

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LÍVIA REIS SILVA

**Etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos: abordagem multifatorial da infância à
idade reprodutiva**

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

LÍVIA REIS SILVA

Etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos: abordagem multifatorial da infância à idade reprodutiva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Livia Reis

Etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos: abordagem multifatorial da infância à idade reprodutiva/ Livia Reis Silva; orientador, Rui Alberto Ferriani. - 2019

63 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Versão Original

1. Síndrome dos ovários policísticos. 2. Pequeno para idade gestacional. 3. Polimorfismo genético. 4. *SUMO1P1*. 5. *ZNF217*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Reis Silva

Etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos: uma abordagem multifatorial da infância à idade reprodutiva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre**.
Área de concentração: Tocoginecologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Às mulheres que participaram desse estudo como colaboradoras para o conhecimento científico.

Aos Prof. Dr. Anderson Melo e Prof. Dr. Rui Ferriani pela confiança, pelo otimismo e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À co-orientadora Prof^a Dr^a Cristiana Libardi, por enriquecer nosso trabalho com sua expertise em Genética Populacional e pela disponibilidade em contribuir.

À pós-doutoranda Dr^a Karina Bezerra Salomão, à Prof^a Dr^a Juliana Meola, às funcionária do laboratório de Biologia da Reprodução, em especial Cristiana Padovan, e à Dra. Daiana Pedroso pelo carinho e pela parceria na realização da técnica de genotipagem usada neste estudo.

À estatística do departamento de Ginecologia e Obstetrícia Suleimy Manzin e secretária Suellen Soares, pela colaboração e desejo de ajudar sempre.

Aos funcionários do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia que contribuíram no recrutamento das pacientes e nos exames laboratoriais e ultrassonográficos realizados. Sem eles seriam impossível realizarmos tal análise.

A todos os integrantes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela ajuda e incentivo sob várias perspectivas.

Aos meus pais, Juarez e Maria do Rosário, ao meu irmão, Hermes Reis, e à minha cunhada, Cíntia Maria, pelo amor e pela disponibilidade para dar suporte nesta jornada da pós-graduação.

Ao meu esposo, Rafael Carlos, que, de maneira companheira e amorosa, participou de todos os momentos, tornando a caminhada agradável.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro com a bolsa (Processo 2015/26152-7).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

O presente projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que disponibilizou recursos financeiros (Processo 2015/26152-7).

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse trabalho.

RESUMO

SILVA, R.L. **Etiopatogenia da síndrome dos ovários policísticos: abordagem multifatorial da infância à idade reprodutiva.** 2019. [dissertação de mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019. 63 p.

Introdução: Mulheres nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG) apresentam risco aumentado para desenvolver a síndrome dos ovários policísticos (SOP) na terceira década de vida. Além do nascimento PIG, a predisposição genética também é outro fator relacionado ao desenvolvimento da SOP. Entretanto, os estudos genéticos deste distúrbio apresentam resultados controversos, não levam em consideração outros aspectos da etiopatogenia da SOP (como o peso ao nascer e fatores ambientais) e não contemplam todas as etnias. Justifica-se, portanto, a realização de estudos regionais e longitudinais para que se possa conhecer de forma mais abrangente a etiopatogenia da SOP.

Objetivo: Comparar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*- SNP) relacionados à SOP [envolvidos na ação das gonadotrofinas (rs13405728/gene *LHCGR*, rs2349415/gene *FSHR*, rs2268361/gene *FSHR*), no crescimento de órgãos e tecidos (rs12468394/gene *THADA*, rs10818854/gene *DENND1A*, rs1894116/gene *YAP1*, rs6022786/ região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*), no DM (rs705702/região entre os genes *RAB5B* e *SUOX*) e na ação de hormônios esteroides (rs4385527/gene *C9ORF3*)] entre mulheres nascidas PIG e nascidas adequadas para idade gestacional (AIG) reavaliadas durante a terceira década de vida. Secundariamente, comparar o comprimento de telômero de leucócito (*Leucocyte Telomere Length*- LTL) entre estes dois grupos e também avaliar a frequência dos SNPs descritos acima entre mulheres com e sem a SOP.

Casuística e Métodos: Estudo observacional, do tipo coorte de nascimento, no qual foram incluídas 40 mulheres nascidas AIG e 26 nascidas PIG. As participantes foram submetidas à anamnese e exame físico com avaliação da idade, peso e altura atuais, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e sedentarismo. Foram acessados dados do nascimento (idade gestacional e peso ao nascer) e dados maternos (situação conjugal, anos de estudo formal, tabagismo) de arquivos médicos. Foram realizadas dosagem de parâmetros bioquímicos (glicemia de jejum, lipidograma, insulina de jejum e resistência insulínica hormonal) e ultrassonografia pélvica/transvaginal. O comprimento de telômero de leucócito (*Leucocyte Telomere Length*-LTL) foi determinado pelo cálculo da razão T / S. Os SNPs foram avaliados utilizando a técnica de PCR em tempo real através do ensaio de discriminação a alélica *Taqman Low Density Array* (TLDA).

Resultados: Os genótipos AG e AA para o SNP rs6022786 (localizado entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) estiveram associados ao nascimento PIG quando comparados ao genótipo GG para o mesmo SNP [AA vs GG: OR = 6.799 (IC 1.233– 37.487) ; AG vs GG: OR = 5.351 (IC 1.326– 21.587)]. Não houve associação dos demais SNPs com nascimento PIG ou AIG. Além disto, não houve diferença na frequência dos SNPs estudados entre os grupos SOP e não-SOP. Nascimento PIG não esteve associado a comprimento telomérico mais curto na terceira década de vida em mulheres da presente coorte.

Conclusão: Até onde se tem conhecimento, este foi o primeiro estudo que comparou a frequência de SNPs associados a SOP em mulheres nascidas PIG e AIG. O SNP rs6022786 (região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) foi associado a nascimento PIG. Portanto, nascimento PIG pode ocorrer em fetos geneticamente predispostos que foram expostos a fatores ambientais pré-natais.

Palavras-chave: 1. Síndrome dos ovários policísticos, 2. Pequeno para idade gestacional, 3. Polimorfismo de nucleotídeo único, 3. *SUMO1P1*, 4. *ZNF217*.

ABSTRACT

SILVA, R.L. **Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: a multifactorial approach from childhood to reproductive age.** [masters dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019. 63 p.

Introduction: Women born small for gestational age (SGA) are at increased risk for developing polycystic ovary syndrome (PCOS) in the third decade of life. In addition to SGA birth, genetic predisposition is also another factor related to the development of PCOS. However, the genetic studies of this disorder present controversial results, did not take into account other aspects of the etiopathogenesis of PCOS (such as birth weight and environmental factors) and does not include all ethnicities. Since PCOS has geographical and ethnic particularities, regional and longitudinal studies are warranted to better understand the etiopathogenesis of PCOS.

Objective: to assess if born SGA women have higher frequency of PCOS-associated single nucleotide polymorphism (SNP) [involved in the action of gonadotropins (rs13405728/*LHCGR* gene, rs2349415/*FSHR* gene, rs2268361/*FSHR* gene), on organ and tissue growth (rs12468394/*THADA* gene, rs10818854/*DENND1A* gene, rs1894116/*YAP1* gene, rs6022786/region between the *SUMO1P1* and *ZNF217* genes), DM (rs705702/region between the *RAB5B* and *SUOX* genes) and the action of steroid hormones (rs4385527/gene *C9ORF3* gene)] compared to born appropriate for gestational age (AGA) women re-evaluated during the third decade of life. Secondly, to compare the leucocyte telomere length (LTL) between women born SGA and AGA and to compare the frequency of the same SNPs among women with and without PCOS reassessed during the third decade of life.

Material and Methods: An observational, cohort study, which included 40 women born AIG and 26 born PIG. Participants underwent anamnesis and physical examination with assessment of age, current weight and height, body mass index (BMI), waist circumference (WC), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and sedentary lifestyle. Birth data (gestational age and birth weight) and maternal data (marital status, years of formal schooling, smoking) were accessed from medical archives. Biochemical parameters were measured (fasting glucose, lipidogram, fasting insulin and hormonal insulin resistance) and pelvic / transvaginal ultrasound. Leucocyte Telomere Length-LTL was determined by calculating the T / S ratio. SNPs were evaluated using the real-time PCR technique using the Taqman Low Density Array (TLDA) allelic discrimination assay.

Results: The AG and AA genotypes for the rs6022786 SNP (located between the *SUMO1P1* and *ZNF217* genes) were associated with SGA birth when compared to the GG genotype for the same SNP [AA vs GG: OR = 6.799 (IC 1.233– 37.487) ; AG vs GG: OR = 5.351 (IC 1.326– 21.587)]. There was no association of the other SNPs with birth SGA or AIG. In addition, there was no difference in the frequency of studied SNPs between the PCOS and non-PCOS groups. SGA birth was not associated with shorter telomeric length in the third decade of life.

Conclusions: As far as we know, this is the first study to compare the frequency of PCOS-associated SNPs among women born SGA and AGA. SNP rs6022786 (located between the *SUMO1P1* and *ZNF217* genes) was associated with PIG birth. Therefore, SGA birth may occur in genetically predisposed fetuses that have been exposed to prenatal environmental factors.

Keywords: 1. Polycystic ovary syndrome, 2. Small for gestational age, 3. Single nucleotide polymorphism, 3. SUMO1P1, 4. ZNF217.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromossomo, gene, SNP.....	20
Figura 2: Cartão de TLDA.....	39
Figura 3: Fluxograma do estudo.....	43
Figura 4: Frequência de SOP.....	45
Figura 5: Resultados apresentados pelo software <i>TLDA SNP Genotyping Analyses</i> (Applied Biosystems).....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Genes envolvidos no crescimento de tecidos órgãos.....	22
Quadro 2: Genes relacionados à insulina e obesidade.....	23
Quadro 3: Genes relacionados a hormônios gonadotróficos e esteroides sexuais.....	24
Quadro 4: Genes relacionados com o DNA e organelas celulares.....	25
Quadro 5: Classificação do peso ao nascimento em relação à idade gestacional.....	33
Quadro 6: Fases de busca para recrutamento das pacientes.....	34
Quadro 7: Critérios diagnósticos da SOP.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: GWASs em população han-chinesa.....	26
Tabela 2: GWASs em população coreana.....	27
Tabela 3: GWASs e estudos associados em população com ancestralidade europeia	28
Tabela 4: Variáveis clínicas dos grupos PIG e AIG	44
Tabela 5: Variáveis laboratoriais dos grupos PIG e AIG	45
Tabela 6: Medidas do LTL.....	45
Tabela 7: Frequência genotípica dos polimorfismos nos grupos PIG e AIG.....	46
Tabela 8: Frequência genotípica dos polimorfismos nos grupos SOP e não-SOP.....	47
Tabela 9: Análise de regressão logística para fatores relacionados à SOP.....	48
Tabela 10: Análise de regressão logística para fatores relacionados à PIG	48

LISTA DE SIGLAS

A - Altura

AIG - Adequado para a idade gestacional

CA - Circunferência abdominal

CT - Colesterol total

DCV- doenças cardiovasculares

DM1 - Diabetes melito tipo 1

DM2 - Diabetes melito tipo 2

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

EGFR - *Epidermal growth factor receptors*

FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de São Paulo

FSH - *Follicle stimulating hormone*

GIG - Grande para idade gestacional

GWAS - *Genome-wide association study*

HCG - *Human gonadotropin chorionic*

HDL - *High density lipoproteins*

HOMA-IR - *Homeostasis model assessment-insulin resistance index*

IMC - Índice de massa corporal

LDL - *Low Density Lipoprotein*

LH - *Luteinizing hormone*

LTL - *Leucocyte Telomere Length*

NIH – *National Institute of Helth*

P - Peso

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

PIG - Pequenos para idade gestacional

razão T / S - relação do telômero (T) com gene de cópia única (S)

RCIU - Restrição de crescimento intrauterino

RN - Recém-nascidos

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

SOP - Síndrome de ovários policísticos

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TG - Triglicérides

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Estudo genético na SOP.....	19
1.1.1. Genes associados à SOP	19
1.1.2. Estudo dos SNPs na SOP: GWAS e estudos associados	25
1.1.3. SNPs e genes relacionados a SOP em nascidas PIG.....	30
1.1.4. Estudo do comprimento telomérico na SOP e no nascimento PIG.....	30
2. JUSTIFICATIVAS	31
3. OBJETIVOS	32
4. MÉTODOS	33
4.1. Desenho do estudo e aspectos éticos.....	33
4.2. Contexto e participantes.....	33
4.3. Variáveis	34
4.3.1. Variáveis de caracterização da amostra	34
4.3.2. Variáveis dependentes.....	35
4.3.3. Variáveis independentes.....	35
4.4. Fontes de dados e mensuração.....	35
4.4.1. Anamnese e exame físico.....	35
4.4.2. Variáveis laboratoriais.....	36
4.4.3. Diagnóstico de SOP.....	37
4.4.4. Avaliação dos polimorfismos genéticos.....	37
4.4.4.1. Extração do DNA	37
4.4.4.2. Genotipagem.....	38
4.4.5. Medida do LTL.....	39

4.5. Viés.....	40
4.6. Cálculo amostral.....	40
4.7. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Fluxograma.....	42
5.2. Variáveis clínicas maternas.....	44
5.3. Variáveis clínicas, laboratoriais e frequência de SOP.....	44
5.4. Avaliação genética.....	45
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9. ANEXOS.....	62

1.INTRODUÇÃO

A síndrome de ovários policísticos (SOP) é uma desordem endócrina heterogênea e complexa com prevalência estimada entre 5% e 13,9% das mulheres em idade reprodutiva (NORMAN et al., 2007; MELO et al., 2010). Além de distúrbios reprodutivos (anovulação e infertilidade), a SOP também pode apresentar repercussões clínico-metabólicas variáveis de acordo com a etnia e região geográfica (NORMAN et al., 2007).

Embora a SOP manifeste-se clinicamente durante a adolescência, sugere-se que sua história natural tenha origem no ambiente intrauterino (de ZEGHER; IBÁÑEZ, 2006). Estudos experimentais em animais (ABBOTT et al., 2002; ABBOTT et al., 2005) e observações clínicas em humanos (MELO et al., 2010) têm apontado para a hipótese da reprogramação fetal como o elo entre predisposição genética e fatores ambientais na etiologia da SOP e de suas alterações em diferentes fases da vida (JAQUET et al., 2005).

Postula-se que a interação entre fatores genéticos, ambiental e intrauterino favoreça a ocorrência de hipóxia fetal e a restrição de crescimento intrauterino (RCIU), determinando o nascimento de indivíduos pequenos para idade gestacional (PIG). Aproximadamente 90% destes indivíduos apresentam rápido ganho de peso nos primeiros dois anos de vida (“catch-up”), característica que está associada à hiperinsulinemia, disfunção adipocitária e obesidade na infância (IBÁÑEZ et al., 2008). Na fase pré-puberal surge a adrenarca e pubarca prematuras (IBÁÑEZ et al., 1998), culminando com o desenvolvimento da SOP na idade reprodutiva (MELO et al., 2010). Na quarta década de vida, estas mulheres nascidas PIG com SOP podem apresentar maior prevalência de comorbidades clínicas e metabólicas (ELTING et al., 2001; MORAN et al., 2010; TIAN et al., 2006), sugerindo a presença de risco aumentado para doenças cardiovasculares durante o climatério (ANDERSON et al., 2014), característica ainda não confirmada em estudos de seguimento.

Apesar destas considerações, a SOP não ocorre em todos os nascidos PIG e mulheres que tiveram peso ao nascer adequado para a idade gestacional (AIG) também desenvolvem este distúrbio (MELO et al., 2010), sugerindo a importância de variantes genéticas e fatores ambientais no desenvolvimento da SOP. Além disto, os fatores genéticos podem influenciar o nascimento PIG e o aparecimento da SOP, sendo que o mais provável é que fatores ambientais e intrauterinos funcionem como gatilho para que indivíduos predispostos geneticamente

apresentem nascimento PIG e SOP (ESCOBAR-MORREALE; LUQUE-RAMÍREZ; SAN MILLÁN, 2005).

1.1. ESTUDO GENÉTICO NA SOP

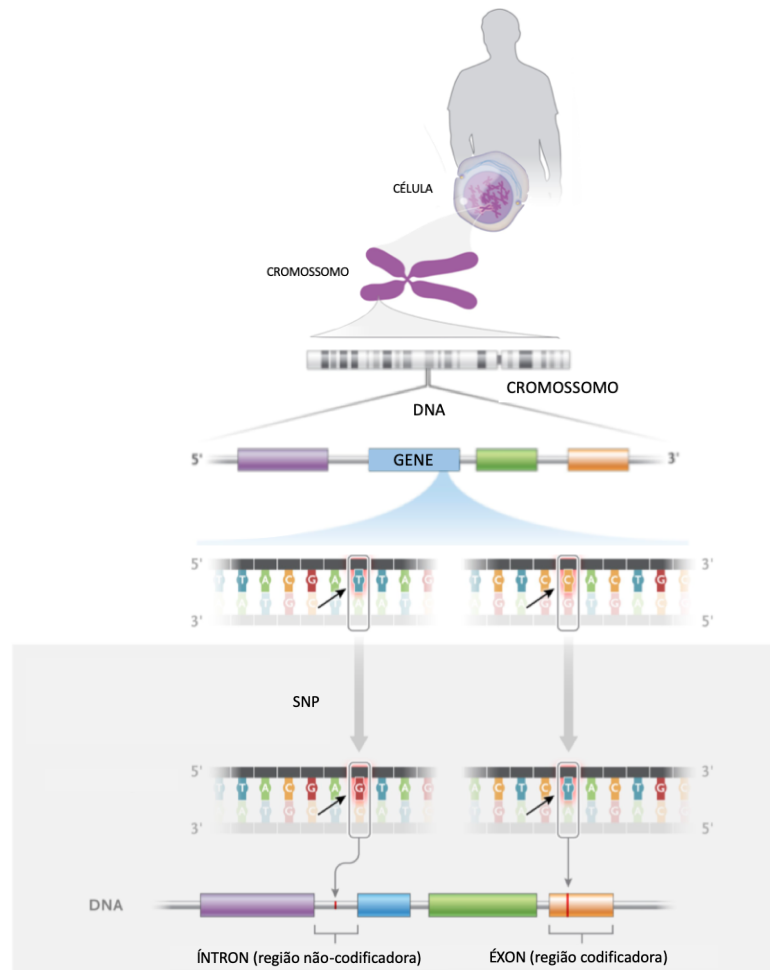
A primeira evidência de que SOP é uma doença de base genética surgiu em 1968 com os estudos de Cooper et al. (1968). Posteriormente, em 1999, estudos com membros de mesma família postularam que a SOP seria um distúrbio de modelo autossômico dominante (GOOVIN; OBHRAI; CLAYTON, 1999) (distúrbio determinado por gene localizado em cromossomo não-sexual e que se manifesta no estado heterozigoto, isto é, em pessoa que possui tanto o alelo anormal/mutante quanto o alelo normal) (TURNPENNY; ELLARD, 2009). O carácter genético ficou mais claro em 2006, quando um estudo com gêmeares mostrou que mulheres com irmã gêmea monozigótica portadora de SOP tinha cerca de duas vezes mais risco de ter a doença quando comparadas àquelas com irmã gêmea dizigótica ou com irmã sem gemelaridade (VIKIN et al., 2006). Já os estudos de genes candidatos foram realizados para estabelecer alguma relação entre as manifestações fenotípicas metabólicas e reprodutivas da SOP com genes hipoteticamente relacionados ao distúrbio. No entanto, a abordagem do gene candidato não se mostrou satisfatório no estudo da etiopatogenia da SOP, já que este é um distúrbio multifatorial e multigênico, em que cada gene contribui com uma parcela da suscetibilidade (JONES; GOODARZI, 2016). Atualmente, o estudo genético da SOP conta com pesquisas sobre comprimento telomérico e polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*- SNP), os quais são estudados através da avaliação do genoma humano (*Genome-wide association study*- GWAS).

1.1.1. GENES ASSOCIADOS À SOP

Cada célula do organismo humano possui em seu núcleo um grupo de cromossomos formados por uma sequência longa de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*-DNA), a qual contém vários genes e outras sequências de nucleotídeos (KARP, 2008). Cada gene localiza-se em um locus e constitui a unidade fundamental da hereditariedade ao conduzir a síntese proteica (SADLER, 2001; TURNPENNY; ELLARD, 2009). Genes e, por conseguinte, o DNA, são formados por nucleotídeos, os quais contém três partes: o ácido fosfórico, a

desoxirribose (pentose) e uma base nitrogenada (citosina, adenosina, guanina, timina) (TURNPENNY; ELLARD, 2009). O SNP, por sua vez, é um tipo de polimorfismo em que ocorre variação na sequência de DNA apenas em um nucleotídeo/base nitrogenada (SANTORO, 2010). Para ser considerado SNP a frequência da variação na população deve ser superior a 1%. Se a frequência for inferior a 1%, a variação é considerada uma mutação (TURNPENNY; ELLARD, 2009). O estudo dos polimorfismos é relevante pois eles são marcadores genéticos de doenças e de características fenotípicas, podendo atuar como fatores de risco, fatores de proteção ou simplesmente ser responsáveis pela diversidade de determinada característica fenotípica (ROCHA et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1- Cromossomo, gene, SNP



Cromossomo: sequência longa de DNA; Gene: unidade fundamental da hereditariedade; SNP: tipo de polimorfismo com variação de apenas um nucleotídeo/base nitrogenada

FONTE: Adaptado de New England Journal of Medicine - Illustrated Glossary (https://illustrated-glossary.nejm.org/index.html?term=single-nucleotide_polymorphism)

Em mulheres com SOP, os loci nos quais foram identificados SNPs associados ao distúrbio são ocupados, em geral, por genes envolvidos no crescimento de tecidos e órgãos [*DENND1A* (*DENN/MADD domain containing 1^a*), *YAP1* (*Yes-associated protein 1*), *SUMO1P1* (*SUMO1 pseudogene 1*)/*ZNF217* (*Zinc finger protein 217*) e *ERBB4* (*Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*)], genes relacionados à insulina [*THADA* (*Thyroid adenoma associated*), *RAB5B* (*RAB5B, member RAS oncogene family*)/*SUOX* (*Sulfite oxidase*), *INSR* (*Insulin receptor*) e *HMGA2* (*High mobility group AT-hook 2*)] e à obesidade [*GYS2* (*GYS2, glycogen synthase 2*) e *MAPRE 1* (*microtubule associated protein RP/EB family member 1*)] e genes que atuam na ação de hormônios gonadotróficos e esteroides sexuais [*LHCGR* (*Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*), *FSHR* (*Follicle stimulating hormone receptor*), *GATA4* (*GATA, binding protein 4*) /*NEIL2* (*Nei like DNA glycosylase 2*), *FHSB* (*Follicle stimulating hormone subunit beta*) e *ZBTB16* (*Zinc finger and BTB domain containing 16*)] (SHI et al., 2012).

Dentre os genes envolvidos no crescimento de tecidos e órgãos, estão *DENND1A*, *YAP1*, *SUMO1P1/ZNF217* e *ERBB4*. O gene *DENND1A* codifica o domínio DENN que é expresso diferentemente em células neoplásicas e células normais (CHEN et al., 2011). Além disto, *DENND1A* pode estar associado com exocitose de gonadotrofinas e é expresso nas células da teca e dos testículos (WELT; DURAN, 2014). Com relação a traços fenotípicos, *DENND1A* foi associado a níveis séricos elevados de insulina 2 horas pós-glicose em pacientes SOP (CUI et al., 2012). Portanto, polimorfismo no *DENND1A* pode estar envolvido na etiopatogenia da SOP através da resistência insulínica e liberação de gonadotrofinas. Já o gene *YAP1* tem um papel central no controle do tamanho dos órgãos e na supressão tumoral através da restrição de proliferação celular e promoção da apoptose (SHI et al., 2012). O aumento do tamanho ovariano, importante característica clínica da SOP, pode, portanto, ser regulado pela via de sinalização ativada pelo *YAP1* (LOUWERS et al., 2013). Além disto, *YAP1* mostrou estar envolvido no desenvolvimento folicular ovariano e na patogênese da SOP (JI et al., 2017). O gene *SUMO1P1* se relaciona a vias envolvidas no desenvolvimento embrionário e na biossíntese de lipídeos (PAU et al., 2017). O gene *ZNF217* está associado a vários cânceres, em especial os de mama e ovário (KALLIONIEMI et al., 1994; CURJAL et al., 1996; WATANABE et al., 2002), levando à transformação neoplásica através do aumento da atividade da telomerase (NONET et al., 2001). Também se associa a pior prognóstico destas neoplasias (VENDRELL et al., 2012; LI et al., 2007) e à síndrome de hiperestímulo ovariano (ZHAI et al., 2017). Já o gene *ERBB4* faz parte de uma família de receptores de fatores de crescimento

epidérmico (*Epidermal growth factor receptors* - EGFR). Este tipo de receptor se relaciona com ativação de células cancerosas através de proliferação celular, bloqueio da apoptose, metástase e neovascularização. Além disso, estão relacionados à esteroidogênese, à maturação folicular tardia e são expressos no câncer de ovário (HAYES et al., 2015) (Quadro 1).

Quadro 1- Genes envolvidos no crescimento de tecidos e órgãos

Gene	Função
<i>DENND1A</i>	Codifica a proteína DENND/MADD e seu domínio 1 ou DENND1A. Expressão diferente em células neoplásicas e células normais. Pode estar associada com a exocitose de gonadotrofinas. É expresso nas células da teca e dos testículos.
<i>YAP 1</i>	Envolvido no controle do tamanho dos órgãos e na supressão tumoral. Envolvido na regulação do desenvolvimento folicular ovariano.
<i>SUMO1P1</i> <i>ZNF217</i>	Associado ao desenvolvimento embrionário e à biossíntese de lipídeos. Associado ao aumento da atividade da telomerase, transformação neoplásica e síndrome de hiperestímulo ovariano.
<i>ERBB4</i>	Associado com ativação de células cancerosas através de proliferação celular, bloqueio da apoptose, metástase e neovascularização. Associado à esteroidogênese e maturação folicular tardia.

No tocante aos genes relacionados à insulina estão *THADA*, *RAB5B/SUOX* e *INSR* *HMGA2*. O gene *THADA* foi identificado no adenoma tireoidiano e está associado ao diabetes melito tipo 2 (DM2) (CHEN et al., 2011). Sugere-se uma ligação entre *THADA* e fatores predisponentes ao DM2 em mulheres portadoras de SOP (WELT; DURAN, 2014). Em estudo de traços fenotípicos, *THADA* foi associado ao aumento dos níveis de testosterona, lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*-LDL) e hormônio luteinizante (*Luteinizing hormone*-LH) (CUI et al., 2012; SAXENA; WELT, 2013). Já a região entre os genes *RAB5B* e *SUOX* está associada ao diabetes melito tipo 1 (DM1) (SHI et al., 2012), o que pode relacionar a etiopatogenia da SOP à insulina. O gene *INSR* codifica o receptor da insulina. Mutações neste gene ocasionam hiperinsulinemia e resistência insulínica (SHI et al., 2012). O gene *HMGA2* está associado ao DM2, tumores vasculares e estatura do adulto (SHI et al., 2012). Há ainda alguns SNPs identificados que estão associados à obesidade como *GYS2*

(HWANG et al., 2012) e *MAPRE 1*, o qual está envolvido na adipogênese e desenvolvimento folicular (DAY et al., 2018) (Quadro 2).

Quadro 2- Genes relacionados à insulina e obesidade

Gene	Função
<i>THADA</i>	Associado ao adenoma tireoidiano. Associado ao aumento dos níveis de testosterona, LDL e LH. Associado ao DM 2.
<i>RAB5B / SUOX</i>	Suscetibilidade para DM1.
<i>INSR</i>	Codifica o receptor da insulina.
<i>HMGGA2</i>	Associado ao DM2, tumores vasculares e estatura do adulto.
<i>GYS2</i>	Relacionado à obesidade.
<i>MAPRE 1</i>	Envolvido na adipogênese e desenvolvimento folicular.

Os genes *LHCGR*, *FSHR*, *C9orf3*, *GATA4/NEIL2*, *FHSB* e *ZBTB16* estão relacionados a hormônios gonadotróficos e esteroides sexuais. O *LHCGR* codifica o receptor acoplado à proteína-G do LH e gonodotrofina coriônica humana (*Human gonadotropin chorionic- HCG*). No ovário, *LHCGR* é expresso nas células da granulosa em estágios avançados de folículos pré-ovulatórios e permite a resposta ao pico de LH e ovulação. Mutações inativadoras do *LHCGR* em mulheres estão associadas com aumento do LH, ovários crescidos, oligomenorreia, resistência ao LH e ao HCG (CHEN et al., 2011). Mutações ativadoras produzem hiperandrogenismo em mulheres, mas nenhum outro efeito na reprodução (CHEN et al., 2011). Já o gene *FSHR* codifica o receptor do hormônio folículo estimulante (*Follicle stimulating hormone – FSH*). Ratas com gene *FSHR* inativado são estéreis, apresentam ovários pequenos, desenvolvimento folicular bloqueado, útero atrófico e vagina imperfurada (SHI et al., 2012). Distúrbios nos receptores das gonadotrofinas podem, portanto, atrapalhar a ação do FSH e do LH, levando à anovulação e ao hiperandrogenismo. O gene *C9orf3* foi associado à disfunção erétil em homens afro-americanos após radioterapia por câncer de próstata (SHI et al., 2012). Já o gene *GATA4* regula o desenvolvimento gonadal e a transcrição dos genes relacionados a esteroidogênese enquanto que o gene *NEIL2* está envolvido no reparo do DNA (HAYES et al., 2015). Ainda com relação à ação do FSH, o gene *FHSB* codifica o polipeptídeo

beta do hormônio folículo estimulante FSH e está associado à redução na contagem de espermatozoides (HAYES et al., 2015). Já o gene *ZBTB16* está relacionado à reposta a androgênios, à atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata, ao controle de estágios precoces da espermatogênese e à decidualização de células estromais endometriais (DAY et al., 2018) (Quadro 3).

Quadro 3- Genes relacionados relacionados a hormônios gonadotróficos e esteroides sexuais

Gene	Função
<i>LHCGR</i>	Codifica o receptor acoplado a proteína-G do LH e HCG.
<i>FSHR</i>	Codifica o receptor do FSH.
<i>C9orf3</i>	Associado à disfunção erétil em homens afro-americanos após radioterapia por câncer de próstata.
<i>GATA4</i>	Regula o desenvolvimento gonadal e a transcrição dos genes relacionados a esteroidogênese.
<i>NEIL2</i>	Envolvido no reparo do DNA.
<i>FHSB</i>	Codifica o polipeptídeo beta-FSH. Associado à redução na contagem de espermatozoides.
<i>ZBTB16</i>	Relacionado à reposta a androgênios e à atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata. Envolvido no controle de estágios precoces da espermatogênese e na decidualização de células estromais endometriais.

Há ainda SNPs identificados que estão relacionados com o DNA e organelas celulares como *TOX 3* (*Thymocyte selection associated high mobility group box*), *RAD50* (*RAD50 double strand break repair protein*), *KRR1* (*KRR1 small subunit processome component homolog*), *KHDRBS3* (*KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 3*) e *PLGRKT* (*Plasminogen receptor with a C-terminal lysine*). O gene *TOX 3* codifica uma proteína que funciona como fator arquitetural na modificação da estrutura da cromatina (SHI et al., 2012). Já o gene *RAD50* está relacionado ao reparo do DNA (DAY et al., 2015). *KRR1* codifica um fator de montagem do ribossomo (DAY et al., 2015). *KHDRBS3* está associado a atividade da telomerase (LEE et al., 2015) e *PLGRKT* codifica o receptor de plasminogênio (DAY et al., 2018) (Quadro 4).

Quadro 4- Genes relacionados com o DNA e organelas celulares

Gene	Função
<i>TOX 3</i>	Codifica uma proteína que funciona como fator arquitetural na modificação da estrutura da cromatina
<i>RAD50</i>	Relacionado ao reparo do DNA.
<i>KRR1</i>	Codifica um fator de montagem do ribossomo.
<i>KHDRBS3</i>	Associado a atividade da telomerase.
<i>PLGRKT</i>	Codifica receptor de plasminogênio.

1.1.2. ESTUDO DOS SNPs NA SOP: GWASs E ESTUDOS ASSOCIADOS

O GWAS foi um grande avanço para o entendimento de doenças poligênicas como a SOP. Ele permite avaliar um número grande de SNPs e testar sua associação com doenças ou características fenotípicas em estudos caso-controle com grande número de participantes. O valor típico de “p” requerido para sugerir associação entre um SNP e SOP nestes estudos caso-controle foi de 1×10^{-8} (WELT; DURAN, 2014).

Chen et al. (2011) realizou o primeiro GWAS na SOP e detectou associação nos loci 2p16.3(rs13405728/ gene *LHCGR*), 2p21(rs13429458, rs12478601, rs12468394/ gene *THADA*) e 9q33.3 (rs2479106, rs10818854, rs10986105/gene *DENND1A*) em população han-chinesa. A amostra do GWAS neste estudo foi pequena para explicar a grande suscetibilidade genética da SOP. Então, Shi et al. (2012) realizou o segundo estudo em população han-chinesa, confirmou a associação dos 3 loci previamente reportados e identificou 8 novos loci associados a SOP: 2p16.3 (rs 2268361, rs2349415/gene *FSHR*), 9q22.32 (rs3802457, rs4385527/gene *C9orf3*), 11q22.1 (rs1894116/gene *YAP 1*), 12q13.2 (rs705702/entre os genes *RAB5B* e *SUOX*), 12q14.3 (rs2272046/gene *HMG2*), 16q12.1 (rs4784165/gene *TOX 3*), 19p13.3 (rs2059807/gene *INSR*) e 20q13 (rs6022786/entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) (Tabela 1).

Tabela 1- GWASs em população han-chinesa

Autor	População	Crom.	Gene	SNP	OR (IC 95%)	<i>p</i> valor*
Chen et al. (2011) População Han-chinesas GWAS 1 →Rotterdam	Metanálise: -SOP: 4.082 vs. Controle: 6.687	2p16.3	<i>LHCGR</i>	rs13405728	0.71 (0.67–0.77)	7.55×10^{-21}
				rs12468394	0.72 (0.68–0.78)	1.59×10^{-20}
	9q33.3	<i>THADA</i>	rs13429458	0.67 (0.62–0.72)	1.73×10^{-23}	
			rs12478601	0.72 (0.67–0.77)	3.48×10^{-23}	
			rs10818854	1.51 (1.37–1.65)	9.40×10^{-18}	
			rs2479106	1.34 1.26–1.43	8.12×10^{-19}	
rs10986105	1.47 1.33–1.61	6.90×10^{-15}				
Shi et al. (2012) População Han-chinesa GWAS 2 →Rotterdam	Metanálise: -SOP: 9.736 vs. Controle: 9.594	2p16.3	<i>FSHR</i>	rs2268361	0.87	9.89×10^{-13}
				rs2349415	1.19	2.35×10^{-12}
	9q22.32	<i>C9orf3</i>	rs4385527	0.84	5.87×10^{-9}	
			rs3802457	0.77	5.28×10^{-14}	
	11q22.1	<i>YAP1</i>	rs1894116	1.27	1.08×10^{-22}	
	12q13.2	<i>RAB5B/SUOX</i>	rs705702	1.27	8.64×10^{-26}	
	12q14.3	<i>HMGA2</i>	rs2272046	0.70	1.95×10^{-21}	
	16q12.1	<i>TOX3</i>	rs4784165	1.15	3.64×10^{-11}	
	19p13.3	<i>INSR</i>	rs2059807	1.14	1.09×10^{-8}	
	20q13.2	<i>SUMO1P1/ZNF217</i>	rs6022786	1.13	1.83×10^{-9}	

Crom.: cromossomo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; GWAS: estudo do genoma humano; SOP: síndrome de ovários policísticos; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

**p* valor da metanálise (caso não haja metanálise no estudo, *p* valor do estudo)

Os achados em população han-chinesa foram testados em outras etnias. Dentre os GWASs coreanos, os resultados foram controversos. O primeiro não identificou nenhum SNP com limiar de significância exigida pelos GWASs (HWANG et al., 2012) e o segundo encontrou associação no locus 8q24.2 (rs10505648/gene *KHDRBS3*) (LEE et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 2- GWASs em população coreana

Autor	População	Crom.	Gene	SNP	OR (IC 95%)	P valor*
Hwang et al. (2012)	SOP: 774 vs. controle: 967 População Coreana GWAS →Rotterdam	12p12.2	GYS2	rs10841843	0.70 (0.59–0.84)	8.02 x 10 ⁻⁵
rs6487237				0.70 (0.59–0.84)	8.14 x 10 ⁻⁵	
rs7485509				0.70 (0.58–0.83)	6.97 x 10 ⁻⁵	
Lee et al. (2015)	Metanálise: -SOP: 1.225 vs. Controle: 1.724	8q24.2	KHDRBS3	rs10505648	0.52 (1.52–2.45)	5.46 x 10 ⁻⁸
População Coreana GWAS →Rotterdam						

Crom.: cromossomo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; GWAS: estudo do genoma humano; SOP: síndrome de ovários policísticos; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

**p* valor da metanálise (caso não haja metanálise no estudo, *p* valor do estudo)

Em população com ancestralidade europeia, os achados também são controversos. Estudo caso-controle confirmou associação com SOP no locus 9q33.3 (rs10818854/gene *DENND1A*) (GOODARZI et al., 2012). Outros estudos não mostraram associação no limiar de significância exigida pelos GWASs com o distúrbio (LERCHBAUM et al., 2011; WELT et al., 2012; ERIKSEN et al., 2012; MUTHARASAN et al., 2013). Metanálise *cross-étnica* com dados da população han-chinesa e de população de ancestralidade europeia encontrou associação apenas nos loci 11q22.1 (rs1894116/gene *YAP 1*) e 12q13.2 (rs705702/entre os genes *RAB5B* e *SUOX*) (LOUWERS ET AL., 2013). Já o primeiro GWAS nesta etnia associou os loci 8p23.1 (rs804279/ entre os genes *GATA4* e *NEIL2*) e 11p14.1 (rs11031006/gene *FSHB*) e 9q22.32 (rs10993397/entre os genes *C9orf3* e *FANCC*) com SOP (HAYES et al., 2015). O segundo GWAS identificou associações nos loci 2q34, (rs1351592/gene *ERBB4*), 11p14.1 (rs11031006/gene *FSHB*), 5q31.1 (rs13164856/gene *RAD50*), 12q21.2 (rs1275468/gene *KRR1*), 11q22.1 (rs11225154/gene *YAP1*) e 2p21 (rs7563201/gene *THADA*) (DAY et al., 2015). Metanálise recente identificou 3 novos loci nos cromossomos 9 (rs10739076/gene *PLGRKT*), 11 (rs1784692, gene *ZBTB16*) e 20 (rs853854/gene *MAPRE 1*) (DAY et al., 2018) (Tabela 3).

A validade interna de todos estes estudos apresenta limitações metodológicas pois foram estudos multicêntricos, transversais, que incluíram mulheres da adolescência até o climatério, com hábitos sociais, culturais e manifestações clínico-metabólicas heterogêneas.

Além disto, não levaram em consideração outros aspectos da etiopatogenia da SOP como peso ao nascer e fatores ambientais.

Tabela 3- GWASs e estudos associados em população com ancestralidade europeia

Autor	População	Crom.	Gene	SNP	OR (IC 95%)	p valor*
Goodarzi et al. (2012)	Metanálise: -SOP: 1.474 vs.	2p21	<i>THADA</i>	rs12468394	0.84 (0.76 -0.93)	0.0006
Ancestralidade europeia →NIH	Controle: 1.802	2p21	<i>THADA</i>	rs6544661 **	0.89 (0.80 -0.98)	0.022
		9q33.3	<i>DENND1A</i>	rs10818854	1.87 (1.48 -2.35)	9.8310 ⁻⁸
Welt et al. (2012)	Metanálise SOP: 1.144 vs.			rs10818854	1.53 (1.17 - 2.0)	0.0019
Ancestralidade europeia →NIH	Controle: 17.619	9q33.3	<i>DENND1A</i>	rs10986105	1.68 (1.27 -2.23)	0.00033
Mutharasan et al. (2013)	SOP: 905 vs. controle: 956	2p16.3	<i>FSHR</i>	rs1922476	1.34	0.0053
Ancestralidade europeia →NIH			<i>LHCGR</i>	rs10495960	1.31	0.0046
				rs7562215	0.56	0.0037
Louwers et al. (2013)	SOP:703 vs controle:2164 →NIH	12q13.2	<i>RAB5B/SUOX</i>	rs705702	1.21	0.00431
Ancestralidade europeia →Rotterdam →NIH	Metanálise Goodzard et al., Welt et al. e Louwers et al. SOP: 3321 vs. controle: 21.585 →NIH	11q22.1	<i>YAP1</i>	rs1894116	1.37	0.00185
		2p21	<i>THADA</i>	rs12468394	0.87	1.01 x 10 ⁻⁵
		9q33.3	<i>DENND1A</i>	rs12478601	0.88	1.77 x 10 ⁻⁴
				rs10818854	1.50	4.9 x 10 ⁻³
				rs10986105	1.56	1.53 x 10 ⁻⁵
		2p16.3	<i>LHCGR</i>	rs13405728	0.79	4.1 x 10 ⁻⁴
		2p21	<i>THADA</i>	rs12468394	0.80	2.2 x 10 ⁻⁴
				rs12478601	0.82	1.3 x 10 ⁻³
	Metanálise cross-étnica Goodzard et al., Welt et al. e Louwers et al. e metanálise han-chinesas (<i>Chen et al. e Shi et al.</i>)	9q33.3	<i>DENND1A</i>	rs10818854	1.45	2.3 x 10 ⁻³
				rs10986105	1.54	2.5 x 10 ⁻³
		2p16.3	<i>FSHR</i>	rs2268361	0.87	3.8 x 10 ⁻⁵
				rs2349415	1.24	3.6 x 10 ⁻⁴
		9q22.32	<i>c9orf3</i>	rs4385527	0.82	2.0 x 10 ⁻⁶
				rs3802457	0.70	9.2 x 10 ⁻⁶
		11q22.1	<i>YAP1</i>	rs1894116	1.32	1.0 x 10 ⁻⁹
	SOP: 5.575 vs. controle: 24.586	12q13.2	<i>RAB5B/SUOX</i>	rs705702	1.28	3.8 x 10 ⁻¹¹
	→Rotterdam	16q12.1	<i>TOX3</i>	rs4784165	1.18	8.1 x 10 ⁻³
	→NIH	20q13.2	<i>SUMO1P1/ZNF217</i>	rs6022786	1.19	2.3 x 10 ⁻³

Tabela 3- GWASs e estudos associados em população com ancestralidade europeia

Autor	População	Crom.	Gene	SNP	OR (IC 95%)	P valor*
Hayes et al. (2015) Ancestralidade europeia GWAS → NIH	Metanálise: -SOP: 3.000 vs. controle: 5.530	8p23.1	<i>GATA4 / NEIL2</i>	rs804279	***	8.0x10 ⁻¹⁰
		9q22.32	<i>C9orf3 / FANCC</i>	rs10993397	***	4.6x10 ⁻¹³
		11p14.1	<i>FSHB</i>	rs11031006	***	1.9x10 ⁻⁸
Day et al. (2015) Ancestralidade europeia GWAS →Rotterdam → NIH → autorrelato	Metanálise -SOP: 7.229 vs. controle: 181.645	2q34	<i>ERBB4</i>	rs1351592	1.18 (1.13–1.23)	1.2x 10 ⁻¹²
		11p14.1	<i>FSHB</i>	rs11031006	1.16 (1.11–1.22)	1.3 x 10 ⁻⁹
		5q31.1	<i>RAD50</i>	rs13164856	1.13 (1.09–1.18)	3.5 x 10 ⁻⁹
		12q21.2	<i>KRR1</i>	rs1275468	1.13 (1.08–1.18)	1.9 x 10 ⁻⁸
		11q22.1	<i>YAP1</i>	rs11225154	1.22 (1.15–1.29)	7.6x10 ⁻¹¹
Day et al. (2018) Ancestralidade europeia →Rotterdam → NIH → autorrelato	Metanálise SOP: 10.074 vs. controle: 103.164	2:43561780 ¹	<i>THADA</i>	rs7563201	0.9 (0.87-0.93)	3.678x10 ⁻¹⁰
		2:21339176 ¹	<i>ERBB4</i>	rs2178575	1.18(1.13- 1.23)	3.344x10 ⁻¹⁴
		5:13181320 ¹	<i>IRF1 / RAD50</i>	rs13164856	1.13(1.09-1.18)	1.453x10 ⁻¹⁰
		8:11623889 ¹	<i>GATA4 / NEIL2</i>	rs804279	1.14(1.1-1.18)	3.761x10 ⁻¹²
		9:5440589 ¹	<i>PLGRKT</i>	rs10739076	1.12(1.07-1.16)	2.51x10 ⁻⁸
		9:97723266 ¹	<i>FANCC</i>	rs7864171	0.91(0.88-0.94)	2.946 x 10 ⁻⁸
		9:126619233 ¹	<i>DENND1A</i>	rs9696009	1.22 (1.15 – 1.3)	7.958x10 ⁻¹¹
		11:30226356 ¹	<i>ARL14EP / FSHB</i>	rs11031005	0.85(0.82-0.89)	8.664x10 ⁻¹³
		11:102043240 ¹	<i>YAP1</i>	rs11225154	1.2(1.13-1.26)	5.438x10 ⁻¹¹
		11:113949232 ¹	<i>ZBTB16</i>	rs1784692	1.15(1.1-1.14)	1.876x10 ⁻¹⁰
		12:56477694 ¹	<i>ERBB3 / RAB5B</i>	rs2271194	1.1(1.07-1.14)	4.568 x 10 ⁻⁹
		12:75941042 ¹	<i>KRR1</i>	rs1795379	0.89(0.86-0.92)	1.808 x 10 ⁻⁹
		16:52375777 ¹	<i>TOX3</i>	rs8043701	0.88 (0.85 – 0.92)	9.610x10 ⁻¹⁰
		20:31420757 ¹	<i>MAPRE1</i>	rs853854	0.91 (0.88 – 0.94)	2.358 x 10 ⁻⁹

Crom.: cromossomo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; GWAS: estudo do genoma humano; SOP: síndrome de ovários policísticos; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

*p valor da metanálise (caso não haja metanálise no estudo, p valor do estudo)

1.1.3. SNPS E GENES RELACIONADOS A SOP EM NASCIDAS PIG

Mulheres nascidas PIG apresentam risco duas vezes maior de desenvolver SOP na terceira década de vida (MELO et al., 2010), no entanto, não é conhecido se ambos distúrbios apresentam *background* genético comum. Até o momento, não há estudos que avaliem se os SNPs associados a SOP são mais frequentes em nascidas PIG quando comparadas a nascidas AIG.

1.1.4. ESTUDO DO COMPRIMENTO TELOMÉRICO NA SOP E NO NASCIMENTO PIG

O telômero é uma sequência de DNA não-codificante, situada na extremidade dos cromossomos, cuja função é preservar a integridade e estabilidade do genoma (ALLSOPP et al., 1992). A cada divisão celular, os telômeros se tornam mais curtos, desta forma, eles encurtam fisiologicamente com a idade e são considerados marcadores biológicos do envelhecimento celular (AVIV, 2004).

Condições que atuam através do estresse oxidativo e inflamatório parecem também estar associadas ao encurtamento telomérico (AVIV, 2004; FINKEL; HOLBROOK, 2000), como as doenças cardiovasculares (SAMANI et al, 2001; BROUILLETTE et al., 2003). A SOP também apresenta relação com o estresse oxidativo e inflamatório (CUSSONS et al, 2006), o que torna possível a relação entre encurtamento telomérico e etiopatogenia da SOP. No entanto, os estudos são controversos. Li et al. (2014) mostrou que SOP está associada a telômeros mais curtos, enquanto Caiqin et al. (2017) mostrou que o distúrbio está associada a telômeros mais longos e Pedroso et al. (2015) não encontrou diferença entre comprimento telomérico em mulheres com e sem SOP. Nascimento PIG também foi associado com estresse oxidativo e inflamatório (LAUSTEN-THOMSEN et al., 2014) e os estudos que avaliam nascimento PIG e comprimento telomérico são divergentes. Os achados encontrados são: associação entre nascimento PIG e telômeros mais curtos (DE ZEGHER et al., 2016); associação entre nascimento PIG e telômeros mais longos (LAGANOVIC et al., 2014; TELLECHEA et al., 2015) e ausência de associação (KEJANTIE et al., 2012; MELO et al., 2017; AKKAD et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVAS

Como foi visto anteriormente, mulheres nascidas PIG apresentam risco aumentado para desenvolver SOP na terceira década de vida. Além do nascimento PIG, a predisposição genética também é outro fator relacionado ao desenvolvimento da SOP. Entretanto, o estudo genético da SOP tem algumas limitações. Os estudos dos SNPs na SOP tem limitações no tocante à validade interna dos achados, uma vez que incluiu mulheres com diferentes critérios definidores da SOP, além de participantes com faixas etárias, etnias, hábitos sociais e culturais diferentes e manifestações clínico-metabólicas heterogêneos. Além disto, estes estudos não levaram em consideração outros aspectos da etiopatogenia da SOP como o peso ao nascer. Já os estudos sobre comprimento telomérico também têm resultados divergentes. Como a SOP apresenta particularidades geográficas e étnicas, justifica-se a realização de estudos regionais e longitudinais para que se possa conhecer de forma mais abrangente a etiopatogenia da SOP.

No Brasil, a prevalência de SOP é 13,9% e as portadoras deste distúrbio podem apresentar maior frequência de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV). Como a DCV é a principal causa de morbimortalidade no Brasil, o estudo dos fatores etiopatogênicos da SOP poderá contribuir para reduzir estes índices através de políticas nacionais de atenção à saúde com a implementação de medidas adequadas de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar a frequência dos SNPs relacionados à SOP [envolvidos na ação das gonadotrofinas (rs13405728/gene *LHCGR*, rs2349415/gene *FSHR*, rs2268361/gene *FSHR*), no crescimento de órgãos e tecidos (rs12468394/gene *THADA*, rs10818854/gene *DENND1A*, rs1894116/gene *YAP1*, rs6022786/ região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*), no DM (rs705702/região entre os genes *RAB5B* e *SUOX*) e na ação de hormônios esteroides (rs4385527/gene *C9ORF3*)] entre mulheres nascidas PIG e AIG reavaliadas durante a terceira década de vida.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Comparar o comprimento de telômero de leucócito (*Leucocyte Telomere Length-LTL*) entre mulheres nascidas PIG e AIG reavaliadas durante a terceira década de vida.

3.2.2. Comparar a frequência dos SNPs envolvidos na ação das gonadotrofinas (rs13405728/gene *LHCGR*, rs2349415/gene *FSHR*, rs2268361/gene *FSHR*), no crescimento de órgãos e tecidos (rs12468394/gene *THADA*, rs10818854/gene *DENND1A*, rs1894116/gene *YAP1*, rs6022786/ região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*), no DM (rs705702/região entre os genes *RAB5B* e *SUOX*) e na ação de hormônios esteroides (rs4385527/gene *C9ORF3*) entre mulheres com e sem a SOP.

4. MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, do tipo coorte de nascimento. O fator de exposição considerado foi o nascimento PIG. Este estudo representa uma análise secundária do estudo da prevalência de SOP nas mulheres nascidas na coorte de Ribeirão Preto entre 1978-79 (MELO et al., 2010). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (Protocolo 4759/2007).

4.2. CONTEXTO E PARTICIPANTES

Considerou-se como critério de inclusão as mulheres no menacme nascidas de gestação à termo em Ribeirão Preto de 31-05-1978 a 01-06-1979. Estas pacientes fazem parte de uma coorte de nascimento e são acompanhadas pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de São Paulo (FMRP-USP) desde o seu nascimento. As participantes foram classificadas em três grupos, conforme o peso de nascimento em relação a idade gestacional: PIG, AIG e grande para idade gestacional (GIG) (Battaglia; Lubchengo, 1967) (Quadro 5). As mulheres nascidas GIG não foram avaliadas neste estudo. As pacientes nascidas PIG e AIG que aceitaram participar da pesquisa após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1) foram incluídas no presente estudo (MELO et al., 2010).

Quadro 5- Classificação do peso ao nascimento em relação à idade gestacional

AIG	Peso ao nascimento entre o P10 e o P90 para a IG
PIG	Peso ao nascimento abaixo do P10 para a IG
GIG	Peso ao nascimento acima do P90 para a IG

AIG: adequado para idade gestacional ; PIG: pequeno para idade gestacional ; GIG: grande para idade gestacional

FONTE: Battaglia e Lubchengo (1967)

Foram considerados como critérios de exclusão para participação neste estudo as seguintes situações:

-Gestantes

-Mulheres em aleitamento materno

-Usuárias de contraceptivo hormonal que não concordaram em fazer suspensão do método por, no mínimo 12 semanas, mesmo quando lhes foi oferecido método contraceptivo não hormonal como alternativa.

Do total de mulheres elegíveis para o estudo, foram recrutadas todas as nascidas PIG e uma subamostra de nascidas AIG escolhida de forma aleatória por randomização através do site www.randomizer.org, utilizando-se a proporção de uma paciente recrutada para cada duas não convocadas. Estas pacientes foram convocadas de novembro de 2007 a outubro de 2008 através de cinco fases de busca (Quadro 6). Este recrutamento inicial objetivou avaliar a prevalência de SOP (MELO et al., 2010) e, naquele momento, foram congeladas as amostras de DNA com qualidade adequada.

Quadro 6- Fases de busca para recrutamento das pacientes.

1. Contato telefônico conforme os dados do arquivo da FMRP-USP (Pediatria).
2. Localização do número de telefone atual através da lista telefônica. Para isso, foi utilizado o endereço das pacientes que foi arquivado pelo Departamento de Pediatria.
3. Envio de convocação de comparecimento ao Hospital via correspondência.
4. Divulgação em mídia impressa, em rádio e em televisão.
5. Busca pelo sistema de Hygia, sistema de cadastro da rede de saúde municipal de Ribeirão Preto – São Paulo.

4.3. VARIÁVEIS

4.3.1. VARIÁVEIS DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A idade na visita de inclusão no estudo, peso (P) e altura (A) atuais, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), sedentarismo, colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoproteins*- LDL), lipoproteína de alta densidade (*High density lipoproteins*- HDL), triglicérides (TG), glicemia de jejum, insulina, resistência insulínica (*homeostasis model assessment-insulin resistance index/HOMA-IR*), antecedentes maternos (anos de estudo formal, situação conjugal, tabagismo).

4.3.2. VARIÁVEIS DEPENDENTES

Presença ou não de SOP e nascimento PIG ou AIG.

4.3.3. VARIÁVEIS INDEPENDENTES

Peso ao nascimento em relação à idade gestacional, HOMA-IR, IMC, pares de base, relação do telômero (T) com gene de cópia única (S) (razão T / S) e os polimorfismos relacionados à SOP (rs13405728/gene *LHCGR*, rs2349415/gene *FSHR*, rs2268361/gene *FSHR*, rs12468394/gene *THADA*, rs10818854/gene *DENND1A*, rs1894116/gene *YAP1*, rs6022786/região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*, rs705702/região entre os genes *RAB5B* e *SUOX*, rs4385527/gene *C9ORF3*).

4.4. FONTES DE DADOS E MENSURAÇÃO

4.4.1. ANAMNESE E EXAME FÍSICO

A avaliação das pacientes foi realizada no laboratório de Ginecologia do HC-FMRP-USP em visita única durante a fase folicular precoce (terceiro ao quinto dia) do ciclo menstrual, após um período de jejum de 10 a 12 horas. Em relação às mulheres com amenorreia, a avaliação foi realizada em programação aleatória, desde que documentada por ultrassonografia a ausência de corpo lúteo ou folículo > 10 mm.

Previamente ao agendamento da consulta, as usuárias de anticoncepcional hormonal foram orientadas a suspender a medicação (“wash out” hormonal) por no mínimo três meses. Com o objetivo de não elevar os riscos da gestação não planejada, foi oferecido a utilização de métodos contraceptivos não hormonais como o dispositivo uterino com cobre ou o preservativo masculino, sempre respeitando o desejo e o interesse das pacientes.

Obedecendo-se as condições acima e após a assinatura do TCLE, todas as mulheres foram submetidas à anamnese e exame físico. Foram avaliados idade, peso e altura atuais; IMC, definido como $P/(A)^2$; CA, considerada a menor medida entre a crista ilíaca e a margem inferior da última costela; PAS; PAD e sedentarismo (definido pela frequência de atividade física < 10 min consecutivos/semana) (CRAIG et al., 2003).

A idade gestacional de nascimento (calculada com base no primeiro dia da última menstruação), o peso ao nascimento e os dados maternos (situação conjugal, anos de estudo formal, tabagismo) foram obtidos dos arquivos da Pediatria.

Os dados de anamnese e exame físico foram coletados no recrutamento em 2007-2008 para a realização dos estudos sobre prevalência de SOP (MELO et al., 2010; MELO et al., 2014).

4.4.2. VARIÁVEIS LABORATORIAIS

Após repouso de 15 minutos, 25 mL de sangue venoso foram coletados, sendo que 10 mL desta amostra foi centrifugada a 2500 rpm (1,600 g) em temperatura ambiente durante 10 minutos e o soro resultante foi armazenado a -70 °C para avaliação das variáveis hormonais em momento único. Os outros 10 mL foram utilizados para análise bioquímica em no máximo 2 horas após a coleta da amostra sanguínea e os outros 5 mL (coletados em tubos Vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético e sal diidrato dissódio 10% - EDTA – pH 8.0) foram armazenadas a -80°C (após extração do DNA - três criotubos para cada paciente) para posterior avaliação dos polimorfismos de nucleotídeo simples.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: glicemia de jejum, LDL, HDL, TG, CT, insulina de jejum e resistência insulínica.

A glicemia foi analisada pelo método de oxidação, através do *Konelab 60i kit* (Wiener Lab®, Rosario, Argentina). O CT, HDL e TG foram dosados pelo método enzimático no do aparelho BT 3000 plus (Wiener lab®, Rosario, Argentina). A concentração sérica do LDL foi calculada a partir da fórmula de Friedewald: $LDL = CT - (HDL + TG/5)$, já que não houve nível de TG superior a 400mg/dL nas amostras das pacientes incluídas (FRIEDEWALD et al., 1972). A insulina de jejum foi avaliada por quimiluminescência através do aparelho DPC Immulite® 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA®). A resistência insulínica foi analisada através do HOMA-IR, isto é, $HOMA-IR = glicemia \text{ de jejum (mg/dL)} \times 0,05551 \times insulina \text{ de jejum } (\mu U/mL) / 22,5$ (MATTHEWS et al., 1985).

4.4.3. DIAGNÓSTICO DE SOP

Após o conhecimento das características clínicas, laboratoriais (perfil androgênico) e ultrassonográficas das mulheres, foram utilizados os critérios de Rotterdam para diagnóstico de SOP (presença de pelo menos dois dos três parâmetros apresentados no Quadro 7) (THE ROTTERDAM ESHRE/AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE - SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004).

Quadro 7: Critérios diagnósticos da SOP

-
1. Oligo e /ou anovulação
 2. Sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo
 3. Ovários policísticos a ultrassonografia (presença de 12 ou mais folículos medindo 2-9 mm de diâmetro ou volume ovariano maior do que 10 cm³)
-

Para o diagnóstico é necessária a exclusão de outras etiologias: Síndrome de Cushing, hiperplasia adrenal congênita, tumores produtores de androgênios

FONTE: Consenso de Rotterdam (2004)

4.4.4. AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

4.4.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA dos leucócitos foi realizada através do *QIAamp® DNA Micro kit* (Qiagen, Valencia, California). Em cada amostra foram adicionados 80µl do tampão ATL, 10µl de Proteinase K e 100µl do tampão AL, os quais foram incubados a 56°C por 10 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 30 segundos e foram adicionados 50µl de etanol 100%, seguido de uma etapa de incubação por 3 minutos a temperatura ambiente (TA). O líquido foi transferido para a coluna, o qual foi centrifugado a 6.000 g por um minuto. Em seguida, foram adicionados 500µl de tampão AW1 em cada amostra que foi centrifugada a 6.000g por um minuto.

Após a centrifugação, foram adicionados 500µl de tampão AW2 a coluna e centrifugado a 6.000 g por um minuto. Para secar a membrana da coluna, a mesma foi centrifugada a 8.000 g por três minutos, qual foi posteriormente transferida para um tubo de 1,5 ml em que foram adicionados 30µl de tampão AE para eluição do DNA. O material foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados a 8.000 g por um minuto. Esse passo foi repetido para uma maior concentração de material eluído. A qualidade e

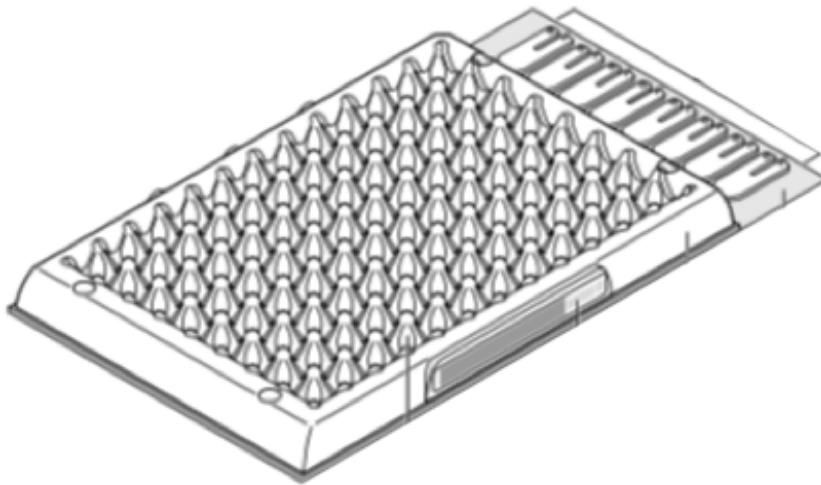
quantidade do DNA genômico foi verificada em espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* da (Thermo Fisher scientific, Massachussetts, EUA) e gel de Agarose 1,5%, corado com *Gel Red* (Uniscience). Somente amostras com mais de 50ng/ μ L de DNA, cujas razões A260/280 encontravam-se entre 1,7 e 2,0 foram incluídas. A seguir, as amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise dos polimorfismos considerados para realização deste estudo.

4.4.4.2. GENOTIPAGEM

Para as análises dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram selecionados os seguintes SNPs: *LHCGR* (rs13405728), *THADA* (rs12468394), *DENND1A* (rs10818854), *FSHR* (rs2349415, rs2268361), *YAP1* (rs1894116), *RAB5B/SUOX* (rs705702), *C9ORF3* (rs4385527) e *SUMO1P1/ZNF217* (rs6022786). A genotipagem foi realizada utilizando a reação de cadeia em polimerase (PCR) em tempo real através do ensaio de discriminação a alélica *Taqman Low Density Array* (TLDA) (Applied Biosystems, Carlsbad, California, EUA). O cartão TLDA utilizado permitiu a avaliação de 07 pacientes por cartão + 01 controle negativo, totalizando 08 amostras diferentes por cartão (4387823C - TLDA - Applied Biosystems).

Foi preparado um mix com 20 μ L de cada amostra de DNA (50 ng/ μ L) e 55 μ L de TaqMan Universal máster mix II e aplicado no poço do cartão. Os cartões TLDA foram centrifugados a 1000 rpm durante 60 segundos por duas vezes para que a amostra fosse distribuída nos poços. Em seguida, o cartão foi selado, os reservatórios de preenchimento da matriz TaqMan foram cortados e o cartão inserido no equipamento *Quant Studio 12 K flex* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As características dos ciclos de PCR foram: inicialmente 10 minutos a 95°C, a seguir 15 segundos a 95°C e finalmente uma etapa de 40 ciclos durante 1 minuto a 60°C. A leitura dos resultados foi realizada pelo software *ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System* (SDS 2.2, Applied Biosystems). A figura 2 ilustra os cartões TLDA utilizados.

Figura 2- Cartão de TLDA



FONTE: Adaptado do Guia de Uso do TaqMan Array Cards

4.4.5. MEDIDA DO LTL

O DNA genômico foi isolado de leucócitos de sangue periférico usando kits QIAamp® DNA Micro (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a integridade do DNA foram determinadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). O LTL foi medido pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) como descrito anteriormente (CALADO et al., 2011), utilizando as seguintes sequências de iniciadoras:

T-Fw 5'CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT3' and T-Rv
 5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'; S-Fw
 5'CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3' and S-Rv
 5'CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'. Somente amostras com concentração de DNA > 50 ng / μ L foram consideradas nesta análise.

Cada amostra foi avaliada em triplicata, sendo considerada a média das três avaliações para análise estatística. A avaliação das amostras foi realizada com o Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix. O LTL foi determinado pelo cálculo da razão T / S (CAWTHON, 2009) usando Δ Ct [Ct (telomere) / Ct (gene único)]. A razão T / S de cada amostra (x) foi normalizada em relação à razão média T / S da amostra de referência [$2 - (\Delta$ ctx - Δ ctr) = $2 - \Delta\Delta$ Ct], o que foi usado para construir curvas padrão, tanto como referência e como amostra de validação

(CALADO et al., 2011). O LTL também foi determinado como pares de base usando a seguinte equação: $f(x) = 3.91x + 5.219$, onde (x) é razão T / S para cada paciente. A variação intra e interassay foi de $9,5 \pm 7,4\%$ e $15,9 \pm 19,4\%$, respectivamente.

4.5. VIÉS

A perda de seguimento, o uso de contraceptivos hormonais, a fase reprodutiva (desejo por filhos) e a necessidade de avaliação clínica e complementar durante a fase folicular do ciclo menstrual foram as maiores limitações no recrutamento inicial das pacientes. Entretanto, para minimizar possíveis vieses, as pacientes foram randomizadas e recrutadas em cinco fases de busca (Quadro 6).

O custo elevado da metodologia dos estudos de coorte limitou a avaliação de diferentes fatores da etiopatogenia da SOP em momento único.

Além disto, é possível que algumas amostras armazenadas tenham perdido sua qualidade. Entretanto, a metodologia empregada para obtenção do DNA foi extremamente rigorosa (foram utilizadas apenas amostras com concentração de DNA $\geq 50\text{ng}/\mu\text{L}$).

4.6. CÁLCULO AMOSTRAL

Para realização do presente estudo foram consideradas todas as pacientes recrutadas em 2007-2008 para avaliação da prevalência de SOP que considerou o seguinte cálculo amostral: para demonstrar diferença absoluta de 15% na prevalência de SOP entre dois grupos distintos na idade reprodutiva [um grupo com o fator de exposição (PIG) e outro sem este fator (AIG)] seriam necessárias 99 pacientes por grupo (total de 198 mulheres), considerando α de 5% e poder de 80% (MELO et al., 2010). Por se tratar de uma avaliação secundária do estudo de coorte inicial (MELO et al., 2010), não houve cálculo amostral específico para o presente estudo.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da distribuição normal das amostras foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal foi utilizado o

teste t não pareado para a comparação. Para variáveis qualitativas foram empregados os testes de Qui-Quadrado. Foram construídos modelo de regressão logística multivariada via método de seleção de variáveis stepwise para prever as variáveis dependentes PIG e SOP. O método de seleção de variáveis stepwise consiste em retirar do modelo estatístico as variáveis que apresentam p-valor maior do que 0.3. As variáveis com $p < 0.3$ irão compor o modelo final. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., North Caroline University, USA).

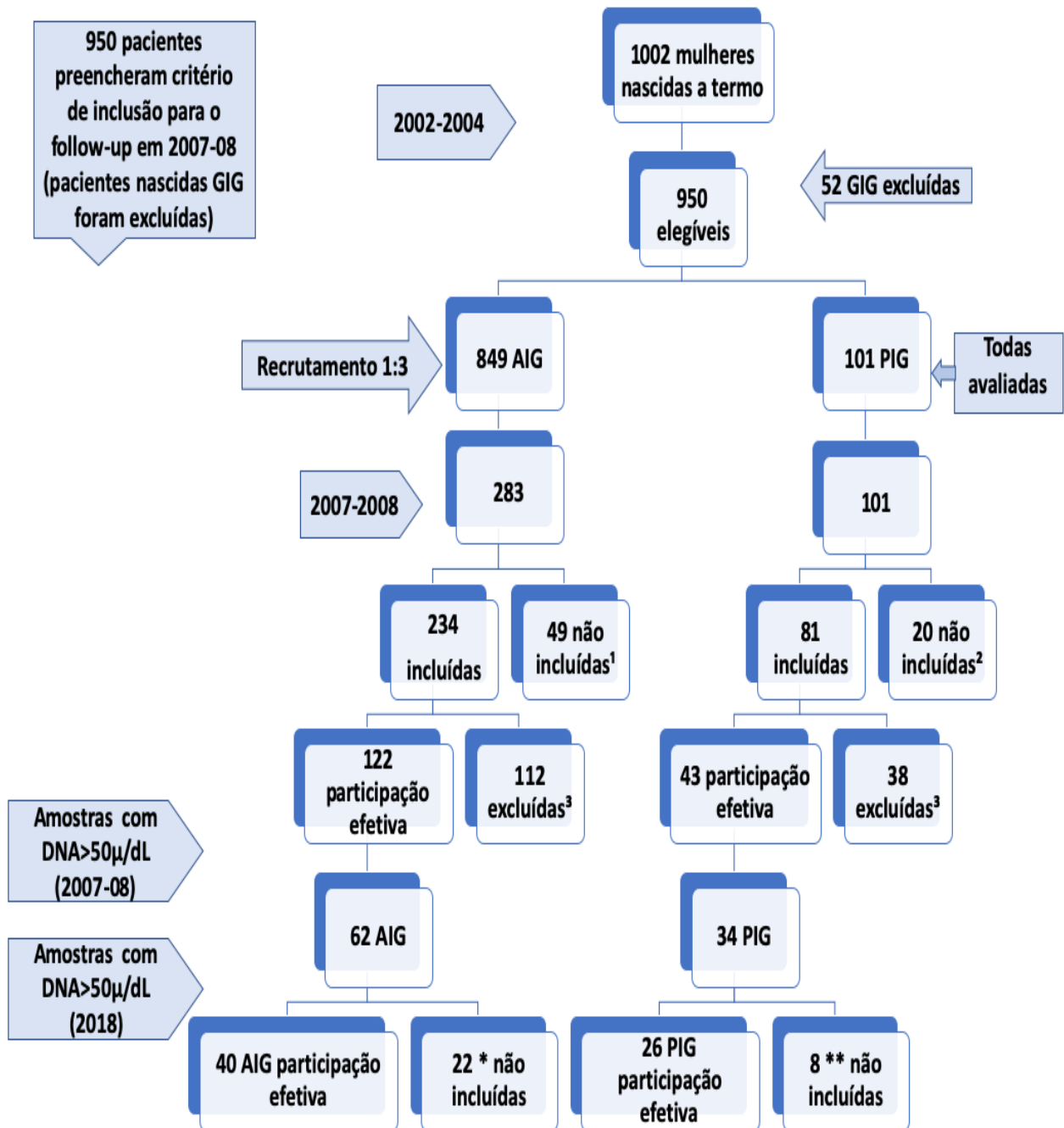
5. RESULTADOS

5.1. FLUXOGRAMA

A amostra total da coorte é representada por 6827 recém-nascidos (RNs) (3316 mulheres e 3511 homens). Do total dos indivíduos do sexo feminino, 3095 foram RN de termo e 221 RN pré-termo (nascimento abaixo de 37 semanas de gestação). Estes indivíduos foram convocados em dois períodos distintos: em 1985-1987 e durante 2002-2004, de modo que, 1002 mulheres nascidas a termo tiveram os seus dados atualizados entre 2002 e 2004. Nesta ocasião, 849 mulheres que atenderam a convocação pertenciam ao grupo dos RNs AIG, 101 fazia parte da população de RNs PIG e 52 pertenciam ao grupo GIG (BARBIERI et al., 2006). Do total de pacientes avaliadas em 2002-04, 950 (RNs PIG e AIG) foram elegíveis para o presente estudo.

Entre novembro de 2007 e outubro de 2008 foram recrutadas todas as mulheres nascidas PIG (n=101) e uma subamostra aleatória de 283 mulheres nascidas AIG, totalizando 384 indivíduos. Do total de mulheres nascidas AIG (n=283), 49 não foram incluídas (16 não aceitaram e 33 não foram localizadas) e 112 preencheram critérios de exclusão. Do total de mulheres nascidas PIG (n=101), 20 não foram incluídas (5 não aceitaram e 15 não foram localizadas) e 38 preencheram critérios de exclusão. Portanto, 150 mulheres preencheram critérios de exclusão: usuárias de anticoncepção hormonal que não quiseram fazer suspensão do método por, no mínimo 12 semanas, mesmo quando oferecido método contraceptivo não hormonal como alternativa (n=76); gestantes (n=63) e lactantes (n=11). Após exclusão, 165 mulheres participaram efetivamente do estudo de 2007-08, sendo 43 do grupo PIG e 122 mulheres do grupo AIG (MELO et al., 2010, 2014). Das pacientes avaliadas em 2007-08, 96 mulheres tiveram amostras de DNA com qualidade adequada e, portanto, foram armazenadas (62 de mulheres nascidas AIG e 34 de mulheres nascidas PIG). Para a realização do presente estudo foram consideradas 66 pacientes, sendo 40 do grupo AIG e 26 do grupo PIG, pois 30 mulheres foram excluídas devido a baixa qualidade do DNA das amostras armazenadas. Destas mulheres, 16 eram portadoras de SOP e 50 não apresentavam este distúrbio. Segue fluxograma do estudo (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma do estudo



¹ : 16 não aceitaram e 33 não foram localizadas

² : 5 não aceitaram e 15 não foram localizadas

³ : gestantes, lactantes, recusaram-se a suspender contraceptivo hormonal por 12 semanas

*: 22 não tinham DNA de qualidade

** : 8 não tinham DNA de qualidade

5.2. VARIÁVEIS CLÍNICAS MATERNAS

Os dados maternos não mostraram diferença significativa em anos de estudo formal [≤ 3 anos: AIG, 23 (57,5%) vs. PIG, 18 (69,23%); 4 – 7 anos AIG, 14 (35,0%) vs. PIG, 7 (26,92%); ≥ 8 anos: AIG, 3 (7,5%) vs. PIG, 1 (3,85%); $p=0.6$], situação conjugal [(união estável: AIG, 38 (95,0%) vs. PIG, 23 (88,46%), $p=0.32$)] e tabagismo [AIG: 13 (32,5%) vs. PIG: 10 (38,46%), $p=0.61$]

5.3. VARIÁVEIS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E FREQUÊNCIA DE SOP

A idade (AIG: $29,36 \pm 0,39$ vs. PIG: $29,51 \pm 0,43$ anos, $p=0.13$), IMC (AIG: $29,36 \pm 0,39$ vs. PIG: $25,81 \pm 7,06$ Kg/m, $p=0.53$), CA (AIG: $84,45 \pm 10,50$ vs. PIG: $87,12 \pm 17,49$ cm, $p=0.48$), PAS (AIG: $110,5 \pm 10,75$ vs. PIG: $112,31 \pm 13,66$ mmHg, $p=0.78$), PAD (AIG: $71,53 \pm 8,11$ vs. PIG: $71,92 \pm 10,96$ mmHg, $p=0.86$) e sedentarismo [AIG: 29 (72,50%) vs. PIG: 20 (76,92%), $p=0.68$] foram semelhantes entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4- Variáveis clínicas dos grupos PIG e AIG

	AIG (n=40)	PIG (n=26)	<i>p</i>
Idade	29,36 ± 0,39	29,51 ± 0,43	0,13
IMC (Kg/m)	24,85 ± 4,42	25,81 ± 7,06	0,53
CA (cm)	84,45 ± 10,50	87,12 ± 17,49	0,48
PAS (mmHg)	110,5 ± 10,75	112,31 ± 13,66	0,78
PAD (mmHg)	71,53 ± 8,11	71,92 ± 10,96	0,86
Sedentarismo [n(%)]	29 (72,50)	20 (76,92)	0,68

Os dados quantitativos são reportados como média ± DP.

Os dados qualitativos são reportados em frequência e percentual.

AIG: adequado para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica

As variáveis laboratoriais, CT (AIG: $179,75 \pm 31,62$ vs. PIG: $179,5 \pm 29,86$ mg/dL, $p=0.97$), LDL (AIG: $107,48 \pm 29,15$ vs. PIG: $108,15 \pm 23,6$ mg/dL, $p=0.92$), HDL (AIG: $54,95 \pm 9,57$ vs. PIG: $52,0 \pm 8,93$ mg/dL, $p=0.21$), triglicérides (AIG: $87,48 \pm 33,53$ vs. PIG: $91,31 \pm 37,45$ mg/dL, $p=0.66$), glicemia de jejum (AIG: $85,44 \pm 6,66$ vs. PIG: $86,92 \pm 5,88$ mg/dL, $p=0.35$), insulina (AIG: $6,65 \pm 4,58$ vs. PIG: $7,15 \pm 5,49$ μ U/mL, $p=0.68$) e HOMA-IR (AIG: $1,42 \pm 1,01$ vs. PIG: $1,55 \pm 1,19$ mg/dL $p=0.64$) foram semelhantes entre os grupos PIG e AIG (Tabela 5).

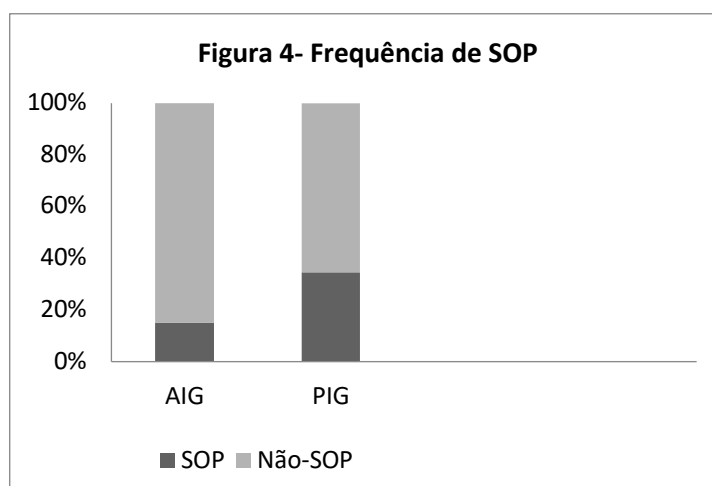
Tabela 5- Variáveis laboratoriais dos grupos PIG e AIG

	AIG (n=40)	PIG (n=26)	<i>p</i>
Colesterol total (mg/dL)	179,75 ± 31,62	179,5 ± 29,86	0,97
LDL(mg/dL)	107,48 ± 29,15	108,15 ± 23,6	0,92
HDL(mg/dL)	54,95 ± 9,57	52,0 ± 8,93	0,21
Triglicérides (mg/dL)	87,48 ± 33,53	91,31 ± 37,45	0,66
Glicemia de jejum(mg/dL)	85,44 ± 6,66	86,92 ± 5,88	0,35
Insulina (μU/mL)	6,65 ± 4,58	7,15 ± 5,49	0,68
HOMA-IR	1,42 ± 1,01	1,55 ± 1,19	0,64

Os dados quantitativos são reportados como média ± DP.

AIG: adequado para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: resistência insulínica

A frequência de SOP nos grupos PIG e AIG foi semelhante [AIG: 6 (15%) vs. PIG: 9 (34,62%), $p=0.06$] (Figura 4).



AIG: adequado para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional; SOP: síndrome dos ovários policísticos; não-SOP: ausência de SOP

5.4. AVALIAÇÃO GENÉTICA

O LTL avaliado pela razão T/S (AIG: 0,68 ± 0,19 vs. PIG: 0,66 ± 0,18 mg/dL, $p=0.74$) e através de pares de base (AIG: 7,86 ± 0,76 vs. PIG: 7,8 ± 0,7, $p=0.74$) não foram diferentes entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6- Medidas do LTL

	AIG (n=40)	PIG (n=26)	<i>p</i>
Razão T/S	0,68 ± 0,19	0,66 ± 0,18	0,74
Pares de base	7,86 ± 0,76	7,8 ± 0,7	0,74

Os dados quantitativos são reportados como média ± DP.

AIG: adequado para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional

As frequências genotípicas dos polimorfismos genéticos associados a SOP nos genes *LHCGR* (rs13405728), *THADA* (rs12468394), *DENND1A* (rs10818854), *FSHR* (rs2349415, rs2268361), *YAP1* (rs1894116), *RAB5B/SUOX* (rs705702), *C9ORF3* (rs4385527) e *SUMO1P1/ZNF217* (rs6022786) não foram diferentes estatisticamente nos grupos PIG e AIG (Tabela 7).

Tabela 7- Frequência genotípica dos polimorfismos nos grupos PIG e AIG

	Genótipo	AIG (n=40)	PIG (n=26)	OR	IC 95% LI	IC 95% LS
rs13405728 Gene <i>LHCGR</i> Locus 2p16.3	GG	2(5,0)	0	REF	REF	REF
	AA	32(80,0)	23(88,46)	3,613 ¹	0,084 ¹	154,636 ¹
	AG	6(15,0)	3(11,54)	2,691 ²	0,051 ²	141,483 ²
rs12468394 gene <i>THADA</i> Locus 2p22	CC	12(30,0)	4(15,38)	REF	REF	REF
	AA	8(20,0)	7(26,92)	2,451 ¹	0,545 ¹	11,029 ¹
	AC	20(50,0)	15(57,69)	2,10 ²	0,574 ²	7,680 ²
rs10818854 gene <i>DENND1A</i> Locus 9q33.3	GG	7(17,5)	0	REF	REF	REF
	AA	2(5,0)	4(15,38)	27,01 ¹	0,827 ¹	882,495 ¹
	AG	31(77,5)	22(84,62)	10,716 ²	0,478 ²	240,016 ²
rs2349415 gene <i>FSHR</i> Locus 2p16.3	TT	3(7,50)	3(11,54)	REF	REF	REF
	CC	21(52,50)	10(38,46)	0,489 ¹	0,083 ¹	2,86 ¹
	CT	16(40,00)	13(50,00)	0,818 ²	0,141 ²	4,756 ²
rs2268361 gene <i>FSHR</i> Locus 2p16.3	TT	15(37,5)	9(34,62)	REF	REF	REF
	CC	4(10,0)	5(19,23)	1,994 ¹	0,423 ¹	9,398 ¹
	CT	21(52,5)	12(46,15)	0,949 ²	0,320 ²	2,811 ²
rs1894116 gene <i>YAP1</i> Locus 11q22.1	GG	2(5,00)	0(0,00)	REF	REF	REF
	AA	32(80,00)	21(80,77)	3,306 ¹	0,077 ¹	141,771 ¹
	AG	6(15,00)	5(19,23)	4,228 ²	0,085 ²	209,447 ²
rs705702 gene <i>RAB5B/SUOX</i> Locus 12q13.2	GG	6(15,0)	3(11,54)	REF	REF	REF
	AA	24(60,0)	15(57,6)	1,175 ¹	0,259 ¹	5,339 ¹
	AG	10(25,0)	8(30,77)	1,504 ²	0,287 ²	7,871 ²
rs4385527 <i>C9ORF3</i> Locus 9q22.32	GG	20(50,0)	12(46,15)	REF	REF	REF
	AA	3(7,5)	2(7,69)	1,171 ¹	0,172 ¹	7,958 ¹
	AG	17(42,5)	12(46,15)	1,171 ²	0,419 ²	3,272 ²
rs6022786 <i>SUMO1P1/ZNF217</i> Locus 20q13.2	GG	17(42,50)	3(11,54)	REF	REF	REF
	AA	5(12,50)	6(23,08)	5,909 ¹	1,112 ¹	31,395 ¹
	AG	18(45,00)	17(65,38)	4,73 ²	1,226 ²	18,243 ²

As frequências genotípicas são reportadas em número absoluto e percentual.

AIG: adequado para idade gestacional; PIG: pequeno para idade gestacional; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior; REF: genótipo de referência

¹ Valores referentes a comparação AA vs. GG.

² Valores referentes a comparação AG vs. GG.

As frequências genotípicas dos polimorfismos genéticos associados a SOP nos genes *LHCGR* (rs13405728), *THADA* (rs12468394), *DENND1A* (rs10818854), *FSHR* (rs2349415, rs2268361), *YAP1* (rs1894116), *RAB5B* e *SUOX* (rs705702), *C9ORF3* (rs4385527) e *SUMO1P1/ZNF217* (rs6022786) não foram diferentes estatisticamente nos grupos SOP e não-SOP (Tabela 8).

Tabela 8- Frequência genotípica dos polimorfismos nos grupos SOP e não-SOP

	Genótipo	Não-SOP (n=50)	SOP (n=16)	OR	IC 95% LI	IC 95% LS
rs13405728 Gene <i>LHCGR</i> Locus 2p16.3	GG	1 (2,0)	1(6,25)	REF	REF	REF
	AA	42(84,0)	13(81,25)	0,318 ¹	0,019 ¹	5,434 ¹
	AG	7(14,0)	2(12,5)	0,333 ²	0,014 ²	7,821 ²
rs12468394 gene <i>THADA</i> Locus 2p22	CC	11(22,0)	5(31,25)	REF	REF	REF
	AA	13(26,0)	2(12,5)	0,387 ¹	0,068 ¹	2,213 ¹
	AC	26(52,0)	9(56,25)	0,749 ²	0,206 ²	2,720 ²
rs10818854 gene <i>DENND1A</i> Locus 9q33.3	GG	6(12,0)	1(6,25)	REF	REF	REF
	AA	3(6,0)	3(18,75)	4,333 ¹	0,362 ¹	51,876 ¹
	AG	41(82,0)	12(75,0)	1,305 ²	0,176 ²	9,668 ²
rs2349415 gene <i>FSHR</i> Locus 2p16.3	TT	6(12,0)	0	REF	REF	REF
	CC	21(42,0)	10(62,5)	6,346 ¹	0,26 ¹	154,953 ¹
	CT	23(46,0)	6(37,5)	3,594 ²	0,142 ²	90,791 ²
rs2268361 gene <i>FSHR</i> Locus 2p16.3	TT	17(34,0)	7(43,75)	REF	REF	REF
	CC	6(12,0)	3(18,75)	1,256 ¹	0,248 ¹	6,375 ¹
	CT	27(54,0)	6(37,5)	0,552 ²	0,161 ²	1,888 ²
rs1894116 gene <i>YAP1</i> Locus 11q22.1	GG	2(4,0)	0	REF	REF	REF
	AA	40(80,0)	13(81,25)	1,668 ¹	0,038 ¹	72,438 ¹
	AG	8(16,0)	3(18,75)	2,060 ²	0,040 ²	105,965 ²
rs705702 gene <i>RAB5B/SUOX</i> Locus 12q13.2	GG	8(16,0)	1(6,25)	REF	REF	REF
	AA	30(60,0)	9(56,25)	1,765 ¹	0,245 ¹	12,692 ¹
	AG	12(24,0)	6(37,5)	2,947 ²	0,371 ²	23,416 ²
rs4385527 <i>C9ORF3</i> Locus 9q22.32	GG	23(46,0)	9(56,25)	REF	REF	REF
	AA	4(8,0)	1(6,25)	0,824 ¹	0,095 ¹	7,178 ¹
	AG	23(46,0)	6(37,5)	0,684 ²	0,213 ²	2,202 ²
rs6022786 <i>SUMO1P1/ZNF217</i> Locus 20q13.2	GG	16(32,0)	4(25,0)	REF	REF	REF
	AA	9(18,0)	2(12,5)	0,965 ¹	0,159 ¹	5,867 ¹
	AG	25(50,0)	10(62,5)	1,51 ²	0,414 ²	5,502 ²

As frequências genotípicas são reportadas em número absoluto e percentual.

SOP: síndrome dos ovários policísticos; não-SOP: ausência de SOP; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior; REF: genótipo de referência

¹ Valores referentes a comparação AA vs. GG.

² Valores referentes a comparação AG vs. GG.

Análise de regressão logística mostrou que resistência insulínica foi associada à SOP quando comparado a ausência do distúrbio (OR: 1.41, IC 95%: 1,07 - 1,86). Nesta análise, SOP foi variável dependente e os nove polimorfismos genéticos, nascimento PIG, LTL, HOMA-IR e IMC foram fatores de variação (Tabela 9).

Tabela 9- Análise de regressão logística para fatores relacionados à SOP

Variável	OR	IC 95% LI	IC 95% LS
HOMA-IR	1.41	1,07	1,86

OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior;
HOMA-IR: Índice de resistência insulínica; SOP: síndrome dos ovários policísticos.

Análise de regressão logística, em que nascimento PIG foi variável dependente e os nove polimorfismos genéticos e LTL foram fatores de variação, mostrou que os genótipos AG e AA para o polimorfismo rs6022786 (localizado entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) estiveram associados ao nascimento PIG quando comparados ao genótipo GG para o mesmo polimorfismo (Tabela 10). Na figura 5 foram demonstrados os resultados da genotipagem do SNP rs6022786 (*SUMO1P1/ZNF217*) na Figura 5.

Tabela 10- Análise de regressão logística para fatores relacionados à PIG

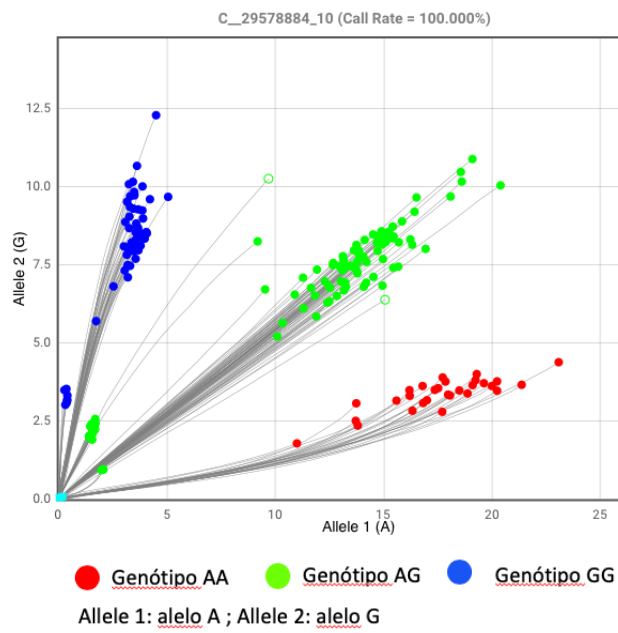
Variável		OR	IC 95% LI	IC 95% LS
Gene <i>SUMO1P1/ ZNF217</i>	rs6022786	AA vs GG	6.799	37.487
		AG vs GG	5.351	21.587

OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior;

PIG: pequeno para idade gestacional;

*variável atingiu significância estatística

Figura 5- Resultados apresentados pelo software *TLDA SNP Genotyping Analyses (Applied Biosystems)*



6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que os genótipos AG e AA para o SNP rs6022786 (localizado entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) estiveram associados ao nascimento PIG quando comparados ao genótipo GG para o mesmo SNP na coorte de nascimento de Ribeirão Preto (1978-1979). Por outro lado, nascimento PIG não esteve associado a comprimento telomérico mais curto na terceira década de vida em mulheres da presente coorte. Além disto, os SNPs avaliados no presente estudo não foram mais frequentes em mulheres com SOP.

Estudos sobre a avaliação dos SNPs relacionados a SOP em mulheres nascidas PIG não foram realizados anteriormente. Estudos prévios dos SNPs na SOP foram, em sua maioria, multicêntricos, transversais, utilizaram critérios diagnóstico diferentes, incluíram mulheres em diferentes fases da vida e com prevalência heterogênea de comorbidades associadas a SOP. Além disto, não levaram em consideração outros fatores etiopatogênicos do distúrbio como peso ao nascer e fatores ambientais (MELO et al., 2015). No presente estudo foi avaliado prospectivamente dois aspectos da etiopatogenia da SOP: os fatores genéticos e o nascimento PIG em mulheres da mesma faixa etária, expostas a hábitos culturais e sociais semelhantes. Estas características dos estudos de coorte representam uma vantagem importante no estudo da história natural da SOP.

Este estudo encontrou associação, não estudada previamente, entre o SNP rs6022786 (região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) e nascimento PIG. Embora este SNP tenha sido associado com SOP em estudo caso-controle e GWAS que incluiu população han-chinesa (SHI et al., 2012), estes autores não consideraram outros aspectos etiopatogênicos da SOP. Por outro lado, em populações coreana e com ancestralidade europeia não foi observada maior frequência do SNP rs6022786 em mulheres com SOP. Esta heterogeneidade nos resultados pode dever-se às diferentes etnias e à inclusão de mulheres em diferentes idades.

Como mulheres nascidas PIG apresentam risco duas vezes maior de desenvolver SOP na terceira década de vida (MELO et al., 2010), é possível que o nascimento PIG e a presença de SOP sejam expressões fenotípicas de predisposição genética semelhante. Apesar de ainda não ter sido confirmada, associação recente entre rs6022786/gene *SUMO1P1* e vias envolvidas no desenvolvimento embrionário e na biossíntese de lipídeos (PAU et al., 2017) pode ser o *link* entre nascimento PIG e SOP, respectivamente. Este SNP pode ser o responsável por distúrbios do desenvolvimento embrionário que culminem com nascimento PIG. Este

mesmo SNP, envolvido com a biossíntese de lipídeos, pode predispor a SOP, uma vez que a resistência insulínica e a obesidade estão intrinsicamente ligadas ao tecido adiposo e são características associadas a SOP.

Com relação aos demais SNPs avaliados, não houve associação com PIG. Já a ausência de associação dos SNPs estudados com SOP, pode dever-se às diferenças étnicas entre os participantes dos estudos anteriores e a população brasileira. Neste sentido, observa-se que os genes associados a SOP na população han-chinesa (*LHCGR*, *FSHR*, *INSR*, *HMGA2*, região entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) (CHEN et al., 2011; SHI et al., 2012) divergiram dos genes identificados em populações com ancestralidade europeia (*FSHB*, *ERBB4*, *RAD50*, *KRR1*, *PLGRK*, *ZBTB16*, *MAPRE1* e região entre os genes *GATA4* e *NEIL2*) (HAYES et al., 2015; DAY et al., 2015; DAY et al., 2018) e coreana (gene *KHDRBS3*) (LEE et al., 2015). Com relação aos SNPs, apesar da identificação de alguns genes semelhantes em populações han-chinesa e com ancestralidade europeia (*THADA*, *DENND1A*, *YAP1*, *TOX3* e as regiões dos genes *RAB5B* e *C9orf3*) (CHEN et al., 2011; SHI et al., 2012; GOODARZI et al., 2012; HAYES et al., 2015; DAY et al., 2015; DAY et al., 2018), os SNPs identificados dentro de cada gene também divergem nestas populações.

Além disto, uma metanálise recente mostra que a divergência entre os critérios diagnósticos usados, frequentemente citada como fonte de heterogeneidade nos resultados do estudo genético da SOP, não teria tanta influência no *background* genético do distúrbio (DAY et al., 2018). Esta metanálise evidenciou que o *background* genético seria, em geral, o mesmo, independente do critério diagnóstico utilizado [Consenso de Rotterdam, National Institute of Health (NIH) autorrelato de SOP (ZAWADSKI; DUNAIF, 1992; THE ROTTERDAM ESHRE/AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE - SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004)] (DAY et al., 2018). Isto pode significar que os resultados controversos no estudo genético da SOP estão ligados mais à etnia do que ao critério diagnóstico.

As mulheres portadoras de SOP nesta coorte apresentaram maiores índices de resistência insulínica, sinalizando que o grupo SOP está bem caracterizado no presente estudo. Este achado, no entanto, não foi devido à maior frequência dos SNPs relacionados ao diabetes melito avaliados neste estudo [rs705702 (região entre os genes *RAB5B* e *SUOX*) e rs12468394 (gene *THADA*)]. Por outro lado, outros estudos que detectaram relação causal entre SOP e resistência insulínica conseguiram identificar associação entre SOP e genes

relacionados ao DM (*THADA*, *RAB5B*) e à obesidade (*MAPRE1*) (DAY et al., 2015; DAY et al., 2018). Esta divergência pode ter ocorrido em função do pequeno tamanho amostral do presente estudo. A SOP é uma doença poligênica, em que cada gene contribui com pequena parcela da suscetibilidade genética (JONES; GOODARZI, 2016), sendo necessárias amostras maiores para comprovar associação.

Os estudos sobre comprimento telomérico em indivíduos na terceira década de vida que nasceram PIG e AIG têm resultados controversos. Alguns estudos não verificaram diferença em comprimento telomérico em nascidos PIG (KEJANTIE et al., 2012; MELO et al., 2017), sendo que Melo et al. (2017) incluiu apenas mulheres na terceira década de vida e Kejantie et al. (2012) incluiu indivíduos na terceira, sétima e oitava décadas de vida. Um outro estudo com homens na terceira década de vida verificou telômeros mais longos em nascidos PIG (LAGANOVIC et al., 2014). Como mulheres têm comprimento telomérico maior do que homens (GARDNER et al., 2014), esses resultados discrepantes podem dever-se ao sexo dos indivíduos incluídos nos estudos: ambos sexos (KEJANTIE et al., 2012), apenas sexo masculino (LAGANOVIC et al., 2014) ou apenas sexo feminino (MELO et al., 2017). Outra fonte de heterogeneidade é a inclusão de gestação gemelar, prematuros, RNs com muito baixo peso (KEJANTIE et al., 2012). Diferentemente de outros estudos (KEJANTIE et al., 2012; LAGANOVIC et al., 2014), os indivíduos incluídos nesta coorte nasceram de gestação a termo e apresentavam mesma faixa etária, características relacionadas a validade interna mais adequada. No presente estudo, mulheres nascidas PIG apresentaram comprimento telomérico semelhante as nascidas AIG na terceira década de vida. Talvez a ausência de diferença entre PIGs e AIGs seja secundário ao fato de que estas mulheres tenham sido avaliadas em período da vida precoce para se demonstrar diferenças no comprimento telomérico e o seguimento das mesmas em fases mais avançadas da vida poderá esclarecer as particularidades da dinâmica do telômero.

Análises em outras faixas etárias, como no período neonatal, também tiveram resultados variados. Um estudo mostrou não haver diferença no comprimento telomérico entre RNs PIG e AIG (AKKAD et al., 2006). Outro estudo evidenciou que RNs PIG têm comprimento telomérico maior que os nascidos GIG (TELLECHEA et al., 2015). Um terceiro estudo verificou o contrário, isto é, que RNs nascidos GIG têm telômeros mais longos que os nascidos AIG e estes, mais longos que os nascidos PIG (DE ZEGHER et al., 2016). Os estudos incluíram ambos sexos e foram estudos caso-controle. As diferenças podem ter ocorrido em

função da idade gestacional de nascimento, do critério usado para classificar indivíduos nascidos PIG e da presença ou não de comorbidades maternas, fetais ou neonatais.

A limitação deste estudo foi o tamanho amostral. A perda de seguimento foi o principal fator limitante na interpretação dos resultados. Apesar desta característica representar uma desvantagem dos estudos de coorte, o recrutamento das mulheres foi realizado em cinco fases de busca para minimizar a perda de participantes. A qualidade inadequada do material genético de algumas amostras também contribuiu para reduzir a inclusão de mulheres neste estudo. Apesar disto, foram incluídos diferentes aspectos da etiopatogenia da SOP em mulheres de mesma faixa etária e expostas a fatores ambientais, culturais e sociais semelhantes.

O presente estudo mostrou que o genótipo AG e o AA para o SNP rs6022786 (localizado entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) esteve associado ao nascimento PIG quando comparado ao genótipo GG. Além disto, mulheres portadoras de SOP não apresentaram maior frequência dos SNPs associados a SOP. Mulheres nascidas PIG também não apresentaram telômero mais curtos na terceira década de vida.

Pelo exposto, é provável que nascimento PIG ocorra em indivíduos geneticamente predispostos que foram expostos a fatores ambientais pré-natais. Além disto, nascimento PIG parece não influenciar o comprimento telomérico na terceira década de vida. Mais estudos são necessários com finalidade de replicar a associação encontrada em outras etnias e de entender quais vias fisiopatológicas podem relacionar o SNP rs6022786 (genes *SUMO1P1/ZNF217*) ao nascimento PIG e ao desenvolvimento da SOP. Desta forma, estratégias de prevenção secundária poderão ser traçadas com o intuito de minimizar riscos e reduzir custos assistenciais ao longo da vida.

7. CONCLUSÃO

Os genótipos AG e AA para o SNP rs6022786 (localizado entre os genes *SUMO1P1* e *ZNF217*) estiveram associados ao nascimento PIG quando comparados ao genótipo GG para o mesmo SNP na coorte de nascimento de Ribeirão Preto (1978-1979). Além disso, nascimento PIG não esteve associado a comprimento telomérico mais curto na terceira década de vida em mulheres da presente coorte. Os SNPs avaliados no presente estudo também não foram mais frequentes em mulheres com SOP. Além de estudos para replicar associação que foi encontrada, são necessários mais estudos longitudinais e regionais para a compreensão do fator genético na etiopatogenia da SOP.

8. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D.; BARNETT, D.; BRUNS, C.; DUMESIC, D. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? **Human reproduction update**, 11, n. 4, p. 357-374, 2005.
- ABBOTT, D. H.; DUMESIC, D. A.; FRANKS, S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. **Journal of Endocrinology**, 174, p. 1-5, 2002.
- AKKAD, A.; HASTINGS, R.; KONJE, J.; BELL, S. *et al.* Telomere length in small-for-gestational-age babies. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, 113, n. 3, p. 318-323, 2006.
- ALLSOPP, R. C.; VAZIRI, H.; PATTERSON, C.; GOLDSTEIN, S. *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, 89, n. 21, p.10114-10118, 1992.
- ANDERSON, S. A.; BARRY, J. A.; HARDIMAN, P. J. Risk of coronary heart disease and risk of stroke in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **International journal of cardiology**, 176, n. 2, p. 486-487, 2014.
- AVIV, A.. Telomeres and Human Aging: Facts and Fibs. **Science Of Aging Knowledge Environment**, 2004, n. 51, p.43-43, 2004.
- BARBIERI, M. A.; BETTIOL, H.; SILVA, A.; CARDOSO, V. *et al.* Health in early adulthood: the contribution of the 1978/79 Ribeirao Preto birth cohort. **Brazilian journal of medical and biological research**, 39, n. 8, p. 1041-1055, 2006.
- BATTAGLIA, F. C.; LUBCHENCO, L. O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. **The Journal of pediatrics**, 71, n. 2, p. 159-163, 1967.
- BROUILLETTE, S.; SINGH, R. K.; THOMPSON, J.R.; GOODALL, A. H. *et al.* White Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, 23, n. 5, p.842-846, 2003.
- CALADO, R. T.; BRUDNO, J.; MEHTA, P.; KOVACS, J. J. *et al.* Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. **Hepatology**, 53, n. 5, p. 1600-1607, 2011.
- CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic acids research**, 37, n. 3, p. e21-e21, 2009.
- CHEN, Z.-J.; ZHAO, H.; HE, L.; SHI, Y. *et al.* Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16. 3, 2p21 and 9q33. 3. **Nature genetics**, 43, n. 1, p. 55, 2011.
- COOPER, H. E.; SPELLACY, W.; PREM, K.; COHEN, W. Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. **American journal of obstetrics and gynecology**, 100, n. 3, p. 371-387, 1968.

COURJAL, F.; CUNY, M.; RODRIGUEZ, C.; LOUASON, G. *et al.* DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. **British journal of cancer**, 74, n. 12, p. 1984, 1996.

CRAIG, C. L.; MARSHALL, A. L.; SJÖSTRÖM, M.; BAUMAN, A. E. *et al.* International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Medicine & science in sports & exercise**, 35, n. 8, p. 1381-1395, 2003.

CUI, L.; ZHAO, H.; ZHANG, B.; QU, Z. *et al.* Genotype–phenotype correlations of PCOS susceptibility SNPs identified by GWAS in a large cohort of Han Chinese women. **Human reproduction**, 28, n. 2, p. 538-544, 2012.

CUSSENS, A. J.; STUCKEY, B. G.a.; WATTS, G. F.. Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: New insights and perspectives. **Atherosclerosis**, 185, n. 2, p.227-239, 2006.

DAY, F.; KARADERI, T.; JONES, M. R.; MEUN, C. *et al.* Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria. **PLoS genetics**, 14, n. 12, p. e1007813, 2018.

DAY, F. R.; HINDS, D. A.; TUNG, J. Y.; STOLK, L. *et al.* Causal mechanisms and balancing selection inferred from genetic associations with polycystic ovary syndrome. **Nature communications**, 6, p. 8464, 2015.

DE ZEGHER, F.; DÍAZ, M.; LOPEZ-BERMEJO, A.; IBANEZ, L. Recognition of a sequence: more growth before birth, longer telomeres at birth, more lean mass after birth. **Pediatric obesity**, 12, n. 4, p. 274-279, 2016.

DE ZEGHER, F.; IBÁÑEZ, L. Prenatal growth restraint followed by catch-up of weight: a hyperinsulinemic pathway to polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, 86, p. S4-S5, 2006.

ELTING, M.; KORSEN, T.; BEZEMER, P.; SCHOEMAKER, J. Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. **Human Reproduction**, 16, n. 3, p. 556-560, 2001.

ERIKSEN, M. B.; BRUSGAARD, K.; ANDERSEN, M.; TAN, Q. *et al.* Association of polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphism rs2479106 and PCOS in Caucasian patients with PCOS or hirsutism as referral diagnosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 163, n. 1, p. 39-42, 2012.

ESCOBAR-MORREALE, H. F.; LUQUE-RAMÍREZ, M.; SAN MILLÁN, J. L. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. **Endocrine reviews**, 26, n. 2, p. 251-282, 2005.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408, n. 6809, p.239-247, 2000.

GARDNER, M.; BANN, D.; WILEY, L.; COOPER, R. *et al.* Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. **Experimental gerontology**, 51, p. 15-27, 2014.

GOODARZI, M. O.; JONES, M. R.; LI, X.; CHUA, A. K. *et al.* Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. **Journal of medical genetics**, 49, n. 2, p. 90-95, 2012.

GOVIND, A.; OBHRAI, M.; CLAYTON, R. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84, n. 1, p. 38-43, 1999.

HAYES, M. G.; URBANEK, M.; EHRMANN, D. A.; ARMSTRONG, L. L. *et al.* Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. **Nature communications**, 6, p. 7502, 2015.

HWANG, J.-Y.; LEE, E.-J.; GO, M. J.; SUNG, Y.-A. *et al.* Genome-wide association study identifies GYS2 as a novel genetic factor for polycystic ovary syndrome through obesity-related condition. **Journal of human genetics**, 57, n. 10, p. 660, 2012.

IBÁÑEZ, L.; LOPEZ-BERMEJO, A.; SUÁREZ, L.; MARCOS, M. V. *et al.* Visceral adiposity without overweight in children born small for gestational age. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 93, n. 6, p. 2079-2083, 2008.

IBÁÑEZ, L.; POTAU, N.; FRANCOIS, I.; DE ZEGHER, F. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 83, n. 10, p. 3558-3562, 1998.

JAQUET, D.; DEGHMOUN, S.; CHEVENNE, D.; COLLIN, D. *et al.* Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. **Diabetologia**, 48, n. 5, p. 849-855, 2005.

Jl, S.-Y.; LIU, X.-M.; LI, B.-T.; ZHANG, Y.-L. *et al.* The polycystic ovary syndrome-associated gene Yap1 is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, 23, n. 10, p. 698-707, 2017.

JONES, M. R.; GOODARZI, M. O. Genetic determinants of polycystic ovary syndrome: progress and future directions. **Fertility and sterility**, 106, n. 1, p. 25-32, 2016.

KAJANTIE, E.; PIETILÄINEN, K. H.; WEHKALAMPI, K.; KANANEN, L. *et al.* No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life—evidence from three cohort studies. **International journal of epidemiology**, 41, n. 5, p. 1400-1408, 2012.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.-P.; PIPER, J.; TANNER, M. *et al.* Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91, n. 6, p. 2156-2160, 1994.

KARP, G. **Cell and molecular biology: concepts and experiments**. 5^a ed ed. New Jersey: John Wiley, 2008. 0470042175.

LAGANOVIC, M.; BENDIX, L.; RUBELJ, I.; KIRHMAJER, M. V. *et al.* Reduced telomere length is not associated with early signs of vascular aging in young men born after intrauterine growth restriction: a paradox? **Journal of hypertension**, 32, n. 8, p. 1613-1620, 2014.

LAUSTEN-THOMSEN, U.; OLSEN, M.; GREISEN, G.; SCHMIEGELOW, K. Inflammatory Markers in Umbilical Cord Blood from Small-For-Gestational-Age Newborns. **Fetal And Pediatric Pathology**, 33, n. 2, p.114-118, 2014.

LEE, H.; OH, J.-Y.; SUNG, Y.-A.; CHUNG, H. *et al.* Genome-wide association study identified new susceptibility loci for polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, 30, n. 3, p. 723-731, 2015.

LERCHBAUM, E.; TRUMMER, O.; GIULIANI, A.; GRUBER, H.-J. *et al.* Susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16. 3, 2p21, and 9q33. 3 in a cohort of Caucasian women. **Hormone and metabolic research**, 43, n. 11, p. 743-747, 2011.

LI, P.; MAINES-BANDIERA, S.; KUO, W. L.; GUAN, Y. *et al.* Multiple roles of the candidate oncogene ZNF217 in ovarian epithelial neoplastic progression. **International journal of cancer**, 120, n. 9, p. 1863-1873, 2007.

LI, Q.; DU, J.; FENG, R.; XU, Y. *et al.* A Possible New Mechanism in the Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Discovery That Leukocyte Telomere Length Is Strongly Associated With PCOS. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 99, n. 2, p.234-240, 2014.

LOUWERS, Y. V.; STOLK, L.; UITTERLINDEN, A. G.; LAVEN, J. S. Cross-ethnic meta-analysis of genetic variants for polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 98, n. 12, p. E2006-E2012, 2013.

MATTHEWS, D.; HOSKER, J.; RUDENSKI, A.; NAYLOR, B. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MELO, A.; VIEIRA, C.; BARBIERI, M.; ROSA-E-SILVA, A. *et al.* High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. **Human reproduction**, 25, n. 8, p. 2124-2131, 2010.

MELO, A. S.; BETTIOL, H.; DA SILVA, A. A. M.; ROSA-E, A. C. J. S. *et al.* Small for gestational age babies are not related to changes in markers of adipose tissue dysfunction during reproductive age. **Early human development**, 90, n. 5, p. 231-235, 2014.

MELO, A. S.; DIAS, S. V.; DE CARVALHO CAVALLI, R.; CARDOSO, V. C. *et al.* Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. **Reproduction**, 150, n. 1, p. R11-R24, 2015.

MELO, A. S.; DOS REIS, R. M.; CALADO, R. T.; DE CARVALHO CAVALLI, R. *et al.* The telomere attrition rate is not accelerated in women born small for gestational age: A birth cohort study. **Gene**, 600, p. 16-20, 2017.

MORAN, L. J.; MISSO, M. L.; WILD, R. A.; NORMAN, R. J. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, 16, n. 4, p. 347-363, 2010.

MUTHARASAN, P.; GALDONES, E.; PEÑALVER BERNABÉ, B.; GARCIA, O. A. *et al.* Evidence for chromosome 2p16. 3 polycystic ovary syndrome susceptibility locus in affected women of European ancestry. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 98, n. 1, p. E185-E190, 2013.

NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE - ILLUSTRATED GLOSSARY. Disponível em: <[https://illustrated-glossary.nejm.org/index.html?term=single-nucleotide polymorphism](https://illustrated-glossary.nejm.org/index.html?term=single-nucleotide%20polymorphism)>. Acesso em: 02 ago. 2019.

NONET, G. H.; STAMPFER, M. R.; CHIN, K.; GRAY, J. W. *et al.* The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. **Cancer research**, 61, n. 4, p. 1250-1254, 2001.

NORMAN, R. J.; DEWAILLY, D.; LEGRO, R. S.; HICKEY, T. E. Polycystic ovary syndrome. **The Lancet**, 370, n. 9588, p. 685-697, 2007.

PAU, C. T.; MOSBRUGER, T.; SAXENA, R.; WELT, C. K. Phenotype and tissue expression as a function of genetic risk in polycystic ovary syndrome. **PloS one**, 12, n. 1, p. e0168870, 2017.

PEDROSO, D. C.; MIRANDA-FURTADO, C.L.; KOGURE, G.S.; MEOLA, J. *et al.* Inflammatory biomarkers and telomere length in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility And Sterility**, 103, n. 2, p.542-547, 2015.

ROCHA, A. P. d.; MAGALHÃES, P. K. R.; MAIA, A. L. S.; MACIEL, L. M. Z. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism. São Paulo. Vol. 51, n. 5 (jul. 2007), p. 723-730, 2007.**

SADLER, T. W. **Langman: Embriología médica con orientación clínica**. 8. ed. ed. Madrid: Editorial Medica Panamerica, 2001. 9500613670.

SAMANI, N. J.; BOULTBY, R.; BUTLER, R.; THOMPSON, J. R. *et al.* Telomere shortening in atherosclerosis. **The Lancet**, 358, n. 9280, p.472-473, 2001.

SANTORO, A. Identificação de Single Nucleotide Polymorphisms no gene Nove-cisepoxicarotenóde dioxigenase (NCED) em Eucalyptus. **Dissertação (mestrado) –Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.**

SAXENA, R.; WELT, C. Polycystic ovary syndrome is not associated with genetic variants that mark risk of type 2 diabetes. **Acta diabetologica**, 50, n. 3, p. 451-457, 2013.

SHI, Y.; ZHAO, H.; SHI, Y.; CAO, Y. *et al.* Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. **Nature genetics**, 44, n. 9, p. 1020, 2012.

TaqMan Gene Expression Assays – TaqMan Array Cards -USER GUIDE. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4400263_TqMnGneExArryCd_UG.pdf> . Acesso em: 05 Jun. 2019.

TELLECHEA, M.; GIANOTTI, T. F.; ALVARIÑAS, J.; GONZÁLEZ, C. D. *et al.* Telomere length in the two extremes of abnormal fetal growth and the programming effect of maternal arterial hypertension. **Scientific reports**, 5, p. 7869, 2015.

THE ROTTERDAM ESHRE/AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE - SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2003, Rotterdam. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Human reproduction**, 19, n. 1, p. 41-47, 2004.

TIAN, J.-Y.; CHENG, Q.; SONG, X.-M.; LI, G. *et al.* Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults. **European journal of endocrinology**, 155, n. 4, p. 601-607, 2006.

TURNPENNY, P.; ELLARD, S. **Emery Genética Médica**. 13ª ed. Elsevier Brasil, 2009. 8535230866.

VENDRELL, J. A.; THOLLET, A.; NGUYEN, N. T.; GHAYAD, S. E. *et al.* ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial–mesenchymal transition and invasion. **Cancer research**, 72, n. 14, p. 3593-3606, 2012.

VINK, J.; SADRZADEH, S.; LAMBALK, C.; BOOMSMA, D. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 91, n. 6, p. 2100-2104, 2006.

WANG, C.; SHEN, F.; ZHU, Y.; FANG, Y. *et al.* Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Clinical Endocrinology**, 86, n. 4, p.552-559, 2016.

WATANABE, T.; IMOTO, I.; KATAHIRA, T.; HIRASAWA, A. *et al.* Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. **Japanese journal of cancer research**, 93, n. 10, p. 1114-1122, 2002.

WELT, C. K.; DURAN, J. M., 2014, **Genetics of polycystic ovary syndrome**. Thieme Medical Publishers. 177-182.

WELT, C. K.; STYRKARSDOTTIR, U.; EHRMANN, D. A.; THORLEIFSSON, G. *et al.* Variants in DENND1A are associated with polycystic ovary syndrome in women of European ancestry. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 97, n. 7, p. E1342-E1347, 2012.

ZHAI, J.; LIU, J.; CHENG, X.; LI, S. *et al.* Zinc finger gene 217 (ZNF217) Promoted Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) through Regulating E 2 Synthesis and Inhibiting Thrombospondin-1 (TSP-1). **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 3245, 2017.

ZAWADSKI, J.; DUNAIF, A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif AGJ, Haseltine F (eds). Polycystic Ovary Syndrome. **Boston: Blackwell Scientific** 1992; 377-84.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO

Estamos convidando a senhora, nascida em Ribeirão Preto durante o período de 31.05.1978 e 01.06.1979, para um estudo que vai avaliar a relação do seu peso ao nascer com a presença de Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) na vida adulta. A SOP é uma doença endócrina que se caracteriza por diversas manifestações clínicas, tais como: alteração na ovulação, excesso de pêlos no corpo, obesidade, irregularidade menstrual, acne (“espinhas”), dificuldade para engravidar, entre outras alterações.

Para a realização deste projeto será necessária a avaliação do seu peso, altura, cintura, pele e da pressão arterial. Vamos coletar uma amostra do seu sangue para dosagem de hormônios, avaliação genética, além de exames para verificar se você tem tendência a apresentar diabetes. Também será realizado um ultra-som pélvico (pela barriga ou vagina). Com isso, poderemos verificar se você tem o diagnóstico de SOP e os possíveis fatores relacionados a esta doença. Tudo isto não trará prejuízos ou danos a você, a não ser um leve desconforto causado pela picada da agulha na coleta de exames. Os resultados desta pesquisa serão divulgados e publicados em revistas científicas da área.

Não haverá custos financeiros para você e sua identidade não será revelada.

Ao assinar este termo, você estará concordando com a atualização de seus exames, além de contribuir para novas descobertas sobre a SOP e conseqüentemente ampliar as possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Estou de acordo com o exposto acima e concordo a me submeter ao estudo proposto. Para isso, assino abaixo:

Ribeirão Preto, __ de _____ de 2007/08.

Paciente: _____

Assinatura: _____

Dr^a Carolina Sales Vieira
Dr^o Anderson Sanches de Melo
Dr^a Ana Carolina Japur Sá Rosa e Silva
(pesquisadores responsáveis)
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (Setor de Reprodução Humana)
Rua Bandeirantes, 3000.
Tel.: 3602-2815 / 3602-2816

FONTE: MELO et al. (2010)