

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DO
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO
ATRIAL (ANP) E SUA RELAÇÃO
COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS
POLICÍSTICOS E CO-MORBIDADES
ASSOCIADAS**

Patrícia Bittencourt Marques Lauria

Belo Horizonte-MG
2012

Patrícia Bittencourt Marques Lauria

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP) E SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS E CO-MORBIDADES ASSOCIADAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Mulher

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Cândido

Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte-MG
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Profa. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

Faculdade de Medicina

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia:

Prof Cezar Alencar de Lima Rezende

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Prof Antônio Carlos Viera Cabral

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Profa Alamanda Kfoury Pereira

Ao meu pai Geraldo, à minha mãe Vilma,
ao meu marido Márcio e
aos meus filhos Alexandre e Priscila,
por todo apoio, carinho e compreensão

Agradecimentos

Ao professor Fernando Marcos dos Reis , pela oportunidade, pelo exemplo e pela competência,

À professora Ana Lúcia Cândido, pelo apoio, dedicação, disponibilidade e conhecimento,

À Mariana Bizzi e à Helen, pessoas fundamentais para a realização desta pesquisa,

Aos meus pais, por todo amor e carinho,

Aos meus filhos, minhas maiores alegrias,

Ao Márcio, meu esposo e maior incentivador, pelo apoio, companheirismo e compreensão.

Ao Laboratório Hermes Pardini

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	8
Resumo	10
1. Introdução	11
2. Revisão da literatura	13
2.1 Síndrome dos Ovários Policísticos	13
2.1.1 Definições	13
2.1.2 Fisiopatologia	15
2.1.2.1 Resistência Insulínica	15
2.1.2.2 Disfunção Neuroendócrina	16
2.1.2.3 Defeito Ovariano	17
2.1.2.4 Papel das Gonadotrofinas e dos Fatores de Crescimento	17
2.1.2.5 Metabolismo Periférico do Cortisol Aumentado	18
2.1.3 Genética	18
2.2 Resistência Insulínica e PCOS	19
2.3 Peptídeos Natriuréticos	20
2.3.1 Definições	20
2.3.2 Receptores	23
2.4 Lipólise	26
2.4.1 Definições	26
2.4.2 Variações Regionais na Lipólise	29
2.5 ANP E IR	30
3.0 Objetivos	32

3.1 Objetivo Primário	32
3.2 Objetivos Secundários	32
4.0 Referências Bibliográficas	33
5.0 Artigo Original	46
5.1 Title	46
5.2 Abstract	46
5.3 Key words	46
5.4 Introduction	46
5.5 Methods	47
5.5.1 Subjects	47
5.5.2 Design of the study	48
5.5.3 Hormone and Metabolite determination	49
5.5.4 Statistical Analysis	50
5.6 Results	51
5.6.1 General Characteristics	51
5.6.2 Natriuretic Peptide Level	53
5.6.3 Adiponectin Level	55
5.6.4 Discussion	57
5.7 References	63
6.0 Considerações Finais	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
AE-PCOS <i>society</i>	<i>The Androgen Excess and PCOS Society</i>
BNP	Peptídeo Natriurético tipo B ou Peptídeo Natriurético Cerebral
CNP	Peptídeo Natriurético tipo C
DNP	Peptideo Natriurético <i>Dendroaspis</i>
GC	Guanilato Ciclase
GMPc	Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica
CGK	Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica -dependente quinase
GNC	Canal fechado de Nucleotídeo Cíclico
GTP	Guanosina 5' trifosfato
HOMA- IR	Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Índice
HSL	Lipase Hormônio Sensível
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotropina
IGF	Fatores de Crescimento Insulina <i>Símile</i>
IGFBP-1	Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Insulina <i>símile</i> tipo 1
IGF-1	Fator de Crescimento Insulina Símile tipo I
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Resistência Insulínica
IRS-1	Substrato do receptor de insulina tipo1
LAP	Produto da Acumulação Lipídica
LH	Hormônio Luteinizante

NIH	Instituto Nacional de Saúde Infantil e Doenças Humanas
NP	Peptídeos Natriuréticos
NPR-A	Receptor de Peptídeo Natriurético tipo A
NPR-B	Receptor de Peptídeo Natriurético tipo B
NPR-C	Receptor de Peptídeo Natriurético tipo C
PDE	Fosfodiesterase
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais

RESUMO

Acredita-se que uma disfunção no tecido adiposo desempenhe um importante papel na etiopatogenia da Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS- Polycystic Ovary Syndrome). Os peptídeos natriuréticos são hormônios liberados pelas células cardíacas com funções de manutenção da homeostase cardiovascular e reconhecida atividade no metabolismo do tecido adiposo. Estudos prévios demonstraram a redução dos seus níveis na obesidade e no diabetes. **Material e Métodos:** Realizamos um estudo transversal com 40 pacientes diagnosticadas como portadoras da PCOS segundo os critérios de Rotterdam e com 36 mulheres controle pareadas por idade e IMC. Foram realizados os exames séricos relacionados ao perfil metabólico, dosados os níveis séricos da adiponectina, do peptídeo natriurético atrial (ANP) e do peptídeo cerebral natriurético (BNP) em ambos os grupos. Calculou-se o homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR) e o Lipid Accumulation Product (LAP). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma v4.0. Na comparação entre os grupos utilizaram-se os testes t de Student, Mann-Whitney, Correlação de Pearson e de Spearman, conforme a indicação. O resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

Resultados: Os valores relativos ao perfil metabólico- insulina, glicemia, HDL e triglicérides- bem como os resultados do LAP e do HOMA-IR não se diferiram entre os grupos ($p > 0,05$). O LDL colesterol apresentou-se mais elevado no grupo com PCOS ($168,5 \pm 33,7$ vs $147,1 \pm 30,32$ mg/dl, $p < 0,05$). Os níveis do ANP e da adiponectina apresentaram-se reduzidos no grupo da PCOS em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$ e $p = 0,0143$, respectivamente). Os valores das dosagens de BNP não diferiram entre os dois grupos ($p = 0,979$). Níveis séricos do ANP apresentaram fraca correlação com aqueles da adiponectina e do BNP na análise geral ($r = 0,35$ e $p = 0,006$, $r = 0,26$ e $p = 0,040$, respectivamente) mas não na análise dos grupos separadamente. Não houve correlação entre os níveis do ANP com os parâmetros metabólicos e com os índices HOMA-IR e LAP.

Conclusão: Pacientes portadoras de PCOS apresentam níveis séricos de ANP e adiponectina reduzidos em relação a controles pareados por idade e IMC especulando-se uma possível contribuição desses hormônios na patogênese dessa síndrome.

Palavras-Chave: Síndrome dos Ovários Policísticos, Peptídeo Natriurético Atrial, Adiponectina

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é uma das endocrinopatias mais comuns em seres humanos acometendo entre 6 e 10% da população feminina em idade reprodutiva (1). Foi descrita, inicialmente, em 1935 por Stein e Leventhal, ao observarem uma associação entre amenorréia, hirsutismo, obesidade e ovários aumentados de volume, com aspecto policístico (2). Atualmente, diversos critérios diagnósticos têm sido adotados (Tabela 1), gerando uma heterogeneidade nos fenótipos dessa síndrome (3).

Tabela 1. Critérios diagnósticos para a síndrome dos ovários policísticos segundo os Consensos do NIH, Rotterdam e *AE-PCOS Society*⁴

NIH ²	Rotterdam ³	<i>AE-PCOS Society</i> ⁴
Presença de dois critérios:	Presença de dois dos três critérios:	Presença de dois critérios:
Disfunção menstrual	Disfunção menstrual	Disfunção menstrual e/ou ovários policísticos
Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo	Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo	Hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo
Ovários policísticos		

(Extraído da referência 4)

Os sintomas da PCOS usualmente se iniciam na menarca, mas podem ocorrer anos após esse período como resultado da ação de modificadores ambientais como ganho de peso e sedentarismo (5). As portadoras da PCOS apresentam graus variados de hiperandrogenemia que se manifestam através de sinais clínicos de hirsutismo, acne e alopecia de padrão masculino (6). A presença de anovulação crônica, caracterizada por oligomenorréia (menos que oito menstruações por ano) ou amenorréia (ausência de menstruação por período superior a 3 meses), também constitui achado frequente e é causa importante de infertilidade nestas pacientes (7). Finalmente, a identificação ecográfica das alterações na arquitetura ovariana acrescentou novas características a essa endocrinopatia. A presença de 12 ou mais folículos

medindo entre 2-9 mm de diâmetro ou volume ovariano aumentado(>10ml) são as características utilizadas na definição do critério ultrassonográfico da PCOS (7).

Existe uma forte associação entre a PCOS e o excesso de peso, sendo descrita uma prevalência de até 75% de obesidade em portadoras dessa síndrome (6). Observa-se um acúmulo preferencial de gordura visceral na PCOS, refletindo em um aumento da circunferência abdominal, que se associa à hiperandrogenemia, à resistência insulínica (IR- insulin resistance), à intolerância à glicose e à dislipidemia observadas nessa síndrome (6,8).

Diversas hipóteses têm sido elaboradas para esclarecimento da etiopatogenia da PCOS, destacando-se a teoria da presença de um ambiente hiperandrogênico determinante na distribuição da gordura corporal e favorecedor do acúmulo de gordura no tecido visceral (9). Essa concentração de gordura em região abdominal seria um fator desencadeador da IR presente nesse grupo de mulheres. Entretanto, outros fatores etiológicos, além do excesso de peso, podem contribuir para o surgimento da IR na PCOS (10-11).

O peptídeo natriurético atrial (ANP) é um hormônio sintetizado pelas células miocárdicas em resposta à distensão atrial observada em situações de sobrecarga de volume cardíaco. Possui ações cardioprotetoras como vasodilatação, natriurese e inibição do sistema nervoso simpático e do eixo renina-angiotensina-aldosterona (12). A identificação da expressão de seus receptores no tecido adiposo humano (13) foi um fato de extrema relevância e desde então, diversos estudos têm demonstrado seu efeito como agente mediador da lipólise (14-16).

Desde a constatação de sua importante atividade lipolítica, diversos estudos, avaliando os peptídeos natriuréticos (NP- Natriuretic Peptides) em população obesa, têm sido realizados. O maior deles, um estudo de coorte com participantes da sexta geração do Framingham Heart Study, identificou uma relação inversa entre os níveis circulantes destes hormônios e a obesidade (17,18) bem como um efeito aditivo do diabetes na redução dos NP. Em outro

estudo, Khan e colaboradores demonstraram que a redução dos NP está mais relacionada à presença de IR do que à obesidade, tendo em vista que os indivíduos obesos sem IR não apresentaram níveis reduzidos desses hormônios (19).

Considerando que a etiopatogenia da PCOS está relacionada à IR e que os NPs apresentam-se reduzidos na IR, o presente estudo, avaliando os níveis de ANP na PCOS, é uma contribuição para a compreensão dos possíveis mecanismos de associação entre essa síndrome e a IR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome dos Ovários Policísticos

2.1.1 Definições:

A PCOS foi descrita inicialmente por Stein e Leventhal em 1935, ao observarem uma associação entre amenorréia, hirsutismo, obesidade e ovários de aspecto anatômico alterado, com aumento de volume, espessamento capsular, múltiplos cistos e estroma denso e hipertrófico (2).

Posteriormente, com a heterogeneidade das características clínicas associadas a esta entidade e com a introdução de novas técnicas de investigação, o que antes era um diagnóstico baseado apenas em aspectos clínicos e anatômicos passou a incorporar critérios bioquímicos e ultrassonográficos (4). Dessa maneira, apesar da evolução dos exames propedêuticos ter trazido maiores possibilidades para investigação e pesquisa dessa síndrome, tornou-se mais difícil definir os critérios que fossem universalmente aceitos para o diagnóstico da PCOS.

Com a intenção de se solucionar esse problema, diversas reuniões de consenso têm sido realizadas por especialistas e estudiosos da área. A primeira delas, elaborada pelo National Institute of Child Health and Human Disease (NIH) do U.S. National Institutes of Health (1), em 1990, concluiu que dentre os critérios maiores para definição da PCOS,

deverão ser incluídos, em ordem de importância: 1) Hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia 2) Oligo-ovulação e 3) exclusão de outras desordens conhecidas associadas ao hiperandrogenismo. Este consenso definiu a PCOS como uma manifestação de um estado de anovulação crônica hiperandrogênica resultando em disfunção menstrual e excesso de androgênios ao exame clínico (hiperandrogenismo) e/ou ao exame laboratorial (hiperandrogenemia).

A segunda reunião de consenso, realizada pela European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) e pela American Society for Reproductive Medicine, em Rotterdam, no ano de 2003 (20), recomendou que o diagnóstico da PCOS fosse realizado quando pelo menos duas das seguintes características estivessem presentes :

1) oligo-e/ou anovulação, 2) sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo , 3) ovários policísticos ao ultrassom. Essa orientação também considerou que outras situações caracterizadas pelo excesso de androgênio fossem excluídas antes de se fazer o diagnóstico da PCOS.

Incluindo a apresentação dos ovários policísticos à ecografia como um critério diagnóstico, o consenso de Rotterdam reconheceu mais quatro fenótipos para a PCOS (3) (tabela 2).

Tabela 2. Todos os fenótipos possíveis baseado na presença ou ausência de oligoanovulação, hiperandrogenemia, hirsutismo e ovários policísticos

Features	Potential phenotypes															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Hyperandrogenemia	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Hirsutism	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Oligoanovulation	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Polycystic ovaries	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
NIH 1990 criteria	✓	✓	✓	✓	✓	✓										
Rotterdam 2003 criteria	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
AES 2006 criteria	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						

+ , Presence; - , absence.

(Extraído da referência 3)

Esta definição fez surgir questões controversas e não resolvidas com implicações no diagnóstico clínico e no delineamento das pesquisas atuais e futuras em PCOS. O reconhecimento de alguns fenótipos não carreadores do hiperandrogenismo resultou em discordância entre aqueles que consideravam esse achado fundamental no desenvolvimento futuro de doenças endócrino-metabólicas, risco comum em portadoras da PCOS, e os que pretendiam ampliar a população de pacientes com o diagnóstico desta síndrome.

O posicionamento oficial da *The Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS Society)*, em 2006 (3), recomendou, baseado em evidências científicas, que o consenso do NIH seja adotado com algumas modificações, levando-se em conta as observações realizadas na conferência de Rotterdam em 2003. Este consenso definiu que para se ter um diagnóstico de PCOS, são necessários dois dos seguintes critérios: 1- oligo e/ou anovulação ou ovários policísticos à ultrassonografia 2- Hiperandrogenismo clínico ou hiperandrogenemia.

Essencialmente a AE-PCOS Society considerou que essa síndrome seja definida por todos aqueles fenótipos que potencialmente apresentem um risco aumentado para IR e, conseqüentemente, para doenças cardiometabólicas (3).

O mais recente consenso realizado em Amsterdam, em 2010, resumizou os conceitos atuais e identificou lacunas no conhecimento dos diversos aspectos da saúde das mulheres com a PCOS (21). Foram abordadas questões referentes às diversas situações associadas a essa síndrome e realizadas recomendações para o manejo clínico individualizado dessas pacientes e para a elaboração de novos estudos nessa área de pesquisa.

2.1.2 Fisiopatologia:

A heterogeneidade da PCOS pode refletir múltiplos mecanismos fisiopatológicos desta doença. Tradicionalmente considera-se que este estado resulte de um ciclo vicioso onde uma excessiva produção de androgênios pelo tecido ovariano e/ou pela adrenal favoreça uma redistribuição da gordura corporal aumentando o acúmulo do tecido adiposo em região

abdominal (6,9). A obesidade central predispõe à resistência insulínica que, por sua vez, estimula a produção de androgênios pelo tecido ovariano (células da teca responsivas à hiperinsulinemia) fechando, portanto, este ciclo vicioso. Além disso, várias outras teorias têm sido descritas para se esclarecer o mecanismo desencadeador desta síndrome. A princípio todas elas são plausíveis e podem associar-se na patogênese de um distúrbio em comum, a produção excessiva de androgênios e a anovulação:

2.1.2.1) Resistência Insulínica:

A resistência insulínica é definida como uma resposta biológica menor do que a esperada para uma dada concentração de insulina. Há vários mecanismos determinantes da resistência insulínica dos quais destacam-se resistência periférica tecidual, clearance hepático reduzido e sensibilidade pancreática aumentada em condições basais e reduzida após as refeições (22).

Estudos com técnica do clamp euglicêmico indicaram que a resistência insulínica é uma manifestação comum em pacientes portadoras da PCOS tanto em obesas quanto em não obesas (23,24). Além desta sensibilidade reduzida à insulina, pacientes com PCOS apresentam disfunção secretória nas células β pancreáticas. A secreção insulínica está aumentada em condições basais e reduzida após as refeições resultando em quantidade insuficiente de insulina para compensar a resistência insulínica já existente. Estudos demonstraram que a perda de peso pode melhorar o quadro de resistência insulínica mas o defeito das células β pancreáticas permanece, sugerindo que este seja um problema primário da PCOS.(25).

Outro potente mecanismo de resistência insulínica atingindo aproximadamente 50% das portadoras da PCOS parece estar relacionada à excessiva fosforilação, pela serina, de receptores de insulina inibindo a sinalização da insulina e aumentando a atividade enzimática da P450c17, responsável pela síntese de androgênios pelos ovários pela adrenal (26).

Book e Dunaif (27), realizando um estudo com fibroblastos cultivados de pele de mulheres com e sem PCOS, lançaram a hipótese da existência de um defeito pós receptor nesse último grupo que afetaria a sinalização da via metabólica sem comprometer a via mitogênica de ação da insulina.

Hiperinsulinemia compensatória à resistência insulínica é um achado frequente na PCOS e o fenômeno responsável pelo aumento da secreção ovariana de androgênios pelas células da teca. A insulina atua diretamente nos ovários, aumentando a ação do hormônio luteinizante (LH- Luteinizing Hormone) através da estimulação de receptores de insulina e de fatores de crescimento insulina *símile* ovarianos e, indiretamente, aumentando a amplitude dos pulsos séricos de LH (22).

Outros dois importantes mecanismos de ação da hiperinsulinemia resultantes em hiperandrogenismo são a inibição da produção hepática de Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais (SHBG) e inibição da produção hepática da proteína ligadora do fator de crescimento insulina *símile* tipo 1 (IGFBP-1) que resultam em aumento da concentração de androgênios e estrogênios e de Fator de Crescimento Insulina *Símile* tipo I (IGF 1) respectivamente (28,29) .

Entretanto a hiperinsulinemia, por si, não é suficiente para a expressão da PCOS. É possível que a IR e distúrbios reprodutivos reflitam defeitos genéticos separados e que a IR “desmascare” a síndrome em pacientes geneticamente susceptíveis (30,31).

2.1.2.2) Disfunção neuroendócrina:

Aumento da secreção basal de LH sob estímulo do GnRH é característica importante da PCOS.(32,33) Este fenômeno tem sido descrito como sendo a anormalidade primária da PCOS clássica e como a causa do hiperandrogenismo. Níveis elevados de LH são parcialmente decorrentes do aumento da sensibilidade hipofisária ao estímulo do GnRH resultando em um aumento da amplitude e da frequência dos pulsos de LH. O aumento da

concentração plasmática de LH e da relação GnRH/LH não se deve somente aos baixos níveis de progesterona em decorrência da anovulação mas reflete uma insensibilidade hipotalâmica intrínseca à inibição do estrogênio/ progesterona na liberação do GnRH (34).

2.1.2.3) Defeito Ovariano:

Grande número de autores propuseram um modelo alternativo para PCOS em que uma anormalidade na regulação enzimática da esteroidogênese pelas células da teca, com aumento na produção da 17 α -hidroxiprogesterona e androstenediona em resposta ao LH, seria o mecanismo desencadeador desta síndrome. Esta alteração envolve, principalmente, a atividade da enzima P450c17. (35,36)

2.1.2.4) Papel das Gonadotrofinas e dos Fatores de Crescimento:

Diversos peptídeos controlam a foliculogênese e esteroidogênese através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos. A estimulação da síntese de androgênios pelo LH parece estar aumentada por fatores como inibina e reguladas para baixo (down-reguladas) por fatores como ativina, fator de crescimento epidermal (EGF), fator transformador do crescimento α (TGF α) e fator transformador do crescimento β (TGF β). Fatores de crescimento modulam a função ovariana induzida pelas gonadotrofinas. Os fatores de crescimento insulina símile (IGF) estimulam a mitose ovariana, inibem a apoptose e aumentam a esteroidogênese. Pacientes com PCOS apresentam fluido folicular com padrão de expressão de IGF semelhante ao de folículos atrésicos, achado condizente com atividade de IGF reduzida (37,38). O hormônio de crescimento (GH- Growth Hormone) parece estar envolvido na gênese e manutenção do estado de anovulação crônica hiperandrogênica e na morfologia de ovários policísticos, pelo menos no subgrupo de pacientes magras com PCOS (39). A ação do GH sobre os fatores de crescimento e suas proteínas ligantes é similar à da insulina.

2.1.2.5) Metabolismo periférico do Cortisol Aumentado:

Um aumento da produção de androgênio pela adrenal é observada em 25% das portadoras de PCOS (40,41). Um aumento do metabolismo periférico do cortisol por maior atividade da enzima 5 α redutase e conseqüente inativação do cortisol (42,43) ou atividade deficiente da 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) com conseqüente regeneração deficiente do cortisol (44) resultam em produção compensatória aumentada de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH- Adrenocorticotrofic Hormone). Isto ocorre devido à redução da retroalimentação (feedback) negativa à produção de ACTH, com conseqüente manutenção dos níveis séricos de cortisol, a despeito do excesso de androgênio adrenal.

2.1.3 Genética:

A hiperandrogenemia parece ser o achado dominante em parentes de primeiro grau de mulheres portadoras da PCOS (45,46). A distribuição dos níveis de testosterona é bimodal, sugerindo uma característica monogênica controlada por dois alelos num locus autossômico (47). Legro *et al.* (48) também identificaram uma associação entre resistência insulínica e hiperandrogenemia em vez de irregularidade menstrual em irmãs de mulheres com PCOS.

Experimentos em cultura de células da teca revelaram a existência de genes que codificam enzimas esteroideogênicas como loci candidatos à etiologia da PCOS. (49,50). Um polimorfismo – uma repetição de pentanucleotídeos- foi identificada como região promotora do CYP11a. Evidências tem sido encontradas da associação e ligação de variantes do locus CYP11a com hiperandrogenismo em mulheres portadoras de PCOS (51). Embora seja improvável que essa seja a causa exclusiva da PCOS, variação neste locus pode contribuir para o excesso da produção de andrógenos, apoiando a visão de que há uma anormalidade da função ovariana geneticamente determinada. É possível que o funcionamento anormal da célula da teca seja a consequência do desenvolvimento folicular ovariano alterado. Portanto, o padrão de herança da PCOS sugere um componente genético porem os genes candidatos ainda estão por ser identificados.

Mulheres anovulatórias com PCOS são relativamente hiperinsulinêmicas e possuem maior resistência insulínica que mulheres controle pareadas pelo peso (Dunaif 1997). As causas desta anormalidade metabólica permanecem incertas mas incluem uma anormalidade intrínseca no sinal da insulina pós receptor (excessiva fosforilação pela serina) e secreção insulínica alterada (25, Dunaif 1997, Eisner et al. 2002). A pergunta chave é se esta característica representa um defeito primário na via de sinalização da insulina (ou na célula) ou se reflete um ambiente androgênico anormal.

Três artigos identificaram polimorfismo em genes envolvidos na secreção de insulina e no seu receptor em portadoras da PCOS (Waterworth et al. 1997,47 , Tucci et al.2001).

Por outro lado, Holte et al.(25) observaram que a redução de peso em mulheres obesas com PCOS melhora significativamente a sensibilidade à insulina, evidenciando que o índice de sensibilidade á insulina pós dieta, após redução da adiposidade abdominal, foi normalizado, comparado com os valores em indivíduos controles pareados pelo peso. Este achado suporta a hipótese que a distribuição da gordura corporal é o maior determinante da sensibilidade à insulina na PCOS e que ele seja fortemente influenciado pelo ambiente hormonal, especialmente durante a vida pré natal e a puberdade.

A hipótese mais defendida (54), atualmente, é a de que o ambiente endócrino (em particular a hiperandrogenemia) durante o desenvolvimento (especialmente durante a vida pré natal e a puberdade) tenha um efeito determinante na distribuição da gordura corporal com a tendência à adiposidade abdominal predispondo à resistência insulínica.

2.2 Resistência Insulínica e PCOS

Apesar da obesidade *per se* não ser o principal condutor da PCOS, é possível que uma disfunção do tecido adiposo, existente nas pacientes com PCOS, desempenhe um importante papel na IR e, portanto, na fisiopatologia da PCOS e da Síndrome Metabólica a ela associada (55).

O tecido adiposo é um órgão endocrinologicamente ativo produtor de inúmeros peptídeos, notavelmente as adipocinas (das quais incluem as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, hormônios neuralmente ativos entre outros), lipídios e esteróides.(10) As adipocinas exercem seu papel de maneira autócrina e parácrina, no próprio tecido adiposo, e via endócrina, atuando em outros tecidos e órgãos como o músculo esquelético, córtex adrenal e o sistema nervoso simpático e central. Estas moléculas protéicas modulam inúmeras ações, dentre as quais, a atividade insulínica e os processos inflamatórios subclínicos presentes na síndrome metabólica (56-59). Adiponectina, peptídeo natriurético atrial, leptina, resistina e fator de necrose tumoral alfa são alguns exemplos de adipocinas com efeitos hormonais (8,10).

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos secretada predominantemente pelo tecido adiposo (adipocina). Este hormônio desempenha sua função favorecendo uma maior sensibilidade à ação da insulina e reduzindo o estado pró- inflamatório encontrado nas doenças metabólicas (60). Ele atua através de dois mecanismos básicos: reduzindo a produção hepática da glicose e aumentando a ação da insulina no fígado (60). Níveis séricos de adiponectina alterados estão associados à patogênese da IR relacionada à obesidade, ao diabetes e ao risco cardiovascular. (60,61). Adipócitos isolados de mulheres com PCOS expressam baixos níveis de RNAm de adiponectina em relação às pacientes não portadoras desta síndrome.

2.3. Peptídeos Natriuréticos:

2.3.1 Definições:

A família dos peptídeos natriuréticos consiste em pelo menos quatro peptídeos: atrial, cerebral, tipo C e peptídeo natriurético dendroapís (ANP, BNP, CNP e DNP respectivamente). Estes dividem uma estrutura comum que consiste em um anel de 17 aminoácidos unidos por pontes dissulfeto intracelular necessárias para sua atividade

natriurética e diurética (62) (Fig1). Cada peptídeo é codificado por um gene distinto e sua expressão varia entre os tecidos.

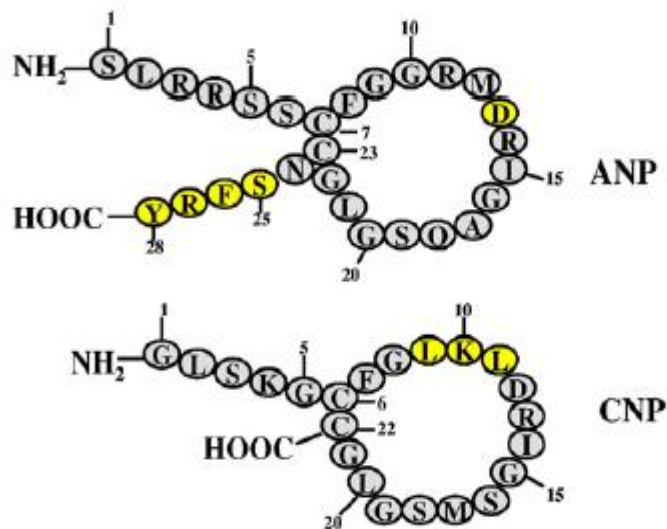


Figura 1- Sequência dos aminoácidos e estrutura dos peptídeos natriuréticos biologicamente ativos peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP)- Os membros da família dos peptídeos natriuréticos apresentam uma estrutura comum que consiste em um anel de 17 aminoácidos unidos por pontes dissulfeto intracelular necessárias para sua atividade natriurética e diurética.

CNP é altamente homólogo ao ANP mas perde a cauda carboxi-terminal. (Extraído da referência 62)

Os NP exercem um papel importante na regulação dos sistemas cardiovascular, renal e endócrino através de suas propriedades diuréticas, vasodilatadoras e anti-mitogênicas (12,62). Recentes estudos demonstraram sua importância no metabolismo lipídico através da regulação da lipólise (14-16).

O ANP foi identificado em 1981 por De Bold e colaboradores (63) que demonstraram a indução da diurese e natriurese em ratos após a administração de extrato atrial. Este achado

inédito transformou os conhecimentos da comunidade científica que passou a entender melhor a fisiologia cardíaca e reconhecer que o coração não é apenas uma bomba mecânica mas um órgão endócrino.

O ANP é um peptídeo de 28 aminoácidos que é sintetizado, estocado e liberado pelo tecido cardíaco atrial em resposta ao estresse mecânico ou estímulo neuroendócrino (α 1-adrenergic stimulation and endothelin-1) (64,65). Este hormônio também é identificado no pulmão, cérebro, adrenal, rim trato gastrointestinal e timo, mas sua maior expressão é constatada no tecido cardíaco atrial.

O ANP é sintetizado a partir de um grande precursor, um peptídeo de 151 aminoácidos, conhecido como prepro-ANP (66). Esse precursor, que contém uma sequência final de 25 aminoácidos, é clivado e passa a ser composto de 126 aminoácidos. O pró-hormônio de 126 aminoácidos (proANP) é armazenado em grânulos nos cardiomiócitos atriais. Ao ser secretado, o pró-ANP sofre um processo proteolítico liberando, em quantidades iguais, um fragmento da porção aminoterminal de 98-aminoácidos (ANP 1- 98), bem como um fragmento carboxiterminal de 28-aminoácidos (ANP 99-126) que é a principal forma ativa do peptídeo (12). Por essa razão, a dosagem do fragmento de ANP com 98 aminoácidos pode ser usada como estimativa da liberação do (ANP 99-126) pelo coração, já que o ANP (1-98) tem meia-vida aproximadamente 10 vezes maior no plasma que o ANP ativo. Ambas as formas circulam no plasma e estão aumentadas na insuficiência cardíaca. (67,68) A expressão do ANP nos ventrículos desaparece após a vida fetal e é extremamente reduzida em adultos saudáveis (1% dos níveis do RNA mensageiro do ANP) (12). Porém diversas doenças cardiovasculares associam-se a expressão rápida e sustentável nos níveis do ANP ventricular conseqüente ao aumento da pressão ou da sobrecarga ventricular (69-71). O ANP exerce um importante papel na manutenção da função cardíaca e renal através da redução da sobrecarga de volume no sistema cardiovascular. Ele promove vasodilatação, natriurese e diurese (72,73)

bem como possui efeito antagônico ao sistema renina-angiotensina-aldosterona e ao sistema simpático (74). A intensidade do seu efeito é controlada pelo balanço entre a sua síntese e sua degradação. (12)

O BNP originalmente identificado no cérebro de porcos é intensamente expresso no ventrículo cardíaco humano. O BNP também é sintetizado inicialmente como preproBNP, um precursor de 134 aminoácidos. Este é clivado e o sinal peptídico com 26 aminoácidos é removido, dando origem ao proBNP com 108 aminoácidos (66). O proBNP é então fragmentado e libera a forma ativa do BNP, uma molécula com 32 aminoácidos (BNP-32) e um fragmento da porção aminoterminal (NT-ProBNP). O proBNP é expresso pelos ventrículos e o BNP é secretado através do seio coronariano (75). A expressão do gene do BNP é rapidamente ativada em cardiomiócitos em resposta ao estresse na parede cardíaca (76). A concentração fisiológica do BNP é baixa e aumenta com a idade, sendo mais alta em mulheres (77). Uma sobrecarga crônica de volume e/ou pressão aumenta a expressão ventricular dos genes do ANP e, de modo mais pronunciado, do BNP.

O CNP é um peptídeo de 22 aminoácidos (Fig. 1) que foi inicialmente descrito no cérebro de porcos e atualmente é conhecido como produto da síntese do endotélio vascular (78-81). A clivagem do seu precursor produz fragmentos de 22 e 53 aminoácidos (82). O fragmento de 22 aminoácidos é considerado ativo e o outro fragmento possui ação ainda não compreendida (83).

O CNP exerce ação vasodilatadora direta através da interferência no tônus vascular controlado pelo tecido muscular liso de artérias e veias. Diferentemente do ANP, que possui uma função endócrina, o CNP exerce predominantemente uma ação autócrina/ parácrina, já que seus níveis séricos são quase que indetectáveis (84). O CNP é também o peptídeo natriurético mais altamente expresso no sistema nervoso central de porcos e humanos (85-87), o principal peptídeo natriurético presente no fluido cerebrospinal e o mais ativo na captação

e liberação de norepinefrina no hipotálamo de ratos (88). Apesar de possuir estrutura homóloga ao ANP – um anel de 17 aminoácidos unidos por pontes dissulfito- o CNP perde uma região carboxi-terminal que é uma extensão do anel, resultando no enfraquecimento de sua atividade diurética e natriurética em relação à dos demais membros da sua família (89, 90). Além do importante papel na regulação do tônus vascular, este peptídeo previne a proliferação do tecido muscular liso, o recrutamento leucocitário e a agregação plaquetária vascular. Conseqüentemente, o CNP exerce um potente efeito anti-aterogênico assim como o óxido nítrico e a prostaciclina (91).

O DNP foi identificado no veneno da serpente africana da espécie *Dendroaspis angusticeps* e sua imunoreatividade tem sido descrita no plasma humano (92). Estudos experimentais com administração deste peptídeo em cães demonstraram seu efeito na regulação do volume sanguíneo e na função renal. Acredita-se que ele se origine do átrio (12).

2.3.2 Receptores dos peptídeos natriuréticos:

Há três subtipos de receptores dos peptídeos natriuréticos (NPR): receptor de peptídeo natriurético tipo A (NPR-A), receptor de peptídeo natriurético tipo B (NPR-B), receptor de peptídeo natriurético tipo C (NPR-C) (93-95). O NPR-A possui maior afinidade para o ANP que para os demais peptídeos natriuréticos. O NPR-B apresenta maior afinidade para o CNP enquanto o NPR-C apresenta alta afinidade para todos peptídeos natriuréticos (95-97).

Os NPR-A e NPR-B são receptores do tipo transmembrana e membros da família da guanilato-ciclase (GC) (98,99). Estruturalmente, o receptor da família da GC apresenta um domínio transmembrana único, composto por um domínio de ligação na região extracelular, um pequeno eixo hidrofóbico e um domínio com homologia à quinase e uma atividade GC intrínseca na região intracitoplasmática (Fig 2). A função do NPR depende do estado de fosforilação do domínio com homologia à quinase (100,101).

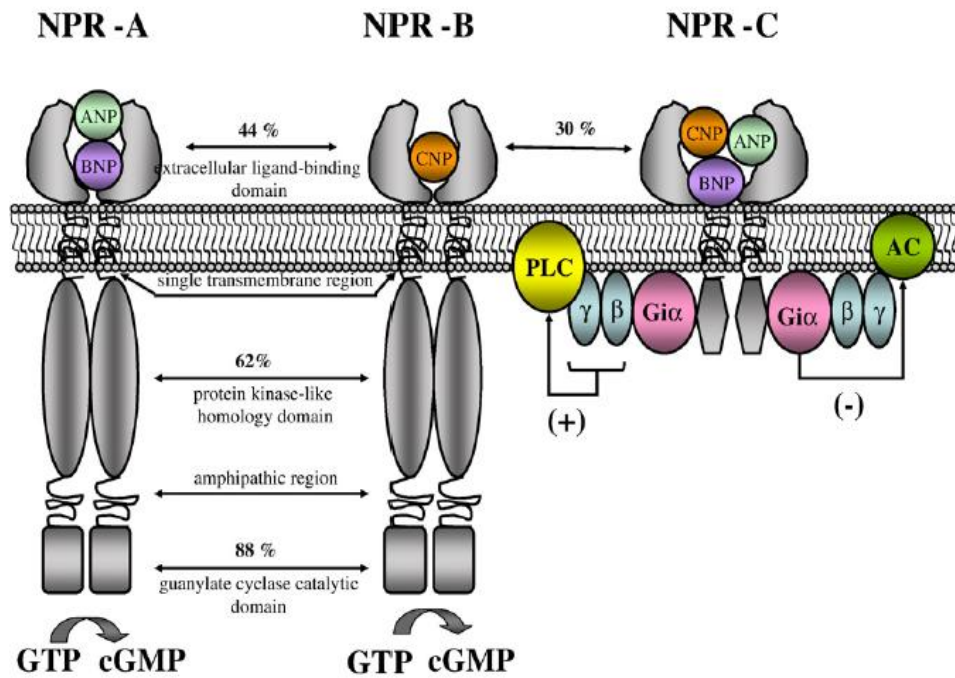


Figura 2- Representação esquemática dos receptores dos peptídeos natriuréticos. O domínio ligante extracelular, o domínio proteína quinase *like* e o domínio guanilato ciclase (GC) dos receptores do peptídeo natriurético tipo A(NPR-A) e tipo B (NPR-B) possuem 44, 62 e 88% de homologia, respectivamente. Diferente dos NPR-A e NPR-B, o receptor NPR-C é constituído de um domínio de ligação extracelular e uma cauda de 37 aminoácidos. O domínio extracelular do NPR-C é 30% semelhante ao NPR-A e ao NPR-B. The NPR-C é acoplado à inibição da adenilato ciclase (AC) que é mediada pela subunidade α da proteína regulatória guanina nucleotídeo (G_i) e à estimulação da fosfolipase C (PLC) mediada pela subunidade $\beta\gamma$ da mesma proteína G_i . (Extraído da referência 62)

O ligante acoplado ao receptor induz alterações conformacionais, ativação da GC que converte Guanosina 5' trifosfato (GTP) em Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica (GMPc), o segundo mensageiro intracelular. Este segundo mensageiro ativa diversos alvos a jusante incluindo GMPc-dependente quinase (CGK), fosfodiesterases (PDE) e o canal fechado de nucleotídeo cíclico (GNC). Em vários tipos de células, GMPc regula positiva ou negativamente a concentração de AMPc através da modulação da atividade da PDE como no pulmão, adrenais e plaquetas (102).

A atividade da GC é rapidamente regulada para baixo (downregulated) quando o domínio de homologia à quinase é desfosforilado (103). Esse estado de dessensibilização se

segue ou à exposição crônica ao NP ou à agentes vasoconstritores como a angiotensina II, a endotelina e a vasopressina (104).

O NPR-A, que possui a maior afinidade para o ANP e o BNP, é expresso pela células da musculatura lisa vascular, glândula adrenal, rins, coração, baço e cérebro(105), útero e tubas uterinas (106). Seu RNA mensageiro foi identificado no tecido adiposo subcutâneo e visceral.

O NPR-B tem maior afinidade pelo CNP em relação aos demais peptídeos e seus níveis são mais abundantes nos fibroblastos cardíacos, células mesangiais e no trato urogenital (107).

O NPR-C não é um integrante da família guanilato ciclase. Ele promove o *clearance* dos peptídeos natriuréticos da circulação pela sua capacidade de internalizá-los para, posteriormente, serem degradados por enzimas lisossômicas (108). Estudos recentes demonstraram que estes efeitos ocorrem pelo menos nos rins e pulmões e que, em outros tecidos, como nos ácinos pancreáticos, glândula submandibular, miócitos atriais e ventriculares e tecido muscular liso do trato gastrintrestinal (109) e vascular (110), este receptor relaciona-se com o processo de sinalização associado a respostas fisiológicas. Nestes tecidos, o NPR associa-se à inibição da adenilato ciclase e à ativação da fosfolipase C, o que nos faz compreender a ação dos peptídeos natriuréticos não mediada pelo GMPc (111-115). Ao contrário do NPR-A e NPR-B, o NPR-C, que representa mais de 95% dos receptores dos peptídeo natriuréticos expressos em tecidos, não é acoplado à GMPc [116,117]. Apesar do domínio extracelular do receptor de NPR-C ser 30% idêntico ao NPR-A e ao NPR-B, o domínio intracelular é composto por apenas 37 aminoácidos. O RNA mensageiro do receptor tipo C foi identificado em vários tecidos como nos rins e no tecido adiposo. Animais com deficiência genética do NPR-C apresentam anormalidades esqueléticas e são propensos a hipotensão em decorrência de atraso no metabolismo do NP plasmático circulante (118).

A demonstração da expressão gênica do receptor do peptídeo natriurético no tecido adiposo sugeriu uma possível ação metabólica deste hormônio (119). Um crescente nível de evidência tem demonstrado que estas proteínas exercem um efeito lipolítico diferente ao daquele exercido pelas catecolaminas, bem como ao daquele inibido pela insulina (12). O ANP, particularmente, é o agente lipolítico mais potente dentre os demais peptídeos pertencentes a este grupo. Este papel tornou-se evidente tanto em estudos com tecido adiposo humano quanto em pesquisas com células adiposas isoladas, *in vitro* (14).

2.4 Lipólise:

2.4.1. Definições:

As células adiposas são compostas por uma proporção de mais de 95% de triglicérides. O fenômeno da lipólise consiste na hidrólise de uma molécula de triglicerídeo em uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos (Fig3) Entretanto, a liberação destes produtos da lipólise não ocorre numa fração de 3:1 já que alguns ácidos graxos são reutilizados pelas células adiposas na produção de novos triglicérides (120). Além de servirem de substrato energético, os ácidos graxos, ligados à albumina e transportados na circulação, interferem na atividade e na produção insulínica e no metabolismo da glicose.

O processo de lipólise é catalizado por pelo menos três enzimas (121). A lipase hormônio sensível é responsável pela hidrólise dos triglicérides em diglicérides e destes em monoglicérides. Corresponde à enzima de maior importância já que é a única sujeita à regulação hormonal. A lipase monoglicérido cataliza a quebra do substrato de mesmo nome em ácidos graxos e glicerol. Uma terceira enzima, recentemente

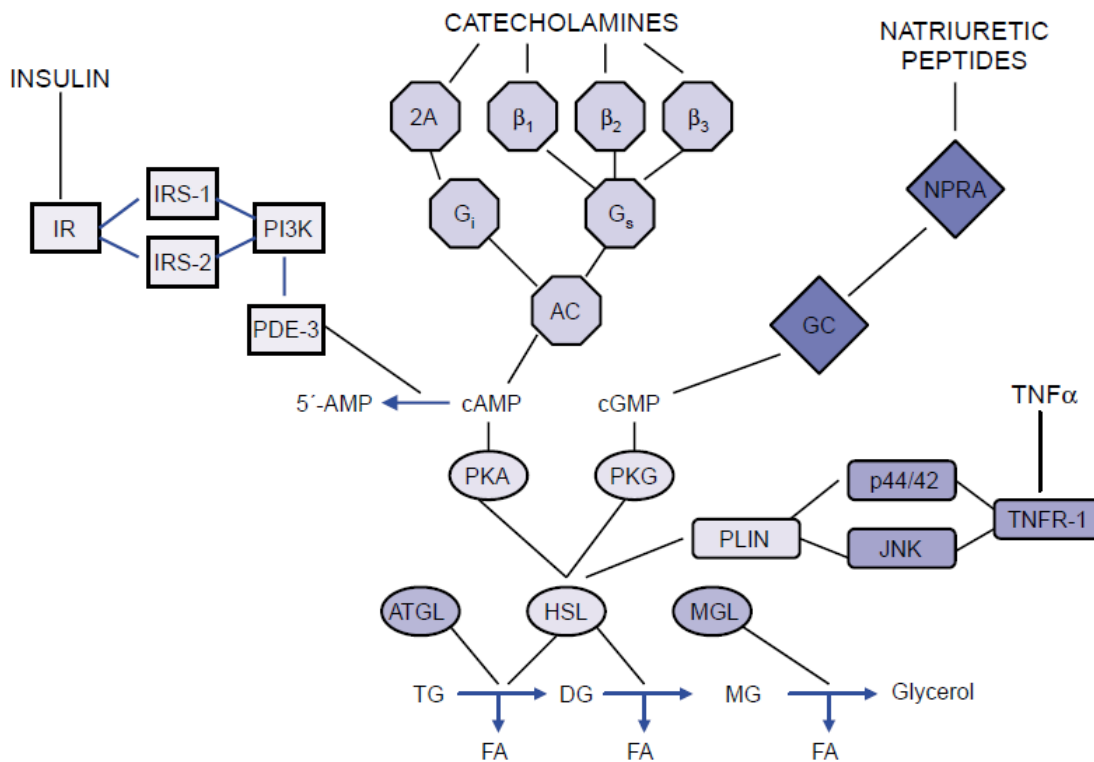


Figura 3- Regulação da lipólise nos adipócitos. β 1,2,3- receptores adrenérgicos beta 1,2,3; α 2A- receptor adrenérgico α 2A; $G_{i,s}$ - proteína G inibitória(i) ou estimulatória(s); AC-adenilato ciclase; cAMP- AMP cíclico; cGMP- GMP cíclico; NPRA- receptor de peptídeo natriurético A; GC- guanilato ciclase, PKG- proteína quinase dependente de cGMP; PKA- proteína quinase A; TNF α - fator de necrose tumoral alfa; P44/42 e JNK- vias MAP quinases; TNFR I- receptor I do TNF α ; ATGL- lipase de triglicérides específica do tecido adiposo; HSL- lipase hormônio sensível; MGL- lipase de monoglicérides; TG-triglicérides; DG- diglicérides, MG-monoglicérides; FA-ácidos graxos; IR- receptor de insulina; IRS 1,2- substratos 1 e 2 do receptor de insulina; PI3K- fosfatidil inositol 3 quinase; PDE3-fosfodiesterase 3. (Extraído da referência 122)

descoberta, a triglicerídeo lipase adipócito específica, cataliza os triglicérides em diglicerides .

Enquanto que em roedores a lipólise é regulada por diversos hormônios, inclusive o ANP, no ser humano, apenas três substâncias com função endócrina controlam este fenômeno: as catecolaminas, os peptídeos natriuréticos e a insulina. Os hormônios do crescimento, a longo prazo, também têm apresentado efeitos facilitadores à lipólise em humanos.

Os adipócitos e as células vasculares do estroma do tecido adiposo também produzem substâncias com ação autócrina no processo da lipólise. Destacam-se neste último grupo as prostaglandinas, adenosina e as citocinas (122).

Até recentemente, as catecolaminas eram consideradas as únicas responsáveis pela lipólise no ser humano (122). Estes hormônios se ligam a receptores β adrenérgicos na membrana dos adipócitos que, se ligam à proteína G_s e formam um complexo ativador da adenilato ciclase, aumentando a produção de AMP cíclico. O AMP cíclico ativa a proteína quinase A levando à fosforilação da lipase hormônio sensível (HSL) e à hidrólise dos triglicérides. O ser humano possui, além dos três receptores β adrenérgicos ativos nas células adiposas, receptores adrenérgicos α_2 que se ligam à proteína G_i inativando a adenilato ciclase. Em geral a via de estímulo dos receptores β adrenérgicos predomina sobre a via inibitória dos receptores α_2 .

A insulina é um potente inibidor da lipólise (123). Este hormônio se liga a receptores específicos nas células adiposas induzindo à fosforilação da tirosina e, portanto, ativando os seus receptores. Isto resulta na interação com proteínas denominadas substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). Essas moléculas protéicas ativam o complexo fosfatidil inositol 3-quinase resultando na fosforilação e, portanto, na ativação da enzima fosfodiesterase 3 A que, por sua vez, cataliza a quebra do AMP cíclico no correspondente inativo 5' AMP. Consequentemente, a proteína quinase A e, portanto, a HSL são menos ativadas.

O tecido adiposo produz prostaglandinas e adenosinas, também inibidores da lipólise. Estas moléculas se ligam a seus receptores específicos nas células adiposas que, por sua vez, se ligam à proteína G_i e inibem a lipólise da mesma forma que os receptores adrenérgicos α_2 . Entretanto o papel das prostaglandinas e adenosinas no processo da lipólise é menor.

Citocinas, particularmente Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), são reguladores importantes da atividade lipolítica basal (124,125). Essas proteínas de ação parácrina estimulam as MAP quinases (p44/42 e JNK) resultando na fosforilação e redução da produção de uma proteína denominada perilipina. Essa proteína envolve as gotículas de gordura protegendo-as da hidrólise pela HSL. Quando a perilipina é fosforilada ou seus níveis reduzem, seu mecanismo de proteção da hidrólise das gorduras pela HSL é reduzido.

Recentemente descobriu-se que os peptídeos natriuréticos (NPs) possuem potente ação lipolítica em seres humanos (14-16). Esta ação lipolítica é mediada NPR-A que ativa a GC na produção do GMPc. Esse último ativa a produção da proteína quinase dependente de GMP levando fosforilação da HSL. A regulação dos NP neste processo ainda é objeto de estudos. Especula-se que os NPs estejam envolvidos no aumento da lipólise do tecido adiposo em pacientes com caquexia onde os seus níveis séricos estão aumentados (128).

2.4.2 Variações Regionais na Lipólise:

Em condições normais, a maioria do tecido adiposo localiza-se em área subcutânea porém também existem importantes depósitos de gordura em região intra abdominal e perirenal (122). O tecido adiposo intra-abdominal ou visceral é drenado pelo sistema porto-hepático e os demais depósitos de gordura são drenados pelo sistema venoso periférico. Existem diferenças importantes na lipólise do tecido adiposo visceral e do subcutâneo. O efeito lipolítico induzido pelas catecolaminas é mais pronunciado no tecido adiposo intra-abdominal que no subcutâneo devido à diferenças no sinal de transdução dos receptores adrenérgicos. O efeito anti-lipolítico da insulina é muito mais pronunciado no tecido adiposo subcutâneo que no visceral, o que se deve, em parte, à menor afinidade do receptor de insulina na região abdominal.

Estas variações regionais na lipólise estão pronunciadas na obesidade e na PCOS e são importantes fatores de risco para dislipidemia, hiperinsulinemia e intolerância à glicose.

Na obesidade, a maior produção de TNF α pelo tecido adiposo correlaciona-se com um aumento da atividade lipolítica no tecido visceral por ativação das MAP quinases. Sob ação das catecolaminas, observa-se uma redução da lipólise no tecido subcutâneo e um aumento da lipólise na gordura visceral nestas pacientes. Estas variações resultam na liberação de ácidos graxos livres para o sistema porta resultando em graus variados de resistência insulínica.

Em pacientes portadoras da PCOS, adipócitos e fibroblastos apresentam redução na lipólise, mediada pelas catecolaminas, no tecido adiposo subcutâneo e aumento na lipólise, mediada por este hormônio, no tecido adiposo visceral (126). Estas alterações resultam em uma redistribuição da mobilização dos ácidos graxos em situações de estresse, favorecendo o tecido visceral e podem explicar algumas das anormalidades metabólicas encontradas nesta síndrome. Múltiplos defeitos na lipólise mediada pelas catecolaminas tem sido descrito em adipócitos de mulheres com a PCOS incluindo níveis reduzidos de receptores adrenérgicos β_2 , da subunidade RII β da proteína quinase dependente de AMP_c (PKA) e da proteína que compõe a lipase hormônio sensível (126)

Um estudo realizado com obesas portadoras de PCOS (126) demonstrou melhora da resistência à lipólise induzida pelas catecolaminas após a redução do peso. O mesmo não aconteceu com o mesmo grupo de mulheres que fizeram uso de contraceptivos hormonais orais, sugerindo que fatores diversos do hiperandrogenismo estariam envolvidos na modulação da lipólise

Recente pesquisa (126) envolvendo pacientes obesas portadoras de PCOS evidenciou através de avaliação *in vitro* e *in vivo* que a lipólise basal e a induzida por ANP e Isoproterenol, um agonista β adrenérgico, estavam consideravelmente reduzidas nesta população. A atividade física reverteu parcialmente esta condição, independente das modificações no peso e nos hormônios sexuais.

2.5 ANP e IR:

Tem sido demonstrado que os níveis de NPs são inversamente proporcionais ao índice de massa corporal em diversas condições clínicas como hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. Em um estudo realizado com mais de três mil participantes, foram observados uma relação inversa entre os níveis circulantes destes hormônios e a obesidade (17) bem como um efeito aditivo do diabetes na redução dos NP. Recentemente, Khan e cols (19) mostraram que a redução dos níveis dos NP aconteceu devido à IR comumente associada à obesidade e que pacientes obesos, sem IR, não apresentaram redução destes hormônios

Essa relação inversa entre o ANP e a IR pode ser explicada por diversos fatores associados à redução do ANP. A ativação do sistema renina-angiotensina, a ausência de inibição de proteínas com propriedades inflamatórias como TNF α , ciclo-oxigenase e proteína quimiotática de monócitos (monocyte chemoattractant protein), o acúmulo de lípidos no tecido adiposo e no músculo esquelético e o comprometimento no transporte de glicose por redução dos níveis de GMPc representam, portanto, estes estados aonde a redução da atividade do ANP predispõe à IR (18). Além disso demonstrou-se que o ANP atua como substrato para enzimas que degradam a insulina (127).

Portanto, considerando que a PCOS é uma endocrinopatia comumente associada à IR e que este estado de IR pode ser um componente fundamental na etiopatogenia desta síndrome, realizamos esta pesquisa..

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Primário:

Avaliar os níveis do ANP em uma população de pacientes com PCOS, sem uso de contraceptivos hormonais e sensibilizadores de insulina e comparar a um grupo controle, pareado pela idade e índice de massa corporal (IMC).

3.2 Objetivos Secundários:

Avaliar os níveis de BNP e de adiponectina nos mesmos sujeitos da pesquisa.

Avaliar o perfil metabólico, os marcadores de resistência insulínica e de risco cardiometabólico (HOMA-IR e LAP) em portadoras de PCOS e no grupo controle.

Correlacionar os níveis de ANP com os níveis de BNP e adiponectina.

Correlacionar os níveis de ANP com o IMC, HOMA-IR e LAP.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Zawadeski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for PCOS: towards a more rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam MR, eds. PCOS. Boston: MA: Blackwell Scientific, 1992; 377-84.
- 2- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*, v. 29, p. 181-91, 1935.
- 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. POSITION STATEMENT: Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(11), p.4237–4245, 2006.
- 4- Marcondes, JA, Barcellos CRG, Rocha, MP. Dificuldades e Armadilhas no diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 55/1, p.6-15, 2011.
- 5- Ibáñez L, Vall C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low-birthweight effect. *Clinical Endocrinology*, 55, p.667-672, 2001.
- 6- Ehrmann DA. Medical progress- Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*, 352, p.1223-36, 2005.
- 7- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*; 370, p. 685–97, 2007.
- 8- Xu H, Barnes GT, Yag Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the

- development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112, p.1821–1830, 2003.
- 9- Hector F. Escobar-Morreale HF, San Millaín JL. Focus on Polycystic Ovary Syndrome Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol.18 No.7
- 10-Garruti G, Depalo R, Vita MG, Lorusso F, Giampetruzzi F, Damato AB, Giorgino F. Adipose tissue, metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome: from pathophysiology to treatment. *Reprod Biomed Online*, 19(4), p.552-63, 2009.
- 11-H. James Harwood Jr Review Article- The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neurpharmacology*, 63 (1), p. 57–75, 2012.
- 12-Moro C, Berlan M. Review Article- Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 20, p. 41–49, 2006.
- 13-Sarzani, R., Dessi-Fulgheri, P., Paci, V. M., Espinosa, E., and Rappelli, A. J. Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *Endocrinol. Invest*, **19**, p. 581–585, 1996.
- 14-Sengenés C, Berlan M, Gliszinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.*, 14, p. 1345–1351, 2000.
- 15-Moro C, Crampes F, Sengenés C, Gliszinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J*, 18, p. 908-10, 2004.
- 16-Moro C, Galitzky J, Sengenés C, Francis Crampes, Lafontan M, and Berlan M. Functional and Pharmacological Characterization of the Natriuretic Peptide-Dependent Lipolytic Pathway in Human Fat Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308 (3), p. 984-992.

- 17-Wang T J, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PWF, Vasani RS. Impact of Obesity on Plasma Natriuretic Peptide Levels. *Circulation*, 109, p. 595-600, 2004.
- 18-Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasani RS. Association of Plasma Natriuretic Peptide Levels with Metabolic Risk Factors in Ambulatory Individuals. *Circulation*, 115, p.1345-1353, 2007.
- 19-Khan AM, Cheng S, Magnusson M, Larson MG, Newton-Cheh C, McCabe EL, Coviello AD, Florez JC, Fox CS, Levy D, Robins SJ, Arora P, Bhasin S, Lam CSP, Vasani RS, Melander O, Wang TJ. Cardiac Natriuretic Peptides, Obesity, and Insulin Resistance: Evidence from Two Community-Based Studies. *J CLIN Endocrinol Metab*, 96, p.3242-3249, 2011.
- 20-The ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reprod*, 19 (1),p. 41-47, 2004.
- 21-Bart C. J. M. Fauser, Basil C. Tarlatzis, Robert W. Rebar, Richard S. Legro, Adam H. Balen, Roger Lobo, Enrico Carmina, Jeffrey Chang, Bulent O. Yildiz, Joop S. E. Laven, Jacky Boivin, Felice Petraglia, C. N. Wijeyeratne, Robert J. Norman, Andrea Dunaif, Stephen Franks, Robert A. Wild, Daniel Dumesic, Kurt Barnhart. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (pcos): the Amsterdam ESHRE/ ASRM- Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group.
- 22-Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 60, p.1-17, 2004
- 23-Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL, Kaplan SA. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 57, p. 356-359, 1983.

- 24-Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, 38,p. 1165–1174, 1989.
- 25-Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L, Lithell H. Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80, p. 2586–2593, 1995.
- 26-Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, p. 10619–10623, 1995.
- 27-Book, CB , Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, p. 3110–3116 , 1999.
- 28-Bach, L.A. The insulin-like growth factor system: basic and clinical aspects. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 29, p. 355–361, 1999.
- 29-Le Roith D, McGuinness M., Shemer J, Stannard B, Lanau F, Faria T.N, Kato H, Werner H., Adamo M, Roberts Jr. Insulin like growth factors. *Biology Signals C.T I*,p. 173–181, 1992.
- 30-Conn J J, Jacobs HS, Conway GS. The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology* **52**, p. 81–86, 2000.
- 31-Rodin, D.A. Bano, G. Bland, J.M. Taylor, K. & Nussey, S.S. Polycystic ovaries and associated metabolic abnormalities in Indian subcontinent Asian women. *Clinical Endocrinology* , **49**, p. 91–99, 1998.

- 32-Yen SS, Vela P, Rankin J. Inappropriate secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 30: 435–442, 1970.
- 33-Barnes R.B, Rosenfield, R.L., Burstein, S., Ehrmann, D.A. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, **320**: 559–565, 1989.
- 34-Pastor, CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 582–590, 1998 .
- 35-Barnes R.B, Rosenfield, R.L., Burstein, S. & Ehrmann, D.A. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, **320**: 559–565, 1989
- 36-Rosenfield RL, Barnes RB, Cara JF, Lucky AW. Dysregulation of cytochrome P450c17 α as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertility and Sterility*, **53**: 785–791, 1990.
- 37-Cataldo NA, Giudice LC. Follicular fluid insulin-like growth factor binding protein profiles in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74: 695–697, 1992.
- 38-San Roman GA, Magoffin DA. Insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicles from women with polycystic ovarian disease: cellular source and levels in follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **75**: 1010–1016, 1992.
- 39-Morales AJ , Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS. Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic

- ovary syndrome: common and distinct features. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**: 2854–2864, 1996.
- 40-Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB , Brigell DF , Sheikh, Z. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *New England Journal of Medicine*, **327**: 157–162, 1992.
- 41-Turner EI, Watson MJ, Perry LA & White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clinical Endocrinology*, **36**: 389–397, 1992.
- 42-Stewart P.M, Shackleton CH, Beastall G.H. & Edwards C.R. 5 α -Reductase activity in polycystic ovary syndrome. *Lancet*, **335**: 431–433, 1990.
- 43-Chin D, Shackleton C, Prasad V.K, Kohn B, David R, Imperato- McGinley J, Cohen H, McMahon D.J. & Oberfield SE. Increased 5 alpha-reductase and normal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase metabolism of C19 and C21 steroids in a young population with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **13**: 253–259, 2000.
- 44-Rodin A, Thakkar H, Taylor N & Clayton, R. Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase. *New England Journal of Medicine* **330**: 460–465, 1994.
- 45-Legro R.S, Driscoll D, Strauss JF, 3rd Fox J , Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 14956–14960, 1998.
- 46-Kahsar-Miller M.D, Nixon C, Boots L.R., Go R.C, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first degree relatives of patients with PCOS. *Fertility and Sterility*, **75**: 53–58, 2001.

- 47-Urbanek M., Legro R.S., Driscoll D., Strauss IIIrd J.F., Dunaif A., Spielman R.S. Searching for the polycystic ovary syndrome genes. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **13** (Suppl. 5): 1311–1313, 2000.
- 48-Legro R.S, Bentley-Lewis R., Driscoll D., Wang S.C, Dunaif A. Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**: 2128–2133, 2002.
- 49-Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW & Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **79**: 1158–1165, 1994.
- 50-Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**: 2304–2311, 2000.
- 51-Gharani N, Waterworth D.M, Williamson R, Franks S. 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **81**: 4174, 1996.
- 52-Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews*, **18**:774-800,1997
- 53-Waterworth D.M., Bennett S.T., Gharani N., McCarthy M.I., Hague S, Batty S, Conway G.S, White D, Todd J.A, Franks S, Williamson R. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet*, **349**: 986–990, 1997.
- 54-Abbott D H, Dumesic D A, Franks S. REVIEW-Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis *Journal of Endocrinology* **174**: 1–5, 2002.

- 55-Chazenbalk G, Trivax BS, Yildiz BO, Bertolotto C, Mathur R, Heneidi S, Azziz R. Regulation of Adiponectin Secretion by Adipocytes in the Polycystic Ovary Syndrome: Role of Tumor Necrosis Factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 95(2): 935–942, 2010.
- 56-Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ *Trends Endocrinol Metab* 11:327–332, 2000.
- 57-Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355, 2004.
- 58-Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ . *J Clin Endocrinol Metab* 89:2546–2556, 2004.
- 59-Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* Ronti T, 64:355–365, 2006
- 60-Michalakis KG, Segars JH. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction *Fertil Steril*. November ; 94(6): 1949–1957, 2010.
- 61-Toulis K.A., Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos N.A, Katsikis I, Tarlatzis B.C, Papadimas I, and Panidis D. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis *Human Reproduction Update*, 15 (3): 297–307, 2009.
- 62-Maria Eugenia Sabbatini. Review Natriuretic peptides as regulatory mediators of secretory activity in the digestive system *Regulatory Peptides* 154: 5–15, 2009.
- 63-de Bold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T., Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*. 28: 89–94, 1981.

- 64-Mangat H, de Bold AJ. Stretch-induced atrial natriuretic factor release utilizes a rapidly depleting pool of newly synthesized hormone. *Endocrinology*; 133(3):1398–403, 1993.
- 65-de Bold AJ, Bruneau B, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res*; 31(1):7–18, 1996.
- 66-Yandle, T.G. Minisymposium: the natriuretic peptides hormones. Biochemistry of natriuretic peptides. *Journal of Internal Medicine*, Oxford, 235 (6): 561- 576, 1994.
- 67-Sato F., Kamoi K., Wakiya Y. et al. Relationship between plasma atrial natriuretic peptide levels and atrial pressure in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 823–827, 1986.
- 68-Webster M.W., Sharpe D.N., Coxon R. et al. Effect of reducing atrial pressure on atrial natriuretic factor and vasoactive hormones in congestive heart failure secondary to ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 63: 217–221, 1989.
- 69-Lattion A.L., Michel J.B., Arnauld E., Corvol P., Soubrier F. Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am. J. Physiol.* 251: H890–H896, 1986.
- 70-Saito Y., Nakao K., Arai H. et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J. Clin. Invest.* 83: 298–305, 1989.
- 71-Beleigoli AMR, Diniz MFHS, Ribeiro ALP. Natriuretic peptides: linking heart and adipose tissue in obesity and related conditions – a systematic review. *Obesity Reviews* **10**: 617–626, 2009.

- 72-Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*;168 (2):863–70, 1990.
- 73-Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: natriuretic peptides. *J Hypertens*; **10**: 907–912, 1992.
- 74-Dillingham M.A., Anderson R.J. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* 231: 1572–1573, 1986.
- 75-Dagnino L., Drouin J., Nemer M. Differential expression of natriuretic peptide genes in cardiac and extracardiac tissues. *Mol. Endocrinol* 5: 1292–1300,1991.
- 76-Mantymaa P., Vuolteenaho O., Marttila M., Ruskoaho H. Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. *Endocrinology* 133:1470–1473, 1993.
- 77-Wang T.J., Larson M.G., Levy D. et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am. J. Cardiol.* 90: 254–258, 2002.
- 78-Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*; 168 (2):863–70, 1990.
- 79-Tawaragi Y, Fuchimura K, Nakazato H, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Gene and precursor structure of porcine C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*; 172 (2):627–32, 1990.
- 80-Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of “vascular natriuretic peptide system”. *J Clin Invest*; 90 (3):1145–9, 1992.

- 81-Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides*; 17(7): 1243–51, 1996.
- 82-Tawaragi Y., Fuchimura K., Nakazato H. et al. Gene and precursor structure of porcine C-type natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 627–632, 1990.
- 83-Mattingly M.T., Brandt R.R., Heublein D.M. et al. Presence of C-type natriuretic peptide in human kidney and urine. *Kidney Int.* 46: 744–747, 1994.
- 84-Komatsu Y., Nakao K., Itoh H. et al. Vascular natriuretic peptide. *Lancet* 340: 622, 1992.
- 85-Minamino N, Aburaya M, Kojima M, Miyamoto K, Kangawa K, Matsuo H. Distribution of C-type natriuretic peptide and its messenger RNA in rat central nervous system and peripheral tissue. *Biochem Biophys Res Commun*; 197 (1): 326–35, 1993.
- 86-Langub Jr MC, Dolgas CM, Watson Jr RE, Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide mRNA expressed in rat hypothalamus *J Neuroendocrinol* 7: 305–9, 1995.
- 87-Stepan H, Leitner E, Siems WE, Maul B, Walther T. mRNA quantification of C-type natriuretic peptide in brain areas of rodents. *Peptides*; 20 (10):1243–5, 1999.
- 88-Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N, et al. C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology*; 129 (2):1104–6, 1991.
- 89-Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*; 168(2):863–70, 1990.
- 90- Furuya M, Tawaragi Y, Minamitake Y, Kitajima Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Structural requirements of C-type natriuretic

- peptide for elevation of cyclic GMP in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 183(3): 964–9, 1992.
- 91-Ahluwalia A., Hobbs A.J. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 162–167, 2005.
- 92-Schweitz H., Vigne P., Moinier D., Frelin C., Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J. Biol. Chem.* 267: 13928–13932, 1992.
- 93-Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors *Peptides*; 26:901–32, 2005
- 94-Schulz S.C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides*; 26:1024–34, 2005.
- 95-Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides*; 26:1044–59, 2005.
- 96- Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV.Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*; 252 (5002):120–3, 1991.
- 97- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* ; 130 (1): 229–39, 1992.
- 98-Schulz S., Singh S., Bellet R.A. et al. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58 1155–1162, 1989.
- 99-Schulz S., Chinkers M., Garbers D.L. The guanylate cyclase/receptor family of proteins. *FASEB J.* 3: 2026–2035, 1989..

- 100- Potter L.R., Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol. Cell Biol* 18: 2164–2172, 1998.
- 101- Potter L.R., Hunter T. Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 15533–15539, 1998.
- 102- Beavo J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev* 75: 725–748, 1995
- 103- Potter L.R., Garbers D.L. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J. Biol. Chem.* 267:14531–14534, 1992.
- 104- Potter L.R., Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 6057–6060, 2001.
- 105- Kuhn M Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ. Res.* 93(8): 700–709, 2003.
- 106- Dos Reis, A.M. et al. Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. *Endocrinology* 10 (136): 4247-4253, 1995.
- 107- Lincoln T.M., Cornwell T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7: 328–338, 1993.
- 108- Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type c receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem*; 265(34): 20952–8, 1990.
- 109- Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JC, Grider JR, Makhlof GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 278(6): G974–80, 2000.

- 110- Palaparti A, Li Y, Anand-Srivastava MB. Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem J*; 346 (Pt 2):313–20, 2000.
- 111- Sabbatini ME, Rodriguez MR, Di Carlo MB, Davio CA, Vatta MS, Bianciotti LG. Ctype natriuretic peptide enhances amylase release through NPR-C receptors in the exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 293(5): G987–994, 2007.
- 112- Ventimiglia MS, Rodriguez MR, Elverdín JC, Davio CA, Vatta MS, Bianciotti LG. Atrial natriuretic factor intracellular signaling in the rat submandibular gland. *Regul Pept*; 150(1–3):43–9, 2008.
- 113- Anand-Srivastava MB, Cantin M. Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 138(1):427–36, 1986.
- 114- Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JC, Grider JR, Makhlof GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 278(6): G974–80, 2000.
- 115- Palaparti A, Li Y, Anand-Srivastava MB. Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase *Biochem J*; 346 (Pt 2):313–20, 2000.
- 116- Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation *Peptides*; 26: 1044–59, 2005.
- 117- Kambayashi Y, Inouye K, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*; 130(1):229–39, 1992.

- 118- Matsukawa N., Grzesik W., Takahashi N. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 7403–7408, 1999.
- 119- Sarzani R., Dessi-Fulgheri P., Paci V. M., Espinosa E and Rappelli A. J. Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *Endocrinol. Invest.* **19**, 581–585, 1996.
- 120- Forest C, Tordjman J, Glorian M et al. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemical Society Transactions*; 31: 1125–1129, 2003.
- 121- Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*; 31: 1120–1124, 2003.
- 122- Arner P. Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 19(4): 471–482, 2005.
- 123- Large V, Peroni O, Letexier D et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes and Metabolism*; 30: 294–309, 2004.
- 124- Pittas AG, Joseph NA & Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 447–452, 2004.
- 125- Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes—role of the adipokines. *Current Molecular Medicine*; 5: 3333–3339, 2005.
- 126- Moro C, Pasarica M, Elkind-Hirsch K, and Redman LM. Aerobic Exercise Training Improves Atrial Natriuretic Peptide and Catecholamine-Mediated Lipolysis in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (7):2579–2586, 2009.

127- Welsh P , McMurray J. J. Comentary- B-type natriuretic peptide and glycaemia: an emerging cardiometabolic pathway? *Diabetologia* May,55(5): 1240-3 DOI 10.1007/s00125-012-2515-3

128- Cédric M, Berlan M. Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 20: 41–49, 2006.

5. ARTIGO ORIGINAL

Low plasma atrial natriuretic peptide levels: a new piece in the puzzle of polycystic ovary syndrome

Patrícia B. M. Lauria¹, Helen L. Del Puerto¹, Adelina M. Reis², Ana L. Cândido³, Fernando M. Reis¹

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, Division of Human Reproduction, ²Internal Medicine, Division of Endocrinology and ³Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, 30130-100 Belo Horizonte, Brazil.

Running title: Lower ANP and Adiponectin levels in PCOS

Correspondence:

Fernando M. Reis, MD, PhD

Division of Human Reproduction, Department of Obstetrics and Gynecology, UFMG

Av. Alfredo Balena, 110 – 9th Floor – Belo Horizonte – MG, Brazil. CEP: 30130-100. Tel: +55 31 3409-9264

Fax: +55 31 3409-9299

e-mail: reis@medicina.ufmg.br

Abstract

Background: It is believed that a dysfunction in adipose tissue plays an important role in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS). Natriuretic peptides are hormones with important roles in cardiovascular and body fluid homeostasis and in adipose tissue metabolism. Previous studies have demonstrated a reduction in their levels in obesity and diabetes.

Objective: The study aim was to investigate whether natriuretic peptide levels are altered in women with PCOS and if they correlate with adiponectin levels or insulin sensitivity markers.

Design: We conducted a cross-sectional study with 40 patients diagnosed as having PCOS according to the Rotterdam criteria and 36 control women matched for age and BMI.

Methods: Serum adiponectin and plasma atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) levels were measured by enzyme immunoassays in both groups. Metabolic markers such as fasting glucose, insulin, total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides were measured. In addition, we calculated the homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR) and the Lipid Accumulation Product (LAP) index and tested the linear correlation between these metabolic indexes and the plasma ANP and serum adiponectin concentrations.

Results: The levels of ANP and adiponectin were reduced in the PCOS group compared to the control group ($p < 0.0001$ and $p = 0.014$, respectively). BNP concentrations did not differ between the two groups ($p = 0.059$). There was no correlation between ANP and any of the metabolic markers evaluated. In the control group, serum adiponectin levels were inversely correlated with BMI ($p=0.011$), waist circumference ($p=0.021$), insulin ($p=0.013$), fasting glucose ($p=0.010$), HOMA-IR ($p=0.007$) and LAP ($p=0.022$). Remarkably, all these correlations were lost in the PCOS women.

Conclusion: Women with PCOS have lower ANP and adiponectin levels compared to controls matched for age and BMI. Thus, the mechanisms that affect ANP and adiponectin production and/or clearance may be altered in PCOS regardless of adiposity. These hormones may be involved in the metabolic features of PCOS.

Keywords: Polycystic Ovarian Syndrome, Atrial Natriuretic Peptide, Brain Natriuretic Peptide, Adiponectin, Adipose tissue.

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS), first described by Stein and Leventhal in 1935 (1), is the most common endocrine disorder in women, with a prevalence between 6% and 10% based on the U.S. National Institutes of Health (NIH) criteria (2) and as high as 15% when the Rotterdam criteria are applied (3).

It is mainly characterized by anovulation, clinical or biochemical signs of hyperandrogenism and polycystic ovaries. The cause of PCOS is unknown (4-6), but the syndrome is often associated with obesity, insulin resistance (IR) and metabolic diseases (4). Although obesity is not a precondition to the development of PCOS, it is possible that a dysfunction of adipose tissue, which exists in patients with this syndrome, plays an important role in the pathophysiology of PCOS and in the metabolic syndrome associated with it (7).

Natriuretic peptides are hormones produced by cardiomyocytes and also by many extracardiac sources that play an important role in fluid and hemodynamic homeostasis (8). They have cardioprotective actions as vasodilation, natriuresis and inhibition of the sympathetic nervous system and of the renin-angiotensin-aldosterone system. The participation of natriuretic peptides in human adipose tissue metabolism has been recently demonstrated by in vitro experiments with human adipocytes, where both atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) induced lipolysis, in a manner similar to catecholamines (9,10). Since this finding, many studies have been conducted in order to elucidate the relationship between ANP, BNP and metabolic diseases (11-14). This led us to hypothesize that in PCOS, subtle changes in adipose tissue endocrine and metabolic activity might be manifested by altered ANP and/or BNP levels, and this could be part of PCOS pathophysiology independently from the confounding effect of obesity.

Adiponectin, a protein hormone produced and released by the adipocytes, has cardioprotective properties including antiatherogenic and anti-inflammatory effects.

Adiponectin improves insulin sensitivity, and its circulating levels are decreased in association with obesity, diabetes, and PCOS (15,16). In particular, women with PCOS have low serum levels of high-molecular-weight adiponectin, a multimeric form that is less abundant but more potent than the smaller isoforms (17–19). A recent experimental study in humans demonstrated that venous infusion of ANP produced an acute stimulation of adiponectin release (30), suggesting that adiponectin could be a mediator of the metabolic and vascular actions of ANP.

In this study we analyzed the plasma ANP and BNP concentrations in PCOS women compared to a control group matched by age and body mass index (BMI) in order to provide new insights into the pathophysiology of PCOS and its co-morbidity. The study aim was to investigate whether plasma ANP and/or BNP levels are altered in women with PCOS and if they correlate with adiponectin levels or insulin sensitivity markers.

Materials and methods

Study Design

Approval from the local Human Investigation Committee was granted and all participants gave written informed consent to participate in the study.

Forty women diagnosed with PCOS based on the criteria established by the Rotterdam Consensus (3) and thirty-six controls paired by BMI and age were recruited to the study at the academic hospital of Federal University of Minas Gerais at Belo Horizonte, Brazil, between March 2009 and July 2011. The volunteers in the control group were healthy women with regular menstrual cycles, attending the gynecology outpatient clinic for family planning and/or routine pelvic examination.

Women in both groups were off use of contraceptive hormones, metformin, anti-androgenic drugs, antihypertensive drugs, statins and any medication that could interfere with the laboratory tests. Furthermore, all subjects had no other causes of oligomenorrhea and hyperandrogenism (hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, Cushing syndrome, thyroid dysfunction) according to medical reports and laboratory tests. In addition, none of the study subjects had hypertension (as defined below), diabetes, or a history of being diagnosed with renal, cardiovascular or pulmonary diseases.

Assessment of Clinical Variables

Medical evaluation and anthropometric measurements were first obtained from all subjects. They were weighed without shoes and wearing light clothing on a calibrated balance with an accuracy of 100 grams. Height was measured with the patient barefoot and erect, with feet parallel and heels, torso, shoulders and head touching the stadiometer (accuracy of 0.5 cm). The waist-hip ratio was calculated as the ratio of waist circumference at the midpoint between the last rib margin and the iliac crest, with the patient standing, and the hip

measurement, in its largest circumference over the great trochanters (15). For evaluation of hirsutism we used the modified Ferriman–Gallwey score (hirsutism if score ≥ 8) (22). Blood pressure measurements were performed with a cuff appropriate for arm circumference, at least 30 minutes after any caffeine consumption or cigarette smoking. Hypertension was defined according to the criteria of the Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure as systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and / or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg (18).

Blood sample collection

Peripheral venous blood samples were collected after at least 12 hours fasting and 72 hours abstaining from alcohol from all study participants at random dates. One sample was drawn into a plain tube, allowed to clot and centrifuged for 10 min at 1500 g at room temperature, and serum aliquots were stored at -80° C. Another blood sample was placed in a chilled tube containing a protease inhibitor cocktail (50 microliters of 0.001 M Pepstatin, 50 microliters of 0.001 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 100 microliters of 0.001 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)), centrifuged for 15 min at 4° C, and plasma aliquots were stored at -80° C until the hormone assays.

Metabolic measurements and calculations

The following biochemical measurements were performed in the serum samples: insulin, glucose, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c) and triglycerides. Total cholesterol, triglycerides, HDL-c and glucose concentrations were determined by semi-automated enzymatic methods (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Baden- Württemberg - Germany); LDL-c was calculated using the Friedewald

equation (20); and insulin was measured by chemiluminescence (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA).

The Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index (HOMA-IR) (21) and the Lipid Accumulation Product (LAP) index {24} were determined. The HOMA-IR was calculated by the formula: $[\text{insulin (mIU / mL)} \times \text{glucose (mg / dL)} \times 0.0555 / 22.5]$ {21}. The cutoff point to define IR was defined as a HOMA-IR > 2.71, based on a reference for the Brazilian population {23}. The LAP index was obtained by the following equation: $\text{abdominal circumference (cm)} - 58 \times \text{triglycerides [mmol / l]}$ and was categorized as normal (<34.5) and increased (≥ 34.5). The conversion of triglyceride concentrations to mmol/l was performed by multiplying the measured value in mg/dl by 0.0113.

Adiponectin assay

Adiponectin concentration was determined by non-competitive enzyme immunoassay (Human Adiponectin ELISA kit, EMD Millipore, St. Charles, MO, USA), and all the assay steps were carried out according to the manufacturer's protocol. The assay sensitivity is 0.2 ng/ml, and the appropriate range of the assay is 2-100 ng/ml.

ANP and BNP assays

The peptides were extracted from plasma samples using C-18 SepPak columns (Waters Associates, Milford, MA, USA). The columns were activated with 9 ml of acetonitrile, followed by 9 ml of 0.2% ammonium acetate (pH 4.0). Plasma samples (1 ml) were acidified with 0.2% ammonium acetate (pH 4.0) and applied to the activated C-18 column. Columns were then washed with 5 ml of 0.2% ammonium acetate (pH 4.0), and the adsorbed products were eluted with 3 ml of 60% acetonitrile. The extracts were placed in a

vacuum centrifuge for 12-18 hours for drying process. The dried pellet obtained was stored at -70°C until the time of testing.

ANP and BNP concentrations were determined using competitive enzyme immunoassays [ANP, alpha (1-28) (Human, Ovine, Canine) EIA Kit and BNP-32 (Human) EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA]. The assay sensitivity limits for detection of ANP and BNP are described by the manufacturer as 0.12 ng/ml and 0.2 ng/ml, respectively, and the assay ranges are 0-25 ng/ml and 0-100 ng/ml, respectively.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Prism v6.0 program (GraphPad, San Diego, CA). Normality tests (D'Agostino-Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilk test) indicated that most variables departed from normal distribution. Therefore, data are reported as medians and interquartile ranges and the comparisons between the two groups were done by the non-parametric Mann-Whitney U test. For correlation analyses, we used the Spearman's rank correlation coefficient, and $p < 0.05$ was considered significant for all tests.

Results

Table 1 summarizes the demographic and metabolic characteristics of the study groups. The groups were similar for age and BMI, as expected from the inclusion criteria. Total cholesterol and LDL-c levels were significantly higher in the PCOS patients compared to controls (respectively 169 [142-184] vs 142 [124-168] mg/dl, $p < 0.05$ and 107 [89-126] vs 87 [68-111] mg/dl, $p < 0.05$). The other characteristics analyzed were similar between the PCOS and control groups (Table 1).

ANP levels were significantly reduced in the PCOS group compared with the control group (0.10 [0.08-0.15] vs 0.59 [0.29-0.85] ng/ml, $p < 0.0001$, Figure 1-A).

BNP levels showed no statistically significant differences between the PCOS and the control group (0.31 [0.20-0.82] vs 0.44 [0.32-0.91] ng/ml, $p = 0.059$, Figure 1-B).

Adiponectin levels were significantly lower in the group of women with PCOS compared to the control group (10.39 [5.53-12.78] vs 13.02 [9.35-23.88] ng/ml, $p = 0.014$, Figure 1-C).

While both ANP and adiponectin concentrations were decreased in women with PCOS, they were not correlated to each other ($r = 0.08$, $p = 0.524$, Figure 1-D). As shown in Table 2, there was no correlation between plasma ANP and anthropometric or metabolic markers (age, BMI, waist circumference, triglycerides, insulin, fasting glucose, HOMA-IR or LAP index). In the control group, serum adiponectin levels were inversely correlated with BMI ($p = 0.011$), waist circumference ($p = 0.021$), insulin ($p = 0.013$), fasting glucose ($p = 0.010$), HOMA-IR ($p = 0.007$) and LAP ($p = 0.022$). Remarkably, all these correlations were lost in the PCOS women (Table 2).

Discussion

PCOS is a common endocrine disorder characterized by hyperandrogenism, oligo-anovulation and associated insulin resistance {8}. The cause of PCOS is not well understood, but there is evidence that abnormalities in the adipose tissue may be associated with this disorder {25,26}.

In this study we examined the possible relationship between plasma ANP and PCOS, taking into account the previously observed changes of ANP in obese individuals, the effects of ANP on the adipose tissue, the increased prevalence of overweight and obesity among women with PCOS and the recently described alterations in adipose tissue function associated specifically with PCOS. To avoid the confounding effect of BMI, women with PCOS and controls were matched for this variable. We also applied exclusion criteria to avoid the interference of oral contraceptives and insulin sensitizing drugs, which could also be a potential source of bias. Our results showed lower levels of ANP in the PCOS group when compared to BMI-matched controls.

Natriuretic peptide hormones are well known as key elements in maintaining hemodynamic homeostasis {8}. They are produced by cardiomyocytes and act as reducers of volume overload of the cardiovascular system by inducing vasodilation, natriuresis and diuresis. Recently, researchers have demonstrated that ANP is a powerful lipolytic agent and may be involved in the pathogenesis of metabolic diseases {8;9}. In the Framingham Heart Study offspring cohort { 13}, when patients were stratified by BMI there were lower levels of pro-ANP in overweight and obese individuals. ANP levels were further reduced in patients with increased risk for insulin resistance and in individuals with diabetes mellitus, regardless of BMI.

We believe that the reduction of ANP levels in PCOS might be related to the pathogenesis of this disorder. It is well known that reduced activity of ANP is associated with

several changes that predispose to insulin resistance {11}. Reduced ANP activity leads to greater activation of the renin-angiotensin system, which promotes the development of insulin resistance via multiple mechanisms, such as oxidative stress, inflammation, reduced adipocyte differentiation and decreased perfusion to the skeletal muscle and pancreas {11}.

Despite all these mechanistic associations between reduced ANP and IR, it is not clear whether low levels of ANP precede or follow the development of IR. A small clinical trial on normotensive volunteers with type 2 diabetes has implicated IR as a causal factor for reducing the levels of plasma ANP {Nannipieri, 2002 #17}. In contrast, the present results suggest that plasma ANP may be lower in women with PCOS who still have not developed IR, as the PCOS group in this study had normal insulin levels and IR indexes. It seems therefore that the relationship between ANP and IR is bidirectional and further research is necessary to clarify which alteration comes first.

Previous studies have shown ANP action in an autocrine and paracrine manner in various extracardiac tissues {Gerbes, 1994 #33}. ANP is produced by luteinized granulosa cells of preovulatory ovarian follicles {Dineva, 2011 #34}, where it acts as a survival factor through cGMP signaling. ANP levels in follicular fluid are positively associated with the number of aspirated follicles for in vitro fertilization {Dineva, 2011 #34}. Another study concluded that ANP can directly modulate progesterin steroidogenesis in both undifferentiated and differentiated rat ovarian granulosa cells in vitro and, therefore, may play an important role in granulosa cell differentiation and follicular maturation {Johnson, 1994 #35}. Since PCOS is an important cause of anovulatory infertility due to abnormalities of folliculogenesis {Tsilchorozidou, 2004 #4;Franks, 2008 #6}, we can therefore postulate that the low serum levels of ANP might contribute to the ovulatory dysfunction in this syndrome.

Among the possible explanations for the reduction in circulating levels of ANP in PCOS are increased gene expression of its receptors in adipose tissue or decreased peptide

release by myocardial cells. Natriuretic peptide clearance receptors (NPR-Cs) are abundant in adipose tissue, suggesting that adipocytes participate in the removal of natriuretic peptides from circulation {Sarzani, 1996 #39;Sarzani, 1995 #40;Crandall, 1989 #41}. Experimental studies have shown that fasting and a hypocaloric diet resulted in a dramatic reduction in gene expression of these receptors {Sarzani, 1995 #40}. Physical activity has also been shown to have an effect in reducing gene expression of NPR-C receptors, thereby increasing the bioavailability of their ligands. These experimental observations require more prospective studies aiming to test whether individuals with PCOS may have increased expression of NPR-C.

Beyond the stimulation of lipolysis {Sengenès, 2000 #9;Moro, 2004 #10}, the phenomenon of browning of white adipose tissue with consequent increase of thermogenesis may be another favorable metabolic effect associated with natriuretic peptides. A recent study evaluating genetically engineered mice lacking NPR-Cs identified enhanced natriuretic peptide signaling and overexpression of genes characteristic of brown adipocytes {Bordicchia, 2012 #42}, which ultimately leads to enhanced thermogenesis and energy expenditure.

Our study showed no differences in BNP levels between PCOS and control groups. Several studies have found an inverse relationship between BNP and metabolic diseases, but this hormone has a weaker lipolytic activity when compared to ANP {Wang, 2004 #13}, which might explain the lack of association with PCOS.

Adiponectin has been linked to the pathophysiology of hormonal disturbances in PCOS, especially those related to IR, but it is unclear whether it is related to the IR present in lean women with PCOS {Olszanecka-Glinianowicz, 2011 #28}. The present study showed reduced levels of adiponectin in women with PCOS, which is in accordance with previous observations {Chazenbalk, 2010 #7;Olszanecka-Glinianowicz, 2011 #28}. However, our two

study groups were paired for BMI and had similar HOMA-IR, suggesting that the lower adiponectin levels in PCOS were not due to the confounding effect of obesity or IR. Moreover, the inverse correlation between adiponectin levels and several metabolic markers was lost women with PCOS, further suggesting that serum adiponectin levels in this group were unrelated to BMI, waist circumference, and IR indexes.

We have not found any correlation between the levels of ANP and adiponectin, suggesting that the mechanisms involved in the reduction of both hormones in PCOS may be independent. Experimental evidence suggests that ANP induces adiponectin release from adipose tissue cultures in vitro {Tsukamoto, 2009 #29} and intravenous ANP infusion increases circulating adiponectin levels in healthy male volunteers {Birkenfeld, 2012 #30}. However, the lack of correlation between these hormones in our patients, either with or without PCOS, shows that independent regulatory mechanisms predominate over any physiological stimulation of adiponectin release by ANP. Thus, the low serum adiponectin levels in PCOS women are not likely to be explainable by a reduced ANP stimulation on the adipose tissue.

Another feature of our study was that PCOS and control groups had no significant differences in HOMA-IR and LAP, two surrogate markers of IR. Indeed, patients in both groups were not hyperinsulinemic according to the laboratory reference range, possibly because most participants in the study sample were young and non-obese. Findings similar to ours were reported in a clinical study performed to evaluate the effects of a drug for the treatment of IR in PCOS women {Hernandez-Yero, 2012 #38}. We hypothesize that our PCOS women had not developed enough IR to be detected by standard indexes. Beyond that, by excluding women using metformin from the study, we probably missed a subgroup of PCOS subjects in which IR could be more evident.

Despite the lack of metabolic difference between groups, our study showed a component that distinguished one group from the other, the LDL-c. Previous studies demonstrated that PCOS women have qualitative LDL-c alterations characterized by an increase in small low-density lipoproteins in the so-called “atherogenic lipoprotein phenotype” {Berneis, 2007 #31}. A recent study analyzing the correlation between lipid profile and IR {Xiang, 2012 #32} also showed high levels of LDL-c in PCOS women compared to a control randomized group.

This study has some limitations. First, it is cross-sectional, so we cannot establish the temporal changes in plasma ANP and its relation with pre-existing metabolic risk factors or the future development of complications. Second, blood samples were obtained at a random day of menstrual cycle. However, previous studies have not shown important menstrual cycle related changes in ANP levels {Yeko, 1995 #36; Bisson, 1992 #37}. Finally, our data should not be extrapolated to women with high grade obesity, diabetes, cardiovascular disease, or any other condition known to affect ANP production or clearance.

In conclusion, this study shows that patients with PCOS have reduced plasma ANP and serum adiponectin levels compared to controls matched for age and BMI. Also adiponectin levels were lower in the PCOS group, but showed no correlation with ANP. Conversely, BNP levels were similar between cases and controls. Finally, serum adiponectin levels correlated with metabolic markers only in control women, not in those with PCOS. These findings suggest that low ANP and adiponectin levels are part of the pathogenesis of this syndrome and may play important roles in the metabolic disturbances associated with it.

5.7 References

- 1- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1935; 29:181-91.
- 2- Zawadeski JK, Dunaif A. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam MR, editors. Diagnostic criteria for PCOS: towards a more rational approach. PCOS. Boston: Blackwell Scientific; 1992: 377-84.
- 3- Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. *Human Reproduction.* 2004; 81:19-25.
- 4- Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 2004; 60:1-17.
- 5- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome *Lancet.* 2007; 370: 685–97.
- 6- Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome *Human Reproduction Update.* 2008; 14(4): 367–378.
- 7- Chazenbalk G, Trivax BS, Yildiz BO, Bertolotto C, Mathur R, Heneidi S, Azziz R. Regulation of Adiponectin Secretion by Adipocytes in the Polycystic Ovary Syndrome: Role of Tumor Necrosis Factor- α . *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(2): 935–942.
- 8- Moro C, Berlan M. REVIEW ARTICLE Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2006; 20:41–49.
- 9- Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes.. *FASEB J.* 2000; 14: 1345–1351.
- 10- Moro C, Galitzky J, Sengenès C, Crampes F, Lafontan M, Berlan M. Functional And Pharmacological Characterization of the Natriuretic Peptide- Dependent Lipolytic

- Pathway in Human Fat Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 308(3): 984-993.
- 11- Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS. Association of Plasma Natriuretic Peptide Levels with Metabolic Risk Factors in Ambulatory Individuals. *Circulation* 2007; 115:1345-1353.
- 12- Verspohl EJ, Bernemann JK, et al. Atrial Natriuretic Peptide induced inhibition of glucagon secretion peptides: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. *Peptides*. 1996; 17: 1023-1029.
- 13- Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation*. 2004; 109:594–600.
- 14- Khan AM, Cheng S , Magnusson M, Larson MG, Newton-Cheh C, McCabe EL, Coviello AD, Florez JC, Fox CS, Levy D, Robins SJ, Arora P, Bhasin S, Lam CSP, Vasan RS, Melander O, Wang TJ. Cardiac Natriuretic Peptides, Obesity, and Insulin Resistance: Evidence from Two Community-Based Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:3242-3249.
- 15- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005; 26:439–451.
- 16- Mannerås-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: E304–E311.
- 17- Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, et al. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009; 15:297–307.
- 18- Wickham EP 3rd, Cheang KI, Clore JN, Baillargeon JP, Nestler JE. Total and high-

molecular weight adiponectin in women with the polycystic ovary syndrome.

Metabolism. 2011; 60:366–372.

- 19- O'Connor A, Phelan N, Tun TK, Boran G, Gibney J, Roche HM. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:1378–1385.
- 20- Birkenfeld AL, Boschmann M, Engeli S, et al. Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man. *PloSOne*. 2012; 7:e 43238.
- 21- Deitel M, Gawdat K, Melissas J. Reporting weight Loss. *Obes Surg*. 2007; 17:565-8.
- 22- Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 1981; 140:815–830.
- 23- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. In: JAMA, editor.; 2560-72, 2003
- 24- Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem*. 1972; 18:499–502.
- 25- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7): 412-9.
- 26- Wiltgen D, Benedetto, I G, Mastella, LS, Spritzer, P M. Lipid Accumulation Product Index: A Reliable Marker of Cardiovascular Risk in Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction*. 2009; 24 (7): 1726-1731.

- 27-Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, et al. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population: IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 72 (2) :219-20.
- 28-Ciaraldi TP, Aroda V, Mudaliar S, Chang RJ, Henry RR. Polycystic Ovary Syndrome is Associated with Tissue-specific Differences in Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.*2009; 94(1): 157-163.
- 29-Dunaif A, Segal KR , Shelley DR , Green G, Dobrjansky A and Licholai T. Evidence for Distinctive and Intrinsic Defects in Insulin Action in Polycystic Ovary Syndrome *Diabetes* 1992; 41(10): 1257-1266.
- 30-Nannipieri M, Seghieri G, Catalano C, Prontera T, Baldi S, Ferrannini E. Defective regulation and action of atrial natriuretic peptide in type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2002 ; 34: 265–270.
- 31- Gerbes AL, Dagnino L, Nguyen T, Nemer M. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:1307–1311.
- 32-Dineva J, Vangelov I, Nikolov G, Gulenova D, Ivanova M. Atrial natriuretic peptide is an antiapoptotic factor for human granulosa luteinized cells with impact on the results of COH/IVF in women undergoing IVF program. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011; 37:511–519.
- 33-Johnson KM, Hughes FMJr, Fong YY, Mathur RS, Williamson HO, Gorospe WC. Effects of atrial natriuretic peptide on rat ovarian granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 1994; 31:163–168.
- 34-Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Paci VM, et al. Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J Endocrinol Invest.*1996; 19:581–585.

- 35- Sarzani R, Paci VM, Zingaretti CM, et al. Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens.* 1995; 13:1241–1246.
- 36- Crandall DL, Ferraro GD, Cervoni P. Effect of experimental obesity and subsequent weight reduction upon circulating atrial natriuretic peptide. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1989; 191: 352–356.
- 37- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 2012; 122:1022–1036.
- 38- Olszanecka-Glinianowicz M, Kuglin D, Dbkowska-Hu A, Skalba P. Serum adiponectin and resistin in relation to insulin resistance and markers of hyperandrogenism in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 154:51–56.
- 39- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 3815–3819.
- 40- Kuo SM, Halpern MM. Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults. *Int J Obes (Lond).* 2011; 35: 1487–1494.
- 41- Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, et al. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53:2070–2077.
- 42- Hernandez-Yero A, Santana Perez F, Ovies Carballo G, Cabrera-Rode E. Diamel therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinaemia, insulin resistance, and hyperandrogenaemia. *Int J Endocrinol.* 2012 ; 2012:382719.

- 43- Berneis K, Rizzo M, Lazzaroni V, Fruzzetti F, Carmina E. Atherogenic lipoprotein phenotype and low-density lipoproteins size and subclasses in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:186–189.
- 44- Xiang SK, Hua F, Tang Y, Jiang XH, Zhuang Q, Qian FJ. Relationship between serum lipoprotein ratios and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:173281.
- 45- Yeko TR, Rao PS, Parsons AK, Mayer JC, Graham LB, Maroulis GB. Atrial natriuretic peptide, oestradiol and progesterone in women undergoing spontaneous and gonadotrophin-stimulated ovulatory cycles. *Hum Reprod.* 1995;10: 2872–2874.
- 46- Renal sodium retention does not occur during the luteal phase of the menstrual cycle in normal women Bisson DL, Dunster GD, O'Hare JP, Hampton D, Penney M. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 247–252.

Figure Legends

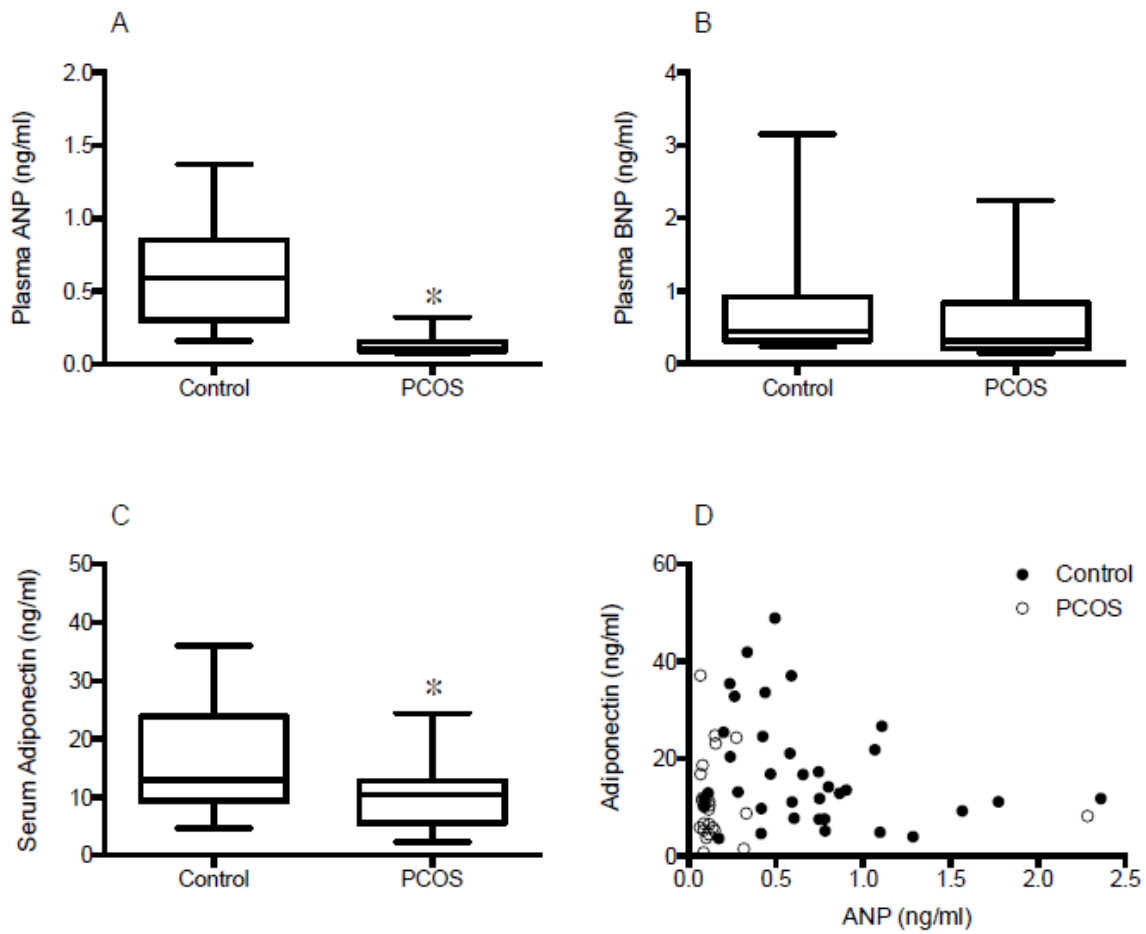


Figure 1: Circulating levels of atrial natriuretic peptide (A), brain natriuretic peptide (B) and adiponectin (C) in the control group vs. women with PCOS. The box plots represent the interquartile ranges, the horizontal bars represents the medians and the error bars indicate the 10th and 90th centiles. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test). D) Scatter plot showing the absence of correlation between ANP and adiponectin levels in the two groups of patients.

Table 1: General characteristics of women with PCOS and controls

	PCOS (n=40)	Control (n=36)	P
Age(years)	29 (25-34)	30 (15-43)	0.300
BMI (kg/m ²)	27.0 (23.6-30.7)	24.2 (21.3-29.7)	0.136
Waist Circumference (cm)	91 (83-101)	94 (83-103)	0.790
Waist-Hip Ratio	0.91 (0.87-0.95)	0.88 (0.84-0.92)	0.168
Total cholesterol (mg/dl)	169 (142-184)	142 (124-168)	0.005
HDL cholesterol (mg/dl)	43 (34-50)	39 (33-44)	0.260
LDL cholesterol (mg/dl)	107 (89-126)	87 (68-111)	0.015
Triglycerides (mg/dl)	81 (65-108)	71 (58-94)	0.192
Insulin (Micro UI/ml)	7.5 (5.5-10.7)	7.7 (5.5-12.9)	0.960
Fasting Glucose (mg/dl)	84 (77-93)	86(81-92)	0.330
HOMA-IR	1.5 (1.1-2.5)	1.6 (1.2-2.8)	0.701
LAP	34.0 (16.4-44.2)	25.4 (17.3-53.2)	0.670

Values are expressed as Median (25-75 interquartile range)-Mann Whitney test.

BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance index; LAP, lipid accumulation product.

Table 2: Spearman’s rank correlation coefficients between plasma ANP, serum adiponectin, and several anthropometric and metabolic markers in each study group.

	ANP		Adiponectin	
	Control	PCOS	Control	PCOS
Age	-0.05 (0.789)	0.29 (0.167)	0.05 (0.789)	0.00 (0.999)
BMI	0.10 (0.561)	0.03 (0.897)	-0.42 (0.011)	-0.03 (0.837)
Waist Circumference	0.06 (0.737)	-0.14 (0.501)	-0.42 (0.021)	-0.17 (0.319)
Triglycerides	0.07 (0.682)	-0.27 (0.176)	-0.32 (0.061)	-0.35 (0.035)
Insulin	0.04 (0.812)	0.06 (0.772)	-0.41 (0.013)	-0.26 (0.119)
Fasting Glucose	0.17 (0.325)	0.20 (0.324)	-0.43 (0.010)	-0.21 (0.215)
HOMA-IR	0.08 (0.646)	0.06 (0.784)	-0.44 (0.007)	-0.25 (0.142)
LAP	0.12 (0.545)	-0.26 (0.192)	-0.42 (0.022)	-0.27 (0.118)

P values are given in parenthesis and the significant correlations are highlighted.

BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance index; LAP, lipid accumulation product.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo, comparando um grupo de mulheres portadoras da PCOS com um grupo controle pareado por idade e IMC demonstrou a existência de uma associação entre níveis séricos reduzidos do ANP e da adiponectina com esta endocrinopatia. Os valores do BNP e dos marcadores para risco metabólico e resistência insulínica não se diferenciaram entre os grupos. Observou-se uma fraca correlação entre os valores do ANP com os da adiponectina e do BNP.

As participantes portadoras da PCOS recrutadas em nossa pesquisa eram jovens, em geral apresentavam peso normal ou sobrepeso e não eram usuárias de metformina. Essas características podem explicar a ausência de diferenças nos indicadores de resistência insulínica e de risco metabólico entre os grupos estudados. A não inclusão das mulheres que estavam usando metformina previamente ao primeiro atendimento em nosso serviço pode ter deixado de incluir aquelas com riscos metabólicos comprovados e com IR mais grave.

Entretanto, com base nos nossos dados, é possível pressupor que o ANP, assim como a adiponectina, apresente uma maior sensibilidade na detecção de alterações metabólicas nas pacientes com PCOS. Além disso, a possibilidade de uma associação entre a redução dos níveis do ANP com distúrbios reprodutivos presentes neste grupo de mulheres anovulatórias deve ser aventada.

Esse trabalho apresenta algumas limitações. Primeiramente, por ser um estudo clínico e transversal, a relação de causalidade entre ANP e PCOS não pode ser afirmada, sendo necessários novos experimentos avaliando a expressão e o mecanismo de ação deste hormônio em ambiente ovariano neste grupo de mulheres. Além disso, por questões técnicas, as nossas dosagens de NP foram realizadas através de técnicas imunoenzimáticas e não por radioimunoensaio, que é considerado um método mais sensível para essas dosagens. Acreditamos, entretanto, que essas limitações não nos prejudicaram na avaliação dos nossos

objetivos. Com este trabalho, obtivemos um resultado inédito, com uma base fisiopatológica plausível e que contribui para a maior compreensão dos distúrbios metabólicos relacionados a PCOS.