

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES CODIFICADORES DAS
ENZIMAS 17 β HSD5 E AROMATASE EM MULHERES COM DIFERENTES
FENÓTIPOS DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS E RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ANTICONCEPCIONAL ORAL**

Polyana Sartori Maier

Orientadora: Prof^a Dr^a Poli Mara Spritzer

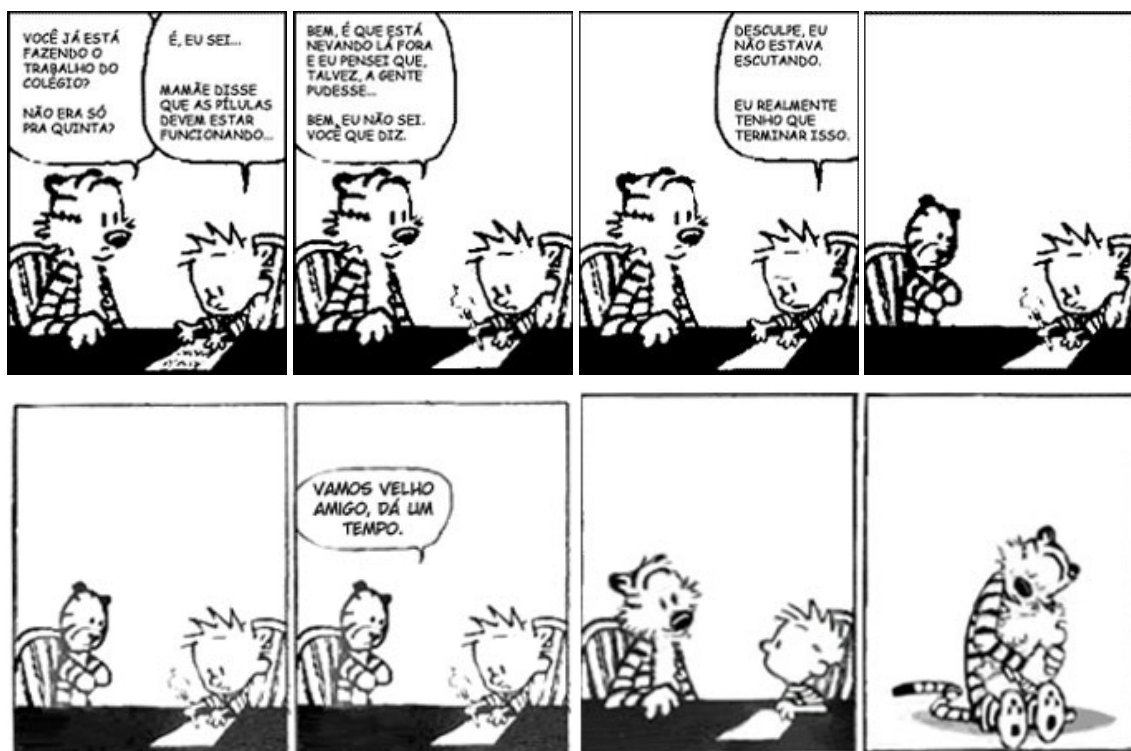
Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia como requisito parcial para a
obtenção do grau de doutor.

Porto Alegre, abril de 2012

"We all have dreams. But in order to make dreams come into reality, it takes an awful lot of determination, dedication, self-discipline, and effort."

Jesse Owens, corredor americano, medalhista de ouro nos Jogos Olímpicos de 1936.

AGRADECIMENTOS



À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por proporcionar o ensino de qualidade através do excelente corpo docente.

Aos colegas do PPG Fisiologia e do PPG Endocrinologia do HCPA, pelo intercâmbio de conhecimentos que me fizeram reconhecer a grandiosidade das áreas de atuação na pesquisa.

A todos os colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica e do Laboratório de Endocrinologia Molecular, pela oportunidade de conhecer o trabalho dos mais diversos profissionais e a importância da contribuição de cada um para o andamento de projetos multidisciplinares.

À Profª Poli Mara, pelos ensinamentos ao longo dos anos e pelo exemplo de dedicação, ética profissional e busca incansável pelo conhecimento.

À Míriam Sant'Helena e à Natália Goulart, pela ajuda sempre disposta com a burocracia que a pesquisa demanda.

Aos colegas Betânia Rodrigues, Ramon Bossardi e Débora Morsch, pela agradável convivência no laboratório e pela disposição na discussão dos protocolos e testes na bancada.

Um agradecimento especial às queridas amigas Fernanda Missio, Sheila Lecke, Simone Radavelli Bagatini e Mariana Toscani, pelos momentos alegres e importantes de nossas vidas que compartilhamos durante esses anos.

Aos meus pais, Osmar e Ana e à minha irmã Letícia, pelo incentivo, carinho, amizade, compreensão e por sempre enaltecereem a importância de seguir em frente.

Ao meu esposo Rafael, pela simplicidade com que me ensina a encarar as adversidades.

RESUMO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é a endocrinopatia mais frequente em mulheres na idade reprodutiva, além de ser a causa mais comum de hiperandrogenismo e anovulação crônica. Diferentes fenótipos da PCOS foram identificados, e um melhor entendimento dessas diferentes apresentações clínicas se faz necessário para o reconhecimento de riscos, medidas preventivas e terapêuticas específicas para cada fenótipo. Associações entre polimorfismos de substituição de um único nucleotídeo (SNPs) em genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo androgênico e PCOS foram descritos. O anticoncepcional oral (ACO) é utilizado para o tratamento de mulheres com PCOS por seu efeito supressivo na secreção de androgênios ovarianos e melhora do hirsutismo. Entretanto, os dados na literatura são conflitantes quanto aos efeitos do ACO nos parâmetros metabólicos de mulheres com PCOS. Além disso, não está bem estabelecido se a presença de alelos polimórficos está associada com diferenças nos fenótipos da PCOS e se pode influenciar na resposta ao tratamento com ACO. Os objetivos desta tese foram investigar a influência dos SNPs -71 AG no gene *AKR1C3* e SNP50 no gene *CYP19* gene (substituição de G por A) na resposta de mulheres com PCOS ao tratamento com ACO e verificar se o SNP50 está associado com fenótipos da PCOS. Cento e sessenta e duas mulheres com PCOS foram estratificadas em PCOS clássicas (hiperandrogenismo e disfunção ovulatória, c-PCOS) e PCOS ovulatórias (hiperandrogenismo, ciclos ovulatórios, aparência policística dos ovários, ov-PCOS) e uma subamostra de 51 mulheres (que não apresentavam resistência insulínica evidente) completaram 6 meses de tratamento com ACO (20 ug etinilestradiol e 75 ug gestodeno, 21/28 dias por ciclo). A presença ou ausência dos alelos polimórficos foram consideradas para expressar os resultados que avaliaram os SNPs -71 AG e SNP50. O escore de hirsutismo foi similar em c-PCOS e ov-PCOS, e as diferenças nos parâmetros hormonais e metabólicos observadas foram independentes da presença do alelo A do SNP50. Após os 6 meses de tratamento com ACO, como era esperado, os níveis de testosterona total e o escore clínico de hirsutismo diminuíram, enquanto os níveis da globulina carreadora de hormônios sexuais aumentaram. Houve uma pequena redução da pressão arterial sistólica e do hormônio luteinizante. As medidas de insulina e do índice HOMA permaneceram inalteradas após o tratamento. Houve um aumento dos níveis de lipídios, mas os valores permaneceram dentro dos limites da normalidade. Nenhuma das alterações observadas esteve associada com a presença dos alelos polimórficos dos SNPs -71 AG ou SNP50. As conclusões são de que o ACO é uma alternativa eficaz para o tratamento dos sintomas do hiperandrogenismo, sem comprometimento dos parâmetros metabólicos, pelo menos naquelas mulheres sem resistência insulínica prévia ao tratamento. Os SNPs -71AG no gene *AKR1C3* e SNP50 no gene *CYP19* não contribuem para as melhoras observadas com o uso do ACO. Além disso, o SNP50 parece não estar associado com as diferenças existentes entre os fenótipos clássico e ovulatório da PCOS.

Palavras-chave: Síndrome dos Ovários Policísticos, anticoncepcional oral, 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase, aromatase, polimorfismos.

ABSTRACT

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women at reproductive age, and also the most common cause of hyperandrogenism and chronic anovulation. Different phenotypes of PCOS have been identified, and a better knowledge of these clinical symptoms is necessary to recognize risks, prevention, and treatment strategies for each phenotype. Associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that codify enzymes responsible for the androgenic metabolism and PCOS have been described. The oral contraceptive pill (OCP) is used to treat women with PCOS due to the suppressive effect on ovarian androgen secretion, with consequent amelioration of hirsutism. However, data are conflicting in literature regarding the effects of OCP on metabolic variables in PCOS. Besides that, it is not well established whether the presence of polymorphic alleles is associated with PCOS phenotypes and whether can influence on the response to OCP treatment. The aims of this thesis were to investigate the influence of the SNPs -71 AG at *AKR1C3* gene and SNP50 of *CYP19* gene (G to A substitution) on the response of PCOS to treatment with oral contraceptive pills and to assess whether the SNP50 is associated with PCOS phenotypes. A hundred sixty two hirsute women were stratified into a classic PCOS group (hyperandrogenism and ovulatory dysfunction, c-PCOS) and an ovulatory PCOS group (hyperandrogenism, ovulatory cycles, polycystic ovaries, ov-PCOS), and a subsample of 51 women (without evidences of insulin resistance) completed a 6-month OCP trial (20 ug ethinylestradiol plus 75 ug gestodene, 21/28 days per cycle). We considered the presence or absence of the polymorphic alleles to express results and to perform the comparisons regarding the SNPs -71 AG and SNP50. Hirsutism score was similar in c-PCOS and ov-PCOS, and the differences in hormone and metabolic variables between phenotypes were independent of the presence of allele A for SNP50. After 6 months of OCP treatment, as expected, total testosterone and hirsutism score declined, while sex hormone binding globulin increased. There was a slight reduction in systolic blood pressure and luteinizing hormone levels. Insulin and homeostasis model assessment remained unchanged after treatment. There was an increase in lipids, but the values remained at the normal range. None of these changes were associated with the presence of polymorphic alleles for -71 AG or SNP50 polymorphisms. We conclude that OCP is an alternative to ameliorate androgenic symptoms without compromising metabolic parameters, at least in women without insulin resistance before treatment. The -71AG SNP of *AKR1C3* gene and the SNP50 of *CYP19* gene did not contribute to the improvements observed. Besides that, SNP50 may not be associated to the existing differences between classic and ovulatory PCOS phenotypes.

Key words: Polycystic Ovary Syndrome, oral contraceptive pill, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, aromatase, polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção ovariana de androgênios na Síndrome dos Ovários Policísticos.....	13
Figura 2	Guia ilustrado para mensuração do escore clínico de hirsutismo.....	27
Figura 3	Fluxograma das pacientes participantes da etapa de tratamento com anticoncepcional oral.....	31
Figura 4	Anelamento específico e emissão de fluorescência de sondas marcadas com fluoróforos VIC [®] e FAM [®] em um ensaio de discriminação alélica.....	33
Figura 5	Genotipagem do polimorfismo -71AG do gene <i>AKR1C3</i> em PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	35
Figura 6	Genotipagem do polimorfismo SNP50 do gene <i>CYP19</i> em PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Imunoensaios realizados pela Unidade de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e valores de referência para mulheres na idade reprodutiva.....	29
Tabela 2	Sequências dos <i>primers</i> e sondas utilizados para o estudo dos polimorfismos -71AG do gene <i>AKR1C3</i> e SNP50 do gene <i>CYP19</i>	34
Tabela 3	Condições de amplificação para o ensaio de discriminação alélica dos polimorfismos -71AG do gene <i>AKR1C3</i> e SNP50 do gene codificador da aromatase em PCR em tempo real.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

17 β HSD	17 β -hidroxiesteróide desidrogenase
17 β HSD5	17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5
ACO	anticoncepcional oral
c-PCOS	PCOS clássicas
CT	colesterol total
DHEAS	sulfato de dehidroepiandrosterona
FSH	hormônio folículo-estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HOMA	<i>homeostatic model assessment index</i> , modelo de avaliação da homeostase
IAL	índice de androgênios livres
LH	hormônio luteinizante
ov-PCOS	PCOS ovulatórias
PCOS	Síndrome dos Ovários Policísticos
PCR	reação em cadeia da polimerase
SHBG	globulina carreadora de hormônios sexuais
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de troca de um único nucleotídeo
TT	testosterona total
UEG	Unidade de Endocrinologia Ginecológica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)	10
1.2 Anticoncepcionais orais (ACO).....	14
1.3 Aspectos genéticos da PCOS	16
1.3.1 <i>17β-hidroxiesteróide desidrogenases</i>	17
1.3.2 <i>Aromatase</i>	19
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
4.1 Delineamento.....	25
4.2 População	25
4.3 Avaliação clínica	26
4.4 Avaliação laboratorial	27
4.5 Tratamento hormonal	30
4.6 Avaliação molecular.....	31
4.6.1 <i>Extração do DNA genômico</i>	31
4.6.2 <i>Discriminação alélica</i>	32
4.7 Análise Estatística	36
4.8 Considerações Éticas	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Artigo I: <i>17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71 A/G HSD17B5 SNP) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities.</i>	39
5.2 Artigo II: <i>Aromatase gene polymorphism does not influence clinical phenotype and response to oral contraceptive pills in PCOS women.</i>	45
6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	66
7 PERSPECTIVAS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS)

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é a endocrinopatia mais comum em mulheres na idade reprodutiva, e também a causa mais frequente de hiperandrogenismo e oligo-anovulação. A PCOS possui apresentação clínica heterogênea, em consequência de alterações nas funções metabólicas, reprodutivas e endócrinas das mulheres afetadas. Estima-se que 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva sejam portadoras de PCOS (Balen, 2004; Ehrmann, 2005; Spritzer e Wiltgen, 2007). Além de sintomas como anovulação crônica, distúrbio menstrual e manifestações do excesso de androgênios, a síndrome está associada com resistência insulínica, obesidade e maior risco para desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemia (Hart et al., 2004; Wiltgen e Spritzer, 2010).

A PCOS foi inicialmente descrita em 1935 por Stein e Leventhal (Stein e Leventhal, 1935) como uma tríade de disfunção menstrual, alterações morfológicas ovarianas e hiperandrogenismo. Atualmente, as recomendações da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia e da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, reunidas no Consenso de Rotterdam (2004), indicam que o diagnóstico de PCOS é definido quando pelo menos dois dos seguintes itens estão presentes:

- I) Oligo-ovulação ou anovulação;
- II) Hiperandrogenismo bioquímico ou clínico;
- III) Ovários policísticos.

Além disso, devem ser excluídas outras condições clínicas que possam causar irregularidade menstrual ou hiperandrogenismo (Síndrome de Cushing, hiperplasia adrenal congênita, hiperprolactinemia e tumores secretores de androgênios).

A PCOS pode se manifestar através de uma grande variabilidade de sintomas, e diferentes conjuntos de características da doença foram sendo identificados e referidos como “fenótipos”, de acordo com os critérios propostos pelo Consenso de Rotterdam (2004). O fenótipo mais comum da PCOS é o denominado “clássico”, e inclui mulheres com hiperandrogenismo clínico e bioquímico, além de disfunção ovulatória. Já o fenótipo “ovulatório” é menos frequente e é caracterizado pela presença de hirsutismo, aparência policística dos ovários e função ovulatória normal nas mulheres portadoras (Carmina et al., 2005; Azziz et al., 2009; Moran e Teede, 2009; Wiltgen e Spritzer, 2010; Yilmaz et al., 2011).

O melhor entendimento desses fenótipos é necessário para identificação dos riscos específicos inerentes a cada conjunto de sintomas. Além disso, as estratégias de tratamento podem ser individualizadas de acordo com o fenótipo de PCOS apresentado pela paciente, resultando em melhorias mais notórias dos sintomas ao longo do acompanhamento clínico. Alguns autores indicam que as PCOS ovulatórias possuem manifestações mais amenas da síndrome, e conseqüentemente os riscos metabólicos e cardiovasculares não são os mesmos apresentados pelas PCOS clássicas (Carmina et al., 2005; Wiltgen e Spritzer, 2010; Yilmaz et al., 2011). Segundo Shroff e colaboradores, o risco de desenvolver a síndrome metabólica varia entre os fenótipos de PCOS, sendo mais prevalente em mulheres com os sintomas clássicos da doença (Shroff et al., 2007). Wiltgen e Spritzer (2010) verificaram que PCOS clássicas possuem pior perfil metabólico e de resistência insulínica do que PCOS ovulatórias. Outra observação interessante é a de que, apesar do fenótipo de PCOS ovulatório ser caracterizado por níveis normais de androgênios, os valores obtidos para os níveis séricos de testosterona total encontram-se no limite superior do intervalo considerado como normal para

mulheres (Wiltgen e Spritzer, 2010). Entretanto, se sugere que as alterações metabólicas em PCOS ovulatórias sejam mais bem explicadas pela adiposidade central dessas mulheres do que pela apresentação de características que as diferem do fenótipo clássico da doença (Moran e Teede, 2009).

Embora a etiopatogenia da PCOS não esteja totalmente esclarecida, alguns mecanismos fisiopatológicos são reconhecidos: aumento da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequente alteração na secreção das gonadotrofinas, secreção acíclica de androgênios ovarianos, resistência insulínica com hiperinsulinemia compensatória e redução da produção da globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG) (Spritzer, 2002).

O hormônio luteinizante (LH) regula a síntese de androgênios nas células da teca do ovário, enquanto o hormônio folículo estimulante (FSH) influencia a quantidade de estrogênio que será produzida pelas células da granulosa a partir dos precursores androgênicos. Quando a relação LH/FSH está elevada, os ovários sintetizam preferencialmente androgênios. A liberação de LH e FSH é regulada pela pulsatilidade do GnRH, e essa liberação de GnRH parece estar desregulada na PCOS (Figura 1). Quando a secreção de GnRH se intensifica, há a estimulação da transcrição da subunidade- β do LH em detrimento da produção da subunidade- β do FSH. Não é evidente se a alteração da pulsatilidade do GnRH ocorreu por alterações intrínsecas ou se foi devido à redução do *feedback* negativo na secreção de LH (causada pelo excesso de androgênios que surgiu primariamente pelo desenvolvimento de ciclos irregulares nessas mulheres) (Ehrmann, 2005; Goodarzi et al., 2011). Assim, o excesso de androgênios produzido pelos ovários impede o desenvolvimento do folículo dominante, que ocorre normalmente a cada ciclo menstrual. As consequências desses eventos são a irregularidade menstrual, a anovulação e o acúmulo de pequenos folículos na periferia do ovário, conferindo a aparência policística (Goodarzi et al., 2011). A insulina interfere diretamente na produção ovariana de androgênios, agindo em sinergia com o LH na estimulação das células da teca. Pode ocorrer também a ação indireta da insulina, que se dá pela inibição da produção hepática da SHBG (proteína que atua como um sistema tampão, limitando a disponibilidade dos esteróides) (Hoffmann, 2001). Assim, ocorre um aumento na proporção de testosterona que circula não-ligada e biologicamente disponível (Ehrmann, 2005).

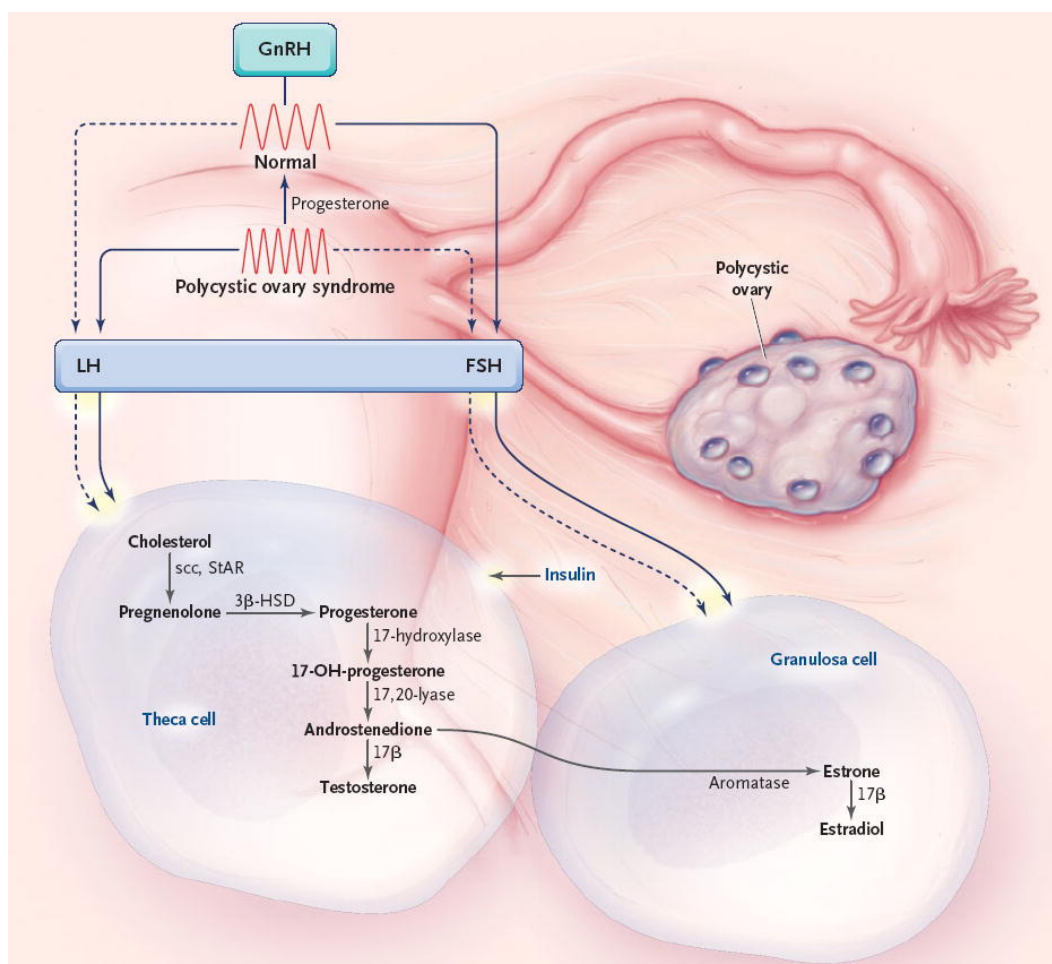


Figura 1. Produção ovariana de androgênios na Síndrome dos Ovários Policísticos (Ehrmann, 2005).

O hiperandrogenismo das pacientes pode ser verificado por dosagens bioquímicas e/ou características clínicas. Através de dosagens bioquímicas, o excesso de androgênios pode ser constatado por medidas séricas de testosterona total (TT) e pelo cálculo do índice de androgênios livres (IAL), que considera as dosagens de TT e SHBG e representa a fração do hormônio que está biologicamente disponível. Clinicamente, o hiperandrogenismo é diagnosticado pela presença de manifestações cutâneas típicas do excesso de androgênios, como hirsutismo (crescimento de pelos pigmentados no corpo e na face), acne ou alopecia (perda de cabelo na região do escalpo).

O hirsutismo é definido como o crescimento de pelos de acordo com o padrão masculino de distribuição, e é o sintoma clínico mais frequente do hiperandrogenismo, presente em aproximadamente 70% das mulheres com PCOS (Vermeulen et al., 1999; Chang et al., 2005; Norman et al., 2007; Azziz et al., 2009). Essa manifestação clínica também afeta psicossocialmente a qualidade de vida das mulheres portadoras: foi observado um aumento no risco de desenvolvimento de depressão (Hollinrake et al., 2007) e de distúrbios de humor e ansiedade nas pacientes (Kerchner et al., 2009). O excesso de androgênios tem influência direta no desenvolvimento do hirsutismo, já que esses hormônios estimulam folículos pilosos produtores de pelos do tipo *vellus* (finos, praticamente despigmentados) a se transformarem em pelos terminais (maiores, mais grossos e pigmentados) (Randall, 2007).

A PCOS é um distúrbio associado tanto com alterações reprodutivas como metabólicas das mulheres afetadas. Cerca de 50% a 70% das mulheres com PCOS possuem resistência insulínica, que resulta em um aumento compensatório da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas para manutenção da homeostase da glicose. Como visto anteriormente, a insulina estimula a produção ovariana de androgênios, mas também pode agir na estimulação da lipólise e produção de ácidos graxos (Teede et al., 2007; Azziz et al., 2009). Assim, a resistência insulínica parece ser a chave para o desenvolvimento de comorbidades associadas à PCOS, como tolerância diminuída à glicose, dislipidemia, doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (Spritzer e Wiltgen, 2007; Teede et al., 2007).

1.2 Anticoncepcionais orais (ACO)

A prescrição de anticoncepcionais orais combinados (ACO), contendo estrogênio e progesterona, tem sido uma alternativa eficaz de tratamento para a PCOS, visto que o uso desse medicamento induz a melhora de vários sintomas da doença. O estrogênio presente no ACO inibe a produção de LH, e conseqüentemente a produção ovariana de androgênios. Além disso, ocorre um aumento na produção de SHBG e uma redução da quantidade de androgênio biologicamente disponível (Ehrmann, 2005; Fauser et al., 2011). A escolha do

progestogênio do ACO também é importante, já que alguns competem pela ligação com o receptor de androgênios (Badawy e Elnashar, 2011; Saha et al., 2011). Além dessas vantagens, o ACO induz a regulação dos ciclos menstruais e promove a contracepção (Vrbikova e Cibula, 2005; Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Fauser et al., 2011).

O primeiro estudo a observar a influência do tratamento com ACO na sensibilidade à insulina data de 1987, em que se demonstrou um aumento da resistência insulínica em mulheres saudáveis após 6 meses de tratamento (Skouby et al., 1987). Os efeitos colaterais do uso prolongado de ACO no perfil metabólico das pacientes com PCOS também têm sido amplamente discutidos na literatura científica, já que essas mulheres possuem maior propensão a desenvolverem obesidade, diabetes e síndrome metabólica (Spritzer e Wiltgen, 2007; Halperin et al., 2011; Saha et al., 2011). Em mulheres saudáveis, se observou que o tratamento com ACO diminui a sensibilidade à insulina e altera o perfil lipídico, mas essas alterações não conferem riscos para o desenvolvimento de diabetes ou doenças cardiovasculares (Vrbikova e Cibula, 2005). Na população em geral, o uso de ACO tem mínimo impacto clínico no metabolismo de mulheres sem diabetes ou outras complicações metabólicas (Kim et al., 2002; Lopez et al., 2009).

Os estudos sobre alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios em PCOS e o uso do ACO revelam dados conflitantes, retratando tanto a melhora nos parâmetros (Escobar-Morreale et al., 2000; Cagnacci et al., 2003) como a piora dos mesmos (Ludicke et al., 2002; Cagnacci et al., 2003; Mastorakos et al., 2006; Meyer et al., 2007). Outros autores não observaram alterações metabólicas significativas nas pacientes após o tratamento (Cibula et al., 2002). Uma metanálise recente (2011) sugere que o uso de ACO não está relacionado com alterações nos níveis de glicose, insulina, colesterol total e colesterol LDL. Entretanto, foram encontradas associações com aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol HDL (Halperin et al., 2011). Algumas limitações dos estudos avaliados e que podem ter gerado resultados conflitantes são a variedade na composição dos ACOs utilizados e os diferentes tempos de tratamento e de métodos de medidas das variáveis estudadas (Fauser et al., 2011).

1.3 Aspectos genéticos da PCOS

O primeiro estudo que sugere um componente genético na PCOS data de 1968. Cooper e colaboradores estudaram pacientes com oligomenorreia e hirsutismo e observaram que a aparência policística dos ovários era mais frequente nas irmãs dessas pacientes do que em mulheres não relacionadas (Cooper et al., 1968). A partir de então, as evidências de que a PCOS é influenciada por fatores genéticos foram reforçadas pelos estudos familiares subsequentes. Ferriman e Purdie (1979) estudaram mulheres hirsutas e verificaram que a prevalência de hirsutismo e infertilidade era maior nas familiares de primeiro grau do que em um grupo controle (Ferriman e Purdie, 1979). Outro estudo verificou que apenas 6-15% das familiares de mulheres com hirsutismo e oligomenorreia estudadas também apresentavam essas características (Lunde et al., 1989). Mais recentemente, se observou que aproximadamente 35% das mães e 40% das irmãs de mulheres com PCOS também são afetadas (Kahsar-Miller et al., 2001).

Apesar dos estudos familiares serem um indicativo do expressivo componente genético que determina a PCOS, a identificação de genes candidatos a terem influência na síndrome permanece inconclusiva na literatura (Diamanti-Kandarakis et al., 2006; Deligeoroglou et al., 2009; Goodarzi et al., 2011). A heterogeneidade de sintomas que as mulheres com PCOS podem apresentar, a possibilidade de variação de sintomas ao longo da vida da paciente e o fato de que a síndrome só se expressa clinicamente durante a idade reprodutiva das mulheres estão entre os fatores que dificultam a identificação das variantes genéticas associadas à PCOS (Diamanti-Kandarakis e Piperi, 2005).

Devido à alta prevalência de mulheres afetadas e à grande variação dos sintomas que envolvem a PCOS, a síndrome parece ser melhor explicada pela interação de genes com fatores ambientais (Diamanti-Kandarakis e Piperi, 2005; Franks, 2006; Deligeoroglou et al., 2009). Provavelmente o padrão de herança de PCOS é do tipo complexo, em que várias alterações genéticas estão presentes e contribuem apenas moderadamente para o desenvolvimento dos sintomas (Goodarzi et al., 2011).

Atualmente, estudos de associação têm sido bastante utilizados para verificar a influência genética na PCOS. Através desse método, indivíduos afetados e não

afetados são comparados e verifica-se se a frequência de ocorrência de um alelo em particular difere entre os grupos. Normalmente são considerados os alelos de um gene que sabidamente tenha significância biológica para a doença em estudo (Diamanti-Kandarakis et al., 2006). Como o hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico é uma característica frequente entre os fenótipos de PCOS, genes envolvidos na biossíntese de androgênios têm sido frequentemente investigados em busca de possíveis associações com essa síndrome.

Single nucleotide polymorphism (SNPs – polimorfismos de troca de um único nucleotídeo) estão entre variações genéticas mais abundantes no genoma humano. Um SNP é uma variação entre indivíduos de apenas uma base em determinada região da sequência de DNA. Em geral, os SNPs são bialélicos, ou seja, há apenas duas possibilidades de alelos e conseqüentemente três possibilidades de genótipos (Butler, 2005).

1.3.1 17 β -hidroxiesteróide desidrogenases

As enzimas 17 β -hidroxiesteróide-desidrogenases (17 β HSDs) são oxidoreductases responsáveis pelo último passo na formação de androgênios e estrogênios nos órgãos clássicos e tecidos periféricos. Catorze tipos de 17 β HSDs foram identificadas em mamíferos e nomeadas de 1 até 14, conforme a ordem cronológica da descrição da estrutura (Labrie et al., 1997; Marchais-Oberwinkler et al., 2011). A diferença entre os subtipos está na distribuição tecidual, na localização celular e na ação catalítica (oxidação ou redução) (Moeller e Adamski, 2009).

A conversão de estrona em estradiol, de androstenediona em testosterona e de dehidroepiandrosterona em androstenediol, além das respectivas reações reversas, são catalizadas por 17 β HSDs. Apesar dos subtipos da enzima catalisarem substratos com estrutura similar, pouca homologia é verificada nos diferentes tipos da enzima (Luu-The, 2001; Marchais-Oberwinkler et al., 2011). Conforme citado anteriormente, a atividade das 17 β HSDs não está presente somente em órgãos esteroidogênicos clássicos (placenta, ovários e testículos), mas também é verificada em tecidos periféricos como tecido adiposo, endométrio, fígado, pulmão, pele, mucosa vaginal e células cancerosas (revisado em (Luu-The, 2001).

A 17 β HSD tipo 5 (17 β HSD5) possui atividade “androgênica”, isto é, catalisa preferencialmente a redução de androstenediona em testosterona. Foi inicialmente clonada de células prostáticas humanas (Lin et al., 1997), é amplamente expressa nos ovários (Qin e Rosenfield, 2000) e possui papel bastante importante na biossíntese de androgênios nas mulheres (Qin e Rosenfield, 2005). A proteína 17 β HSD5 é membro da família aldo-ceto redutase (ARK), sendo a única entre as 17 β HSDs a pertencer a essa família (as demais fazem parte da família proteica de desidrogenases/redutases de cadeia curta – SDR) (Marchais-Oberwinkler et al., 2011). O gene que codifica a 17 β HSD5 (gene *AKR1C3*) está localizado no cromossomo 10p14,15, possui nove éxons e uma região promotora rica em G, e não possui regiões TATA ou CAAT comumente encontradas em promotores (Qin e Rosenfield, 2005). Dada a importância que a 17 β HSD5 representa no balanço androgênico, variantes genéticas no gene codificador dessa enzima têm despertado o interesse de pesquisadores na busca da elucidação das bases genéticas de doenças relacionadas com o hiperandrogenismo, como a PCOS.

Qin e pesquisadores, ao analisar a sequência do promotor do gene *AKR1C3* de uma paciente com hipertricose, descobriram a existência da substituição de uma adenina por uma guanina a 71 pares de bases do sítio de início da transcrição do gene (-71A>G). Ao comparar as frequências genotípicas da variante em mulheres com e sem PCOS, o mesmo estudo mostrou que o alelo G é mais frequente nas pacientes com PCOS, e que a variante se trata de um SNP. Além disso, o genótipo GG parece contribuir com até 20% nos níveis de testosterona dessas mulheres (Qin et al., 2006). O SNP -71AG do gene *AKR1C3* está registrado sob o código rs3763676 no banco de dados dbSNP *Short Genetic Variations* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). A nomenclatura utilizada nesta tese para este polimorfismo (-71AG) está de acordo com a que foi inicialmente proposta por Qin e colaboradores (Qin et al., 2006).

A região do polimorfismo -71AG está próxima à região de ligação dos fatores de transcrição Sp1/Sp3. Experimentos com células da teca de ratas indicaram que as células que apresentavam o alelo -71G possuíam aumento da atividade de transcrição do promotor, por aumento da afinidade das proteínas Sp1/Sp3. Apesar de significativo, esse aumento foi apenas modesto (Qin et al., 2006). Assim, é de se

esperar que a presença do alelo -71G leve a aumentos dos níveis de mRNA e da proteína 17 β HSD5 e, conseqüentemente, da biossíntese de testosterona.

Petry e colaboradores testaram a relevância clínica previamente descrita do polimorfismo -71AG do gene *AKR1C3* em uma amostra de meninas com pubarca precoce (PP). Entretanto, não foram encontradas associações deste polimorfismo com PP, com características clínicas de hiperandrogenismo (acne e hirsutismo), ou com concentrações séricas de testosterona (Petry et al., 2007). A associação do SNP -71AG com PCOS e com níveis de testosterona não foi confirmada quando uma amostra maior de caucasianas foi genotipada (Goodarzi et al., 2008). Apesar de também não terem encontrado diferenças na frequência genotípica do SNP -71AG entre mulheres com PCOS e controles, Marioli e pesquisadores mostraram que a presença da variante genética está associada com maiores níveis de testosterona (Marioli et al., 2008). Entretanto, o alelo G mostrou-se raro quando o SNP foi estudado em uma amostra de mulheres chinesas com e sem PCOS (Ke et al., 2010).

1.3.2 Aromatase

A aromatase é a enzima responsável pela biossíntese de estrogênio, catalisando a desaturação do anel "A" esteróide. Através de reações consecutivas de hidroxilação, ocorre a conversão de compostos de 19 carbonos (androgênios) em metabólitos de 18 carbonos (estrogênios) (Chen *et al.*, 2002). Em humanos, vários tecidos têm a capacidade de expressar aromatase: ovários (células da granulosa e corpo lúteo), testículos (células de Sertoli, de Leydig e germinativas), placenta, fígado (somente fetal), tecido adiposo, pele, ossos (condrócitos e osteoblastos), células endoteliais e de músculo liso. Além disso, a biossíntese de estrogênio ocorre em várias regiões do cérebro, incluindo áreas do hipotálamo, sistema límbico e córtex cerebral (Simpson et al., 2002; Mendelson et al., 2005).

O gene *CYP19*, que está localizado no cromossomo 15 (15q21.1) e contém a sequência codificadora da aromatase, é composto por 34 kb correspondendo à região codificadora (éxons II a X) e 96 kb (éxon I) representando a porção regulatória. Essa região regulatória de tamanho incomum contém 10 promotores tecido-específicos que são utilizados alternativamente em vários tipos celulares.

Apesar de cada tecido expressar um único éxon I não-traduzido, a região codificadora da aromatase inicia no éxon II, permitindo que a proteína seja idêntica em todas as células em que é expressa (Simpson et al., 2002; Bulun et al., 2003; Mendelson et al., 2005).

Alguns autores propõem que o desenvolvimento da PCOS pode ser explicado pela redução da atividade da aromatase, favorecendo a deposição androgênica (Grumbach e Auchus, 1999; Gabrilove, 2002). Primatas desenvolveram cistos nos ovários após administração de inibidores da aromatase (Shetty et al., 1997), e camundongos *knockout* para o gene *CYP19* apresentaram níveis elevados de androgênios, obesidade abdominal e resistência insulínica (Jones et al., 2000). Essas evidências são ressaltadas por estudos que indicam que mulheres portadoras de mutações no gene *CYP19* que conferem perda de função desenvolvem características típicas de PCOS, como amenorreia e cistos nos ovários (Ito et al., 1993; Belgorosky et al., 2003).

Vários polimorfismos foram detectados no gene *CYP19*, e essas alterações podem ser responsáveis por diferenças qualitativas ou quantitativas da expressão gênica ou da atividade da aromatase (Gennari et al., 2004). Haiman e colaboradores descreveram 74 variantes genéticas comuns no gene codificador da aromatase (Haiman et al., 2003). Entre os SNPs estudados, destaca-se o SNP50, uma troca de G por A localizada no íntron 2, registrado sob o código rs2414096 no banco de dados dbSNP *Short Genetic Variations* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). A nomenclatura utilizada nesta tese para este polimorfismo (SNP50) está de acordo com a que foi inicialmente proposta por Haiman e colaboradores (Haiman et al., 2003).

É sabido que as porções intrônicas dos genes possuem sequências específicas para regulação da transcrição e direcionamento do *splicing*, e que esses eventos podem originar diferentes isoformas de mRNAs e conseqüentemente alterar a atividade proteica (Altmae et al., 2009). Em uma população de meninas com puberdade precoce (doença também caracterizada pelo hiperandrogenismo), as pacientes homozigotas para o alelo polimórfico (alelo A) apresentaram níveis mais elevados de testosterona plasmática e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). O mesmo estudo também avaliou mulheres espanholas com alta prevalência de PCOS e mostrou que o SNP50 também está associado com variações nos níveis de testosterona nesse grupo (Petry et al., 2005).

Quando mulheres na premenopausa e na perimenopausa de diferentes etnias foram avaliadas quanto ao SNP50, verificou-se que as frequências genóticas foram diferentes entre os grupos. A frequência do genótipo AA foi menor nas afroamericanas (5%) e nas japonesas (8%), quando comparadas às caucasianas (25%) e às chinesas (24%). As mulheres portadoras do alelo A também apresentaram maiores níveis de testosterona, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (Sowers et al., 2006).

Apenas um grupo de pesquisadores estudou a associação do SNP50 com PCOS. O estudo caso-controle com mulheres chinesas mostrou que a distribuição genotípica era diferente entre controles e PCOS, sugerindo que o polimorfismo pode estar associado à etiopatogenia da síndrome. Entretanto, não foi observada associação entre o SNP50 e níveis de testosterona nessas pacientes com PCOS (Jin et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a PCOS é uma doença multifatorial e provavelmente poligênica, se faz necessário o melhor entendimento das bases genéticas dessa síndrome e da variabilidade na apresentação clínica. O estudo de genes codificadores de enzimas responsáveis pela regulação do metabolismo androgênico parece ser a chave para o esclarecimento da patogenia, sendo que já foram descritas algumas associações de polimorfismos nos genes codificadores da 17β HSD5 e da aromatase com hiperandrogenismo. Entretanto, não é sabido se essas alterações genéticas podem influenciar em uma resposta diferenciada ao tratamento de mulheres com PCOS. Investigações no campo da farmacogenética podem contribuir para a individualização do tratamento e consequente melhora mais eficaz dos sintomas apresentados, que afetam tão profundamente a vida psicossocial dessas mulheres.

Além disso, os dados na literatura sobre o uso de anticoncepcional oral para tratamento da PCOS são conflitantes quanto à segurança do medicamento, já que podem ocorrer alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios. Assim, os baixos riscos já descritos do uso do anticoncepcional em mulheres saudáveis podem não ser aplicados a pacientes com PCOS, que mesmo quando não obesas ou sem alterações metabólicas significativas já possuem predisposição aumentada ao desenvolvimento de resistência insulínica, diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares.

Outrossim, diferenças clínicas existentes entre pacientes com os fenótipos clássico e ovulatório da PCOS são bem conhecidas, e sabe-se que os riscos para as comorbidades associadas à PCOS são diferentes entre as mulheres portadoras de diferentes conjuntos de características da síndrome. Entretanto, não há registros de investigações acerca de polimorfismos ou variações genéticas que possam elucidar porque pacientes com o mesmo diagnóstico desenvolvem manifestações tão distintas.

3 OBJETIVOS

- Verificar os efeitos de anticoncepcional oral no escore clínico de hirsutismo e em variáveis hormonais e metabólicas de um grupo de PCOS sem alterações metabólicas e avaliar se o SNP na posição -71 do gene *AKR1C3* contribui para diferenças na resposta ao tratamento hormonal (Artigo I: *17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71 A/G HSD17B5 SNP) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities*);
- Determinar a distribuição genotípica do SNP50 do gene *CYP19* em PCOS com os fenótipos clássico e ovulatório, verificar se esta variante genética está associada com características clínicas, hormonais e metabólicas dessas mulheres e se a presença do polimorfismo influencia na resposta ao tratamento com anticoncepcional oral (Artigo II: *Aromatase gene polymorphism does not influence clinical phenotype and response to oral contraceptive pills in PCOS women*).

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento

Estudo transversal para avaliação de associação de polimorfismos e características fenotípicas em pacientes com PCOS e ensaio quase-experimental com anticoncepcional em uma sub-amostra destas pacientes.

4.2 População

Cento e sessenta e duas mulheres portadoras de PCOS e com queixas de hirsutismo atendidas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica (UEG), Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). PCOS foi definida de acordo com os critérios de Rotterdam (presença de no mínimo dois dos critérios a seguir): 1) oligo ou anovulação, 2) hiperandrogenismo clínico ou bioquímico, 3) aparência policística dos ovários (2004).

- Critérios de inclusão: pacientes na idade reprodutiva e que não estavam recebendo tratamentos hormonais há pelo menos 3 meses, com função renal e hepática normais.
- Critérios de exclusão: diabetes, presença de tumores ovarianos ou adrenais, Síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, distúrbios de tireóide, hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica, distúrbios de tireóide e gestação.

Para a avaliação de associação de polimorfismos com características clínicas, hormonais e metabólicas, as pacientes foram estratificadas de acordo com o fenótipo de PCOS observado: “PCOS clássicas” (mulheres com hiperandrogenismo e disfunção ovulatória, c-PCOS) ou “PCOS ovulatórias” (mulheres com hiperandrogenismo, ciclos ovulatórios e aparência policística dos ovários, ov-PCOS) (2004; Wiltgen e Spritzer, 2010).

4.3 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada pela equipe médica da UEG/HCPA. A anamnese consistiu de questionamentos sobre história e evolução de sintomas associados à PCOS, ciclos menstruais, história familiar de doenças correlatas e métodos contraceptivos ou medicamentos utilizados previamente. A avaliação antropométrica e o exame físico (medidas de peso, altura, circunferência da cintura, pressão arterial, determinação do escore clínico de hirsutismo e ultrasonografia) foram realizados conforme estudos previamente realizados (Toscani et al., 2007; Wiltgen et al., 2009).

O escore clínico de hirsutismo foi estimado com modificações do originalmente proposto por Ferriman e Gallwey (Ferriman e Gallwey, 1961). Nove áreas do corpo (lábio superior, mento, peito, região dorsal, região lombar, abdômen superior, abdômen inferior, braço e coxa) recebem uma nota de 0 a 4, de acordo com a quantidade de pelos espessos e pigmentados existentes. O escore 0

representa a ausência total de pelos terminais, enquanto a nota 4 indica grande quantidade de pelos com pigmentação escura (Figura 2) (Azziz et al., 2009). O escore clínico de hirsutismo é definido pela soma das notas de cada região analisada. O escore maior ou igual a 8 foi utilizado como ponto de corte para indicar a presença de hirsutismo (Hatch et al., 1981).

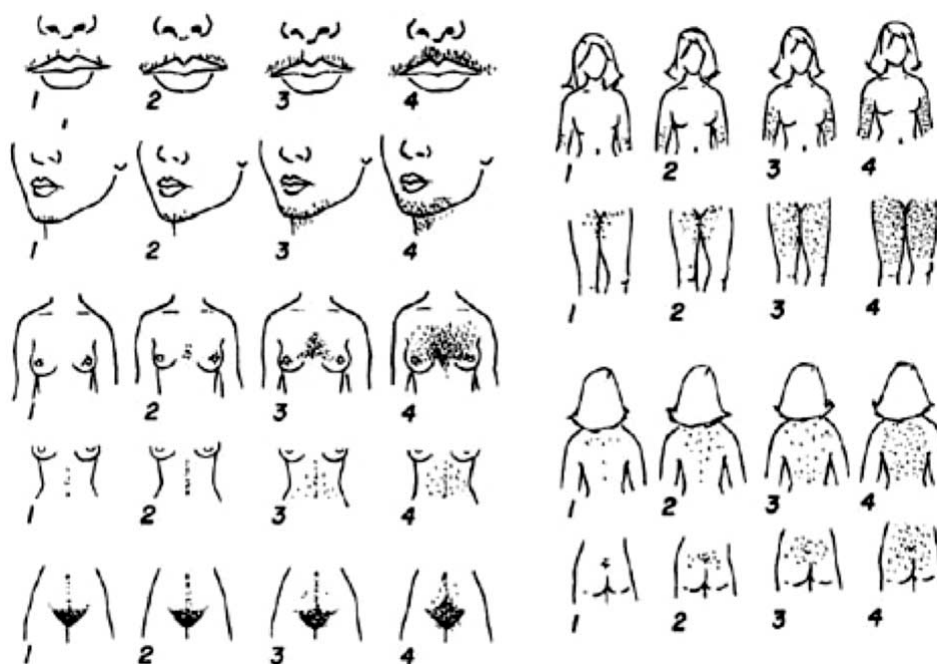


Figura 2. Guia ilustrado para mensuração do escore clínico de hirsutismo (Rosenfield, 1986).

As participantes do estudo foram também submetidas à ultrasonografia transvaginal ou transabdominal. A paciente foi considerada com aparência ecográfica de ovários policísticos quando pelo menos um dos ovários apresentou 12 ou mais folículos e/ou volume superior a 10 mL (Jonard et al., 2003; 2004).

4.4 Avaliação laboratorial

A avaliação laboratorial foi realizada na Unidade de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA. As coletas para os exames hormonais e metabólicos ocorreram entre os dias 2 e 10 do ciclo menstrual (exceto nas mulheres em amenorreia, em que as coletas foram realizadas em qualquer dia do ciclo), entre as

8 e 10 horas da manhã. As coletas de sangue foram realizadas após jejum noturno (12 horas) para determinação de colesterol plasmático total (CT), colesterol HDL, triglicerídeos, glicose, insulina, SHBG, DHEAS, androstenediona, LH e TT. Também foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA.

Os níveis de colesterol-LDL foram estimados indiretamente por meio da Fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972):

$$\text{LDL calculado} = \text{CT} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{5}$$

O IAL foi determinado da seguinte maneira (Blight et al., 1989):

$$\text{IAL} = \frac{\text{TT (nmol/L)}}{\text{SHBG (nmol/L)}} \times 100$$

Já o índice HOMA (*homeostatic model assessment index*) foi calculado de acordo com o estudo de Wallace e colaboradores, de 2004 (Wallace et al., 2004):

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{Glicose (mmol/L)}}{22,5}$$

As dosagens hormonais e metabólicas foram realizadas de acordo com os métodos e equipamentos constantes na Tabela 1, que também apresenta os valores de referência para mulheres na idade reprodutiva. Cabe ressaltar que alguns testes foram utilizados apenas para fins diagnósticos e para avaliação dos critérios de inclusão ou exclusão das participantes, e não foram considerados na análise de resultados.

Tabela 1. Imunoensaios realizados pela Unidade de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e valores de referência para mulheres na idade reprodutiva.

Teste	Método	Equipamento	Valores de referência
17OHP	Radioimunoensaio	-	Fase folicular: 0,1 – 0,8 ng/mL Fase luteal: 0,27 – 2,9 ng/mL Pós ACTH: < 3,2 ng/mL
ACTH	Quimioluminescência	Immulite 2000	< 46,0 pg/mL
Androstenediona	Quimioluminescência	Immulite 2000	0,3 – 3,5 ng/mL
Colesterol HDL	Enzimático Colorimétrico Homogêneo	Advia 1800	Risco baixo: > 60 mg/dL Risco moderado: 35 - 60 mg/dL Risco alto: <35 mg/dL
Colesterol Total	Enzimático Colorimétrico	Advia 1800	Risco baixo: < 200 mg/dL Risco moderado: 200 – 239 mg/dL Risco alto: ≥ 240 mg/dL
Cortisol	Quimioluminescência	Centaur XP	Manhã (entre 7 e 9 h): 4,30 – 22,4 µg/dL
DHEAS	Quimioluminescência	Immulite 2000	35 – 430 ug/dL
Glicose	Enzimático Hexoquinase	Advia 1800	Soro/Plasma: 60 - 100 mg/dL
Insulina	Quimioluminescência	Centaur XP	3,0 – 25,0 µUI/mL
LH	Quimioluminescência	Centaur XP	Fase folicular: 1,9 – 12,5 mUI/mL Pico ovulatório: 8,7 – 76,3 mUI/mL Fase luteal: 0,5 – 16,9 mUI/mL
Progesterona	Quimioluminescência	Centaur XP	Fase folicular: 0,15 – 1,40 ng/mL Fase luteal: 3,34 – 25,56 ng/mL
SHBG	Quimioluminescência	Immulite 2000	18 – 114 nmol/L
TT	Quimioluminescência	Centaur XP	0,14 – 0,76 ng/mL
Triglicerídeos	Enzimático Colorimétrico	Advia 1800	Ótimo: < 150 mg/dL Limítrofe: 150 – 200 mg/dL Alto: 201 – 499 mg/dL Muito alto: ≥ 500 mg/dL
TSH	Quimioluminescência	Centaur XP	0,35 – 5,50 µUI/mL
T4 livre	Quimioluminescência	Centaur XP	0,70 – 1,90 ng/dL

17OHP = 17 alfa hidroxiprogesterona, ACTH = hormônio adrenocorticotrófico, DHEAS = sulfato de dehidroepiandrosterona, LH = hormônio luteinizante, SHBG = globulina carreadora de hormônios sexuais, TT = testosterona total, TSH = tireotrofina.

4.5 Tratamento hormonal

Das participantes do estudo, 58 mulheres sem alterações metabólicas e que concordaram em participar de um ensaio clínico com 6 meses de duração receberam tratamento com ACO para verificar se as variantes genéticas estudadas exerceriam influência na melhora do escore de hirsutismo e dos níveis de androgênios após o uso do medicamento. Sete pacientes não seguiram o tratamento conforme o proposto e foram excluídas das análises. Das 51 mulheres que completaram a etapa de tratamento, 36 eram c-PCOS e 15 foram classificadas como ov-PCOS e os resultados foram analisados agrupando-se estes dois fenótipos (Figura 1).

As pacientes utilizaram ACO contendo 20 µg de etinilestradiol com 75 µg de gestodeno durante 6 ciclos (Femiane[®] Schering-Plough). Em cada ciclo de tratamento, a paciente era orientada a ingerir um comprimido por dia, durante 21 dias consecutivos, sempre no mesmo horário e a realizar um intervalo de 7 dias antes de reiniciar o ACO.

Além do ACO, 32 mulheres com PCOS receberam 100 mg por dia do antiandrogênio espironolactona (Aldactone[®], Pfizer) devido à severidade do hirsutismo apresentado. Essas pacientes foram orientadas a ingerirem o comprimido de espironolactona juntamente com a drágea de ACO, e a realizarem o intervalo de ingestão de ambos os medicamentos conforme descrito no parágrafo anterior.

Após o término dos 6 ciclos de tratamento, foi realizada nova avaliação clínica e laboratorial nessas pacientes. Durante o tratamento com ACO, as pacientes foram orientadas a não modificarem seus hábitos alimentares e de prática de exercícios físicos.

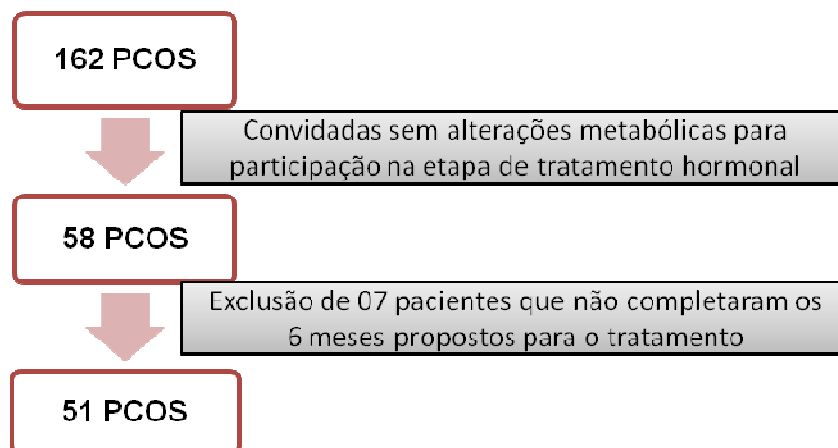


Figura 3. Fluxograma das pacientes participantes da etapa de tratamento com anticoncepcional oral.

4.6 Avaliação molecular

A avaliação molecular foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Molecular do Departamento de Fisiologia/UFRGS, módulo instalado no Serviço de Endocrinologia do HCPA.

4.6.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico (4 mL colhidos em um frasco de vidro contendo ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA) pelo método modificado de *salting out* (Miller et al., 1988). A alíquota de sangue era transferida para um tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL de volume e adicionava-se 8 mL de uma solução para lise de hemáceas (NH_4Cl 144 mM, NH_4HCO_3 1 mM). Após repouso por 30 minutos a 4°C, a amostra era centrifugada por 15 minutos a 5000 g e posteriormente o sobrenadante era descartado. Esse procedimento de lavagem e centrifugação com a solução de lise de hemáceas era repetido até que todo o pigmento vermelho fosse eliminado da amostra. Após essa etapa, adicionava-se 2,4 mL de uma solução para lise de leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0) juntamente com 48 μL de

dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) e 40 µL de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e a amostra era incubada a 37°C por 18 horas.

Passada a incubação, acrescentava-se 960 µL de uma solução saturada de NaCl (6 M). Depois de uma vigorosa agitação, a amostra era centrifugada por 15 minutos a 5000 g. O sobrenadante era transferido para um novo tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL, e o DNA era precipitado com a adição de 8 mL de etanol absoluto a 4°C. O precipitado de DNA era transferido para um tubo de polipropileno com capacidade de 2 mL de volume e lavado com etanol 70%. Após o descarte do etanol e a secagem da amostra à temperatura ambiente, o DNA era ressuspenso em tampão TE (10:0,1) (Tris -HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

4.6.2 Discriminação alélica

Para obtenção dos resultados apresentados nessa tese, foi utilizado o ensaio de discriminação alélica para genotipagem dos polimorfismos -71AG do gene *AKR1C3* e SNP50 do gene *CYP19* com o uso de oligonucleotídeos e sondas Taqman® *Minor Groove Binder* (MGB) Probes (Applied Biosystems, California, USA), do equipamento de PCR em tempo real 7500 Fast Real Time PCR System e do programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, California, USA).

O ensaio de discriminação alélica é uma reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada no equipamento de PCR em tempo real que, através do anelamento de sondas específicas ao polimorfismo de interesse, detecta diferenças de uma única base variante na sequência de DNA por meio de emissão de fluorescência.

Assim como na PCR convencional, um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) é utilizado para amplificação da região de interesse do genoma. O diferencial do sistema de discriminação alélica é a adição de duas sondas, cada uma com especificidade para ligação em um dos alelos do SNP. Cada sonda possui um fluoróforo emissor na porção 5' (*reporter*) e um fluoróforo silenciador na extremidade 3' (*quencher*). Quando a sonda está intacta, a proximidade dos dois fluoróforos resulta na supressão da fluorescência do emissor. Durante a reação da PCR, as sondas hibridizam na região que possuem especificidade, e a enzima AmpliTaq Gold (que realiza a extensão das fitas na PCR) cliva a sonda, já que possui atividade de

nuclease 5'-3'. Os fluoróforos são separados pela clivagem e ocorre a emissão da fluorescência do emissor.

Cada sonda é marcada com um tipo distinto de fluoróforo. No caso dos polimorfismos genotipados nessa tese, utilizou-se a marcação fluorescente com VIC[®] e FAM[®]. A emissão de diferentes fluoróforos, detectada ao fim da reação da PCR, fornece o genótipo da paciente, já que indivíduos homozigotos contêm apenas a emissão de fluorescência de um dos pigmentos (VIC[®] ou FAM[®]), enquanto os indivíduos heterozigotos possuem ambas. A Figura 3 ilustra a hibridização específica das sondas e a emissão de fluorescência.

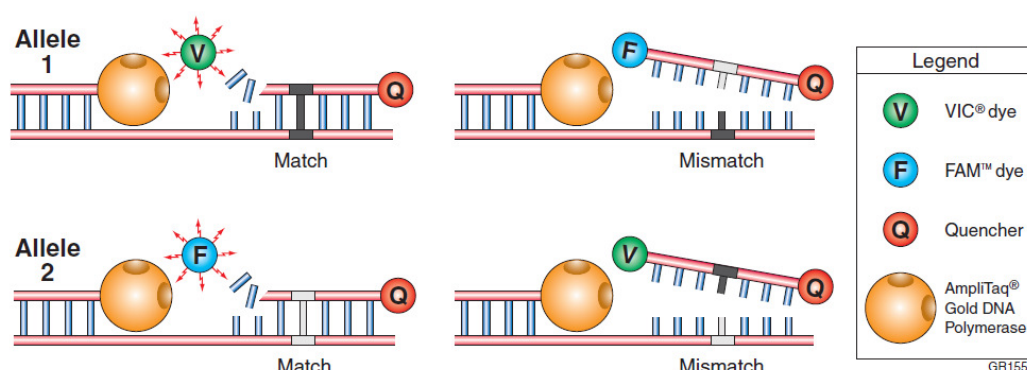


Figura 4. Anelamento específico e emissão de fluorescência de sondas marcadas com fluoróforos VIC[®] e FAM[®] em um ensaio de discriminação alélica (AppliedBiosystems, 2005).

Para o estudo do polimorfismo -71AG do gene *AKR1C3*, as sondas que hibridizavam no alelo A foram marcadas com o fluoróforo VIC[®], enquanto as sondas que anelavam no alelo G foram marcadas com o fluoróforo FAM[®]. Na genotipagem do SNP50 do gene *CYP19*, a marcação VIC[®] foi utilizada nas sondas específicas para o alelo A e a marcação fluorescente FAM[®] correspondia às sondas que anelavam no alelo G.

Para realização do ensaio de discriminação alélica de ambos os polimorfismos, as amostras de DNA extraído das participantes foram diluídas à concentração de 2 ng/μL, após quantificação estimada através de leitura espectrofotométrica pelo equipamento GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare). As sequências dos *primers* e das sondas (desenhados e confeccionados pela empresa Applied Biosystems), assim como as condições específicas de amplificação de cada reação estão descritas nas Tabelas 2 e 3. Após o fim das reações, o programa 7500 Fast SDS System Software plota os resultados

da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida à amplificação. Os gráficos gerados para a discriminação alélica dos polimorfismos -71AG do gene *AKR1C3* e SNP50 do gene *CYP19* estão ilustrados nas Figuras 4 e 5.

Tabela 2. Sequências dos *primers* e sondas utilizados para o estudo dos polimorfismos -71AG do gene *AKR1C3* e SNP50 do gene *CYP19*.

SNP	Primer sense	Primer antisense	Sonda VIC	Sonda FAM
-71AG	ACT GAT GGT TAA CCA ATG GCA TGT A	GAA TGC AAT TTT CTC CAC AGA CCA T	AAG ACT GCC TAT GTA CCT C	CTG CCT GTG TAC CTC
SNP50	GAG AAT GTC CAAT CCA AGA ACA TCT ATT TC	CCC CAT CTC TTA GCT TTA TTT TGC CTA A	AGC CTT TTC TTA AAT GGA GTC	CCT TTT CTT AAA CGG AGT C

Tabela 3. Condições de amplificação para o ensaio de discriminação alélica dos polimorfismos -71AG do gene *AKR1C3* e SNP50 do gene codificador da aromatase em PCR em tempo real.

Polimorfismo	Passo 1		Passo 2	
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Nº de ciclos
-71AG	95°C – 10 min	95°C – 15 s	63°C – 1 min	40
SNP50	95°C – 10 min	95°C – 15 s	62°C – 1 min 30 s	50

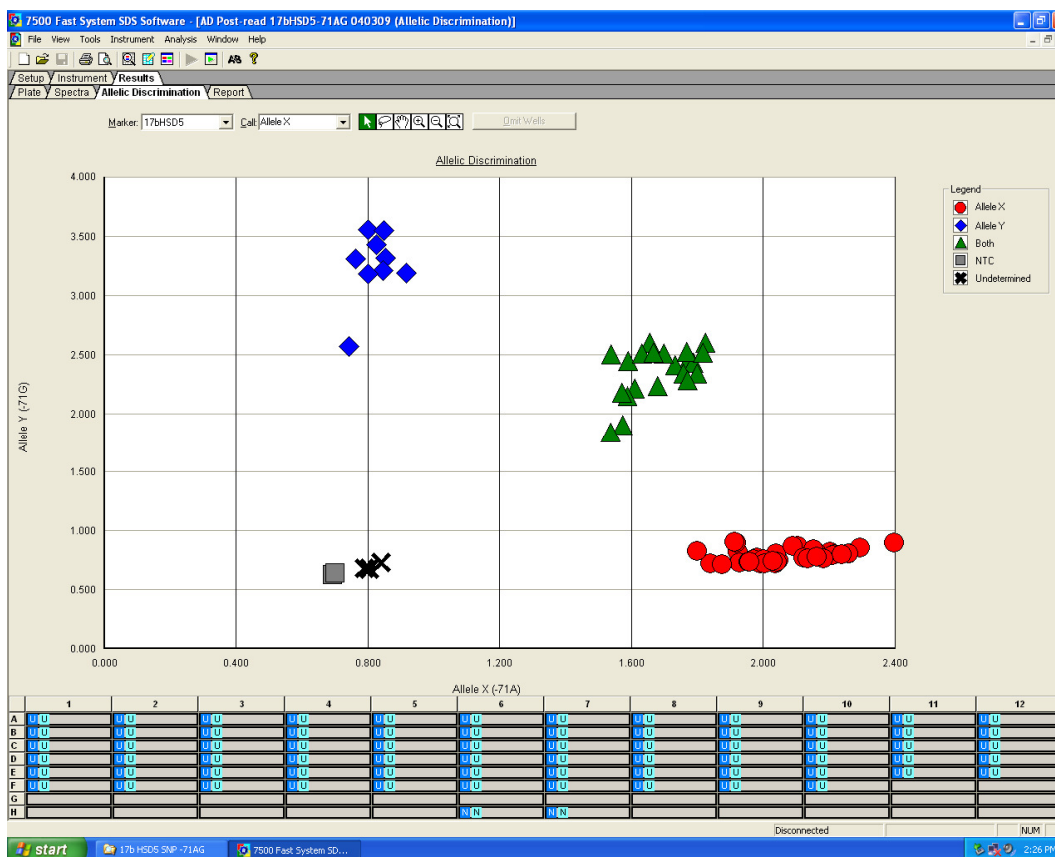


Figura 5. Genotipagem do polimorfismo -71AG do gene *AKR1C3* em PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ◆ = GG, ▲ = AG, ● = AA, ■ = controle negativo, X = genotipagem inconclusiva.

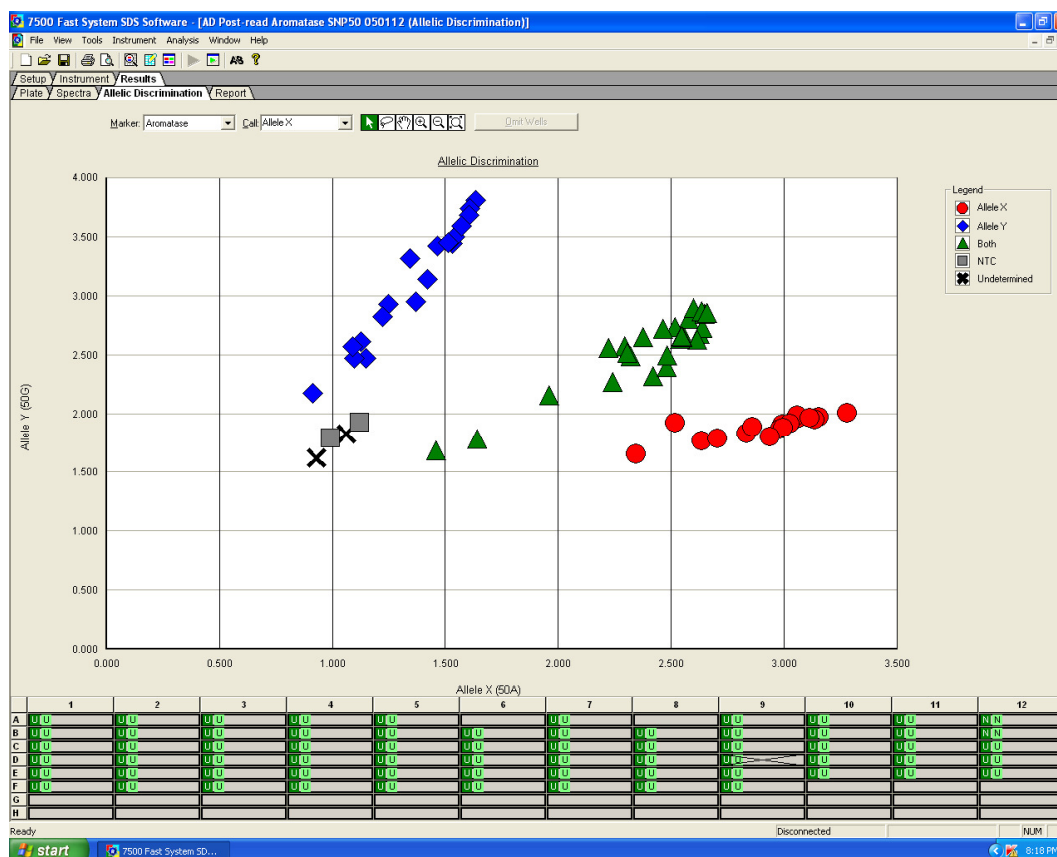


Figura 6. Genotipagem do polimorfismo SNP50 do gene *CYP19* em PCR em tempo real, ensaio de discriminação alélica.

Legenda: ◆ = GG, ▲ = AG, ● = AA, □ = controle negativo, X = genotipagem inconclusiva.

4.7 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (dados paramétricos) ou mediana e intervalo interquartil (dados não-paramétricos). Algumas variáveis de distribuição não-gaussiana foram submetidas à transformação logarítmica para que pudessem se adequar aos pressupostos dos testes para dados paramétricos.

O teste do χ^2 foi realizado para verificação da homogeneidade da distribuição genotípica dos SNPs estudados. As comparações entre os grupos c-PCOS e ov-PCOS, analisados conforme a presença do alelo polimórfico, foram realizadas por ANOVA de duas vias. Para a análise dos dados das pacientes submetidas ao tratamento hormonal, utilizou-se Teste t para amostras pareadas e ANOVA para

amostras repetidas para as comparações entre antes e após o uso do ACO. Foi utilizado o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA) versão 17.0 e foram considerados como significativos os valores de $P < 0,05$.

4.8 Considerações Éticas

Os resultados descritos nessa tese fazem parte de um projeto mais amplo desenvolvido na UEG - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O projeto foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 04-364 e todas as pacientes participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido concordando com a participação.

5 RESULTADOS

Os resultados que compõem essa tese foram descritos na forma de dois artigos científicos e serão apresentados conforme o quadro abaixo:

Artigo	Periódico
<i>Artigo I: 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71 A/G HSD17B5 SNP) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities.</i>	Gynecological Endocrinology (Epub ahead of print)
<i>Artigo II: Aromatase gene polymorphism does not influence clinical phenotype and response to oral contraceptive pills in PCOS women.</i>	Gynecologic and Obstetric Investigation (submetido em 28/02/2012)

5.1 Artigo I: 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71 A/G HSD17B5 SNP) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities.

Maier PS, Mattiello SS, Lages L, Spritzer PM

Gynecological Endocrinology, 2012 (*Epub ahead of print*)

ORIGINAL ARTICLE

17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities

Polyana S. Maier^{1,2}, Simone S. Mattiello¹, Luiza Lages^{1,2} & Poli M. Spritzer^{1,2,3}

¹Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; ²Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and ³National Institute of Hormones and Women's Health-CNPq, Brazil

We studied (1) the effects of oral contraceptive pills (OCPs) on hirsutism, hormonal and metabolic variables in 49 polycystic ovary syndrome patients without metabolic comorbidities and (2) the effect of 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) on the response to OCP treatment. Mean age was 21.9 ± 6.5 years. Patients received monophasic OCP (20 µg ethinyl estradiol plus 75 µg gestodene), 21/28 days per cycle, during 6 months; 32 patients with severe hirsutism also received spironolactone 100 mg. The frequencies of HSD17B5 genotypes were: AA = 0.49 (55.1%), AG = 0.42 (30.6%) and GG = 0.09 (14.3%). After 6 months, body mass index and waist circumference remained unchanged regardless of the presence of allele G. A slight reduction ($p < 0.05$) was noted in systolic blood pressure ($p < 0.05$) and luteinizing hormone levels, whereas a slight increase ($p < 0.05$) was noted in lipids. Total testosterone and hirsutism score declined, while sex hormone binding globulin increased after OCP treatment ($p < 0.05$). None of these changes were associated with genotype. Insulin and homeostasis model assessment remained unchanged after treatment and did not vary according to the presence of allele G. OCP seems to ameliorate androgenic symptoms without compromising metabolic parameters. The -71A/G SNP of HSD17B5 gene did not contribute to the improvements observed.

Keywords: 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism, oral contraceptive pills, polycystic ovary syndrome

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by hyperandrogenism, chronic anovulation and insulin resistance, which cause androgenic skin problems, menstrual cycle disturbance and anovulatory infertility [1,2]. Current evidence also indicates that PCOS is a multifactorial polygenic disorder [2].

An association between a single nucleotide polymorphism in 17 beta hydroxysteroid dehydrogenases (-71A/G HSD17B5 SNP) and PCOS has been recently described [3]; however, it was not confirmed in different PCOS populations [4,5] or in girls with precocious pubarche [6]. -71A/G HSD17B5 SNP has also been related to hyperandrogenemia in PCOS patients [5].

The oral contraceptive pill (OCP) has long been used to treat women with PCOS because of its effectiveness in reducing

circulating androgens. However, the low risk of long-term OCP use reported in the general population may underestimate a potentially higher risk for patients with PCOS, since these women are more prone to have insulin resistance, metabolic syndrome and diabetes mellitus [7,8]. There is no consensus regarding the effects of OCP on metabolic variables in PCOS: the reports range from a deleterious action on glucose tolerance, mainly in obese patients [9–12], to no changes in cardiovascular risk markers in lean PCOS women [13].

Therefore, we assessed the effects of OCP on hirsutism, hormonal and metabolic variables in selected PCOS women without metabolic comorbidities and evaluated whether -71A/G HSD17B5 SNP also influences the response to OCP treatment.

Therefore, we assessed (1) the effects of OCPs on hirsutism, hormonal and metabolic variables in 49 PCOS patients without metabolic comorbidities and (2) the effect of genotype (17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism, -71A/G HSD17B5 SNP) on the response to OCP treatment.

Methods

Patients

The study was carried out with hirsute women of reproductive age consulting at a university hospital in Brazil. PCOS was defined by clinical or laboratory signs of hyperandrogenism, anovulation or polycystic ovarian appearance at ultrasound and exclusion of other hyperandrogenic disorders [14]. None of the subjects had received drugs known to interfere with hormonal levels for at least 3 months before the study. Patients with diabetes, hepatic or renal diseases were excluded. Fifty-eight hirsute women were enrolled. Nine patients with incomplete data were excluded, and 49 women were selected for the study. The study was approved by the local Ethics Committee (Institutional Review Board-equivalent) and registered at clinicaltrials.gov (NCT01372293). The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. A written informed consent was obtained from all subjects.

Study protocol

Anthropometric measurements included body weight, height, body mass index (BMI) and waist circumference [15,16]. Normal weight was defined as BMI between 18 and 24.9, overweight as

2 P.S. Maier et al.

BMI between 25 and 29.9 and obesity as BMI equal or higher than 30 kg/m². Hirsutism was defined as a score of 8 or more on the modified Ferriman-Gallwey index [17]. Blood pressure was measured after a 10-minute rest in the supine position. Transvaginal or transabdominal ovarian ultrasound was performed in all patients.

Hormonal and metabolic parameters were evaluated between days 2 and 10 of the menstrual cycle or on any day if the patient was oligo-amenorrheic. After an overnight 12-hour fast, blood samples were drawn from an antecubital vein for determination of plasma total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglycerides, fasting glucose, insulin, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), androstenedione, luteinizing hormone (LH) and total testosterone (TT). All samples were obtained between 8 and 10 a.m. Blood samples were also drawn for DNA extraction. Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was estimated indirectly with the Friedewald formula [18]. The free androgen index (FAI) was determined by dividing TT (nmol/L) by SHBG (nmol/L) × 100. Homeostasis model assessment index (HOMA index) was calculated by multiplying insulin (μIU/mL) by glucose (mmol/L) and dividing this product by 22.5 [19].

Patients received OCP for treating hirsutism and to decrease androgen levels. A monophasic OCP containing 20 μg of ethinyl estradiol plus 75 μg of gestodene, 21/28 days per cycle, was administered during 6 months. Thirty-two patients (65%) with severe hirsutism also received spironolactone 100 mg by day in addition to contraceptive pills. Clinical, hormonal and metabolic assessments were repeated at the end of 6 months of treatment. During the study, participants were requested not to modify their lifestyle or dietary habits.

Assays

Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and glucose were determined by colorimetric-enzymatic methods using the Bayer 1650 Advia System (Mannheim, Germany). Serum insulin, LH, SHBG levels and DHEAS serum concentrations were measured with electrochemiluminescent immunoassays (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with sensitivity (S) of 0.2 μIU/mL, 0.1 mIU/mL, 0.35 nmol/L and 0.10 μg/dL, respectively. Intraassay and interassay coefficients of variation were <3%

and <5%, respectively. TT and androstenedione were measured by direct radioimmunoassay (Diagnostics Systems Laboratories Inc., Webster, TX) with S <0.1 ng/mL and S <0.03 ng/mL, respectively.

SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by a standard salting-out procedure. DNA samples were diluted to 2 ng/μL and genotyped for -71 A/G SNP (rs3763676) by real-time PCR (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA) using the allelic discrimination assay with TaqMan Minor Groove Binder (MGB) primers and probes (Applied Biosystems, California, USA). The recessive model (AA × AG + GG patients) was chosen to express the results and to perform the comparisons.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SD, or median and interquartile range. Logarithmic transformation was used to normalize distribution of non-Gaussian variables in order to allow comparisons between the groups with paired t-test and ANOVA for repeated measures. Chi² was also calculated to verify the homogeneity of genotypic distribution. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 17.0, Chicago, IL, USA). Data were considered to be significant at p < 0.05.

Results

The mean age of women was 21.9 ± 6.5 years. Forty-six participants (95%) were Caucasian, and the remaining participants were of mixed (African and European) descent. Weight was normal in 46.9% of the women, whereas 26.5% were overweight and 26.5% were obese. Mean hirsutism score was 14 (range: 11–23) before treatment. As expected, participants had increased median TT (0.82 [0.61–1.1] ng/mL) and decreased median SHBG (29 [16.5–42.6] nmol/L). No clinical evidence of metabolic disturbances was observed concerning lipid profile, mean glucose (84.6 ± 8.9 mg/dL) and median insulin levels (14.7 [8.7–24.9] mIU/mL).

The genotype frequencies of type 5 17b-HSD gene polymorphism (-71A/G SNP) were as follows: AA – 0.49 (55.1%),

Table 1. Clinical, hormonal and metabolic characteristics in polycystic ovary syndrome women before and after the treatment with oral contraceptive pills according to the presence of allele G (polymorphic allele) at position -71 of the promoter of type 5 17b-HSD gene.

	AA		AG + GG	
	Before	After	Before	After
BMI (kg/m ²)	26.8 ± 5.3	26.7 ± 5.2	26.7 ± 8.8	26.9 ± 9
Waist circumference (cm)	85.6 ± 13.8	81.8 ± 11.7	83.1 ± 21.6	84.6 ± 19.4
SBP (mmHg)	123.7 ± 11.3	120 ± 10.8 ^b	124.7 ± 23.5	118.7 ± 11.7 ^b
DBP (mmHg)	80.4 ± 11.2	77.8 ± 10.9	76.3 ± 13.7	76.4 ± 12.5
Glucose (mg/dL)	82.8 ± 7.5	76.4 ± 12 ^b	86.8 ± 10.1	79.7 ± 6.3 ^b
Total cholesterol (mg/dL)	161.7 ± 32.5	183 ± 41 ^b	175.4 ± 39.9	193.9 ± 37.2 ^b
HDL (mg/dL)	52.7 ± 9.4	59.3 ± 13.4 ^b	53.4 ± 10.5	61.8 ± 9.8 ^b
LDL (mg/dL)	91.3 ± 30.6	98.8 ± 37.5 ^b	105.6 ± 30	110.8 ± 28.9 ^b
Triglycerides (mg/dL) ^a	72 (52–116)	110 (67–149) ^b	68 (59.2–98.5)	84 (64–109) ^b
DHEAS (μg/dL)	244 ± 101	200 ± 85 ^b	247 ± 114	214 ± 89 ^b
Androstenedione (ng/mL) ^a	3.1 (2.2–3.9)	2 (1.7–3.4) ^b	2.8 (2.4–3.5)	2.1 (1.7–3.6) ^b
LH (mIU/mL) ^a	6.7 (3.7–13.8)	4.1 (2.3–5.5) ^b	4.9 (3–7.5)	3.4 (1.7–4.4) ^b

BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulphate; LH, luteinizing hormone.

Values are expressed as mean ± SD or *median and interquartile range (25%–75%) (ANOVA for repeated measures).

^bp < 0.05 for before versus after treatment comparisons. No differences were observed between genotypes.

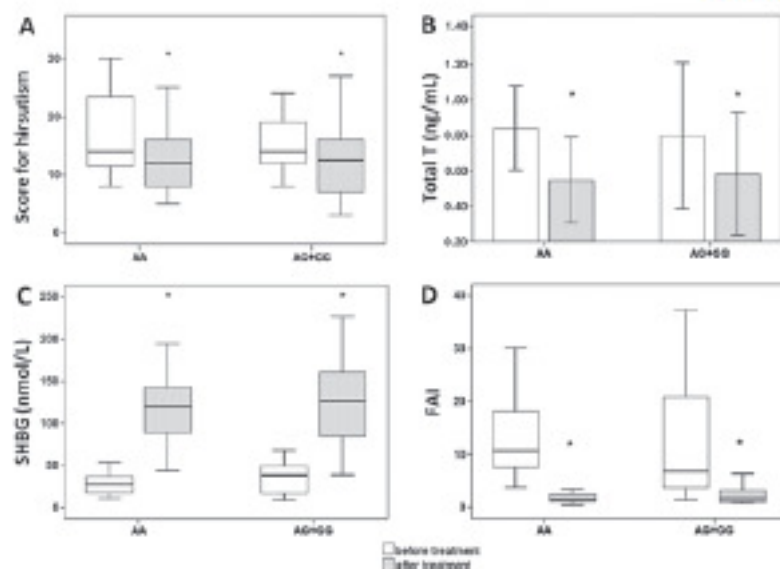


Figure 1. Score for hirsutism (A), total testosterone levels (B), sex hormone binding globulin (SHBG) levels (C) and free androgen index (FAI) (D) of polycystic ovary syndrome women before and after oral contraceptive pill treatment considering the presence of the allele G at position -71 of the type 5 17 β -HSD gene. Values of total testosterone are expressed as mean \pm SD; the other variables are expressed as median and interquartile range. * $p < 0.05$ for before versus after treatment comparisons by ANOVA for repeated measures. No differences were observed between genotypes.

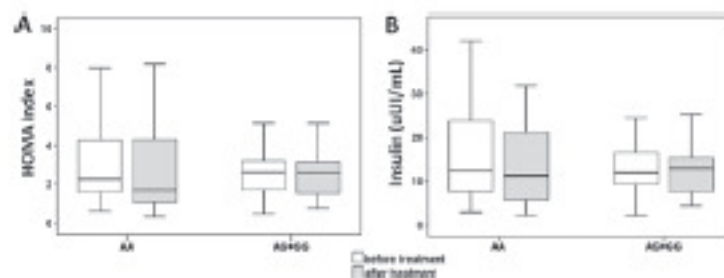


Figure 2. Homeostasis model assessment (HOMA) Index (A) and insulin levels (B) before and after oral contraceptive pill treatment of polycystic ovary syndrome women. Values are expressed as median and interquartile range. No differences were observed before and after the treatment, neither between carriers and noncarriers of the allele G (ANOVA for repeated measures).

AG = 0.42 (30.6%) and GG = 0.09 (14.3%). Genotype frequencies were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. The number of patients receiving spironolactone in addition to the OCP was similar between the genotypes (AA = 18 [66%] and AG + GG = 14 [64%]; $p = 0.825$).

Table 1 shows clinical, metabolic and hormonal variables before and after OCP treatment and according to the presence of allele G. BMI, waist circumference and diastolic blood pressure remained unchanged in both groups. There was a small reduction in systolic blood pressure. DHEAS, androstenedione and LH levels also regressed, but no differences were found regarding the presence of allele G. There was a slight increase in triglycerides, total cholesterol, HDL-c and LDL-c levels after treatment, as well as a decrease in glucose levels, but no differences were detected when the patients were stratified according to the polymorphism.

Hirsutism score also declined independently of the presence of allele G, as well as total testosterone levels and FAI; meanwhile, increased levels of SHBG were detected in both groups (Figure 1). Insulin levels and HOMA index remained unchanged after treatment and among the genotypes (Figure 2).

Discussion

In the present study, OCP, prescribed for treatment of hirsutism and androgen excess, did not have major adverse effects on anthropometric and metabolic profile in a sample of PCOS women without evidence of metabolic comorbidities. In addition, the improvements in hirsutism and androgen levels with OCP were similar in carriers of allele G and in women without the -71 A/G SNP. Consistent with our data, current evidence indicates that hormonal contraceptives have little clinical impact on carbohydrate metabolism in healthy women without diabetes or other metabolic comorbidities [20,21]. To the best of our knowledge, this is the first pharmacogenetic study analyzing this polymorphism in women with PCOS. The present findings suggest that HSD17B5 gene variants do not influence the effects of OCP treatment in these patients.

Cagnacci and coworkers compared OCPs containing the progestin desogestrel versus cyproterone acetate and found better results for insulin sensitivity with cyproterone acetate [22]. In unselected PCOS women, gestodene in combination with ethinyl estradiol during 13 cycles promoted higher fasting glucose,

4 P.S. Maier et al.

without changes in fasting insulin [23]. Mastorakos and colleagues studied the influence of two OCPs in adolescents with PCOS and observed an increase in HOMA and insulin resistance after 12 months of treatment; the group receiving cyproterone acetate had increased fasting insulin levels. Another study reported that in overweight PCOS women using high-dose OCP, insulin resistance worsened after 6 months of treatment [24]. Whereas some authors found an estrogen dose-dependent effect of OCP-induced insulin resistance [25], the results of a meta-analysis suggest that different types of OCPs do not result in distinct metabolic effects in PCOS [7].

In the present group of PCOS women using OCP, no changes were observed in body weight or diastolic pressure, and a slight reduction in systolic blood pressure was observed after six cycles of treatment. Our data confirm a marked suppressive effect of OCP treatment on androgen concentrations along with a significant increase in SHBG concentrations, causing a significant reduction in FAI [26–28]. These effects, which resulted from a peripheral influence of spironolactone in some patients, also yielded a significant reduction in Ferriman score. Interestingly, these beneficial effects of OCP were not specifically associated with HSD17B5 gene polymorphism. Given the physiological significance of HSD17B5 in the regulation of androgenic metabolism, studies focusing on specific enzyme isoforms are relevant in order to clarify their role in androgen-related diseases, such as androgen excess disturbances.

Our group has previously studied HSD17B2 responsible for oxidative reactions leading to less active androgen precursors [29]. The results of that study suggest that hirsute women have a local hair follicle metabolism driven to more potent androgen formation, similar to that observed in men, and provide indirect evidence that HSD17B2 activity is restored by hormonal treatment [29].

The genotypic frequency verified in our study is similar to that of other studies [3–5], except for one, which indicated that -71A/G SNP of HSD17B5 gene is rare in Chinese women with PCOS [30].

A higher binding affinity of transcription factors at the promoter gene has been found in rat thecal cells in the presence of -71A/G SNP of HSD17B5 gene [3]. That study also showed an association of -71A/G SNP with PCOS and the possibility that the proximity of this polymorphism with the Sp1/Sp3 binding site could modulate testosterone production [3]. In contrast, the similarities that we found in hormonal, metabolic and lipid profile after OCP treatment when comparing patients with and without allele G may be due to the small or null contribution of this SNP to PCOS features. Nevertheless, other investigators [4,5] were also unable to replicate the association between -71A/G SNP of HSD17B5 gene and PCOS as well as precocious pubarche [6].

In conclusion, this pilot study suggests that OCP ameliorates androgenic symptoms without significantly compromising metabolic parameters. For selected PCOS patients without major metabolic comorbidities, OCP may be a safe and effective treatment for slight to moderate hirsutism and irregular cycles. Additionally, the -71A/G SNP of HSD17B5 gene did not contribute to the improvements observed in the studied variables. Further studies with PCOS women from different ethnic origins and longer duration of OCP treatment should be carried out to confirm the clinical relevance of the present results.

Declaration of interest: The authors report no declarations of interest.

References

- Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1223–1236.
- Azziz R, Carmina E, Dewafly D, Diamanti-Kandaraki E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, et al.; Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456–488.
- Qin K, Ehrmann DA, Cox N, Befertoff S, Rosenfield RL. Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:270–276.
- Goodarzi MO, Jones MR, Antoine HJ, Pail M, Chen YD, Azziz R. Nonreplication of the type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:300–303.
- Mariotti DJ, Saitamavros AD, Vervita V, Kotka V, Adonakis G, Decavalas C, Markou KB, Georgopoulos NA. Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Fertil Steril* 2009;92:648–652.
- Petry CJ, Ong KK, Wingate DL, de Zegher F, Bédet L, Dunger DB. Lack of association between common polymorphisms in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;105:176–180.
- Halperin IJ, Kumar SS, Stroup DJ, Laredo SE. The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Hum Reprod* 2011;26:191–201.
- Spritzer PM, Willgen D. Prevalence of metabolic syndrome in patients of south of Brazil with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:146–147.
- Soares GM, Vieira CS, de Paula Martins W, Dos Reis RM, de Sá ME, Ferrantini RA. Metabolic and cardiovascular impact of oral contraceptives in polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Pract* 2009;63:160–169.
- Diamanti-Kandaraki E, Kandaraki E, Christakou C, Pantidis D. The effect of pharmaceutical intervention on lipid profile in polycystic ovary syndrome. *Obes Rev* 2009;10:431–441.
- Kılıc S, Yilmaz N, Zulfikaroglu E, Erdogan G, Aydın M, Baltoglu S. Inflammatory-metabolic parameters in obese and nonobese normoandrogenic polycystic ovary syndrome during metformin and oral contraceptive treatment. *Gynecol Endocrinol* 2011;27:622–629.
- Nader S, Diamanti-Kandaraki E. Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives and metabolic issues: new perspectives and a unifying hypothesis. *Hum Reprod* 2007;22:317–322.
- Mancini F, Cianciolo A, Persico N, Facchinetti F, Busacchi P, Battaglia C. Drospirenone and cardiovascular risk in lean and obese polycystic ovary syndrome patients: a pilot study. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:169.e1–169.e8.
- Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (pcos). *Hum Reprod (Oxford, England)* 2004;19:41–47.
- Toscani M, Migliavacca R, Sisson de Castro JA, Spritzer PM. 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. *Metab Clin Exp* 2007;56:992–997.
- Willgen D, Spritzer PM. Variation in metabolic and cardiovascular risk in women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertil Steril* 2010;94:2493–2496.
- Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440–1447.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487–1495.
- Lopez LM, Grimes DA, Schulz KE. Steroidal contraceptives: effect on carbohydrate metabolism in women without diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev (Online)* 2009:CD006133.
- Kim C, Siscovick DS, Sidney S, Lewis CE, Kiefe CI, Koepsell TD; CARDIA Study. Oral contraceptive use and association with glucose, insulin, and diabetes in young adult women: the CARDIA Study.

HSD17B5 and pill in PCOS 5

- Coronary Artery Risk Development in Young Adults. *Diabetes Care* 2002;25:1027-1032.
22. Cagnacci A, Paoletti AM, Renzi A, Orrù M, Piloni M, Melis GB, Volpe A. Glucose metabolism and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome during therapy with oral contraceptives containing cyproterone acetate or desogestrel. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3621-3625.
 23. Lüdtke F, Gaspard UJ, Demeyer E, Schoen A, Lefebvre P. Randomized controlled study of the influence of two low estrogen dose oral contraceptives containing gestodene or desogestrel on carbohydrate metabolism. *Contraception* 2002;66:411-415.
 24. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2007;30:471-478.
 25. Skouby SO, Endrikat J, Düsterberg B, Schmidt W, Gerlinger C, Wessel J, Goldstein H, Jespersen J. A 1-year randomized study to evaluate the effects of a dose reduction in oral contraceptives on lipids and carbohydrate metabolism: 20 microg ethinyl estradiol combined with 100 microg levonorgestrel. *Contraception* 2005;71:111-117.
 26. De Leo V, Di Sabatino A, Musacchio MC, Morgante G, Scolaro V, Cianci A, Petraglia F. Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. *Contraception* 2010;82:276-280.
 27. Escobar-Morreale HF, Lasunción MA, Sancho J. Treatment of hirsutism with ethinyl estradiol-desogestrel contraceptive pills has beneficial effects on the lipid profile and improves insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2000;74:816-819.
 28. Masiorakos G, Koltopoulos C, Deligeorgiou E, Diamanti-Kandarakis E, Creatsas G. Effects of two forms of combined oral contraceptives on carbohydrate metabolism in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006;85:420-427.
 29. Oliviera IO, Lhuillier C, Brum IS, Spritzer PM. Gene expression of type 2 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. *Steroids* 2003;68:641-649.
 30. Ke L, Che YN, Cao YX, Wu XK, Hu YL, Sun HX, Jiang FJ, et al. Polymorphisms of the HSD17B6 and HSD17B5 genes in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *J Womens Health (Larchmt)* 2010;19:2227-2232.

5.2 Artigo II: *Aromatase gene polymorphism does not influence clinical phenotype and response to oral contraceptive pills in PCOS women.*

Maier PS & Spritzer PM

Gynecologic and Obstetric Investigation (artigo submetido)

Aromatase gene polymorphism does not influence clinical phenotype and response to oral contraceptive pills in PCOS women

Polyana S Maier^{1,2} and Poli Mara Spritzer^{1,2,3}

¹Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

²Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; ³National Institute of Hormones and Women's Health- CNPq, Brazil

Running title: *CYP19* gene and PCOS phenotypes

Corresponding author:

Poli Mara Spritzer, MD, PhD

Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Phone: ++55 51 3359 8027

Fax: +55 51 3359 8777

E-mail: spritzer@ufrgs.br

Keywords: PCOS, genetics, genetic polymorphism, contraception

ABSTRACT

Aims: To assess whether a single nucleotide polymorphism (SNP50) of the aromatase gene (*CYP19*) is associated with polycystic ovary syndrome (PCOS) phenotypes and to investigate the influence of this polymorphism on the response of PCOS to treatment with oral contraceptive pills (OCP).

Methods: 162 hirsute women were stratified into a classic PCOS group (hyperandrogenism and ovulatory dysfunction, c-PCOS) and an ovulatory PCOS group (hyperandrogenism, ovulatory cycles, polycystic ovaries, ov-PCOS). Fifty-one women completed a 6-month OCP trial (20 ug ethinyl estradiol plus 75 ug gestodene, 21/28 days per cycle, plus 100 mg spironolactone in 32 women with moderate to severe hirsutism). We considered the presence or absence of the polymorphic allele (GG x AG+AA) to express results and to perform the comparisons regarding the SNP50.

Results: Mean age was 23.3±6.9 years. Hirsutism score was similar in c-PCOS and ov-PCOS (15 [11-20] vs. 13 [11-20]). The differences in hormone and metabolic variables between phenotypes were independent of the presence of allele A. In the OCP trial sub-sample, no differences were observed between genotypes after 6 months of treatment.

Conclusion: The differences between classic and ovulatory PCOS cannot be explained by the genetic variation at SNP50 in the *CYP19* gene.

INTRODUCTION

In the past decade, different phenotypes [1] have been identified for polycystic ovary syndrome (PCOS), the most common endocrine disorder in women of reproductive age, and also the most common cause of hyperandrogenism and chronic anovulation [2,3]. A better knowledge of PCOS phenotypes has been regarded as useful to identify specific risks and to allow the development of more aggressive treatments for patients [3-7].

“Classic” PCOS is the most common phenotype, encompassing women who present both clinical or biochemical hyperandrogenism and ovulatory dysfunction. A less frequent phenotype is “ovulatory” PCOS, characterized by hirsutism, polycystic ovaries at ultrasound and ovulatory cycles [1,3,5-7]. As current evidence suggests that PCOS is a multifactorial polygenic disorder [3], these phenotypes and their different response to treatment could be partly attributed to a genetic basis.

Oral contraceptive pills (OCP) have long been used to treat PCOS because of their suppressive effect on ovarian androgen secretion, with consequent amelioration of hirsutism scores as well as estrogen and progestin-induced regularization of the cycles [8-11]. However, the possibility that OCP might alter the lipid profile and glucose tolerance should be considered before prescribing these drugs to PCOS patients, since they are more prone to develop insulin resistance, metabolic syndrome, and diabetes mellitus [12-14].

Aromatase, codified by the *CYP19* gene, is a member of the cytochrome P450 family of enzymes, which catalyses the conversion of androgens to estrogens. It has been proposed that reduced aromatase activity may lead to PCOS development [15,16], since *CYP19* gene knockout mice had elevated androgen levels and insulin resistance [17,18], and women with loss of function mutations at aromatase gene developed characteristic that are typical of PCOS [19]. Recently, investigators have reported that a common intronic single nucleotide polymorphism (SNP) in the *CYP19* gene (SNP50, G to A substitution) is associated with precocious pubarche and functional hyperandrogenism [20]. More recently, this polymorphism has also been associated with susceptibility to PCOS [21].

Therefore, the aim of this study was to assess the genotype distribution of SNP50 of the *CYP19* gene in women with classic or ovulatory PCOS and to verify whether this gene variant is associated with the clinical, hormonal, and metabolic characteristics of these PCOS phenotypes. Additionally, we investigated a possible influence of this polymorphism on the response of PCOS women to OCP treatment.

METHODS

Patients

Hirsute women of reproductive age consulting at the Gynecological Endocrinology Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil were enrolled. None of the subjects had received any drugs known to interfere with hormonal levels for at least 3 months before the study. Patients with diabetes, hepatic or renal diseases were excluded. Patients meeting the PCOS diagnosis criteria defined by the Rotterdam Consensus [1] were selected, and 162 women were included in the study. Participants were stratified into a “classic PCOS phenotype group” (women with hyperandrogenism and ovulatory dysfunction, c-PCOS) and an “ovulatory PCOS phenotype group” (hyperandrogenism, ovulatory cycles, confirmed by luteal phase progesterone higher than 3.8 ng/mL and polycystic ovaries appearance at ultrasound, ov-PCOS) [1,5].

The study was approved by the local Ethics Committee (Institutional Review Board-equivalent), and registered at clinicaltrials.gov (NCT01372293). Written informed consent was obtained from all subjects.

Study protocol

Physical examination included anthropometric measurements: body weight, height, body mass index (BMI), and waist circumference, as previously described [5,22-24]. Obesity was defined as BMI \geq 30 kg/m². Hirsutism was defined as a score of 8 or more on the modified Ferriman–Gallwey index [25]. Blood pressure was measured twice after a 10-minute rest—with the patient seated. Transvaginal or transabdominal ovarian ultrasound was performed in all patients.

Biochemical and ultrasound evaluations were made between days 2 and 10 of the menstrual cycle or on any day if the patient was oligo-amenorrheic. After an overnight 12-hour fast, blood samples were drawn from an antecubital vein for determination of plasma total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides, fasting glucose, insulin, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), androstenedione, luteinizing hormone (LH), 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) and total testosterone levels (TT). Biochemical measurements were performed using commercial kits, as previously described [22,26]. Blood samples were also drawn for DNA extraction. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL) was estimated indirectly with the Friedewald formula.[27] The free androgen index (FAI) was determined by dividing TT (nmol/L) by SHBG (nmol/L) x 100. Homeostasis model assessment index (HOMA index) was calculated by multiplying insulin (μ IU/mL) by glucose (mmol/L) and dividing this product by 22.5.[28]. The lipid accumulation product index (LAP index) was assessed using the formula [waist (cm) – 58] x triglyceride concentration (mmol/L), according to previously described [29]. Metabolic Syndrome (MS) was classified accordingly to NCEP/ATPIII and IDF criteria [30].

Of the group of 162 women enrolled, 58 women who did not present metabolic comorbidities agreed to participate in the OCP clinical trial with to assess whether the *CYP19* gene polymorphism exerts an influence on the pill-induced amelioration of hirsutism and androgen levels. Seven patients did not attend the consultation at the end of the treatment, and therefore their partial results were not considered. Thus, 51 PCOS patients (36 c-PCOS and 15 ov-PCOS) who received a monophasic OCP containing 20 ug of ethinyl estradiol plus 75 ug of gestodene, 21/28 days per cycle, during 6 months, completed the study. Thirty-two (65%) with moderate to severe hirsutism also received spironolactone 100 mg, in addition to OCP. Clinical, hormonal and metabolic assessments were repeated at the end of the 6-month period of treatment. During the study, participants were requested not to modify their lifestyle or dietary habits. Details of patients enrolled in the OCP clinical trial were described elsewhere [31].

SNP Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by a standard salting-out procedure [32]. DNA samples were diluted to 2 ng/uL and genotyped for SNP50 of the *CYP19* gene (rs2414096) by real time PCR (7500 Fast Applied Biosystems, California, USA), using the allelic discrimination assay with TaqMan minor groove binder (MGB) primers and probes (Applied Biosystems, California, USA). We considered the presence or absence of the polymorphic allele (GG x AG+AA patients) to express the results and to perform the comparisons regarding the SNP50.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard deviation (SD), or median and interquartile range (25%-75%). Logarithmic transformation was used to normalize the distribution of non-Gaussian variables in order to allow comparisons between the groups using two-way ANOVA and ANOVA for repeated measures. χ^2 was also calculated to verify the homogeneity of genotypic distribution. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 17.0, Chicago, IL, USA). Data were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The PCOS women participating in this study were young (23.3 ± 6.9 years), and 95% were Caucasian (the remaining subjects were of mixed descent). Hirsutism was mild to severe (median 14, ranging from 11 to 20), and 47.5% were obese. The frequency of high blood pressure ($\geq 140/90$ mmHg) was 18.5%, and 27.2% had metabolic syndrome.

The genotype distribution of the SNP50 *CYP19* gene polymorphism was consistent with Hardy–Weinberg equilibrium. The genotype frequencies, shown in Table 1, were similar in the classic and ovulatory PCOS groups. The number of women who used spironolactone in addition to contraceptive pill was also similar between the genotypes [GG = 14 (41.2%), AG = 16 (47.1%), AA = 4 (11.8%), $p=0.103$].

Table 2 shows clinical, hormonal, and metabolic characteristics of the women with classic and ovulatory PCOS according to the presence of allele A for SNP50 of the *CYP19* gene. Classic PCOS patients had higher TT (1 ± 0.41 ng/mL) and free androgen index (15.7 [9.2 – 23.6]) than those with ovulatory PCOS (0.59 ± 0.24 ng/mL; $p<0.001$, and 4.9 [3.6 – 8.4; $p<0.001$ respectively). Hirsutism scores were similar in classic and ovulatory PCOS women (15 [11 – 20] *versus* 13 [11 – 20]). Classic PCOS was associated with higher BMI and systolic blood pressure, as well as a worse lipid profile than ovulatory PCOS. However, all the differences between groups were independent of the presence of allele A.

Table 3 shows clinical, hormonal, and metabolic variables of a sub-sample of PCOS women (classic and ovulatory) before and after oral contraceptive pill treatment and considering the genotypes for SNP50 in the *CYP19* gene. No differences were observed in BMI, waist circumference and diastolic blood pressure after 6 months of treatment. While an increase in CT, HDL, and triglycerides levels was observed, a decrease in LDL occurred after OCP use. We also observed a slight reduction in systolic blood pressure, fasting glucose, and LH levels after treatment. No differences were found in any of these variables when patients were stratified by the presence of the polymorphic allele.

Hirsutism score also declined independently of the presence of allele A, as well as testosterone levels, FAI, androstenedione, and DHEAS. SHBG levels were increased after OCP-treatment, without association with the studied polymorphism (Figure 1).

DISCUSSION

The most common PCOS phenotype is represented by a hyperandrogenic status and anovulation. Nevertheless, prominent ovulatory dysfunction is not a universal characteristic of PCOS: some hirsute patients have ovulatory cycles, and in those ~~with~~ a polycystic ovary appearance is the main sign of ovarian dysfunction [1,3]. Even though this attenuated form of the syndrome is less frequent, as can be observed in the present study, in which the prevalence of ov-PCOS was 22.8%, women with ov-PCOS seem to make up a significant part of the PCOS population, and should be considered separately from classic PCOS for clinical management. Recently, we and others have shown that the prevalence of cardiovascular risk factors was lower in ovulatory

PCOS vs. classic PCOS [4-6,33]. In this sense, studies comparing these different phenotypes are relevant in order to provide a better understanding of the pathophysiology and genetic basis of PCOS, as well as to guide the treatment.

Aromatase catalyses the conversion of androgens to estrogens and thus variation in *CYP19* gene may contribute to female syndromes of androgen excess. In the present study, the genotypic frequencies of SNP50 were very similar in classic and ovulatory PCOS. In addition, the genotypic frequencies observed for classic and ovulatory PCOS phenotypes were also similar to those observed in a group of women with PCOS symptoms [20] and to PCOS Chinese patients [21].

We did not find associations of SNP50 with androgen levels, hirsutism score or metabolic characteristics in c-PCOS or ov-PCOS. While Petry and colleagues (2005) found an association of SNP50 with hyperandrogenism in a group of girls with precocious pubarche and in a population of women with high prevalence of PCOS symptoms, our results are in accordance with those described by Jin and colleagues, who did not observe differences in testosterone levels among the three genotypes of SNP50 in PCOS patients [21]. Also, in a population of pre- and perimenopausal women, no statistical difference was found in testosterone levels considering the presence of allele A for this genetic variant [34]. Taken together, these data and the fact that similar genotypic frequencies were observed between the classic and ovulatory phenotypes of PCOS in the present study, we suggest that genetic variation at the *CYP19* gene appears to not be specifically associated with PCOS heterogeneity.

The association of SNP50 [21] with the etiopathogenesis of PCOS is still controversial. Urbanek and colleagues mapped 37 candidate genes for linkage and association with PCOS or hyperandrogenemia and did not find any strong evidence supporting this association, which suggests a limited contribution of the *CYP19* gene to the etiology of PCOS [35]. Furthermore, the sequencing of all exons of the aromatase gene and its ovary promoter were performed, and no mutant alleles were identified in any of the PCOS patients studied [36].

The SNP50 is located in intron 2 and does not affect the protein sequence of aromatase. However, the proximity of genetic variants in introns to regulatory sequences can lead to differences in gene and protein expression by altering the conformational sites for binding of transcription factors. Besides that, hormonal treatment can also alter the pattern of binding of these regulatory factors. Because of that, in addition to the association study of SNP50 with classic and ovulatory PCOS phenotypes, we investigated whether the genetic variant could influence the response to OCP treatment in a mixed group of PCOS. In fact, the results of the present study seem to show that SNP50 does not exert any influence on the effects of OCP in PCOS women.

We recently showed that treatment with OCP was safe for selected PCOS patients who were non-obese and/or presented no clinical evidence of insulin resistance [31]. In the present study, carriers of allele A using OCP did present improvements in hirsutism and androgen levels that were similar to those experienced by women without the genetic variant.

As we expected, OCP use appeared beneficial after 6 months of treatment, as reflected by decreasing testosterone levels, FAI, and consequently hirsutism score in PCOS patients. However, the improvements in hormonal parameters were independent of SNP50. Also, the significant increase in total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides levels observed by us was not clinically relevant, since the values remained within the normal range. Increased total cholesterol and triglycerides levels have been reported as the most common adverse effect of OCP treatment in PCOS women [37]. Moreover, the *CYP19* polymorphism did not influence the alterations in lipid profile.

One limitation of this study refers to the inability to perform a separate analysis of classic and ovulatory PCOS patients included in the OCP trial at the end of treatment. However, the apparent lack of contribution of SNP50 to ameliorate PCOS symptoms after treatment supports the notion that *CYP19* may not be the major candidate gene to explain PCOS.

In conclusion, the differences observed between classic and ovulatory PCOS phenotypes cannot be explained by the genetic variation at SNP50 in the *CYP19* gene. Additionally, this genetic variant seems not to influence the improvements after OCP treatment in a mixed group of PCOS. Further studies with a larger population of PCOS patients with different phenotypes are required to expand these results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq INCT 573747/2008-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 1289/05), and Fundo de Apoio à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA 340/2004), Brazil. The funding sources were not involved in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

References

1. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-47.
2. Ehrmann DA: Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1223-1236.
3. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF: The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: The complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456-488.
4. Carmina E, Chu MC, Longo RA, Rini GB, Lobo RA: Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2545-2549.
5. Wiltgen D, Spritzer PM: Variation in metabolic and cardiovascular risk in women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertil Steril* 2010;94:2493-2496.
6. Moran L, Teede H: Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2009;15:477-488.
7. Yilmaz M, Isaoglu U, Delibas IB, Kadanali S: Anthropometric, clinical and laboratory comparison of four phenotypes of polycystic ovary syndrome based on Rotterdam criteria. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37:1020-1026.
8. De Leo V, Di Sabatino A, Musacchio MC, Morgante G, Scolaro V, Cianci A, Petraglia F: Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. *Contraception* 2010;82:276-280.
9. Escobar-Morreale HF, Lasuncion MA, Sancho J: Treatment of hirsutism with ethinyl estradiol-desogestrel contraceptive pills has beneficial effects on the lipid profile and improves insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2000;74:816-819.
10. Mulders AG, ten Kate-Booij M, Pal R, De Kruif M, Nekrui L, Oostra BA, Fauser BC, Laven JS: Influence of oral contraceptive pills on phenotype expression in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2005;11:690-696.
11. Saha L, Kaur S, Saha PK: Pharmacotherapy of polycystic ovary syndrome - an update. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;26:54-62.

12. Halperin IJ, Kumar SS, Stroup DF, Laredo SE: The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Hum Reprod* 2011;26:191-201.
13. Spritzer PM, Wiltgen D: [prevalence of metabolic syndrome in patients of south of brazil with polycystic ovary syndrome (PCOS)]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:146-147.
14. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE: Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1929-1935.
15. Gabrilove JL: The pathogenesis of the polycystic ovary syndrome: A hypothesis. *Endocr Pract* 2002;8:127-132.
16. Grumbach MM, Auchus RJ: Estrogen: Consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4677-4694.
17. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER: Aromatase-deficient (arko) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12735-12740.
18. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER: Characterization of mice deficient in aromatase (arko) because of targeted disruption of the CYP19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6965-6970.
19. Belgorosky A, Pepe C, Marino R, Guercio G, Saraco N, Vaiani E, Rivarola MA: Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterozygote for two new point mutations of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5127-5131.
20. Petry CJ, Ong KK, Michelmore KF, Artigas S, Wingate DL, Balen AH, de Zegher F, Ibanez L, Dunger DB: Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. *Hum Reprod* 2005;20:1837-1843.
21. Jin JL, Sun J, Ge HJ, Cao YX, Wu XK, Liang FJ, Sun HX, Ke L, Yi L, Wu ZW, Wang Y: Association between CYP19 gene snp rs2414096 polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chinese women. *BMC Med Genet* 2009;10:139.
22. Toscani M, Migliavacca R, Sisson de Castro JA, Spritzer PM: 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* 2007;56:992-997.

23. Donato GB, Fuchs SC, Oppermann K, Bastos C, Spritzer PM: Association between menopause status and central adiposity measured at different cutoffs of waist circumference and waist-to-hip ratio. *Menopause* 2006;13:280-285.
24. Brum IS, Spritzer PM, Paris F, Maturana MA, Audran F, Sultan C: Association between androgen receptor gene cag repeat polymorphism and plasma testosterone levels in postmenopausal women. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:135-141.
25. Ferriman D, Gallwey JD: Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440-1447.
26. Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM: Lipid accumulation product index: A reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:1726-1731.
27. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
28. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-1495.
29. Kahn HS: The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: A population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord* 2005;5:26.
30. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr.: Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645.
31. Maier PS, Matiello SS, Lages L, Spritzer PM: 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71a/g hsd17b5 snp) and treatment with oral contraceptive pills in PCOS women without metabolic comorbidities. *Gynecological Endocrinology* 2012;in press
32. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
33. Shroff R, Syrop CH, Davis W, Van Voorhis BJ, Dokras A: Risk of metabolic complications in the new PCOS phenotypes based on the rotterdam criteria. *Fertil Steril* 2007;88:1389-1395.

34. Sowers MR, Wilson AL, Kardia SR, Chu J, Ferrell R: Aromatase gene (CYP 19) polymorphisms and endogenous androgen concentrations in a multiracial/multiethnic, multisite study of women at midlife. *Am J Med* 2006;119:S23-30.
35. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, Strauss JF, 3rd, Spielman RS, Dunaif A: Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8573-8578.
36. Soderlund D, Canto P, Carranza-Lira S, Mendez JP: No evidence of mutations in the p450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:965-969.
37. Vrbikova J, Cibula D: Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2005;11:277-291.

Table 1. Frequency of genotypes for SNP50 in the *CYP19* gene in classic and ovulatory PCOS phenotypes

Genotype	Classic PCOS	Ovulatory PCOS	p
GG	38 (30.4%)	14 (37.8%)	0.579
AG	59 (47.2%)	14 (37.8%)	
AA	28 (22.4%)	9 (24.4%)	
	125	37	

PCOS = polycystic ovary syndrome.

Values are expressed as number of patients and (%) (chi-square test for homogeneity).

Table 2. Clinical, hormonal, and metabolic characteristics of classic and ovulatory PCOS phenotypes according to the presence of allele A (polymorphic allele) for SNP50 in the *CYP19* gene

	Classic PCOS		Ovulatory PCOS		p*
	GG (n = 38)	AA+AG (n = 87)	GG (n = 14)	AA+AG (n = 23)	
BMI (kg/m ²)	31.9±7.8	31.1±7.7	27.7±5.9	26.6±5.2	0.003
Waist circumference (cm)	94±16.7	93.5±18.1	84.3±14.5	82.1±10.6	0.002
Ferriman-Gallwey score	14 (11-18)	15 (10-20)	13 (10-24)	13 (11-17)	0.610
Systolic BP (mmHg)	125.5±13.9	124.2±20.1	118.5±10.2	118.1±13.7	0.056
Diastolic BP (mmHg)	82.2±9.8	79.5±12.9	73.1±11.6	76.1±13.2	0.01
Insulin (uIU/mL)	19.4 (12.8-33.6)	20.3 (10.9-38.4)	10.5 (7.7-21.7)	10.3 (5.8-15.5)	<0.001
Glucose (mg/dL)	93.8± 18.7	90.9±20.2	88.4±12.5	85.3±9.8	0.123
HOMA index	4.1 (3-8)	4 (2.3-7.8)	2.2 (1.7-5.1)	2 (1.1-3.6)	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	193.8±36.4	173.3±43.1	162±28	166.9±29.6	0.013
HDL cholesterol (mg/dL)	48.1±8.7	48.4±9.8	54.8±9.4	50.5±9.9	0.019
LDL cholesterol (mg/dL)	119.4± 30.6	103.2±34.9	94.2±28.5	96.5±25.4	0.014
Triglycerides (mg/dL)	112 (73-147)	85 (62-131)	56 (39-86)	93 (60-129)	0.002
LAP index	47.9 (26.4-77.7)	31.5 (14.2-70.2)	11.7 (7.6-27.9)	22.2 (11.4-48.4)	<0.001
Total T (ng/mL)	1.08±0.45	1.04±0.39	0.6±0.18	0.59±0.27	<0.001
SHBG (nmol/L)	23.3 (15.6-32.1)	22.8 (13.9-32)	38.5 (18.7-50.2)	28.8 (18.8-47.7)	0.004
FAI	16.4 (8.9-23.3)	15.4 (9.4-23.6)	6.8 (4- 8.4)	4.6 (3.6- 8.6)	<0.001
DHEAS (ug/dL)	234 (147-293)	217 (137-300)	327 (276-383)	187 (121-329)	0.332
Androstenedione (ng/mL)	3.7 (2.6-4.9)	2.7 (2.4-3.7)	3.1 (1.9-3.6)	2.8 (1.7-3.4)	0.373
17-OHP (ng/mL)	1.1 (0.9-1.7)	1.1 (0.8-1.5)	1 (0.65-1.7)	0.82 (0.56-1.2)	0.055
LH (mIU/mL)	7.1 (4.1-9.7)	6.7 (4.4-12)	5.6 (3.9-7)	5.1 (4-6.7)	0.06
Ovarian volume (cm ³)	11.8±5.2	10.5±4.9	10.4±2.4	11.5±5.1	0.845

Values are expressed as mean±SD or median and interquartile range (25%–75%) (Two-way ANOVA)

BMI = body mass index; BP = blood pressure; DHEAS = dehydroepiandrosterone sulphate; FAI = free androgen index; HDL = high density lipoprotein cholesterol; HOMA = homeostasis model assessment; LAP = lipid accumulation index; LDL = low density lipoprotein cholesterol; LH = luteinizing hormone; PCOS = polycystic

ovary syndrome; SHBG = sex hormone-binding globulin; 17-OHP = 17 α -hydroxyprogesterone.

* $p < 0.05$ for Classic PCOS x Ovulatory PCOS comparisons. No differences were found regarding the presence of allele A.

No differences were found regarding the presence of allele A.

Table 3. Clinical, hormonal, and metabolic characteristics of a mixed group including classic and ovulatory PCOS women before and after treatment with oral contraceptive pills according to the presence of allele A (polymorphic allele) for SNP50 in the *CYP19* gene

	GG (n = 16)		AA+AG (n = 35)		p treatment	p interaction
	Before	After	Before	After		
BMI (kg/m ²)	26.7±6.7	26.4±6.2	26.7±7.1	26.7±7.3	0.589	0.361
Waist circumference (cm)	79.1±13.8	79±13.1	84.8±20.3	84.5±16.4	0.875	0.947
Systolic BP (mmHg)	120.5±10.1	116.5±9.3	126.1±20.6	120.8±11.7	0.038	0.747
Diastolic BP (mmHg)	77.9±11.6	77.9±11.5	79±13.3	76.9±11.7	0.487	0.487
Insulin (mUI/mL)	14.2 (6.4-31.2)	8.9 (5.3-26.4)	15.2 (9.6-24)	12.9 (7.5-19)	0.339	0.694
Glucose (mg/dL)	83.8±6.8	76.7±6,3	83.3±7.2	78.7±11.6	0.007	0.556
HOMA index	3 (1.4-7.2)	1.6 (0.9-5.1)	2.9 (1.9-4.8)	2.2 (1.3-3.2)	0.144	0.718
Total cholesterol (mg/dL)	172.9±29.9	197.2±42.9	156.3±29	181±38.5	<0.001	0.962
HDL cholesterol (mg/dL)	54.8±8.3	61.2±11.1	51.8±11.1	59.4±12.7	<0.001	0.668
LDL cholesterol (mg/dL)	101.5±31.9	111.4±41.9	87.2±23.8	97.8±32.3	0.041	0.943
Triglycerides (mg/dL)	71.5 (54.2-114)	87 (65-128)	72 (57-118)	107 (66.5-146.5)	<0.001	0.696
LAP index	15.9 (8.6-34.6)	17.5 (11.5-41.5)	19.8 (9.4-42.7)	17.1 (14.2-31.4)	0.036	0.637
LH (mIU/mL)	5.6 (3.9-8.1)	3.8 (2.4-5.4)	5.5 (2.8-12)	3.3 (1.6-4.6)	0.004	0.267
Ovarian volume (cm ³)	11.1 (8.4-13.3)	6.8 (5.3-7.9)	9.1 (6.1-13.2)	5.3 (3.8-7.6)	0.018	0.562

Values are expressed as mean \pm SD or median and interquartile range (25%–75%) (ANOVA for repeated measures).

BMI = body mass index; BP = blood pressure; DHEAS = dehydroepiandrosterone sulphate; FAI = free androgen index; HDL = high density lipoprotein cholesterol; HOMA = homeostasis model assessment; LAP = lipid accumulation index; ; LDL = low density lipoprotein cholesterol; LH = luteinizing hormone.

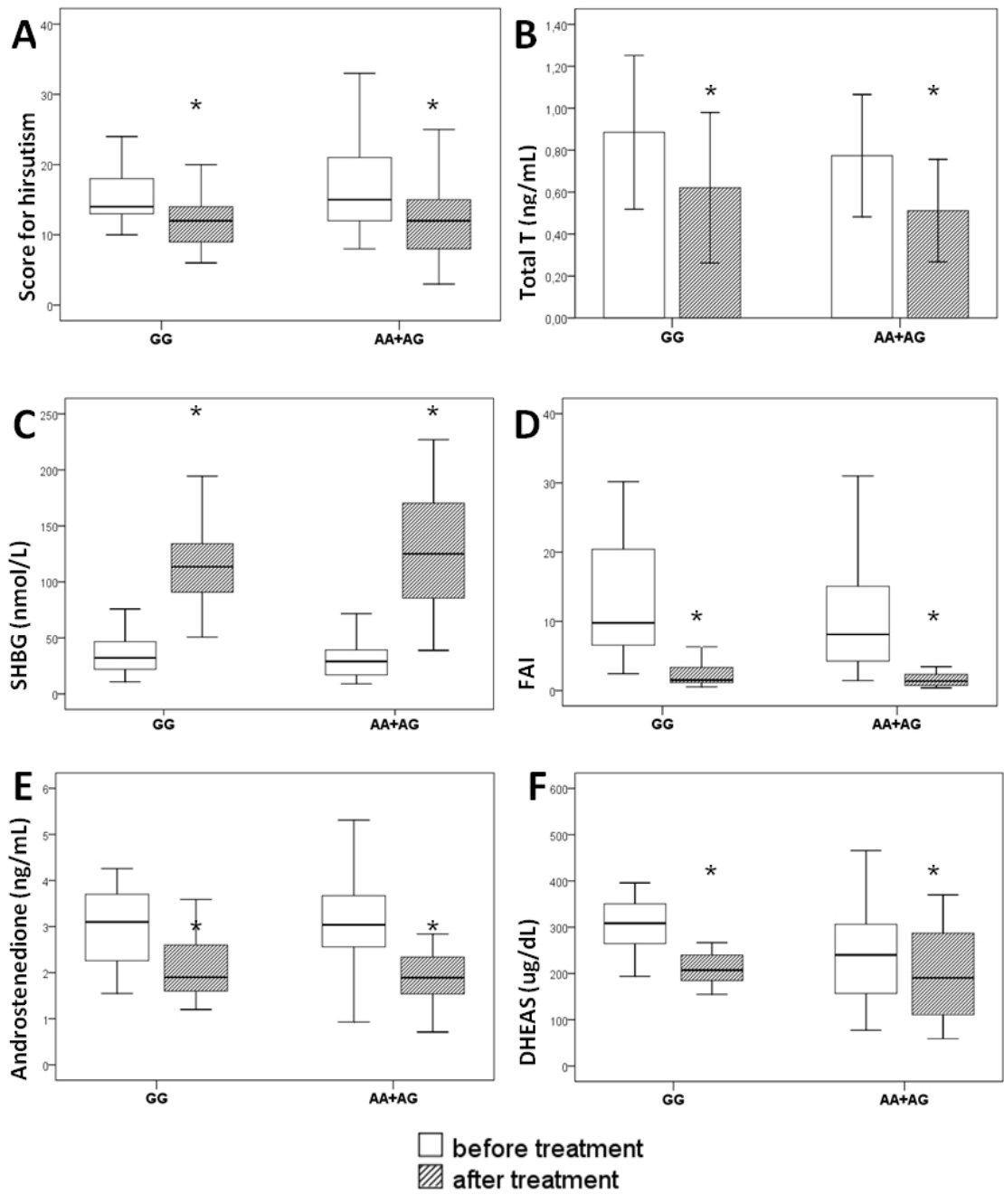
PCOS = polycystic ovary syndrome; SHBG = sex hormone-binding globulin.

P treatment = before treatment x after treatment comparisons. No differences were observed between genotypes.

P interaction = GG x AA+AG comparisons after treatment.

Figure legend

Figure 1. Hirsutism score (A), total testosterone levels (B), SHBG levels (C), FAI (D), androstenedione (E), and DHEAS levels (F) in PCOS women before and after treatment with oral contraceptive pills according to the presence of allele A at the SNP50 in the *CYP19* gene.



6 DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Os resultados compilados em forma de dois artigos nesta tese indicam que o tratamento com ACO é eficaz para a melhora de sintomas relacionados à PCOS, representando baixos riscos para mulheres sem alterações metabólicas. Além disso, foram avaliadas se variantes genéticas (SNPs) influenciavam nas melhorias verificadas nessas pacientes, porém, não foram obtidos resultados que sugerissem alguma contribuição. É importante ressaltar que estes estudos foram os primeiros que avaliaram se a presença dos polimorfismos -71AG do gene *AKR1C3* e SNP50 do gene *CYP19* podem levar à resposta diferenciada ao tratamento hormonal em mulheres com PCOS. Os resultados do presente trabalho indicam que não houve associações entre as melhoras observadas com o tratamento e a presença destes polimorfismos.

O papel fisiológico das enzimas 17 β HSD5 e aromatase no metabolismo androgênico sugere que alterações nos genes que codificam essas enzimas podem ter associações com o desenvolvimento de síndromes relacionadas ao excesso de androgênios, como a PCOS. A 17 β HSD5 é bastante expressa nos ovários (Qin e Rosenfield, 2000) e, especificamente nestes órgãos, atua na produção de esteróides com maior potencial androgênico. Já a aromatase converte androgênios em estrogênios, sendo que ambas as enzimas são fundamentais na regulação da quantidade de androgênios que estará biologicamente disponível para ação nos ovários e tecidos periféricos (Moeller e Adamski, 2009).

A importância das 17β HSDs na patogênese da PCOS é bem evidenciada na literatura. Nosso grupo já estudou o tipo 2 dessa enzima, que inativa os androgênios mais potentes. A expressão gênica da 17β HSD2 nos folículos pilosos de mulheres hirsutas é semelhante aos níveis verificados em homens, e menor que a expressão gênica observada em mulheres normais, mostrando a importância dessa enzima na regulação do metabolismo local de androgênios das mulheres hirsutas (Oliveira et al., 2003). Qin e colaboradores (2006) foram os primeiros autores a verificarem que o SNP -71AG do gene *AKR1C3* pode estar envolvido com a PCOS, já que a frequência de ocorrência do alelo G foi maior em pacientes do que em um grupo controle (Qin et al., 2006). Os mesmos autores sugerem que o alelo G em homozigose pode contribuir com até 20% dos níveis de testosterona em mulheres com PCOS (Qin et al., 2006). Essa associação do SNP -71AG com níveis de androgênios também foi confirmada por outros autores, que observaram que o alelo G está mais frequentemente presente em mulheres com maiores níveis séricos de testosterona total (Marioli et al., 2008).

Em estudo anterior do nosso grupo, o tratamento com ACO alterou a expressão gênica da 17β HSD2 nas mulheres hirsutas, atingindo níveis comparáveis aos de mulheres normais (Oliveira et al., 2003). Entretanto, nos resultados apresentados nesta tese, não foi verificada a contribuição do SNP -71AG do gene *AKR1C3* na resposta ao tratamento hormonal. Apesar do objetivo da análise do SNP -71AG ter sido a sua possível influência na resposta ao tratamento com ACO ao invés da associação com componentes da síndrome, nossos resultados sugerem que a participação desse SNP na patogênese da PCOS parece ser muito pequena. Se a contribuição do alelo G fosse significativa, teríamos sido capazes de observar alguma influência nos parâmetros clínicos e hormonais das mulheres portadoras após o uso do ACO. Há alguns dados conflitantes na literatura quanto à associação do SNP -71AG do gene *AKR1C3* com a PCOS e seus componentes. Alguns autores não verificaram a associação entre essa variante genética com PCOS (Goodarzi et al., 2008; Marioli et al., 2008; Ke et al., 2010) ou com puberdade precoce (Petry et al., 2007).

De acordo com os critérios de diagnóstico reunidos no Consenso de Rotterdam (2004), mulheres com hiperandrogenismo e anovulação são consideradas portadoras de PCOS, sendo este o fenótipo mais frequente e

denominado como “clássico” (c-PCOS). Entretanto, seguindo estas recomendações para o diagnóstico, se observa um grupo de mulheres com PCOS com uma forma “atenuada” da síndrome (ciclos ovulatórios, hirsutismo e aparência policística dos ovários), denominadas de portadoras do fenótipo ovulatório (ov-PCOS). Alguns autores relatam que as pacientes ov-PCOS possuem menor prevalência de fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares que mulheres c-PCOS, embora estes riscos possam ser mais elevados do que em mulheres saudáveis (Carmina et al., 2005; Shroff et al., 2007; Moran e Teede, 2009; Wiltgen e Spritzer, 2010). Entretanto, nenhum estudo verificou se a frequência de variantes genéticas possivelmente relacionadas com PCOS e hiperandrogenismo difere entre c-PCOS e ov-PCOS, buscando a elucidação das bases genéticas dos fenótipos de PCOS. Dessa forma, os resultados apresentados sobre o SNP50 nessa tese parecem ser pioneiros neste sentido.

A proximidade do SNP50 com outros polimorfismos no gene *CYP19* associados com câncer de mama e com níveis circulantes de estradiol (Siegelmann-Danieli e Buetow, 1999; Haiman et al., 2003; Somner et al., 2004) sugere uma possível relação do SNP50 com doenças relacionadas à desregulação do metabolismo androgênico. Nesta tese, investigamos se a frequência desse polimorfismo era diferente entre pacientes c-PCOS e ov-PCOS. Nossos resultados mostram que as frequências genotípicas são similares entre esses dois subgrupos da PCOS, sugerindo que o SNP50 não parece ser a variante genética responsável pelas diferenças clínicas, metabólicas e hormonais existentes entre estes fenótipos.

Outros autores sugerem ainda que o gene codificador da aromatase não pode ser considerado um gene candidato para o desenvolvimento da PCOS. Após o mapeamento de 37 genes em busca da associação com PCOS e hiperandrogenemia, verificou-se que a contribuição do gene *CYP19* para etiologia dessas características, se existente, seria mínima (Urbanek et al., 1999). Através da análise dos éxons do gene codificador da aromatase, se observou que mulheres com PCOS não apresentavam mutações nas regiões analisadas (Soderlund et al., 2005). Além disso, a aparente falta de contribuição do SNP50 nas melhoras verificadas após o tratamento com ACO nos resultados obtidos nesta tese é outra evidência de que o SNP50 não pode ser considerado a “chave” para explicação das bases genéticas da patogênese da PCOS.

Petry e pesquisadores (2005) observaram a existência de associação do SNP50 com maiores concentrações de testosterona circulantes em uma população com grande prevalência de PCOS (Petry et al., 2005). Outros autores verificaram que mulheres na perimenopausa e menopausa portadoras do alelo A apresentaram maiores níveis de androgênios circulantes. Entretanto, o aumento observado não possui significância estatística (Sowers et al., 2006). Nossos resultados também estão de acordo com os obtidos por Jin e pesquisadores (2009), que estudaram uma população de mulheres chinesas com PCOS e não verificaram nenhuma associação dos níveis de androgênios com os genótipos do SNP50 (Jin et al., 2009).

Como esperado, os benefícios do uso do ACO puderam ser observados através da diminuição dos níveis de testosterona, do índice de androgênios livres e do escore de hirsutismo. Esses dados confirmam o anteriormente verificado por outros pesquisadores, evidenciando os efeitos do ACO na supressão da produção de androgênios ovarianos e na melhora da qualidade de vida das pacientes (Escobar-Morreale et al., 2000; Cibula et al., 2002; Mulders et al., 2005; De Leo et al., 2010).

As mulheres que receberam ACO não apresentaram alterações nos níveis de insulina e no índice HOMA após 6 meses de tratamento. Além disso, foi observada uma discreta redução nas dosagens de glicose das pacientes. Cibula e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos de um ACO com progestogênio de pouco efeito androgênico no tratamento de PCOS não-obesas e observaram níveis constantes de insulina e uma diminuição nos níveis de glicose, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo (Cibula et al., 2002). Outros pesquisadores não verificaram alterações na resistência insulínica de pacientes que realizaram tratamento com ACO de baixa dosagem por 6 meses (Meyer et al., 2007). Os resultados referentes ao metabolismo da glicose e da insulina observados nesta tese também estão de acordo com uma metanálise recente que revisou 42 estudos que avaliaram os efeitos do ACO no metabolismo de carboidratos e lipídios. Segundo esses autores, não há associação do uso do ACO com alterações significativas nos níveis de insulina e do índice HOMA em mulheres com PCOS. Apesar de os estudos relatarem dados controversos quanto à influência no metabolismo de carboidratos, Fauser e pesquisadores (2011) também sugerem que o uso de ACO de baixa dosagem por até 12 meses não implica em impacto significativo na sensibilidade à insulina da maioria das mulheres com PCOS, embora

algumas alterações possam ser observadas em um pequeno número de pacientes (Fauser et al., 2011).

Nossos resultados também indicaram um aumento nos níveis de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos das pacientes após o uso do ACO. Apesar da diferença estatística observada, os valores são considerados normais, segundo os valores de referência. Em geral, o aumento do colesterol total e dos níveis de triglicerídeos são efeitos colaterais comuns do tratamento com ACO em mulheres com PCOS (Vrbikova e Cibula, 2005; Ozdemir et al., 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Apesar de o aumento de triglicerídeos ser bastante documentado (Diamanti-Kandarakis et al., 2009), não raramente se observam elevações nas dosagens de colesterol total nas mulheres com PCOS após o tratamento com ACO (Banaszewska et al., 2007). A partir da meta-análise realizada por Halperin e colaboradores (2011) sugere-se que o uso de ACO está associado com aumento nos níveis de HDL-colesterol e triglicerídeos. Entretanto, esses autores não observaram mudanças significativas em parâmetros como o colesterol total e o LDL-colesterol nos estudos avaliados (Halperin et al., 2011).

Dessa forma, o conjunto de resultados obtidos em relação ao metabolismo de carboidratos e de lipídios indica que o tratamento com ACO é uma opção segura para mulheres com PCOS não-obesas ou que não apresentam alterações metabólicas. Nossos dados também evidenciam a importância da individualização do tratamento de acordo com a história clínica pregressa da paciente. Também se faz necessário o melhor conhecimento da resposta ao tratamento hormonal entre diferentes fenótipos da PCOS e se variantes genéticas podem ter alguma influência adicional na melhoria de variáveis clínicas, hormonais e metabólicas após o uso da medicação. Entretanto, o número reduzido de pacientes que realizaram o tratamento com ACO não permitiu que se fizesse uma comparação entre c-PCOS e ov-PCOS e que considerasse a presença dos polimorfismos na mesma análise, sendo essa uma das limitações dos resultados apresentados.

Em conclusão, os resultados obtidos nessa tese sugerem que o uso do ACO é uma alternativa eficaz para tratamento do hirsutismo e do excesso de androgênios, sem trazer riscos ao perfil metabólico e lipídico de mulheres com PCOS sem comorbidades metabólicas. Entretanto, a presença dos SNPs -71AG do gene *AKR1C3* e do SNP50 do gene *CYP19* parece não ter influência na resposta ao

tratamento com ACO verificada nessas mulheres. Além disso, o SNP50 não está associado com os fenótipos clássico e ovulatório da PCOS.

7 PERSPECTIVAS

Para prosseguimento das avaliações farmacogenéticas, outros polimorfismos presentes em genes codificadores de enzimas relacionadas ao metabolismo androgênico devem ser investigados. Além disso, polimorfismos nos genes *CYP19* e *AKR1C3* que estejam em proximidade aos SNPs estudados deverão ser genotipados.

Um número maior de participantes também permitirá que se avalie concomitantemente a influência dos polimorfismos no tratamento hormonal de mulheres com diferentes fenótipos da PCOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Hum Reprod** 19(1): 41-7.

Altmae S, Haller K, et al. (2009). Aromatase gene (CYP19A1) variants, female infertility and ovarian stimulation outcome: a preliminary report. **Reprod Biomed Online** 18(5): 651-7.

AppliedBiosystems (2005) Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real Time PCR System - Allelic Discrimination Getting Started Guide. **Volume**, DOI: 4347822

Azziz R, Carmina E, et al. (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. **Fertil Steril** 91(2): 456-88.

Badawy A e Elnashar A (2011). Treatment options for polycystic ovary syndrome. **Int J Womens Health** 3: 25-35.

Balen A (2004). The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 18(5): 685-706.

Banaszewska B, Pawelczyk L, et al. (2007). Effects of simvastatin and oral contraceptive agent on polycystic ovary syndrome: prospective, randomized, crossover trial. **J Clin Endocrinol Metab** 92(2): 456-61.

Belgorosky A, Pepe C, et al. (2003). Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterocygote for two new point mutations of the CYP19 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 88(11): 5127-31.

Blight LF, Judd SJ, et al. (1989). Relative diagnostic value of serum non-SHBG-bound testosterone, free androgen index and free testosterone in the assessment of mild to moderate hirsutism. **Ann Clin Biochem** 26 (Pt 4): 311-6.

Bulun SE, Sebastian S, et al. (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. **J Steroid Biochem Mol Biol** 86(3-5): 219-24.

Butler JM (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STRs Markers, Elsevier Academic Press.

Cagnacci A, Paoletti AM, et al. (2003). Glucose metabolism and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome during therapy with oral contraceptives containing cyproterone acetate or desogestrel. **J Clin Endocrinol Metab** 88(8): 3621-5.

Carmina E, Chu MC, et al. (2005). Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. **J Clin Endocrinol Metab** 90(5): 2545-9.

Chang WY, Knochenhauer ES, et al. (2005). Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. **Fertil Steril** 83(6): 1717-23.

Chen W, Thiboutot D, et al. (2002). Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. **J Invest Dermatol** 119(5): 992-1007.

Cibula D, Sindelka G, et al. (2002). Insulin sensitivity in non-obese women with polycystic ovary syndrome during treatment with oral contraceptives containing low-androgenic progestin. **Hum Reprod** 17(1): 76-82.

Cooper HE, Spellacy WN, et al. (1968). Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. **Am J Obstet Gynecol** 100(3): 371-87.

De Leo V, Di Sabatino A, et al. (2010). Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. **Contraception** 82(3): 276-80.

Deligeoroglou E, Kouskouti C, et al. (2009). The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. **Gynecol Endocrinol** 25(9): 603-9.

Diamanti-Kandarakis E, Kandaraki E, et al. (2009). The effect of pharmaceutical intervention on lipid profile in polycystic ovary syndrome. **Obes Rev** 10(4): 431-41.

Diamanti-Kandarakis E, Kandarakis H, et al. (2006). The role of genes and environment in the etiology of PCOS. **Endocrine** 30(1): 19-26.

Diamanti-Kandarakis E e Piperi C (2005). Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. **Hum Reprod Update** 11(6): 631-43.

Ehrmann DA (2005). Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med** 352(12): 1223-36.

Escobar-Morreale HF, Lasuncion MA, et al. (2000). Treatment of hirsutism with ethinyl estradiol-desogestrel contraceptive pills has beneficial effects on the lipid profile and improves insulin sensitivity. **Fertil Steril** 74(4): 816-9.

Fauser BC, Tarlatzis BC, et al. (2011). Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. **Fertil Steril** 97(1): 28-38 e25.

Ferriman D e Gallwey JD (1961). Clinical assessment of body hair growth in women. **J Clin Endocrinol Metab** 21: 1440-7.

Ferriman D e Purdie AW (1979). The inheritance of polycystic ovarian disease and a possible relationship to premature balding. **Clin Endocrinol (Oxf)** 11(3): 291-300.

Franks S (2006). Candidate genes in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 86 Suppl 1: S15.

Friedewald WT, Levy RI, et al. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem** 18(6): 499-502.

Gabrilove JL (2002). The pathogenesis of the polycystic ovary syndrome: a hypothesis. **Endocr Pract** 8(2): 127-32.

Gennari L, Masi L, et al. (2004). A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. **J Clin Endocrinol Metab** 89(6): 2803-10.

Goodarzi MO, Dumesic DA, et al. (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. **Nat Rev Endocrinol** 7(4): 219-31.

Goodarzi MO, Jones MR, et al. (2008). Nonreplication of the type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 93(1): 300-3.

Grumbach MM e Auchus RJ (1999). Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. **J Clin Endocrinol Metab** 84(12): 4677-94.

Haiman CA, Stram DO, et al. (2003). A comprehensive haplotype analysis of CYP19 and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. **Hum Mol Genet** 12(20): 2679-92.

Halperin IJ, Kumar SS, et al. (2011). The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Hum Reprod** 26(1): 191-201.

Hart R, Hickey M, et al. (2004). Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 18(5): 671-83.

Hatch R, Rosenfield RL, et al. (1981). Hirsutism: implications, etiology, and management. **Am J Obstet Gynecol** 140(7): 815-30.

Hoffmann R (2001). Enzymology of the hair follicle. **Eur J Dermatol** 11(4): 296-300.

Hollinrake E, Abreu A, et al. (2007). Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 87(6): 1369-76.

Ito Y, Fisher CR, et al. (1993). Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(24): 11673-7.

- Jin JL, Sun J, et al. (2009). Association between CYP19 gene SNP rs2414096 polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chinese women. **BMC Med Genet** 10: 139.
- Jonard S, Robert Y, et al. (2003). Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? **Hum Reprod** 18(3): 598-603.
- Jones ME, Thorburn AW, et al. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(23): 12735-40.
- Kahsar-Miller MD, Nixon C, et al. (2001). Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. **Fertil Steril** 75(1): 53-8.
- Ke L, Che YN, et al. (2010). Polymorphisms of the HSD17B6 and HSD17B5 genes in Chinese women with polycystic ovary syndrome. **J Womens Health (Larchmt)** 19(12): 2227-32.
- Kerchner A, Lester W, et al. (2009). Risk of depression and other mental health disorders in women with polycystic ovary syndrome: a longitudinal study. **Fertil Steril** 91(1): 207-12.
- Kim C, Siscovick DS, et al. (2002). Oral contraceptive use and association with glucose, insulin, and diabetes in young adult women: the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. **Diabetes Care** 25(6): 1027-32.
- Labrie F, Luu-The V, et al. (1997). The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. **Steroids** 62(1): 148-58.
- Lin HK, Jez JM, et al. (1997). Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. **Mol Endocrinol** 11(13): 1971-84.
- Lopez LM, Grimes DA, et al. (2009). Steroidal contraceptives: effect on carbohydrate metabolism in women without diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Rev**(4): CD006133.
- Ludicke F, Gaspard UJ, et al. (2002). Randomized controlled study of the influence of two low estrogen dose oral contraceptives containing gestodene or desogestrel on carbohydrate metabolism. **Contraception** 66(6): 411-5.
- Lunde O, Magnus P, et al. (1989). Familial clustering in the polycystic ovarian syndrome. **Gynecol Obstet Invest** 28(1): 23-30.
- Luu-The V (2001). Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. **J Steroid Biochem Mol Biol** 76(1-5): 143-51.
- Marchais-Oberwinkler S, Henn C, et al. (2011). 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases (17beta-HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. **J Steroid Biochem Mol Biol** 125(1-2): 66-82.

Marioli DJ, Saltamavros AD, et al. (2008). Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (-71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Fertil Steril**.

Mastorakos G, Koliopoulos C, et al. (2006). Effects of two forms of combined oral contraceptives on carbohydrate metabolism in adolescents with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 85(2): 420-7.

Mendelson CR, Jiang B, et al. (2005). Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. **J Steroid Biochem Mol Biol** 95(1-5): 25-33.

Meyer C, McGrath BP, et al. (2007). Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. **Diabetes Care** 30(3): 471-8.

Miller SA, Dykes DD, et al. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** 16(3): 1215.

Moeller G e Adamski J (2009). Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. **Mol Cell Endocrinol** 301(1-2): 7-19.

Moran L e Teede H (2009). Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod Update** 15(4): 477-88.

Mulders AG, ten Kate-Booij M, et al. (2005). Influence of oral contraceptive pills on phenotype expression in women with polycystic ovary syndrome. **Reprod Biomed Online** 11(6): 690-6.

NCBI. "National Center for Biotechnology Information." Retrieved 01/16/2012, 2012, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Norman RJ, Dewailly D, et al. (2007). Polycystic ovary syndrome. **Lancet** 370(9588): 685-97.

Oliveira IO, Lhullier C, et al. (2003). Gene expression of type 2 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. **Steroids** 68(7-8): 641-9.

Ozdemir S, Gorkemli H, et al. (2008). Clinical and metabolic effects of medroxyprogesterone acetate and ethinyl estradiol plus drospirenone in women with polycystic ovary syndrome. **Int J Gynaecol Obstet** 103(1): 44-9.

Petry CJ, Ong KK, et al. (2005). Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. **Hum Reprod** 20(7): 1837-43.

Petry CJ, Ong KK, et al. (2007). Lack of association between common polymorphisms in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. **J Steroid Biochem Mol Biol** 105(1-5): 176-80.

- Qin K, Ehrmann DA, et al. (2006). Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 91(1): 270-6.
- Qin K e Rosenfield RL (2005). Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. **Biochim Biophys Acta** 1728(3): 115-25.
- Qin KN e Rosenfield RL (2000). Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 in human ovary: a pilot study. **J Soc Gynecol Investig** 7(1): 61-4.
- Randall VA (2007). Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. **Semin Cell Dev Biol**.
- Rosenfield RL (1986). Pilosebaceous physiology in relation to hirsutism and acne. **Clin Endocrinol Metab** 15(2): 341-62.
- Saha L, Kaur S, et al. (2011). Pharmacotherapy of polycystic ovary syndrome - an update. **Fundam Clin Pharmacol** 26(1): 54-62.
- Shetty G, Krishnamurthy H, et al. (1997). Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. **J Steroid Biochem Mol Biol** 61(3-6): 157-66.
- Shroff R, Syrop CH, et al. (2007). Risk of metabolic complications in the new PCOS phenotypes based on the Rotterdam criteria. **Fertil Steril** 88(5): 1389-95.
- Siegelmann-Danieli N e Buetow KH (1999). Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (Cyp19) and breast cancer risk. **Br J Cancer** 79(3-4): 456-63.
- Simpson ER, Clyne C, et al. (2002). Aromatase--a brief overview. **Annu Rev Physiol** 64: 93-127.
- Skouby SO, Andersen O, et al. (1987). Oral contraception and insulin sensitivity: in vivo assessment in normal women and women with previous gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 64(3): 519-23.
- Soderlund D, Canto P, et al. (2005). No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod** 20(4): 965-9.
- Somner J, McLellan S, et al. (2004). Polymorphisms in the P450 c17 (17-hydroxylase/17,20-Lyase) and P450 c19 (aromatase) genes: association with serum sex steroid concentrations and bone mineral density in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab** 89(1): 344-51.
- Sowers MR, Wilson AL, et al. (2006). Aromatase gene (CYP 19) polymorphisms and endogenous androgen concentrations in a multiracial/multiethnic, multisite study of women at midlife. **Am J Med** 119(9 Suppl 1): S23-30.

Spritzer PM (2002). Revisitando o hirsutismo. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia** 46(2): 127-136.

Spritzer PM e Wiltgen D (2007). [Prevalence of metabolic syndrome in patients of south of Brazil with polycystic ovary syndrome (PCOS)]. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 51(1): 146-7.

Stein I e Leventhal M (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **Am J Obstet Gynecol** 29: 181-185.

Teede HJ, Hutchison SK, et al. (2007). The management of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Trends Endocrinol Metab** 18(7): 273-9.

Toscani M, Migliavacca R, et al. (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(7): 992-7.

Urbanek M, Legro RS, et al. (1999). Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(15): 8573-8.

Vermeulen A, Verdonck L, et al. (1999). A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. **J Clin Endocrinol Metab** 84(10): 3666-72.

Vrbikova J e Cibula D (2005). Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod Update** 11(3): 277-91.

Wallace TM, Levy JC, et al. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care** 27(6): 1487-95.

Wiltgen D, Benedetto IG, et al. (2009). Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod** 24(7): 1726-31.

Wiltgen D e Spritzer PM (2010). Variation in metabolic and cardiovascular risk in women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. **Fertil Steril** 94(6): 2493-6.

Yilmaz M, Isaoglu U, et al. (2011). Anthropometric, clinical and laboratory comparison of four phenotypes of polycystic ovary syndrome based on Rotterdam criteria. **J Obstet Gynaecol Res** 37(8): 1020-6.