenerate cells containing pyknotic nuclei scattered throughout the
259 granulosa membrane. Dying apoptotic cells in atretic follicles can secrete soluble factors that recruit
260 macrophages (36) which appear in the follicular fluid during atresia. The macrophages can then cross
261 and disrupt the basement membrane separating the vascular granulosa membrane from the theca cell
262 layer (19) as we observed in our study. Similar changes have been shown in other animal models of

263 induced PCOS, with ovaries with atretic antral follicles, a thickened theca inner cell layer, a
264 diminished granulosa cell compartment and few fresh CL (19, 27, 37, 38) . All these histological
265 assessments are consistent with characteristics of human PCOS and suggest that the NZO mouse may
266 well be an appropriate model to use to study this heterogeneous disease.

267

268 The number of corpora lutea (CL) was decreased in young and adult NZO mice compared with
269 controls suggesting reduced ovulatory rate and explaining the poor breeding performance of this
270 strain (22). It has previously been reported that NZO mice present fewer litters than control mice and
271 regular oestrous cycle is seen only occasionally in these animals (22). Metabolic abnormalities of
272 NZO mice were first reported in 1953 (39) and the poor breeding was shown one year later (40). This
273 is supported by Lara and colleagues who found a significantly decreased number and size of the
274 corpora lutea in rats with steroid-induced PCOS compared to controls (27).

275

276 Of interest is that testosterone levels were not different between NZO and C57BL/6 mice at the young
277 and adult stages. Other models of PCOS also display normal testosterone levels (19) and
278 hyperandrogenism is not always seen in patients with PCOS (41). Furthermore LH levels were lower
279 in young NZO compared with C57BL/6 mice but no differences were seen at the older ages tested.
280 LH levels actually increased with advancing age in the obese and insulin-resistant NZO mice, in
281 agreement with previous studies in women with PCOS. Similarly, we did observe a significant
282 increase in plasma testosterone levels in aged C57BL/6 mice compared with all other groups. The
283 reason for this is not clear. While a number of studies have assessed testosterone levels at different
284 ages of male C57BL/6 mice (42-45) such information is not available for female mice. It is important
285 to state that the 2003 Rotterdam consensus criteria state that PCOS can be present and diagnosed
286 without evidence of higher testosterone or LH levels (46). In fact the previously excluded by NIH
287 definition ovarian dysfunction and PCOS without hyperandrogenism phenotype is typically
288 characterised with lower LH levels compared with control (46). This is evidence of the heterogeneity
289 of the phenotype of PCOS.

290

291 Finally the higher estradiol levels displayed by the young NZO compared with young C57BL/6 mice
292 may be due the decreased LH levels in the obese group, as seen in PCOS (47-51). Interestingly,
293 estradiol levels decreased with advancing age in the NZO mice only as expected (23, 52, 53), since
294 ovarian hormonal levels diminish as menopause approaches in humans, and reproductive senescence
295 in rodents is similar to menopause in several critical respects, including similar alterations in pulsatile
296 LH release and the LH surge, variability of cycle length prior to acyclicity, and ultimate cessation of
297 hormone cycling (23, 53, 54).

298

299 In conclusion, this study describes ovarian morphological characteristics in the obese and insulin
300 resistant NZO mouse that resemble those observed in humans with PCOS. These ovarian changes
301 may well be associated with the pathophysiological mechanism involved in the recognized poor
302 reproductive performance of female NZO mice. Therefore the NZO mouse is a suitable animal model
303 to assess the adverse effects of obesity and insulin resistance on ovarian structure and function.

304 **ACKNOWLEDGEMENTS**

305 We would like to thank Mr. Christian Rantzaou for performing the insulin radioimmunoassay,
306 Associate Professor Mark Hedger from the Monash Medical Centre for performing the testosterone,
307 luteinizing hormone and estradiol radioimmunoassay and Dr Ann Drummond from the Prince
308 Henry's Institute who helped with the histological assessment. SRB is a Grant recipient from
309 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brazil. SA is a National
310 Health and Medical Research Council of Australia Career Development Award Recipient. This study
311 was supported by the Sir Edward Dunlop Medical Research Foundation.

312 **REFERENCES**

- 313 1. **Lobo RA, Carmina E** 2000 The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome.
314 *Ann Intern Med* 132:989-993
- 315 2. **Norman RJ** 2002 Hyperandrogenaemia and the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 191:113-119
- 316 3. **Norman RJ, Wu R, Stankiewicz MT** 2004 4: Polycystic ovary syndrome. *Med J Aust*
317 180:132-137
- 318 4. **Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF** 2000
319 A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian
320 women from Spain. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:2434-2438
- 321 5. **Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO** 2004 The
322 prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *The Journal of*
323 *clinical endocrinology and metabolism* 89:2745-2749
- 324 6. **Ehrmann DA** 2005 Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352:1223-1236
- 325 7. **Crosignani PG, Nicolosi AE** 2001 Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity.
326 *Hum Reprod Update* 7:3-7
- 327 8. **Franks S, McCarthy MI, Hardy K** 2006 Development of polycystic ovary syndrome:
328 involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl* 29:278-285; discussion 286-290
- 329 9. **Franks S, Mason H, Willis D** 2000 Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome.
330 *Mol Cell Endocrinol* 163:49-52
- 331 10. **Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S** 2003
332 Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* 362:1017-1021
- 333 11. **Toscani M, Migliavacca R, Sisson de Castro JA, Spritzer PM** 2007 Estimation of truncal

- 334 adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance
335 screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome. *Metabolism: clinical and*
336 *experimental* 56:992-997
- 337 12. **Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E** 2001 Leptin concentrations in hirsute
338 women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship
339 with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 16:1340-1346
- 340 13. **Dunaif A** 1997 Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and
341 implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18:774-800
- 342 14. **Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S** 2006 Obesity and polycystic ovary
343 syndrome. *Clinical endocrinology* 65:137-145
- 344 15. **Leeman L, Acharya U** 2009 The use of metformin in the management of polycystic ovary
345 syndrome and associated anovulatory infertility: the current evidence. *J Obstet Gynaecol* 29:467-472
- 346 16. **Zain MM, Norman RJ** 2008 Impact of obesity on female fertility and fertility treatment.
347 *Women's health (London, England)* 4:183-194
- 348 17. **Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, Hirsh L,**
349 **Itskovitz-Eldor J, Lessing JB, Homburg R, Amsterdam A** 2004 Induction of polycystic ovary by
350 testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio.
351 *Int J Mol Med* 14:207-215
- 352 18. **Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N** 2004 Letrozole-induced polycystic ovaries in
353 the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 35:103-108
- 354 19. **Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin**
355 **E** 2007 A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary
356 syndrome. *Endocrinology* 148:3781-3791

- 357 20. **Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn**
358 **AW** 2007 Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced
359 obesity. *Diabetes, obesity & metabolism* 9:840-852
- 360 21. **Veroni MC, Proietto J, Larkins RG** 1991 Evolution of insulin resistance in New Zealand
361 obese mice. *Diabetes* 40:1480-1487
- 362 22. **Bielschowsky F, Bielschowsky M** 1956 The New Zealand strain of obese mice; their
363 response to stilboestrol and to insulin. *Aust J Exp Biol Med Sci* 34:181-198
- 364 23. **Frick KM** 2009 Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned
365 and where do we go from here? *Hormones and behavior* 55:2-23
- 366 24. **Pedersen T, Peters H** 1968 Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse
367 ovary. *J Reprod Fertil* 17:555-557
- 368 25. **Brawer JR, Munoz M, Farookhi R** 1986 Development of the polycystic ovarian condition
369 (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of reproduction* 35:647-655
- 370 26. **Convery M, McCarthy GF, Brawer JR** 1990 Remission of the polycystic ovarian condition
371 (PCO) in the rat following hemiovariectomy. *Anat Rec* 226:328-336
- 372 27. **Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR** 2000 An
373 increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal
374 component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141:1059-1072
- 375 28. **Desjardins GC, Brawer JR** 1989 Development and maintenance of a polycystic condition in
376 ovaries autotransplanted under the kidney capsule. *Anat Rec* 225:118-123
- 377 29. **Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J** 2008 Evaluating the glucose
378 tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1323-1332
- 379 30. **Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P, Joost HG** 2000 A

380 metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New
381 Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* 30:195-202

382 31. **Koza RA, Flurkey K, Graunke DM, Braun C, Pan HJ, Reifsnyder PC, Kozak LP, Leiter**
383 **EH** 2004 Contributions of dysregulated energy metabolism to type 2 diabetes development in
384 NZO/H1Lt mice with polygenic obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 53:799-808

385 32. **Herter LD, Magalhaes JA, Spritzer PM** 1996 Relevance of the determination of ovarian
386 volume in adolescent girls with menstrual disorders. *J Clin Ultrasound* 24:243-248

387 33. **Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo RA, Lombardi G, Lobo RA** 2005 Ovarian size and
388 blood flow in women with polycystic ovary syndrome and their correlations with endocrine
389 parameters. *Fertil Steril* 84:413-419

390 34. **Hahn S, Bering van Halteren W, Roesler S, Schmidt M, Kimmig R, Tan S, Mann K,**
391 **Janssen OE** 2006 The combination of increased ovarian volume and follicle number is associated
392 with more severe hyperandrogenism in German women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin*
393 *Endocrinol Diabetes* 114:175-181

394 35. **Sikka P, Gainder S, Dhaliwal LK, Bagga R, Sialy R, Sahdev S** 2007 Ultrasonography of
395 the ovaries and its correlation with clinical and endocrine parameters in infertile women with PCOS.
396 *International journal of fertility and women's medicine* 52:41-47

397 36. **Ravichandran KS** 2003 "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet
398 meal. *Cell* 113:817-820

399 37. **Anderson E, Lee GY** 1997 The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and
400 epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the
401 dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue Cell* 29:171-189

402 38. **Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Pezzone N, Ortega HH** 2006 Microscopic
403 characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat.

404 Arch Med Res 37:830-839

405 39. **Bielschowsky F** 1953 The role of ovarian secretions in the pathogenesis of chemically
406 induced cancers. Acta Physiol Lat Am 3:57-59

407 40. **Runner MN, Gates A** 1954 Conception in prepuberal mice following artificially induced
408 ovulation and mating. Nature 174:222-223

409 41. **Rotterdam** 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks
410 related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 19:41-47

411 42. **Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C** 2005 Sex and strain differences in adult mouse
412 cardiac repolarization: importance of androgens. Cardiovasc Res 65:148-157

413 43. **Krishnamurthy H, Babu PS, Morales CR, Sairam MR** 2001 Delay in sexual maturity of
414 the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. Biology of reproduction 65:522-531

415 44. **Shapiro BH, Niedermeyer TM, Babalola GO** 1989 Serum androgen levels in senescent
416 Cr1:CD-1 (ICR)BR mice: effects of castration and testosterone treatment. J Gerontol 44:B15-19

417 45. **Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF** 1999 Effect of the genetic background on
418 the reproduction of leptin-deficient obese mice. Endocrinology 140:732-738

419 46. **Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE,**
420 **Steiner RA, Tena-Sempere M** 2007 Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of
421 the rat. Endocrinology 148:1774-1783

422 47. **Holte J, Bergh T, Gennarelli G, Wide L** 1994 The independent effects of polycystic ovary
423 syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal
424 women. Clinical endocrinology 41:473-481

425 48. **Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS** 1996 Insulin,
426 somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary

427 syndrome: common and distinct features. The Journal of clinical endocrinology and metabolism
428 81:2854-2864

429 49. **Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS** 1997 Inappropriate gonadotropin secretion in
430 polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. The Journal of clinical endocrinology and
431 metabolism 82:3728-3733

432 50. **Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, Hall JE**
433 1997 Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic
434 ovary syndrome. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 82:2248-2256

435 51. **Pagan YL, Srouji SS, Jimenez Y, Emerson A, Gill S, Hall JE** 2006 Inverse relationship
436 between luteinizing hormone and body mass index in polycystic ovarian syndrome: investigation of
437 hypothalamic and pituitary contributions. The Journal of clinical endocrinology and metabolism
438 91:1309-1316

439 52. **Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS** 1979 Chronological changes in sex steroid,
440 gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states.
441 Biology of reproduction 21:193-203

442 53. **Nelson JF, Karelus K, Bergman MD, Felicio LS** 1995 Neuroendocrine involvement in
443 aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. Neurobiology of aging
444 16:837-843; discussion 855-836

445 54. **LeFevre J, McClintock MK** 1988 Reproductive senescence in female rats: a longitudinal
446 study of individual differences in estrous cycles and behavior. Biology of reproduction 38:780-789
447
448

TABLES

Table 1: Body weight, 6-hour fasted plasma glucose and insulin resistance and insulin resistance index (HOMA-IR) in female NZO and C57BL/6J mice (n=5-12)

Groups	Young		Adult		Aged	
	C57BL/6J (n=9)	NZO (n=12)	C57BL6J (n=5)	NZO (n=6)	C57BL/6J (n=6)	NZO (n=7)
Age (weeks)	11.5 ± 0.2	11.8 ± 0.6	27.0 ± 0.1	24.0 ± 0.01	45.7 ± 2.3	42.1 ± 1.2
BW (g)	21.3 ± 0.3	35.7 ± 0.8 ^a	24.7 ± 0.7 ^a	46.2 ± 2.2 ^{b,d}	37.7 ± 2.3 ^{a,b}	51.6 ± 2.5 ^{c,d}
Glucose (mmol/L)	12.7 ± 0.8	16.0 ± 1.0 ^a	9.6 ± 0.6 ^a	15.0 ± 0.8 ^b	10.9 ± 0.7	12.5 ± 0.7 ^{d,e}
Insulin (ng/mL)	0.33 ± 0.04	0.98 ± 0.09 ^a	0.39 ± 0.07	1.16 ± 0.28 ^b	0.48 ± 0.09	2.25 ± 0.98 ^c
HOMA-IR	0.19 ± 0.03	0.68 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.03	0.81 ± 0.22 ^b	0.23 ± 0.04	1.26 ± 0.54 ^c

Values presented as mean ± SD; ^a P<0.05 vs Young C57BL/6J; ^b P<0.05 vs Adult C57BL/6J; ^c P<0.05 vs Aged C57BL/6J; ^d P<0.05 vs Young NZO; ^e P<0.05 vs Adult NZO.

Table 2: Reproductive hormonal levels following a 6-hour fast in female NZO and C57BL/6J mice (n=5-12)

Groups	Young		Adult		Aged	
	C57BL/6J (n=9)	NZO (n=12)	C57BL6J (n=5)	NZO (n=6)	C57BL/6J (n=6)	NZO (n=7)
Testosterone (pg/mL)	69.8 ± 10.0	61.2 ± 2.4	64.5 ± 7.1	51.4 ± 5.0 ^d	195.5 ± 20.2 ^{a,b}	45.9 ± 3.3 ^{c,d}
Luteinizing Hormone (ng/mL)	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.47	0.27 ± 0.05 ^d	0.48 ± 0.24	0.31 ± 0.07 ^d
Estradiol (pg/mL)	2.7 ± 0.1	5.1 ± 1.4 ^a	3.3 ± 1.3	3.2 ± 1.0 ^d	3.6 ± 1.0 ^a	3.8 ± 1.3 ^d

Values presented as mean ± SD; ^a P<0.05 vs Young C57BL/6J; ^b P<0.05 vs Adult C57BL/6J; ^c P<0.05 vs Age C57BL/6J; ^d P<0.05 vs Young NZO.

Figure Legends

Figure 1: (A) Plasma glucose levels during an insulin tolerance test (1 I.U./kg) in female C57BL/6 and NZO mice at the young, adult and aged stages as defined in the Methods section. (B) Area under the curve (AUC) of glucose of the insulin tolerance test. Values are presented as mean \pm SEM (n=6-8). ^a P<0.05 vs C57BL/6.

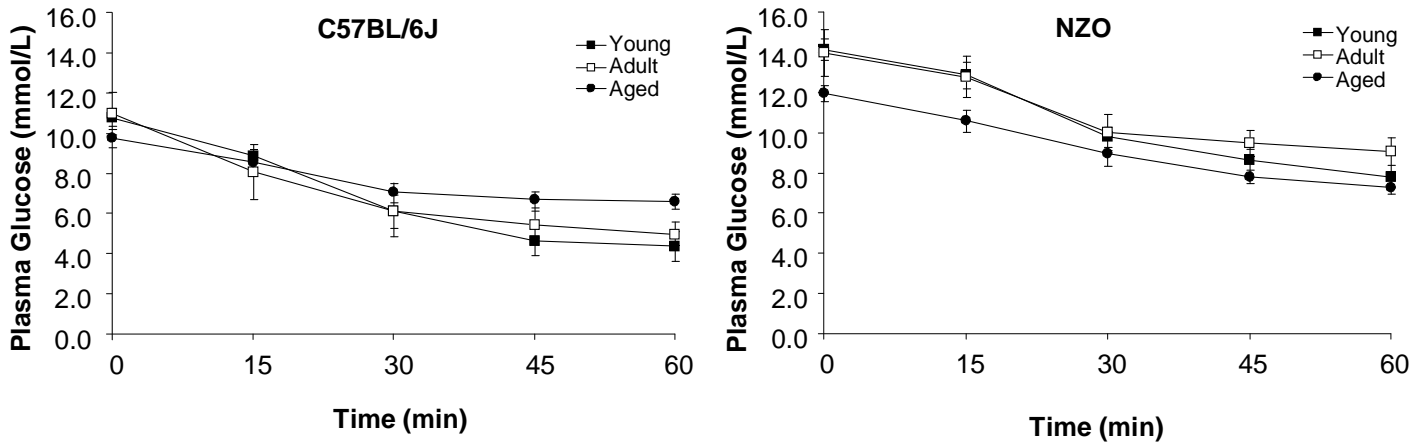
Figure 2: Histological assessment of ovarian structure (25x magnification) in young C57BL/6J and NZO (A,B); adult C57BL/6J and NZO (C,D) and aged C57BL/6J and NZO mice (E,F). A: Atretic Follicles; CL: Corpora lutea; G: Graafian; H: Healthy follicles.

Figure 3: (A) Number of follicles; (B) Number of corpora lutea in C57BL/6J and NZO mice. Values are presented as mean \pm SEM (n=6-8); p<0.05; ^a P<0.05 vs Young C57BL/6; ^b P<0.05 vs Adult C57BL/6; ^c P<0.05 vs aged C57BL/6; ^d P<0.05 vs Young NZO; ^e P<0.05 vs Adult NZO.

Figure 4: (A) Total number of follicles; (B) Number of healthy follicles; (C) Number of atretic follicles and (D) Percentage of healthy and unhealthy follicles in female C57BL/6J and NZO mice. Values are presented as mean \pm SEM (n=6-8). ^a P<0.05 vs Young C57; ^b P<0.05 vs Adult C57; ^c P<0.05 vs aged C57; ^d P<0.05 vs Young NZO; ^e P<0.05 vs Adult NZO.

FIGURE 1

A



B

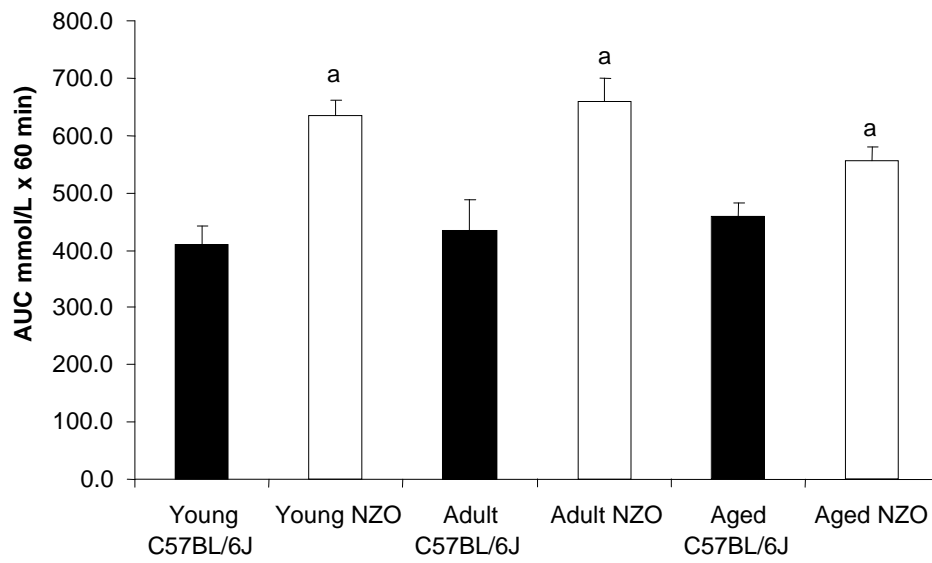


FIGURE 2

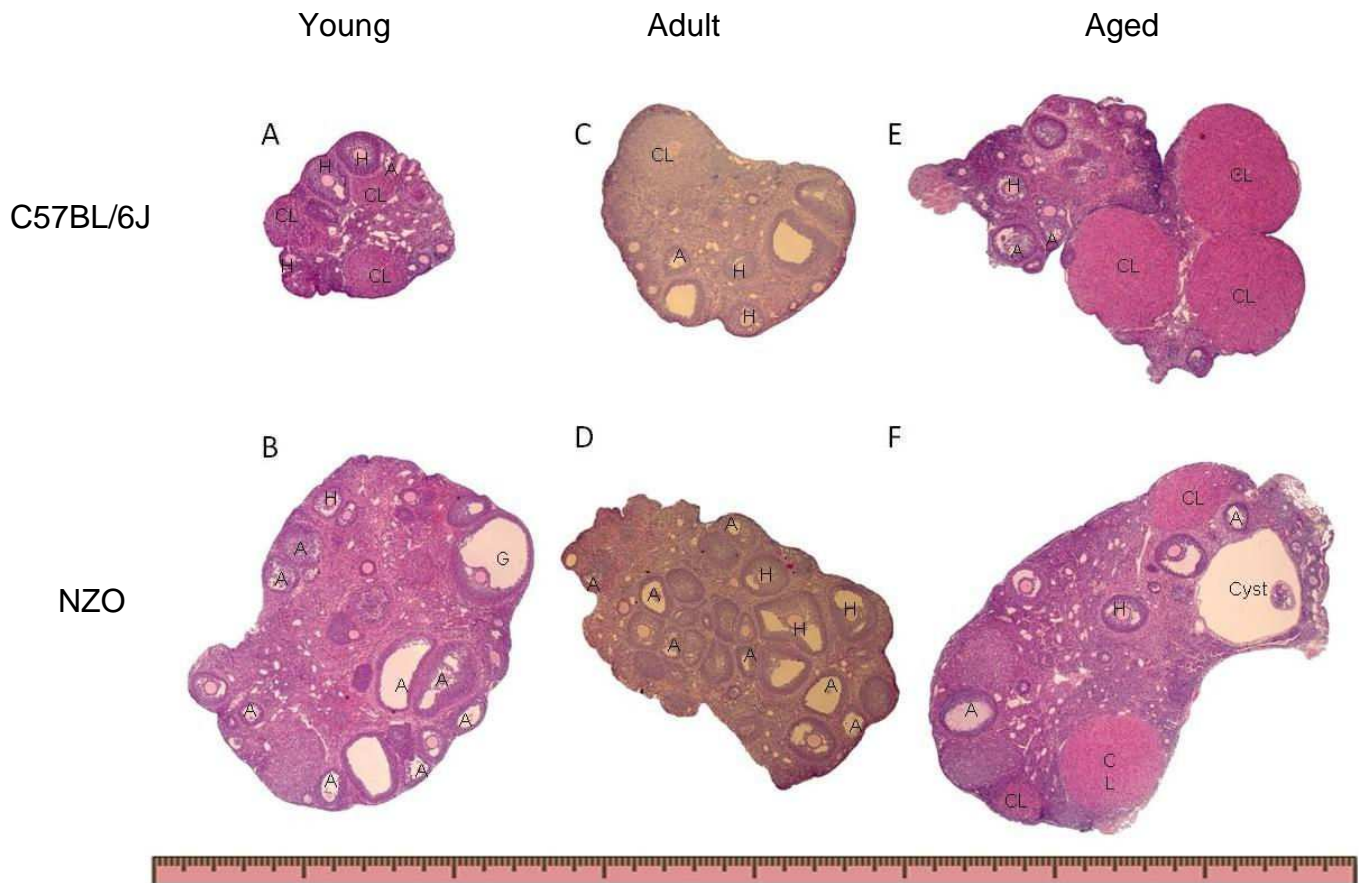
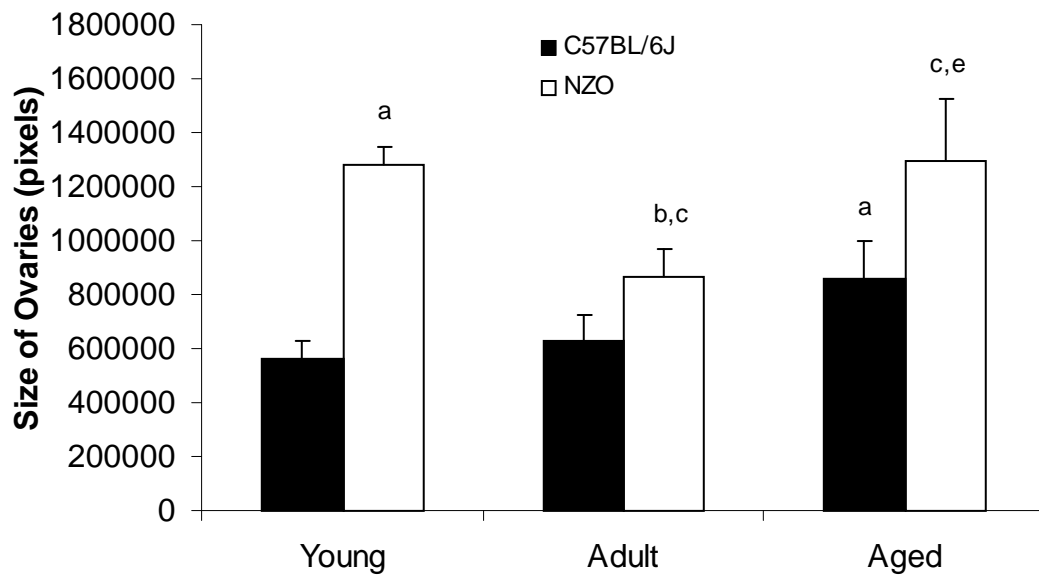


FIGURE 3

A



B

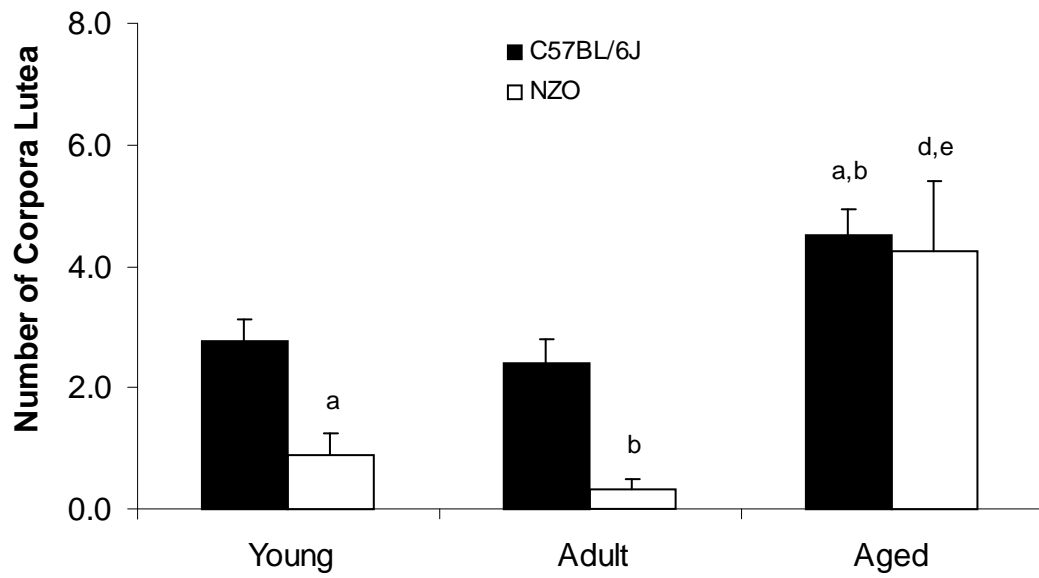
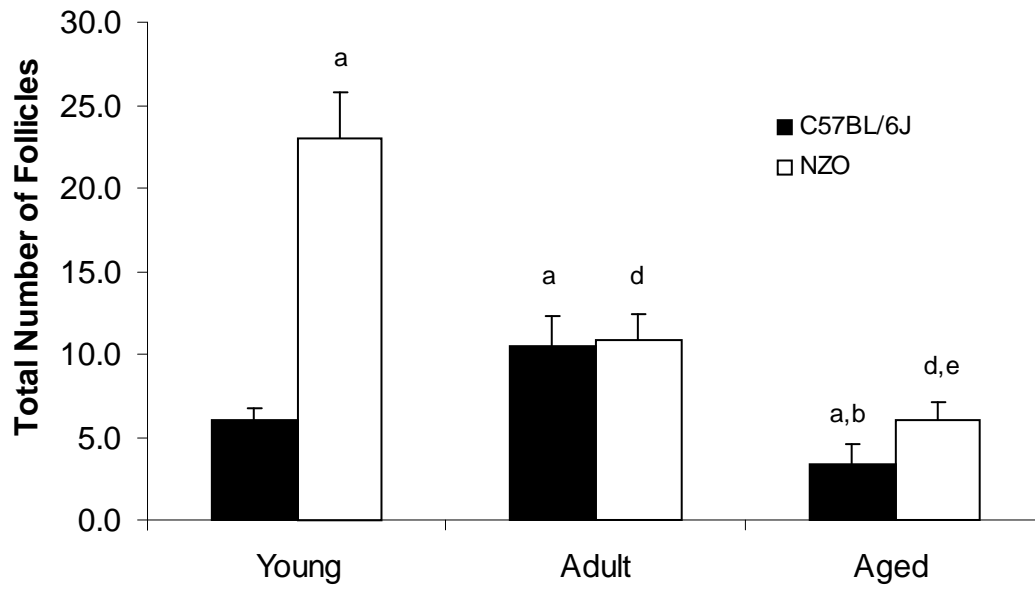
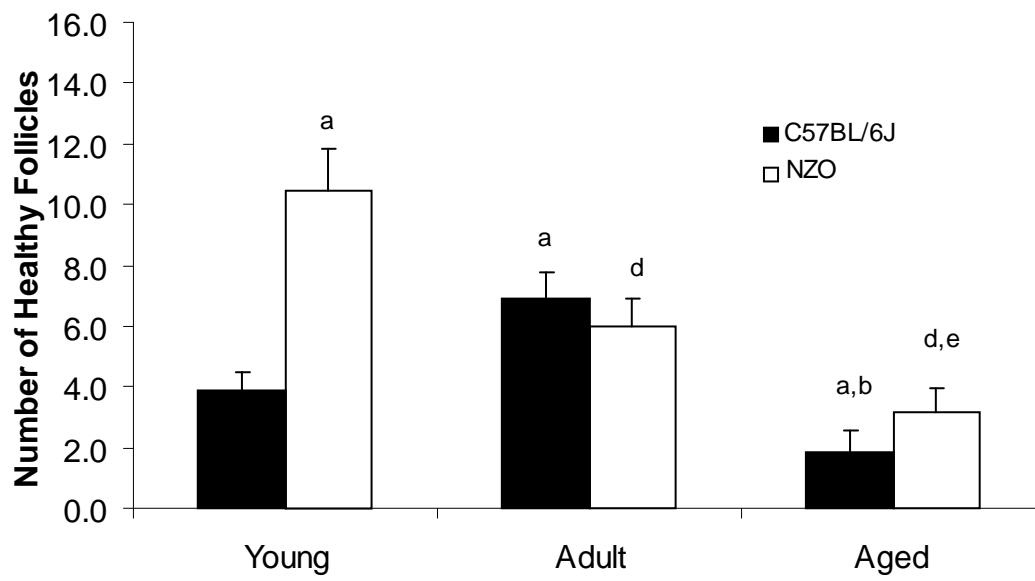


FIGURE 4

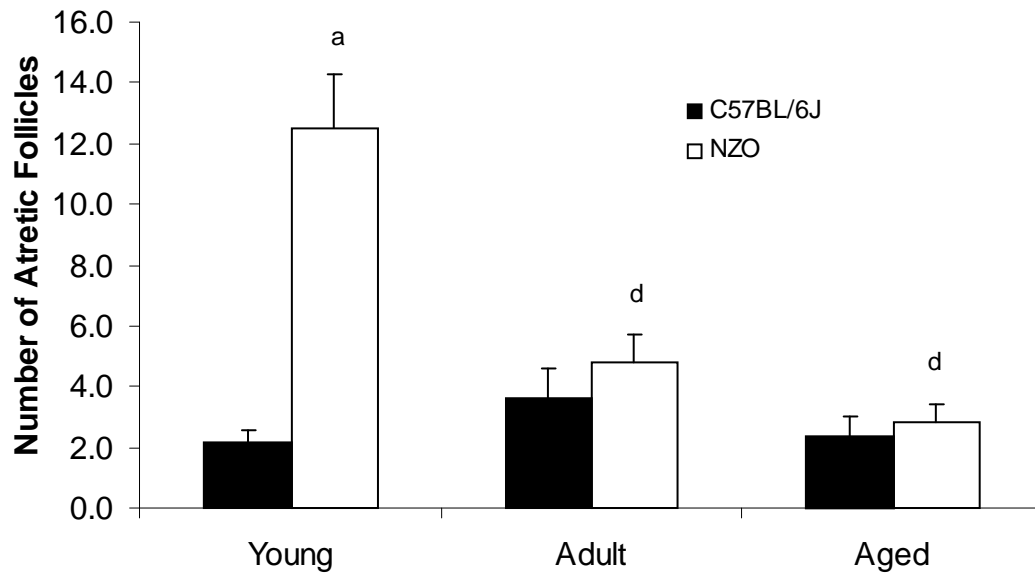
A



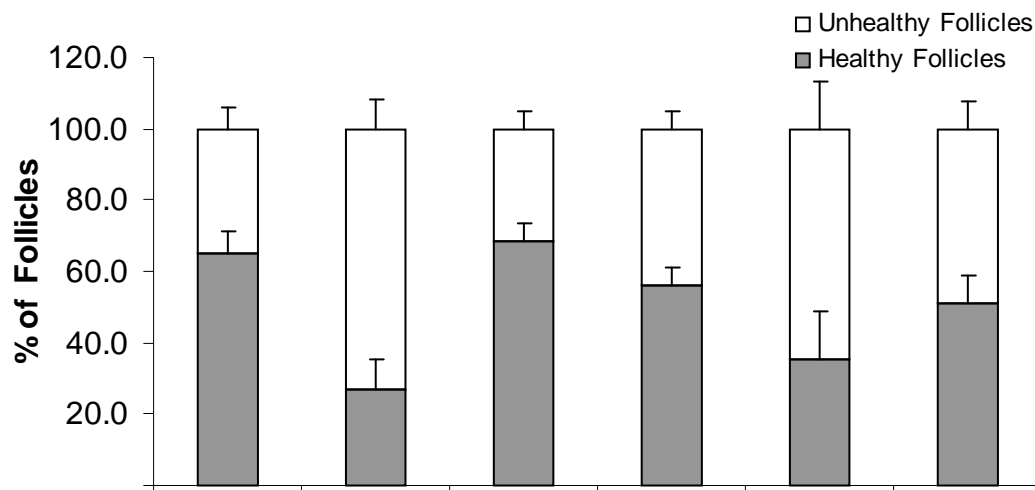
B



C



D



4 DISCUSSÃO CONCLUSIVA

A PCOS é uma endocrinopatia muito comum em mulheres em idade reprodutiva, e sua etiologia não está completamente esclarecida. No presente trabalho, sugerimos que as variantes genéticas do gene da adiponectina poderiam estar associadas com a RI e com alterações metabólicas em mulheres com PCOS (estudo 1). Decidimos investigar esta associação, já que são ainda escassas as informações sobre a influência dos SNPs deste gene em mulheres brasileiras com a síndrome. Acreditamos ainda que a criação ou descoberta de um modelo animal poderia ser útil para o estudo da PCOS. Neste sentido, investigamos as fêmeas de camundongos NZO como um modelo promissor de PCOS (estudo 2), já que são um modelo poligênico de obesidade e RI e poderiam apresentar outras características similares às encontradas na PCOS humana.

No estudo com fêmeas de camundongos NZO, confirmamos a informação de que este grupo apresenta maior peso corporal em relação a controles, nas três diferentes idades estudadas (12, 24 e 43 semanas). Os camundongos NZO apresentam peso similar aos controles ao nascimento (Crofford and Davis, 1965), mas com 4-6 semanas de vida geralmente são marcadamente mais pesados, além de apresentarem aumento de tecido adiposo corporal e dos níveis de ácidos graxos livres. Estas diferenças persistem na idade adulta, quando os camundongos NZO desenvolvem obesidade precoce (Andrikopoulos et al., 1996; Crofford and Davis, 1965).

No presente trabalho, as fêmeas de camundongos NZO apresentaram aumento do tamanho ovariano, característica morfológica presente na PCOS humana, o qual tem sido associado com marcadores de RI e com fluxo sanguíneo ovariano (Carmina et al., 2005; Herter et al., 1996). Nas fêmeas obesas, também encontramos uma correlação positiva

entre os níveis de insulina plasmática e o tamanho ovariano ($r=0,40$, $p=0,013$ – dados não mostrados).

O aumento da quantidade de folículos ovarianos totais observados nas fêmeas de camundongos NZO, se assemelha aos achados na PCOS humana. Estudos mostram associação entre o número de folículos com a RI e com os níveis de testosterona (Hahn et al., 2006; Sikka et al., 2007).

O número mais elevado de folículos ovarianos observado nas fêmeas NZO, em comparação com o grupo controle, foi representado por maior quantidade de folículos “saudáveis”, mas principalmente por aumento do número de folículos atresícos. Observamos uma variação bastante grande no grau de atresia folicular nestes animais, caracterizada por um número elevado de células com núcleos picnóticos, degeneradas e apoptóticas. Estas últimas podem levar ao recrutamento de macrófagos (Ravichandran, 2003), os quais aparecem no fluido folicular durante a atresia, e têm a capacidade de atravessar e danificar a membrana plasmática que separa a camada de células da granulosa, das células da teca (Manneras et al., 2007), como observado no nosso estudo. Alterações similares foram mostradas em outros modelos animais que induziram à PCOS em ratos (Anderson et al., 1997; Baravalle et al., 2007; Lara et al., 2000; Manneras et al., 2007). Todas estas características histológicas são consistentes com a PCOS humana, o que sugere que os camundongos NZO podem ser um modelo apropriado para o estudo desta doença heterogênea.

Um menor número de corpos lúteos foi observado nos ovários de fêmeas obesas em relação a controles, o que sugere uma menor taxa de ovulação e explica a fertilidade reduzida nestes animais (Bielschowsky et al., 1956). Estudos anteriores já haviam notado que os camundongos NZO apresentavam ninhadas menores e menos freqüentes do que controles, e o ciclo estral regular era visto apenas ocasionalmente nestes animais (Bielschowsky et al., 1956). As anormalidades metabólicas nestes camundongos foram primeiramente observadas em 1953 (Bielschowsky and Hall, 1953) e a fertilidade prejudicada mostrada um ano mais tarde (Runner and Gates, 1954). Estes achados estão de acordo com os dados de Lara et al. (Lara et al., 2000) que observaram menor número e tamanho de corpos lúteos em ratos com PCOS induzida por esteróides, comparado a controles.

No presente trabalho não encontramos diferença nos níveis de testosterona nas fêmeas de camundongos NZO, em relação a controles, resultados que corroboram com outros estudos com modelos de PCOS (Manneras et al., 2007). Além disso, de acordo com o critério de Rotterdam, o hiperandrogenismo nem sempre está presente na PCOS humana (Rotterdam, 2004). No entanto, observamos um aumento dos níveis de testosterona no grupo controle de meia idade, comparado aos demais grupos. A razão para estes resultados não está clara. Apesar de vários estudos terem avaliado os níveis de testosterona em diferentes idades em camundongos machos C57BL/6 (Brouillette et al., 2005; Ewart-Toland et al., 1999; Krishnamurthy et al., 2001; Shapiro et al., 1989), estes dados não foram analisados em fêmeas.

As fêmeas obesas mais jovens apresentaram níveis diminuídos de LH e níveis mais elevados de estradiol, comparado com controles. Isto pode ser devido aos níveis elevados de estradiol que poderiam estar suprimindo ainda mais os níveis de LH. Além disso, a liberação de LH nas fêmeas NZO pode ser menor devido à obesidade, em relação a controles, como mostrado em mulheres com PCOS (Arroyo et al., 1997; Holte et al., 1994; Morales et al., 1996; Pagan et al., 2006; Spritzer et al., 2001; Taylor et al., 1997). Como esperado, os níveis de estradiol diminuíram com a idade no grupo de camundongos NZO (Frick, 2009; Nelson et al., 1995), processo que ocorre naturalmente em humanos quando a menopausa se aproxima, sendo o envelhecimento em roedores similar à menopausa humana em vários aspectos, como nas alterações da liberação de LH e variação do período cíclico que antecede a interrupção definitiva da ovulação (Frick, 2009; LeFevre and McClintock, 1988; Nelson et al., 1995).

Em conclusão, no estudo 1, com humanos, confirmamos as alterações clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais presentes em mulheres com PCOS e mostramos associação dos SNPs T45G e G276T do gene da adiponectina com a PCOS, mas não dos SNPs da região promotora. A presença dos polimorfismos não interferiu sobre as variáveis clínicas, antropométricas, metabólicas e hormonais em mulheres com PCOS e controles. Estudos futuros com o aumento do tamanho amostral poderão aprofundar e esclarecer a real influência dos polimorfismos do gene da adiponectina sobre as alterações metabólicas e os fatores de risco cardiovascular observados com maior frequência em mulheres com PCOS.

No estudo 2, descrevemos as características morfológicas ovariana em camundongos obesos com RI, as quais são similares às características observadas na PCOS humana. Estas alterações ovarianas podem estar associadas com o mecanismo fisiopatológico

envolvido na fertilidade reduzida das fêmeas de camundongos NZO. Eles parecem ser um modelo animal apropriado para avaliar os efeitos adversos da obesidade e resistência insulínica sobre a estrutura e função ovariana, podendo ser úteis no estudo da PCOS humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA (2009). Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 32 *Suppl 1*, S13-61.

Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11, 327-332.

Anderson, E., Lee, G.Y., and O'Brien, K. (1997). Polycystic ovarian condition in the dehydroepiandrosterone-treated rat model: hyperandrogenism and the resumption of meiosis are major initial events associated with cystogenesis of antral follicles. *The Anatomical record* 249, 44-53.

Andrikopoulos, S., Rosella, G., Kaczmarczyk, S.J., Zajac, J.D., and Proietto, J. (1996). Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-biphosphatase in the New Zealand Obese mouse: an acquired defect. *Metabolism* 45, 622-626.

Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* 257, 79-83.

Arroyo, A., Laughlin, G.A., Morales, A.J., and Yen, S.S. (1997). Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3728-3733.

Azziz, R. (2006). Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 781-785.

Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H.F., Futterweit, W., Janssen, O.E., Legro, R.S., Norman, R.J., Taylor, A.E., and Witchel, S.F. (2006). Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 4237-4245.

Baba, T., Endo, T., Sata, F., Nagasawa, K., Honnma, H., Kitajima, Y., Hayashi, T., Manase, K., Kanaya, M., Moriwaka, O., *et al.* (2009). The contributions of resistin and adiponectin gene single nucleotide polymorphisms to the genetic risk for polycystic ovary syndrome in a Japanese population. *Gynecol Endocrinol* 25, 498-503.

Baravalle, C., Salvetti, N.R., Mira, G.A., Lorente, J.A., and Ortega, H.H. (2007). The role of ACTH in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome in rats: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 56, 67-78.

Beloosesky, R., Gold, R., Almog, B., Sasson, R., Dantes, A., Land-Bracha, A., Hirsh, L., Itskovitz-Eldor, J., Lessing, J.B., Homburg, R., and Amsterdam, A. (2004). Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *International journal of molecular medicine* 14, 207-215.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature medicine* 7, 947-953.

Bielschowsky, F., and Hall, W.H. (1953). The endocrine imbalance induced in female rats by autotransplantation of the ovary into the tail. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 31, 85-97.

Bielschowsky, M., Bielschowsky, F., and Lindsay, D. (1956). A new strain of mice with a high incidence of mammary cancers and enlargement of the pituitary. *British journal of cancer* 10, 688-699.

Bouatia-Naji, N., Meyre, D., Lobbens, S., Seron, K., Fumeron, F., Balkau, B., Heude, B., Jouret, B., Scherer, P.E., Dina, C., *et al.* (2006). ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes* 55, 545-550.

Brouillette, J., Rivard, K., Lizotte, E., and Fiset, C. (2005). Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovascular research* 65, 148-157.

Carmina, E., Ferin, M., Gonzalez, F., and Lobo, R.A. (1999). Evidence that insulin and androgens may participate in the regulation of serum leptin levels in women. *Fertil Steril* 72, 926-931.

Carmina, E., and Lobo, R.A. (1999). Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1897-1899.

Carmina, E., Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., Longo, R.A., Colao, A.M., Lombardi, G., and Lobo, R.A. (2005). Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 152, 389-394.

Carr, M.C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404-2411.

Chung, H.K., Chae, J.S., Hyun, Y.J., Paik, J.K., Kim, J.Y., Jang, Y., Kwon, H.M., Song, Y.D., Lee, H.C., and Lee, J.H. (2009). Influence of adiponectin gene polymorphisms on adiponectin level and insulin resistance index in response to dietary intervention in overweight-obese patients with impaired fasting glucose or newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 552-558.

Crofford, O.B., and Davis, C.K., Jr. (1965). Growth Characteristics, Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity of New Zealand Obese Mice. *Metabolism* 14, 271-280.

Crosignani, P.G., and Nicolosi, A.E. (2001). Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Human reproduction update* 7, 3-7.

Demirci, H., Yilmaz, M., Ergun, M.A., Yurtcu, E., Bukan, N., and Ayvaz, G. (2010). Frequency of adiponectin gene polymorphisms in polycystic ovary syndrome and the association with serum adiponectin, androgen levels, insulin resistance and clinical parameters. *Gynecol Endocrinol* 26, 348-355.

Despres, J.P. (1998). The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obesity research* 6 Suppl 1, 8S-17S.

Dolley, G., Bertrais, S., Frochot, V., Bebel, J.F., Guerre-Millo, M., Tores, F., Rousseau, F., Hager, J., Basdevant, A., Hercberg, S., *et al.* (2008). Promoter adiponectin polymorphisms and waist/hip ratio variation in a prospective French adults study. *International journal of obesity* (2005) 32, 669-675.

- Donato, G.B., Fuchs, S.C., Oppermann, K., Bastos, C., and Spritzer, P.M. (2006). Association between menopause status and central adiposity measured at different cutoffs of waist circumference and waist-to-hip ratio. *Menopause (New York, N.Y)* 13, 280-285.
- Dunaif, A. (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18, 774-800.
- Dunaif, A. (2006). Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86 *Suppl 1*, S13-14.
- Ehrmann, D.A. (2005). Polycystic ovary syndrome. *The New England journal of medicine* 352, 1223-1236.
- Ehrmann, D.A., Barnes, R.B., Rosenfield, R.L., Cavaghan, M.K., and Imperial, J. (1999). Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22, 141-146.
- Ehrmann, D.A., Liljenquist, D.R., Kasza, K., Azziz, R., Legro, R.S., and Ghazzi, M.N. (2006). Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 48-53.
- Escobar-Morreale, H.F., Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Alvarez-Blasco, F., Sanchon, R., Luque-Ramirez, M., and San Millan, J.L. (2006). Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 21, 2257-2265.
- Essah, P.A., and Nestler, J.E. (2006). Metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86 *Suppl 1*, S18-19.
- Ewart-Toland, A., Mounzih, K., Qiu, J., and Chehab, F.F. (1999). Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* 140, 732-738.
- Fam, B.C., and Andrikopoulos, S. (2006). The New Zealand Obese Mouse: Polygenic Model of Obesity, Glucose Intolerance, and the Metabolic Syndrome. In *Animal Models of Diabetes*, 137-156.
- Fam, B.C., Morris, M.J., Hansen, M.J., Kebede, M., Andrikopoulos, S., Proietto, J., and Thorburn, A.W. (2007). Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes, obesity & metabolism* 9, 840-852.
- Ferriman, D., and Gallwey, J.D. (1961). Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 21, 1440-1447.
- Finucane, F.M., Luan, J., Wareham, N.J., Sharp, S.J., O'Rahilly, S., Balkau, B., Flyvbjerg, A., Walker, M., Hojlund, K., Nolan, J.J., and Savage, D.B. (2009). Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* 52, 2345-2349.
- Franks, S., McCarthy, M.I., and Hardy, K. (2006). Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *International journal of andrology* 29, 278-285; discussion 286-290.
- Frick, K.M. (2009). Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Hormones and behavior* 55, 2-23.

Friedewald, W.T., Levy, R.I., and Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 18, 499-502.

Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2005-2010.

Fumeron, F., Aubert, R., Siddiq, A., Betoulle, D., Pean, F., Hadjadj, S., Tichet, J., Wilpart, E., Chesnier, M.C., Balkau, B., *et al.* (2004). Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes* 53, 1150-1157.

Gambineri, A., Pelusi, C., Vicennati, V., Pagotto, U., and Pasquali, R. (2002). Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 883-896.

Gil-Campos, M., Canete, R.R., and Gil, A. (2004). Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 23, 963-974.

Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior* 94, 206-218.

Goyenechea, E., Collins, L.J., Parra, D., Abete, I., Crujeiras, A.B., O'Dell, S.D., and Martinez, J.A. (2009). The -11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. *Horm Metab Res* 41, 55-61.

Gu, H.F., Abulaiti, A., Ostenson, C.G., Humphreys, K., Wahlestedt, C., Brookes, A.J., and Efendic, S. (2004). Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. *Diabetes* 53 Suppl 1, S31-35.

Haap, M., Machicao, F., Stefan, N., Thamer, C., Tschritter, O., Schnuck, F., Wallwiener, D., Stumvoll, M., Haring, H.U., and Fritsche, A. (2005). Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113, 275-281.

Hahn, S., Bering van Halteren, W., Roesler, S., Schmidt, M., Kimmig, R., Tan, S., Mann, K., and Janssen, O.E. (2006). The combination of increased ovarian volume and follicle number is associated with more severe hyperandrogenism in German women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114, 175-181.

Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Eto, K., *et al.* (2002). Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51, 536-540.

Heinonen, S., Korhonen, S., Helisalmi, S., Koivunen, R., Tapanainen, J., Hippelainen, M., and Laakso, M. (2005). Associations between two single nucleotide polymorphisms in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 21, 165-169.

Herter, L.D., Magalhaes, J.A., and Spritzer, P.M. (1996). Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *J Clin Ultrasound* 24, 243-248.

Hoefle, G., Muendlein, A., Saely, C.H., Risch, L., Rein, P., Koch, L., Schmid, F., Aczel, S., Marte, T., Langer, P., and Drexel, H. (2007). The -11377 C>G promoter variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men. *Thrombosis and haemostasis* 97, 451-457.

Hoeger, K. (2001). Obesity and weight loss in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 28, 85-97, vi-vii.

Holte, J., Bergh, T., Gennarelli, G., and Wide, L. (1994). The independent effects of polycystic ovary syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 41, 473-481.

Holte, J., Gennarelli, G., Berne, C., Bergh, T., and Lithell, H. (1996). Elevated ambulatory day-time blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: a sign of a prehypertensive state? *Hum Reprod* 11, 23-28.

Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., *et al.* (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1595-1599.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry* 271, 10697-10703.

Huber-Buchholz, M.M., Carey, D.G., and Norman, R.J. (1999). Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1470-1474.

Kafali, H., Iriadam, M., Ozardali, I., and Demir, N. (2004). Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Archives of medical research* 35, 103-108.

Kahn, H.S. (2005). The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC cardiovascular disorders* 5, 26.

Kiddy, D.S., Hamilton-Fairley, D., Bush, A., Short, F., Anyaoku, V., Reed, M.J., and Franks, S. (1992). Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36, 105-111.

Krishnamurthy, H., Babu, P.S., Morales, C.R., and Sairam, M.R. (2001). Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. *Biology of reproduction* 65, 522-531.

Lara, H.E., Dissen, G.A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J.L., and Ojeda, S.R. (2000). An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141, 1059-1072.

LeFevre, J., and McClintock, M.K. (1988). Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biology of reproduction* 38, 780-789.

Legro, R.S. (2001). Polycystic ovary syndrome: the new millenium. *Mol Cell Endocrinol* 184, 87-93.

- Legro, R.S. (2006). Type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86 Suppl 1, S16-17.
- Lobo, R.A., and Carmina, E. (2000). The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med* 132, 989-993.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications* 221, 286-289.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., *et al.* (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50, 2094-2099.
- Manneras, L., Cajander, S., Holmang, A., Seleskovic, Z., Lystig, T., Lonn, M., and Stener-Victorin, E. (2007). A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148, 3781-3791.
- Marx, T.L., and Mehta, A.E. (2003). Polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleve Clin J Med* 70, 31-33, 36-41, 45.
- Matsuzawa, Y., Funahashi, T., and Nakamura, T. (2002). Molecular mechanism of vascular disease in metabolic syndrome X. *J Diabetes Complications* 16, 17-18.
- Menzaghi, C., Ercolino, T., Di Paola, R., Berg, A.H., Warram, J.H., Scherer, P.E., Trischitta, V., and Doria, A. (2002). A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51, 2306-2312.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.
- Morales, A.J., Laughlin, G.A., Butzow, T., Maheshwari, H., Baumann, G., and Yen, S.S. (1996). Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2854-2864.
- Morandi, A., Maffeis, C., Lobben, S., Bouatia-Naji, N., Heude, B., Pinelli, L., Meyre, D., and Froguel, P. (2009). Early Detrimental Metabolic Outcomes of rs17300539-A Allele of ADIPOQ Gene Despite Higher Adiponectinemia. *Obesity* (Silver Spring).
- Nacul, A.P., Andrade, C.D., Schwarz, P., de Bittencourt, P.I., Jr., and Spritzer, P.M. (2007). Nitric oxide and fibrinogen in polycystic ovary syndrome: associations with insulin resistance and obesity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 133, 191-196.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry* 120, 803-812.
- NCEP (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285, 2486-2497.

Nelson, J.F., Karelus, K., Bergman, M.D., and Felicio, L.S. (1995). Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiology of aging* 16, 837-843; discussion 855-836.

Nishizawa, H., Shimomura, I., Kishida, K., Maeda, N., Kuriyama, H., Nagaretani, H., Matsuda, M., Kondo, H., Furuyama, N., Kihara, S., *et al.* (2002). Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51, 2734-2741.

Norman, R.J. (2002). Hyperandrogenaemia and the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 191, 113-119.

Norman, R.J., Wu, R., and Stankiewicz, M.T. (2004). 4: Polycystic ovary syndrome. *The Medical journal of Australia* 180, 132-137.

Ortlepp, J.R., Kluge, R., Giesen, K., Plum, L., Radke, P., Hanrath, P., and Joost, H.G. (2000). A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *European journal of clinical investigation* 30, 195-202.

Pagan, Y.L., Srouji, S.S., Jimenez, Y., Emerson, A., Gill, S., and Hall, J.E. (2006). Inverse relationship between luteinizing hormone and body mass index in polycystic ovarian syndrome: investigation of hypothalamic and pituitary contributions. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1309-1316.

Panidis, D., Kourtis, A., Kukuvtis, A., Farmakiotis, D., Xita, N., Georgiou, I., and Tsatsoulis, A. (2004). Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of Delta4-androstenedione. *Hum Reprod* 19, 1728-1733.

Pasquali, R., Casimirri, F., Cantobelli, S., Buratti, P., Bortoluzzi, L., Capelli, M., Labate, A.M., and Barbara, L. (1993). Beta-endorphin response to exogenous corticotrophin-releasing hormone in obese women with different patterns of body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17, 593-596.

Perez-Martinez, P., Lopez-Miranda, J., Cruz-Teno, C., Delgado-Lista, J., Jimenez-Gomez, Y., Fernandez, J.M., Gomez, M.J., Marin, C., Perez-Jimenez, F., and Ordovas, J.M. (2008). Adiponectin gene variants are associated with insulin sensitivity in response to dietary fat consumption in Caucasian men. *The Journal of nutrition* 138, 1609-1614.

Petrone, A., Zavarella, S., Caiazzo, A., Leto, G., Spoletini, M., Potenziani, S., Osborn, J., Vania, A., and Buzzetti, R. (2006). The promoter region of the adiponectin gene is a determinant in modulating insulin sensitivity in childhood obesity. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1498-1504.

Pollin, T.I., Tanner, K., O'Connell J, R., Ott, S.H., Damcott, C.M., Shuldiner, A.R., McLenithan, J.C., and Mitchell, B.D. (2005). Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene. *Diabetes* 54, 268-274.

Ravichandran, K.S. (2003). "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* 113, 817-820.

Rotterdam (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 19, 41-47.

Runner, M.N., and Gates, A. (1954). Conception in prepuberal mice following artificially induced ovulation and mating. *Nature* 174, 222-223.

Salehi, M., Bravo-Vera, R., Sheikh, A., Gouller, A., and Poretsky, L. (2004). Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: what is the role of obesity? *Metabolism* 53, 358-376.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.

San Millan, J.L., Corton, M., Villuendas, G., Sancho, J., Peral, B., and Escobar-Morreale, H.F. (2004). Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2640-2646.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 270, 26746-26749.

Shapiro, B.H., Niedermeyer, T.M., and Babalola, G.O. (1989). Serum androgen levels in senescent Cr1:CD-1 (ICR)BR mice: effects of castration and testosterone treatment. *Journal of gerontology* 44, B15-19.

Sikka, P., Gainder, S., Dhaliwal, L.K., Bagga, R., Sialy, R., and Sahdev, S. (2007). Ultrasonography of the ovaries and its correlation with clinical and endocrine parameters in infertile women with PCOS. *International journal of fertility and women's medicine* 52, 41-47.

Spritzer, P.M., Comim, F.V., Capp, E., and D'Avila, A. (2005). Influence of leptin, androgens and insulin sensitivity on increased GH response to clonidine in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res* 37, 94-98.

Spritzer, P.M., Lisboa, K.O., Mattiello, S., and Lhullier, F. (2000). Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52, 587-594.

Spritzer, P.M., Poy, M., Wiltgen, D., Mylius, L.S., and Capp, E. (2001). Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 16, 1340-1346.

Spritzer, P.M., and Wiltgen, D. (2007). [Prevalence of metabolic syndrome in patients of south of Brazil with polycystic ovary syndrome (PCOS)]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 51, 146-147.

Stumvoll, M., Tschrirter, O., Fritsche, A., Staiger, H., Renn, W., Weisser, M., Machicao, F., and Haring, H. (2002). Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 37-41.

Taylor, A.E., McCourt, B., Martin, K.A., Anderson, E.J., Adams, J.M., Schoenfeld, D., and Hall, J.E. (1997). Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2248-2256.

Thorburn, A.W., Holdsworth, A., Proietto, J., and Morahan, G. (2000). Differential and genetically separable associations of leptin with obesity-related traits. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 742-750.

Toscani, M., Migliavacca, R., Sisson de Castro, J.A., and Spritzer, P.M. (2007). Estimation of truncal adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 56, 992-997.

Tsuzaki, K., Kotani, K., Nagai, N., Saiga, K., Sano, Y., Hamada, T., Moritani, T., Yoshimura, M., Egawa, K., Horikawa, C., *et al.* (2009). Adiponectin gene single-nucleotide polymorphisms and treatment response to obesity. *Journal of endocrinological investigation* 32, 395-400.

Ukkola, O., Ravussin, E., Jacobson, P., Sjostrom, L., and Bouchard, C. (2003). Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort. *Metabolism* 52, 881-884.

Vasseur, F., Helbecque, N., Dina, C., Lobbens, S., Delannoy, V., Gaget, S., Boutin, P., Vaxillaire, M., Lepretre, F., Dupont, S., *et al.* (2002). Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 11, 2607-2614.

Vasseur, F., Helbecque, N., Lobbens, S., Vasseur-Delannoy, V., Dina, C., Clement, K., Boutin, P., Kadowaki, T., Scherer, P.E., and Froguel, P. (2005). Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. *Diabetologia* 48, 892-899.

Vernon, R.G., Denis, R.G., and Sorensen, A. (2001). Signals of adiposity. *Domest Anim Endocrinol* 21, 197-214.

Veroni, M.C., Proietto, J., and Larkins, R.G. (1991). Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* 40, 1480-1487.

Vojarova de Courten, B., Hanson, R.L., Funahashi, T., Lindsay, R.S., Matsuzawa, Y., Tanaka, S., Thameem, F., Gruber, J.D., Froguel, P., and Wolford, J.K. (2005). Common Polymorphisms in the Adiponectin Gene ACDC Are Not Associated With Diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 54, 284-289.

Waldstreicher, J., Santoro, N.F., Hall, J.E., Filicori, M., and Crowley, W.F., Jr. (1988). Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 165-172.

Wallace, T.M., Levy, J.C., and Matthews, D.R. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27, 1487-1495.

WHO (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 854, 1-452.

Wiltgen, D., Benedetto, I.G., Mastella, L.S., and Spritzer, P.M. (2009). Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 24, 1726-1731.

Wolf, G. (2003). Adiponectin: a regulator of energy homeostasis. *Nutr Rev* 61, 290-292.

Wong, G.W., Wang, J., Hug, C., Tsao, T.S., and Lodish, H.F. (2004). A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10302-10307.

Xita, N., Georgiou, I., Chatzikyriakidou, A., Vounatsou, M., Papassotiriou, G.P., Papassotiriou, I., and Tsatsoulis, A. (2005). Effect of adiponectin gene polymorphisms on

circulating adiponectin and insulin resistance indexes in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical chemistry* 51, 416-423.

Xita, N., Georgiou, I., Tsatsoulis, A., Kourtis, A., Kukuvtis, A., and Panidis, D. (2004). A polymorphism in the resistin gene promoter is associated with body mass index in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 82, 1466-1467.

Yamamoto, Y., Hirose, H., Saito, I., Tomita, M., Taniyama, M., Matsubara, K., Okazaki, Y., Ishii, T., Nishikai, K., and Saruta, T. (2002). Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103, 137-142.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., *et al.* (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine* 8, 1288-1295.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature medicine* 7, 941-946.

Yang, M., Qiu, C.C., Chen, W., Xu, L.L., Yu, M., and Xiang, H.D. (2008). Identification of a regulatory single nucleotide polymorphism in the adiponectin (APM1) gene associated with type 2 diabetes in Han nationality. *Biomed Environ Sci* 21, 454-459.

Yang, W.S., Lee, W.J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C.L., Chen, C.L., Tai, T.Y., and Chuang, L.M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3815-3819.

Yang, W.S., Tsou, P.L., Lee, W.J., Tseng, D.L., Chen, C.L., Peng, C.C., Lee, K.C., Chen, M.J., Huang, C.J., Tai, T.Y., and Chuang, L.M. (2003). Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *J Mol Med* 81, 428-434.

Yoshihara, K., Yahata, T., Kashima, K., Mikami, T., and Tanaka, K. (2009). Association of single nucleotide polymorphisms in adiponectin and its receptor genes with polycystic ovary syndrome. *The Journal of reproductive medicine* 54, 669-674.

Zhang, N., Shi, Y.H., Hao, C.F., Gu, H.F., Li, Y., Zhao, Y.R., Wang, L.C., and Chen, Z.J. (2008). Association of +45G15G(T/G) and +276(G/T) polymorphisms in the ADIPOQ gene with polycystic ovary syndrome among Han Chinese women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 158, 255-260.

Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., Benedetto, F.A., Cutrupi, S., Parlongo, S., Malatino, L.S., Bonanno, G., Seminara, G., Rapisarda, F., *et al.* (2002). Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 134-141.