**Maria Cândida Pinheiro Baracat Rezende**

# Análise gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial em mulheres com síndrome dos ovários policísticos

**São Paulo**

**2018**

**Maria Cândida Pinheiro Baracat Rezende**

# Análise gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial em mulheres com síndrome dos ovários policísticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pós-Graduação em Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

**São Paulo**

**2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rezende, Maria Cândida Pinheiro Baracat
Análise gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial em mulheres com síndrome dos ovários policísticos / Maria Cândida Pinheiro Baracat Rezende. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: José Maria Soares Júnior.
Coorientador: Paulo Cesar Serafini.

Descritores: 1.Síndrome do ovário policístico 2.Infertilidade 3.Expressão gênica 4.Angiogênese 5.Endométrio 6.Implantação

USP/FM/DBD-452/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Dedicatória

Ao meu pai meu maior exemplo e minha inspiração.

E minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

**Agradecimentos**

Aos Profs. José Maria Soares Junior, Paulo Serafini, Manuel de Jesus Simões e Katia Carvalho, pela orientação, paciência e apoio para a realização da tese.

Aos amigos do LIM (Marinalva, Kelly, Natalia e Thiago) e do ambulatório da Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP (Dra Anne Pereira, Dr Walter Pinheira, Erika Mendonça, Ricardo Simões e as equipes administrativa e de enfermagem) pela grande ajuda na obtenção do material para a realização deste trabalho.

Agradeço a Disciplina de Ginecologia pela disponibilização do material necessário para as pesquisas técnicas.

**Sumário**


| | |
|---|---|
| Resumo | **I** |
| Abstract | **III** |
| Lista de abreviaturas | **V** |
| Lista de Tabelas | **X** |
| Lista de Figuras | **XII** |
| Introdução | **1** |
| Objetivos | **26** |
| Pacientes e Métodos | **28** |
| Resultados | **46** |
| Discussão | **72** |
| Conclusões | **83** |
| Referências Bibliográficas | **85** |
| Anexos | **98** |

## Resumo

Rezende MCPB. *Análise gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial em mulheres com síndrome dos ovários policísticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2018.

**Introdução:** A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a desordem endócrina mais comum em mulheres durante o período reprodutivo. Contudo, representa ainda um desafio, principalmente, quando há infertilidade. Portanto, há necessidade de mais estudos nesta área, em especial, no endométrio. Nosso estudo tem como objetivo realizar a análise da expressão gênica e proteica de marcadores de receptividade endometrial em pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos, comparando-a com a de mulheres com ciclos menstruais regulares. **Casuística e métodos:** Foram avaliadas 36 mulheres na menacme, divididas em dois grupos: Grupo SOP (n=23) e Grupo Controle - mulheres com ciclos menstruais regulares (n=13). As pacientes do grupo SOP receberam progesterona micronizada na dose de 400mg ao dia, por via vaginal, durante 10 dias. Após o 14º dia do fluxo menstrual, receberam novamente a mesma dose de progesterona natural, por 10 dias. A biópsia de endométrio foi feita durante os últimos dias do emprego da progesterona (6º ao 10º dia de tratamento). No Grupo Controle, a biópsia foi feita na fase secretora (janela de implantação - 20º ao 24º dia). Além disso, foi feita biópsia endometrial em um grupo de mulheres com SOP durante a fase proliferativa. O material coletado foi processado e analisado por técnicas de biologia molecular (avaliação gênica por *microarray*) e análise imunoistoquimica relacionada à angiogênese. **Resultados:** As mulheres com SOP apresentaram alterações do metabolismo de carboidratos, hiperinsulinemia e

hiperandrogenismo. Após o uso de progesterona natural, o endométrio revelou, na janela de implantação, modificações secretoras, assemelhando-se ao das mulheres com ciclos menstruais regulares. Os dados imunoistoquímicos mostraram haver redução da expressão do VEGF nas mulheres com SOP tratadas com progesterona natural em relação às com ciclo menstrual regular. Após a análise gênica, registrou-se predomínio de genes que podem interferir negativamente com a angiogênese no endométrio das pacientes com SOP tratadas com progesterona natural. **Conclusão:** O endométrio das mulheres com SOP, mesmo após tratamento com progesterona natural, mostra-se inadequado para a implantação endometrial devido à redução da angiogênese local.

**Descritores**: síndrome do ovário policístico; infertilidade; expressão gênica; angiogênese; endométrio; implantação.

**Abstract**

Rezende MCPB. *The gene and protein analysis of endometrial receptor markers in women with polycystic ovarian syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo"; 2018.

**Introduction:** The Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women during the reproductive period. However, it still presents a challenge, especially when there is infertility. Therefore, there is a need for further studies in this area, mainly in the endometrium. Our study aims to perform the analysis of gene and protein expression of endometrial receptors in patients with PCOS, comparing it with that of women with regular menstrual cycles. **Patients and methods:** Thirty-six women in the study were divided into two groups: PCOS group (n = 23) and Control Group - women with regular menstrual cycles (n = 13). Patients in the PCOS group received micronized progesterone at a dose of 400mg per day, vaginally, for 10 days. After the 14th day of menstrual flow, they again received the same dose of natural progesterone for 10 days. Endometrial biopsy was performed during the last days of the use of progesterone (6th to 10th day of treatment). In the Control Group, the biopsy was done in the secretory phase (implantation window - 20th to 24th day). In addition, endometrial biopsy was performed in a group of women with PCOS during the proliferative phase. The collected material was processed and analyzed by molecular biology techniques (microarray gene evaluation) and immunohistochemical analysis related to angiogenesis. **Results:** PCOS women had some changes in carbohydrate metabolism, hyperinsulinemia and hyperandrogenism. After the use of natural progesterone, the endometrium revealed, during the implantation window, secretory

modifications, resembling that of women with regular menstrual cycles. Immunohistochemical data showed reduced expression of VEGF in PCOS women treated with natural progesterone compared to those with a regular menstrual cycle. After gene analysis, there was a predominance of genes that could negatively interfere with the endometrial angiogenesis in patients with PCOS treated with natural progesterone. **Conclusion:** The endometrium of women with PCOS, even after treatment with natural progesterone, may be inadequate for endometrial implantation due to the reduction of local angiogenesis.

**Descriptors:** polycystic ovary syndrome; infertility; gene expression; angiogenesis; endometrium; implantation.

**Lista de abreviaturas**

| | |
|---|---|
| **17-OHP** | 17 hidroxiprogesterona |
| **AES - PCOS** | Sociedade de Excesso de Androgênios e Síndrome dos Ovários Policísticos |
| **AR** | Receptor de androgênio |
| **ASRM** | Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva |
| **B-hCG** | Gonadotrofina coriônica beta |
| **C** | Cortisol |
| **CA** | Circunferência abdominal |
| **$E_2$** | Estradiol |
| **ERA** | *Endometrial receptivity array* |
| **ESHRE** | Sociedade de Reprodução Humana e Embriologia |
| **FIV** | Fertilização *in vitro* |
| **FSH** | Hormônio folículo-estimulante |
| **HE** | Hematoxilina-ensina |
| **IGF** | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| **IGFBPS** | Proteínas de ligação de IGF |
| **IMC** | Índice de massa corpórea |
| **LH** | Hormônio luteinizante |
| **NIH** | National Institutes of Health |
| **PA** | Pressão arterial |
| **PRL** | Prolactina |
| **S-DHEA** | Sulfato de dehidroepiandroastenediona |
| **SHBG** | Globulina carreadora dos hormônios sexuais |
| **SOP** | Síndrome dos ovários policísticos |

| | |
|---|---|
| **$T_4$ livre** | Tretra-iodotironina livre |
| **TOTG** | Teste oral de tolerância a glicose |
| **TSH** | Hormônio tíreo-estimulante |
| **MXRA5** | Matrix-remodelling associated 5 |
| **IL1RN** | Interleukin 1 receptor antagonist |
| **TIMP3** | TIMP metallopeptidase inhibitor 3 |
| **MMP2** | Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) |
| **MMP9** | Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) |
| **COMP** | Cartilage oligomeric matrix protein |
| **MMP26** | Matrix metallopeptidase 26 |
| **POSTN** | Periostin, osteoblast specific factor |
| **OLFM4** | Olfactomedin 4 |
| **SLC2A6** | Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 |
| **IGFBP5** | Insulin-like growth factor binding protein 5 |
| **RARB** | Retinoic acid receptor, beta |
| **IGFBP1** | Insulin-like growth factor binding protein 1 |
| **COL6A2** | Collagen, type VI, alpha 2 |
| **CTHRC1** | Collagen triple helix repeat containing 1 |
| **COL1A1** | Collagen, type I, alpha 1 |
| **COL6A3** | Collagen, type VI, alpha 3 |
| **SFRP4** | Secreted frizzled-related protein 4 |
| **MCL1** | Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) |
| **CASP8** | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase |

| | |
|---|---|
| **WNT5A** | Wingless-type MMTV integration site family, member 5A |
| **MUC16** | Mucin 16, cell surface associated |
| **THBS2** | Thrombospondin 2 |
| **DPP4** | Dipeptidyl-peptidase 4 |
| **DUOX1** | Dual oxidase 1 |
| **PDGFRB** | Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide |
| **PLXNA3** | Plexin A3 |
| **EFNA1** | Ephrin-A1 |
| **LRP4** | Low density lipoprotein receptor-related protein 4 |
| **TGFBR3** | Transforming growth factor, beta receptor III |
| **CTNNA2** | Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2 |
| **HABP2** | Hyaluronan binding protein 2 |
| **IFNGR2** | Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1) |
| **PCNA** | Proliferating cell nuclear antigen |
| **ERRFI1** | ERBB receptor feedback inhibitor 1 |
| **LITAF** | Lipopolysaccharide-induced TNF factor |
| **CXCL14** | Chemokine (C-X-C motif) ligand 14 |
| **CFD** | Complement factor D (adipsin) |
| **KLRC1** | Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 |
| **PER2** | Period homolog 2 (Drosophila) |
| **CDK6** | Cyclin-dependent kinase 6 |
| **ERBB2** | V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) |
| **MTNR1A** | Melatonin receptor 1A |
| **CCNG1** | Cyclin G1 |

| | |
|---|---|
| **MTNR1B** | Melatonin receptor 1B |
| **ACTBL2** | Actin, beta-like 2 |
| **UBE2A** | Ubiquitin-conjugating enzyme E2A |
| **GADD45A** | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha |
| **FOXC2** | Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1) |
| **CENPE** | Centromere protein E, 312kDa |
| **CSRP2** | Cysteine and glycine-rich protein 2 |
| **KISS1R** | KISS1 receptor |
| **ESR1** | Estrogen receptor 1 |
| **ESR2** | Estrogen receptor 2 (ER beta) |
| **PRLR** | Prolactin receptor |
| **TSHR** | Thyroid stimulating hormone receptor |
| **GAST** | Gastrin |
| **PAEP** | Progestagen-associated endometrial protein |
| **CLOCK** | Clock homolog (mouse) |
| **NR4A2** | Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 |
| **LAMB3** | Laminin, beta 3 |
| **SLC1A1** | Solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1 |
| **SLC15A1** | Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1 |
| **TCN1** | Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family) |
| **SLC16A6** | Solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) |
| **PTGER2** | Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa |
| **HPGD** | Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) |

| | |
|---|---|
| **GAB1** | GRB2-associated binding protein 1 |
| **SORD** | Sorbitol dehydrogenase |
| **DHRS3** | Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 |
| **C4BPA** | Complement component 4 binding protein, alpha |
| **CLU** | Clusterin |
| **PENK** | Proenkephalin |
| **HLA-DOB** | Major histocompatibility complex, class II, DO beta |
| **S100P** | S100 calcium binding protein P |
| **CALB2** | Calbindin 2 |
| **CYP3A5** | Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 |
| **SERPING1** | Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1 |
| **CRISP3** | Cysteine-rich secretory protein 3 |
| **LIF** | Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) |
| **GPX3** | Glutathione peroxidase 3 (plasma) |
| **HOXA10** | Homeobox A10 |
| **HOXA11** | Homeobox A11 |
| **GAPDH** | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| **TFRC** | Transferrin receptor (p90, CD71) |
| **HPRT1** | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| **LDHA** | Lactate dehydrogenase A |
| **ACTB** | Actin, beta |

Lista de Tabelas


| | | |
|---|---|---|
| Tabela 1 | Critérios diagnósticos | **7** |
| Tabela 2 | Ontologia dos genes presentes no ERA | **17** |
| Tabela 3 | Ontologia dos genes selecionados para avaliar receptividade em pacientes com SOP | **41** |
| Tabela 4 | Ontologia dos genes selecionados para avaliar receptividade em pacientes com SOP | **42** |
| Tabela 5 | Dados demográficos e clínicos das participantes do estudo | **48** |
| Tabela 6 | Dados antropométricos, pressão arterial sistêmica, metabolismo glicêmico e lipídico | **50** |
| Tabela 7 | Dados de hirsutismo e hormonais | **52** |
| Tabela 8 | Espessuras dos epitélios superficial, glandular número de células e de vasos sanguíneos presentes no estroma endometrial de mulheres pertencentes com síndrome dos ovários policísticos tratadas na segunda fase do ciclo menstrual com progesterona natural. | **63** |
| Tabela 9 | Relação dos genes hiperexpressos do grupo SOP em relação ao controle | **68** |
| Tabela 10 | Relação dos genes hipoexpressos do grupo SOP em relação ao controle | **69** |
| Tabela 11 | Relação dos principais genes hiperexpressos com a angiogênese endometrial | **70** |
| Tabela 12 | Relação dos principais genes hipoexpressos com a angiogênese endometrial | **71** |

Lista de Figuras


| | | |
|---|---|---|
| Figura 1 | Imagem esquemática das etapas da implantação do embrião | **14** |
| Figura 2 | Fluxograma do estudo (Visita 1) | **33** |
| Figura 3 | Fluxograma do estudo (Visita 2) | **35** |
| Figura 4 | Fotomicrografia de endométrio de mulher na segunda fase do ciclo menstrual. | **54** |
| Figura 5 | Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policístico. | **55** |
| Figura 6 | Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policístico tratada com progesterona natural | **56** |
| Figura 7 | Fotomicrografia de endométrio de mulher comsíndrome dos ovários policísticos tratada com progesterona natural. | **57** |
| Figura 8 | Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policísticos tratada com progesterona natural. | **58** |
| Figura 9 | Fotomicrografia de endométrio de mulher com ciclo menstrual regular na segunda fase do ciclo. | **59** |
| Figura 10 | Fotomicrografia do epitélio superficial e da lâmina própria do endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos na segunda fase do ciclo menstrual com progesterona natural. | **60** |

| | | |
|---|---|---|
| Figura 11 | Fotomicrografia da lâmina própria do endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos na segunda fase do cicl menstrual com progesterona natural. | **61** |
| Figura 12 | Fotomicrografia da lâmina própria de endométrios de mulheres com síndrome dos ovários policísticos na segunda fase do cicl menstrual com progesterona natural. | **64** |
| Figura 13 | Fotomicrografia dos endométrios de mulheres com síndrome dos ovários policísticos na segunda fase do ciclo menstrual cor progesterona natural. | **65** |
| Figura 14 | Representação gráfica da dispersão dos dados na comparação entre os dois grupos, após a normalização da expressão de cada gene no *microarray.* | **67** |

# I – INTRODUÇÃO

Descrições de mulheres masculinizadas, barbudas e obesas, características relacionadas com a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), são encontradas em papiros de 1500 A.C. Possivelmente, esta seja o relato mais antigo sobre esta síndrome (citado por Szydlarska et al., 2017).

O relato de Stein e Leventhal é considerado um marco na Síndrome dos Ovários Policísticos. Contudo, a primeira descrição de ovários aumentados foi feita por Vallisneri, médico italiano, em 1721. Descreveu, nessa ocasião, caso de mulher casada e infértil, que tinha ovários com superfície brilhante e cistos do tamanho de ovos de pomba durante cirurgia.

Em 1844, Chereau e Rokitansky também observaram ovários fibrosos e com lesões escleróticas degenerativas. Sugeriram a existência de uma afecção ou doença no ovário.

A primeira associação de alterações clínicas aos ovários aumentados foi feita por Bulius e Kretschmar em 1871 (citado por Szydlarska et al., 2017).

Tait, em 1879, foi pioneiro na cirurgia de ooforectomia bilateral para o tratamento de algia pélvica e da degeneração cística e sintomática (hirsutismo) dos ovários. Posteriormente, em 1902, alguns cirurgiões começaram a fazer ressecção parcial dos ovários para a mesma finalidade. Contudo, várias complicações ocorreram e McGlinn, em 1915, sugeriu a realização da punção superficial dos cistos ao invés da ressecção ovariana em cunha (citado por Szydlarska et al., 2017).

Stein e Leventhal (1935) ficaram notórios ao descrever, em grupo de

sete mulheres, a síndrome composta por amenorreia, hirsutismo, obesidade e infertilidade, que estava associada ao seguinte quadro histomorfológico ovariano: aumento volumétrico da gônada com a presença de inúmeros pequenos folículos subcapsulares e espessamento da camada albugínea (Szydlarska et al., 2017). Sugeriram, ainda, que a falta de menstruação seria devido ao volume excessivo das gônadas e propuseram que a ressecção em cunha dos ovários poderia ser o tratamento, pois 90% delas voltaram a ter ciclos menstruais regulares e 2 delas engravidaram (Azziz et al., 2016). Este tratamento foi utilizado por muitos anos.

Em 1958, alguns investigadores verificaram que havia, nas pacientes com SOP, retrocontrole inadequado do eixo hipotalâmico-hipófisário-ovariano, o que trouxe novos entendimentos que a afecção decorreria de um distúrbio endócrino e não apenas de modificações histomorfométricas dos ovários (Szydlarska et al., 2017).

Em meados de 1961, o aumento dos níveis séricos de testosterona em pacientes com SOP foi confirmado (Dignam et al., 1964). Neste momento, os pesquisadores procuravam ferramentas ou marcadores para o diagnóstico da SOP sem a necessidade de radiografia ou laparotomia. Portanto, o achado de incremento da produção androgênica facilitou a identificação da mulher com SOP.

Na prática clínica, o grande progresso na investigação dessas pacientes foi o surgimento do exame ultrassonográfico do sistema reprodutivo (Szydlarska et al., 2017). Na ocasião, os benefícios deste método de investigação mostraram-se importantes, pois seria um método não invasivo, reprodutível e simples, preciso para avaliar os folículos e o estroma do ovário. Contudo, este exame deveria ser complementar aos dados clínicos.

Swanson et al. (1981) foram pioneiros em descrever, à ultrassonografia, a imagem estrutural dos ovários em mulheres com SOP. A tecnologia aprimorada e a utilização do ultrassom na medicina levou à utlização da imagem ao quadro clínico da SOP, pela definição da estrutura ovariana e principalmente, pelo grande número de folículos antrais pequenos. Contudo, este exame só foi considerado como critério de diagnóstico muito tempo mais tarde, no consenso de Rotterdam na Holanda, em 2003 (Azziz et al., 2006).

Outro marco na história da Síndrome dos Ovários Policísticos foi a possibilidade do tratamento hormonal com o lançamento contraceptivo chamado “Enovid”, que foi empregado também como regulador do fluxo menstrual (Christin-Maitre, 2013). Esta seria a grande transformação no tratamento, passando de tratamento cirúrgico que poderia ocasionar aderências tuboperitoneais e insuficiência ovariana prematura, para um tratamento eminentemente clínico. Apesar de todos os avanços, a SOP continua um desafio, principalmente, no campo da fertilidade. Mais recentemente, alguns investigadores consideram ser a SOP uma síndrome

reprodutiva metabólica, pois, haveria muitos casos com distúrbios de carboidratos, alterações no metabolismo de insulina e síndrome metabólica (Teede et al., 2018).

**Epidemiologia**

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a desordem endócrina mais comum em mulheres durante o período reprodutivo (Savaris et al., 2011). Estima-se afetar de 5% a 10% da população feminina nesta fase. Representa a causa mais frequente de infertilidade anovulatória, disfunção menstrual e hirsutismo (Qiao et al., 2008; King et al., 2010 Azziz, 2016; Teede et al, 2018). Dentre as mulheres com hiperandrogenismo atendidas no Ambulatório de Hiperandrogenismo da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as com SOP correspondem a aproximadamente 75%. Este dado mostra a importância desta afecção em Ginecologia.

**Diagnóstico**

A definição desta síndrome, mais comumente aceita, baseia-se na associação de anovulação crônica e/ou hiperandrogenismo, na ausência de outros distúrbios hipofisários ou da suprarrenal, como hiperprolactinemia, hipotireoidismo, acromegalia, síndrome de *Cushing* e deficiência enzimática da suprarrenal em sua forma não clássica ou tardia. O uso excessivo de anabolizantes também pode levar a um quadro clínico semelhante (Lopes et al., 2011; Azziz, 2016).

As características clínicas da SOP têm grande espectro e variação, o que torna seu diagnóstico difícil, necessitando auxílio de critérios baseados em consensos de especialistas (Azziz, 2018).

O primeiro foi promovido pelo *National Institutes of Health* (NIH, 1990), que definiu ser preciso a presença de hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e de poucos ciclos anuais, ou seja, menos que seis ciclos por ano ou até amenorreia (ausência da menstruação por mais de três ciclos consecutivos). Deve-se ainda afastar outras afecções: Síndrome de *Cushing*, Hiperprolactinemia, Deficiência enzimática da suprarrenal e Distúrbios da tireoide (Baracat e Soares Jr, 2007). Contudo, este consenso não era totalmente aceito, pois não incluía as imagens de ovários policísticos. Posteriormente, o consenso de Rotterdam, que foi realizado em 2003 pelas Sociedades de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), rediscutiu os critérios de diagnóstico e propôs: ciclos alongados (>60 dias, espaniomenorreicos) ou amenorreia. Ambos conotam anovulação crônica; sinais clínicos ou bioquímicos de hiperandrogenismo e; presença de ovários policísticos (identificados, em geral, pela ultrassonografia). Para o diagnóstico, a mulher deve ter pelo menos dois desses três critérios (Trivax e Azziz, 2007). Neste consenso, acrescentou-se como, um dos critérios, imagem de ovários policísticos, o que não existia antes.

Mais recentemente, os critérios diagnósticos foram revistos pela Sociedade de Excesso de Androgênio e Síndrome dos Ovários Policísticos

(AES - PCOS), que recomenda a presença obrigatória de hiperandrogenismo (hirsutismo e/ou hiperandrogenemia), que pode estar associado à disfunção ovariana clínica (anovulação crônica) e/ou por imagem (ovários policísticos). Salienta-se ainda a exclusão de outras causas de excesso de androgênios (Azziz et al., 2009; Guastella et al., 2010). Contudo, há ainda divergências sobre a necessidade de haver hiperandrogenismo, como critério de diagnóstico. Assim, o consenso de Rotterdam (2003) é o mais aceito e que adotamos em nosso estudo.

Tabela 1. Critérios diagnósticos

| Critérios | NIH 1990 | Rotterdam 2003 | AES 2006 |
|---|---|---|---|
| Diagnóstico | Todos os critérios | 2 de 3 critérios | Todos os critérios |
| | Anovulação | Anovulação | Disfunção ovariana: ciclos espaniomenorreicos ou ovários policísticos |
| | Sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo | Sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo | Sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo |
| | | Ovários policísticos ao ultrassom | |

Baseados nos critérios do Rotterdam (Azziz et al., 2009; Lizneva et al., 2016), podem ser identificados quatro fenótipos da SOP, a saber: tipo A – hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos; tipo B - hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários normais; tipo C - hiperandrogenismo, ciclos ovulatórios e ovários policísticos e tipo D – sem hiperandrogenismo e com anovulação crônica e ovários policísticos (Lizneva et

al., 2016). Estes fenótipos também dificultam a compressão e a caracterização desta afecção. Deve-se salientar que as mulheres com o fenótipo A (a sua forma clássica) representam a causa mais frequente de infertilidade anovulatória e seu tratamento constitui sério desafio ao clínico (Qiao et al., 2008). Por razão, escolhemos este grupo de mulheres com SOP.

**Etiopatogenia**

Prapas et al. (2009), em extensa revisão da literatura, referem haver fatores genéticos envolvidos na SOP. Encontraram alterações em genes relacionados com várias vias de transdução de sinal: esteroidogênese, ação dos hormônios esteroides, ação e regulação das gonadotrofinas, ação e secreção de insulina, homeostase tecidual e inflamação crônica, o que sugere ser a SOP uma doença muito complexa, envolvendo inúmeras variáveis.

Concha et al. (2017), em recente revisão na literatura sobre epigenetica e SOP, demonstrou diferenças de metilação em alguns genes das pacientes com SOP comparadas ao controle. Um estudo revelou que haveria 79 genes diferencialmente metilados entre as pacientes com SOP. Esses genes estão envolvidos na resposta inflamatória. O mesmo estudo mostrou que o gene CEBPB foi diferencialmente metilado entre pacientes com SOP com e sem resistência insulínica (RI), o que poderia sugerir que esse gene teria um papel importante no desenvolvimento da RI em mulheres com SOP. Outro estudo de varredura completa do genoma em um nível tecidual específico indicou que há pelo menos 3% de locais metilados diferencialmente e 650 transcritos diferentes

entre mulheres com SOP e controles, no tecido ovariano. Destes locais metilados diferencialmente, 59,8% são hipermetilados e 40,2% hipometilados em mulheres com SOP. Esses genes estão envolvidos em processos celulares basais, tais como: regulação da transcrição, morte celular, apoptose, proliferação celular e resposta ao estresse. A análise mostrou ainda que os genes metilados diferencialmente estão associados com várias vias celulares: a diabetes tipo 1, miocardite virais, a regulação do citoesqueleto de actina, a formação eixo dorsoventral, adesão focal, doença da tiroide autoimune, moléculas de adesão celular, apresentação e processamento de antígenos. Esses dados sugerem a existência de um padrão de metilação e expressão de diferentes genes entre mulheres com SOP e controles, o que provavelmente está envolvido no desenvolvimento e progressão da SOP.

Na mesma revisão da literatura de Concha et al. um estudo realizado em mulheres inférteis com SOP mostrou altos níveis de testosterona no soro e nos fluidos foliculares que estavam associadosalterações significativas no padrão de metilação de diferentes genes. O hiperandrogenismo induz alterações epigenéticas nos genes PPARG1, NCOR1 e HDAC3 das células da granulosa. Esses dados sugerem que esses genes provavelmente estão envolvidos na disfunção ovariana na SOP.

**Fisiopatogenia**

Não é tarefa fácil avaliar, em conjunto, todas as alterações de cada setor do eixo cortico-hipotalâmico-hipofisário-ovariano-uterino. Para facilitar a

compreensão da SOP, acredita-se que a pesquisa focalizada em determinada área do eixo, proporcione mais claramente informações sobre a fisiopatogenia desta afecção. O tecido alvo é o endométrio que é sensível à variação hormonal e é fundamental para a nidação e gestação. Portanto, de grande relevância na área de reprodução humana.

**Endométrio**

O endométrio é hormônio-dependente e seus componentes celulares e teciduais respondem às variações dos níveis sanguíneos de estrogênios e progesterona, durante os ciclos ovulatórios normais (Giudice, 2003).

O aumento dos níveis séricos de estradiol ($E_2$), devido ao crescimento dos folículos ovarianos, na primeira fase do ciclo menstrual, promove a proliferação e o crescimento das células endometriais. Com isso, o endométrio aumenta em espessura, passando de cerca de alguns milímetros no período pós-menstrual, para 10-12 mm na fase periovulatória (Giudice, 2003). O adequado crescimento desta fase será importante para transformação endometrial durante a maior ação da progesterona durante a segunda fase do ciclo.

Estudos recentes da expressão gênica no tecido endometrial mostraram que alguns genes presentes na fase proliferativa do ciclo menstrual são essencialmente relacionados à replicação do DNA, levando à proliferação e remodelação das células. Após a ovulação, com a produção de progesterona, o endométrio sofre uma série de modificações, incluindo a inibição da proliferação celular, da síntese do DNA e da atividade mitótica. Assim, há o início da

diferenciação celular, importante para preparação do endométrio para possível implantação embrionária (Lopes et al., 2011).

A ação da progesterona também está relacionada com a regulação do receptor de androgênio (AR) no epitélio e no estroma endometrial, principalmente sete a dez dias após a ovulação, quando o endométrio se torna mais receptivo à implantação embrionária, período este denominado de "janela de implantação". Este processo parece ser crítico para a interação materno-embrião (Slayden et al., 2001; Lopes et al., 2011).

**Janela de implantação**

Durante a janela de implantação, as células do estroma endometrial passam por um processo de decidualização (transformação) pela ação da progesterona, o qual se caracteriza por alterações no citoesqueleto com redução de actina no músculo liso e aumento da ação de prolactina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), proteínas de ligação IGF (IGFBPs), insulina, relaxina, entre outros. Este processo é essencial à interação materno-embrião e à invasão do trofoblasto, estabelecendo ainda ambiente do sistema imune local adequado, com redução de algumas citocinas pró-inflamatórias e aumento de imunomoduladores, reduzindo a rejeição ao embrião (Lopes et al., 2011).

Na ausência da implantação do embrião, ocorre queda dos níveis circulatórios de estradiol e progesterona que determinará mudanças endometriais, resultando no fluxo menstrual. Este processo inicia-se com alteração dos

imunomoduladores e reativação de genes relacionados com a imunidade endometrial, juntamente com a apoptose celular e o aumento da produção de metaloproteinases e prostaglandinas, bem como migração leucocitária. Há, como consequência, a descamação do tecido endometrial e a menstruação (Davidson et al., 2016). Contudo, distúrbios hormonais podem acometer este equilíbrio, causando disfunção menstrual, como ocorre na SOP.

A ação regulatória da progesterona está inadequada nas mulheres com SOP, o que determina na falha de oposição à ação proliferativa ao estrogênio no endométrio. Dessa forma, o tecido não sofre as transformações sequenciais na expressão gênica dos processos que são responsáveis pela proliferação endometrial normal, diferenciação e descamação regular. Além disso, alguns estudos demonstraram haver também alteração da qualidade dos ooócitos, levando a implantação inadequada e maiores taxas de abortamentos (Giudice et al., 2006; Piltonen et al., 2015).

O processo sequencial da implantação é necessário e cada passo acontece para assegurar o próximo, acarretando no sucesso da gestação. Há três estágios: aposição, adesão e invasão. Na fase de aposição, o embrião deixa a zona pelúcida sobrepondo-se ao endométrio e as células do trofoblasto se fixam de uma forma não estável à superfície do epitélio endometrial receptivo em humanos (Staun-ram e Shalev, 2005; Salamonsen, 2009; Margarit et al., 2010). Posteriormente, o blastocisto se adere de forma íntima no epitélio endometrial, na lâmina basal endometrial e na matriz extracelular estromal. Neste sentido, a interação entre o endométrio e o embrião é

suficientemente forte e resiste ao deslocamento pelo fluxo uterino, ou seja, as L-selectinas nas mucinas (MUC1) do epitélio superficial do endométrio expressam epítopos receptivos que auxiliam a fixação do blastocisto (Margarit et al., 2010). O primeiro sinal desse processo ocorre ao próximo do 21º do ciclo menstrual e coincide com incremento da permeabilidade vascular dependente da angiogênese no local da fixação do blastocisto. Em seguida, há a penetração do blastocisto, invadindo o estroma para estabelecer uma relação com a vascularização materna e, embora essa atividade seja principalmente controlada pelo trofoblasto, a decídua também limita a extensão da invasão (Figura 1) (Sharkey e Smith, 2003; Cakmak e Taylor, 2011; Salamonsen, 2009).

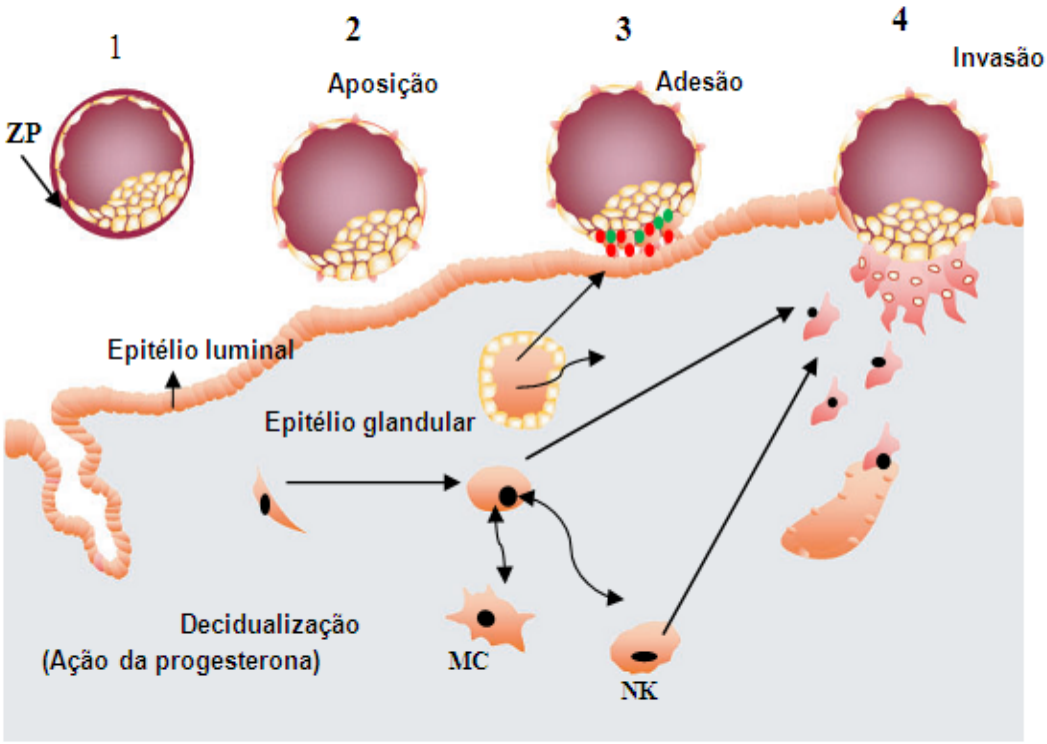



**Figura 1:** Imagem esquemática das etapas da implantação do embrião 1- Blastocisto livre na cavidade uterina, **ZP**-zona pelúcida; 2- Aposição gradual do blastocisto ao endométrio (integrinas em vermelho, selectinas em verde); 3- Adesão (as integrinas do trofoblasto, em vermelho, são necessárias nesta etapa; a adesão induz reações nas células trofoblásticas que se diferenciam em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto); 4- Invasão (Íntimo contato do trofoblasto com o estroma decidualizadodo. MC-macrófagos, NK- *natural killer*). (Adaptado de Salamonsen, 2009 e Lopes, 2011).

A indução de ovulação em mulheres com SOP não determina, necessariamente, à melhora da receptividade endometrial e invasão do embrião, sobretudo em programas de fertilização assistida. As usuárias de citrato de clomifeno podem ter resultados desapontadores, com baixas taxas

de gestação (Savaris et al., 2011). Esse fato também foi comprovado em mulheres submetidas à fertilização in vitro (FIV), cujas taxas de sucesso também foram baixas (aproximadamente 25%) (Li et al., 2014). Esses dados sugerem que a anovulação não é a única causa de infertilidade em mulheres com SOP (Lopes et al., 2011). Portanto, pode haver ainda outros fatores que influenciam a qualidade endometrial, independente da progesterona. Entre eles, acredita-se que a hiperinsulinemia, o hiperandrogenismo e os efeitos de alguns fatores de crescimento, como o IGF, podem impactar negativamente nas taxas de gestação (Giudice et al., 2006, Piltonen et al., 2015).

O processo de implantação ocorre de forma sequencial, em três estágios: aposição, adesão e invasão. Durante a fase de aposição, o blastocisto adere-se de forma intima ao epitélio e a lamina endometrial, como também à matriz extracelular estromal. A receptividade do endométrio depende da presença de ligantes de adesão, com menor proporção de fatores inibitórios, como integrinas, caderinas, selectinas e imunoglobulinas. Os dados da literatura mostram ser possível que o embrião expresse, em superfície, L-selectina, e o endométrio o seu receptor (Lopes et al., 2011). Tanto para a adesão, como para a invasão embrionária, a expressão dos genes HOX é essencial, por mediarem algumas funções que levam a apoptose do tecido e modulam as citocinas do processo inflamatório local (Lopes et al., 2011). Em cada sequência do processo de implantação, há a ativação e a inibição de genes específicos que podem funcionar como biomarcadores destes eventos (Ruiz et al., 2013). Portanto, a seleção de genes específicos neste processo é importante para entendimento da fisiopatogenia da SOP.

O endométrio de mulheres com SOP é considerado como modelo de endométrio disfuncional, onde ocorre a superexpressão de receptores androgênicos e falha em regular os receptores estrogênicos (REs), quando comparado ao de mulheres eumenorreicas (Gregory et al., 2002). Estudos realizados em pacientes com SOP demonstraram haver diferenças nos complementos dos receptores esteroídicos e coativadores em comparação a mulheres férteis. O endométrio, nesses casos, mostra superexpressão de receptores androgênicos e falha na regulação do RE-alfa (receptor estrogênico alfa) na janela de implantação (Apparao et al., 2002; Gregory et al., 2002). Contudo, há a necessidade de se ampliar as informações dos outros genes que são codificados ou suprimidos devido à anovulação crônica em mulheres com SOP.

Defeitos no receptor de insulina podem determinar aumento da mitogênese endometrial, o que pode contribuir para a proliferação excessiva e dificultar a decidualização (Lopes et al., 2011). A melatonina tenta diminuir a hiperinsulinemia e por isto, está aumentada em muitas mulheres com SOP (Song et al., 2015). Este hormônio tem ação antagonista ao estrogênio no endométrio e também pode influenciar na implantação (Song et al., 2016). O mecanismo primário de ação da melatonina ocorre pela inibição do AMP cíclico. Consequentemente, pode bloquear a ação dos genes c-myc e c-fos, que são estimulados pelo estrogênio e determinam proliferação tecidual excessiva (Molis et al., 1995). Portanto, ao que parece a melatonina deve ser importante para a regulação do crescimento tecidual, bem como na receptividade endometrial. Contudo, o excesso de melatonina pode diminuir a

expressão de seus receptores e ter consequências negativas para hemostasia endometrial, o que torna o seu estudo relevante em mulheres com SOP.

Para aquilatar o melhor dia de transferência embrionária durante a janela de implantação, em 2011, Díaz-Gimeno et al. utilizaram um painel gênico em mulheres inférteis. Esta técnica se baseia na análise de ensaio com 238 genes específicos e diferencialmente expressos no endométrio, denominado de ERA (*endometrial receptivity array*). A Tabela 2 resume os genes analisados. De acordo com Ruiz et al., esta técnica possibilitaria selecionar o momento mais propício para a implantação do embrião. Com isso, melhorariam as taxas de gestação. Além disso, é útil para analisar quais os genes ativados durante a janela de implantação.

Tabela 2 – Ontologia dos genes presentes no ERA*.

| Natureza do gene | Número de genes | Relação dos genes |
|---|---|---|
| Resposta Imune (GO: 0006955) | 26 | DPP4 OPRK1 C3 CRISP3 HLA-DOB C4BPA NR4A2 XCL2 LIF CXCL14 GZMA XCL1 CXCL13 KLRC1 IL15 INDO CD7 BCL6 SERPING1 CLU CTSW GBP2 PSMB10 DEFB1 CFD ARHGDIB |

| | | |
|---|---|---|
| Resposta ao estresse (GO: 0006950) | 27 | ADRA2A C3 PROS1 AOX1 C4BPA HPSE DUOX1 SOD2 FGB SCYE1 CXCL14 MAP2K6 RAD54B THBD CXCL13 BARD1 IDH1 ANG BCL6 GPX3 GADD45A SERPING1 CLU PPARGC1A PENK CFD CDC2 |
| Resposta de defesa (GO: 0006952) | 18 | C3 AOX1 CRISP3 C4BPA HPSE SCYE1 CXCL14 GNLY CXCL13 IL15 CD7 BCL6 SERPING1 CLU OFD1 DEFB1 PENK CFD |
| Circulação (GO: 0008015) | 8 | EDNRB FGB XCL2 CYP2J2 S100A1 SERPING1 EDN3 TH |
| Resposta a estímulos externos (GO: 0009605) | 18 | C4BPA HPSE FGB XCL2 SCYE1 CXCL14 THBD XCL1 CXCL13 BCL6 SERPING1 CLU PPARGC1A DEFB1 CFD C3 PROS1 AOX1 |
| Crescimento (GO: 0007610) | 11 | OPRK1 XCL2 SCYE1 CXCL14 XCL1 CXCL13 MAOA TRH TH DEFB1 PENK |

| | | |
|---|---|---|
| Ciclo celular (GO: 0007049) | 21 | HRASLS3 RASSF2 MAP2K6 RAD54B CCNB2 GAS1 PBK BARD1 G0S2 HPGD KIF11 PRC1 ASPM GADD45A IGF2 RPRM DLG7 CORO1A BUB1B CDC2 CDC20 |
| Adesão celular (GO: 0007155) | 18 | CRISP3 MUC16 HABP2 CTNNA2 CLDN10 EMCN BCL6 CLDN4 VCAM1 COBL COMP AMIGO2 THBS2 POSTN SPP1 LAMB3 COL16A1 ARHGDIB |
| Microarquitetura (GO: 0048856) | 39 | POSTN ID4 EVC OLFM1 SPP1 EDN3 LAMB3 TH CRABP2 NR4A2 NDRG2 DUOX1 EDNRB ALPL EFNA1 IGFBP1 CDA TAGLN LIF HAND2 ADAMTS1 PRKCQ CTNNA2 ENPEP CXCL13 DKK1 LRP4 ANG HEY2 IER3 IL15 EMCN BCL6 CSRP2 HEY1 COBL COMP IGF2 MSX1 |
| Resposta humoral imune (GO: 0006959) | 10 | C3 C4BPA NR4A2 XCL1 KLRC1 SERPING1 CLU PSMB10 DEFB1 CFD |

| | | |
|---|---|---|
| Sinalização celular (GO: 0007267) | 22 | OPRK1 SLC1A1 HSD11B2 NR4A2 GDF15 EFNA1 XCL2 SCYE1 LIF CXCL14 XCL1 ENPEP CXCL13 NRG2 MAOA TRH IL15 GABARAPL1 DLG7 EDN3 TH PENK |
| Resposta imune inata (GO: 0045087) | 7 | SERPING1 CLU DEFB1 CFD C3 CRISP3 C4BPA |
| Divisão celular mitótica (GO: 0000278) | 11 | DLG7 CORO1A BUB1B CDC2 CDC20 CCNB2 GAS1 PBK KIF11 PRC1 ASPM |
| Resposta a injuria (GO: 0009611) | 14 | C4BPA HPSE FGB SCYE1 CXCL14 THBD CXCL13 BCL6 SERPING1 CLU CFD C3 PROS1 AOX1 |
| Atividade da oxirredutase (GO: 0016491) | 21 | CBR3 SORD SOD2 IDH1 MAOA KMO CYP2J2 ACADSB INDO HSD11B2 LEPREL1 LAMB3 AOX1 TH CYBRD1 GPX3 HPGD DHRS3 CYP3A5 CP DUOX1 |

| | | |
|---|---|---|
| Metabolismo de carboidratos (GO: 0030246) | 11 | ADAMTS1 EMCN FAM59A THBD GALNT12 SERPINA5 HABP2 KLRC1 THBS2 ANG POSTN |
| Ligantes de receptores (GO: 0005102) | 23 | FGB EFNA1 XCL2 SCYE1 IGF2 ANG CXCL14 LIF TRH C3 ADAMTS1 EDN3 SPP1 PPARGC1A XCL1GABARAPL1 GDF15 CXCL13 GREM2 NRG2 PENK GAST DKK1 |
| Proteínas do fuso mitótico (GO: 0005819) | 7 | CDC2 CDC20 KIF11 PRC1 KIF4A DLG7 BUB1B |
| Proteínas relacionadas aos microtubulos (GO: 0005876) | 4 | CDC2 KIF11 PRC1 KIF4A |

*Modificado de Diaz-Gimeno et al. (2011)

Deve-se ressaltar que alguns dos genes avaliados no ERA não têm ainda função definida no endométrio ou correlação com a fisiopatogenia da SOP. Desse modo, pretendemos utilizar a expressão de alguns genes do ERA que estão relacionados com a SOP e incorporação aos genes conhecidos e influenciados pelas alterações hormonais e metabólicas relacionadas com a

SOP sob a ação da progesterona. Acreditamos que estes genes podem auxiliar no entendimento e na elaboração de novas estratégias na terapia das mulheres com SOP.

**Endométrio inadequado – falha de implantação**

A anovulação crônica parece não ser o único problema de infertilidade da mulher com SOP. De fato, os fármacos que induzem a ovulação, levam a taxas de 80% de sucesso, mas o índice de gestação de termo não corresponde a este número, ficando abaixo de 30% (Abdalmageed et al., 2018). Portanto, as pacientes estão mais predispostas à falha de interação materno-fetal e abortamento. Possivelmente, o endométrio esteja inadequado.

Simões et al. (2017) avaliaram a histomorfologia e a imunoistoquimica do endométrio de pacientes com SOP, comparando-as com as de pacientes com ciclos menstruais regulares durante a fase proliferativa. Observaram que as pacientes com SOP tiveram maior espessura dos epitélios superficial e glandular e maior concentração de leucócitos logo abaixo do epitélio superficial, juntamente com várias figuras de mitose, bem como poucos corpos apoptóticos, o que resulta em grande proliferação celular tanto no epitélio superficial como no glandular. Estes autores sugerem que esta estrutura endometrial pode dificultar a diferenciação endometrial, bem como aumentar o risco de hiperplasia. Contudo, não estudaram os efeitos da progesterona neste endométrio.

A concentração de glicosaminoglicanos sulfatados e de ácido hialuronico

foi menor no endométrio de pacientes com SOP no estudo de Simões *et al.* (2017). Outro achado foi a maior concentração de HAS1 e HAS2, enzimas relacionadas com a produção de ácido hialurônico de alto peso molecular, que pode prejudicar a implantação e a penetração embrionária. Esta ação seria inibida pelo estrogênio, mas é estimulada por fatores de crescimento, como o insulinóide (Sjaarda et al., 2017). Houve maior expressão de decorim e lumicam no endométrio das pacientes com SOP, fazendo com o estroma endometrial seja mais denso durante a fase proliferativa. Estas substâncias estão intimamente relacionadas com a regeneração da mucosa uterina, tanto nas células estromais como epiteliais. Este fato pode justificar a grande proliferação celular verificada à histomorfologia. Possivelmente, este tipo endometrial possa responder piora a progesterona.

As alterações estruturais do endométrio são importantes e podem justificar a menor taxa de implantações, mas o aporte sanguíneo também pode prejudicar a nutrição do embrião e a manutenção da gestação.

Em todos os tecidos, inclusive ovariano, é necessário fluxo sanguíneo adequado para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, para a remoção de CO2 e de outros subprodutos metabólicos e para a transferência de hormônios para as células-alvo (Berisha et al., 2015). Em adultos, o crescimento vascular se dá pela angiogênese, a qual se caracteriza pela proliferação e migração de células endoteliais a partir de vasos pré-existentes (Berisha et al., 2015).

No sistema genital feminino, a angiogênese ocorre como processo normal e crucial para o crescimento folicular, a função lútea e a adequação endometrial para a interação materno-embrionária (Duncan e Nio-Kobayashi,

2013). Por isso, os mecanismos genéticos e moleculares que controlam a angiogênese durante este processo estão sendo investigados (Duncan e Nio-Kobayashi, 2013).

No endométrio, cada fase específica do ciclo hormonal é acompanhada por grandes mudanças vasculares (Duncan e Nio-Kobayashi, 2013). Existem evidências de que a manutenção do leito vascular e a inadequação endometrial possam estar intimamente relacionadas com a produção hormonal e fatores de crescimento (Duncan e Nio-Kobayashi, 2013), sendo que a formação de uma rede vascular adequada é um fator limitante não só na seleção e na maturação do folículo dominante ovariano, mas também no preparo endometrial para o embrião (Fraser e Duncan, 2009).

Por ser o crescimento vascular um evento importante para a preparação endometrial para implantação embrionária, distúrbios da angiogênese estão envolvidos na gênese de vários distúrbios e posterior afecções durante a gestação (Berisha et al., 2015). Apesar de alguns investigadores sugerirem que o AMP cíclico participaria da sinalização celular e da angiogênese relacionadas aos hormônios, os mecanismos não estão totalmente esclarecidos no sistema reprodutor. Portanto, o seu conhecimento pode auxiliar na busca de novas terapêuticas para o tratamento da infertilidade feminina. Entre eles, há genes que podem estar alterados na SOP e que interferem com a ação do segundo mensageiro, AMP cíclico, das citocinas e dos fatores de crescimento (Berisha et al., 2015). Contudo, este processo é muito complexo, principalmente na SOP.

A endostatina e a angiostatina são descritos como os fatores

antiangiogênicos que regulam a vascularização (Berisha et al., 2015). No entanto, nos últimos anos, uma ampla variedade de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), as angiopoetinas e o fator de crescimento epidermal, dentre outros, são amplamente descritos e tem grande ação na angiogênese do sistema reprodutor feminino (Berisha et al., 2015). Embora os mecanismos de ação dos fatores pró-angiogênicos sejam mais conhecidos em comparação ao dos fatores anti-angiogênicos, esses mecanismos ainda não são totalmente conhecidos no endométrio de mulheres com SOP. Por esta razão, decidimos avaliar estes fatores conjuntamente com as alterações histomorfológicas e gênicas no endométrio de mulheres com SOP. Possivelmente, estas informações possibilitarão o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas na SOP, em especial as relacionadas à infertilidade.

# II. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

- Analisar a expressão gênica e proteica de marcadores de receptividade endometrial de pacientes com síndrome dos ovários policísticos, comparando-a com a de mulheres com ciclos menstruais regulares.

## 2.2 Objetivos específicos

Analisar os dados clínicos e bioquímicos (hormonais e metabólicos);

Avaliar os aspectos histomorfométricos;

Analisar os aspectos imunoistoquímicos relacionados à angiogênese;

Analisar a expressão gênica endometrial usando placa de *microarray* com 85 genes selecionados.

# III. PACIENTES E MÉTODOS

### 3.1. Tipo de estudo

O estudo foi do tipo prospectivo, aberto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (21253613.6.0000.0068) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 01 de abril de 2014 a 31 de abril de 2018.

### 3.2. Casuística

A população do estudo consistiu de 40 mulheres com idade variando de 18 a 35 anos, as quais foram divididas em dois grupos: 1) Grupo SOP (N=23) com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos de acordo com os critérios de Rotterdam – ESHRE/ASRM em 2003 (Azziz, 2006; Diamanti-Kandarakis e Dunaif, 2012) e o grupo controle (N=13), formado por mulheres saudáveis, com ciclos menstruais regulares. Todas foram atendidas no Setor de Ginecologia Endócrina da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC – FMUSP).

Todas foram submetidas à anamnese pormenorizada e exames físico geral e ginecológico. Foram também determinados os seguintes dados clínicos: o Índice de Massa Corpórea (IMC), a Circunferência Abdominal (CA) e a Circunferência do Quadril (CQ).

Realizaram-se nas pacientes com SOP, dosagens séricas de LH, FSH, prolactina, cortisol, estradiol, TSH, T4 livre, fração livre de testosterona e

testosterona total, androstenediona, sulfato de deidroepiandrosterona (S-DHEA), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), globulina carreadora dos hormônios sexuais (SHBG), insulina, glicemia, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com determinação de insulina e glicemia após 30 min, 60 min, 90 min, 120 min após a ingestão de 75g de glicose, e β-HCG. A ultrassonografia pélvica transvaginal também foi efetuada. Antes da inclusão no estudo, foram aplicados os critérios de elegibilidade.

### 3.3. Critérios de elegibilidade

#### 3.3.1. Critérios de inclusão

Grupo SOP - Pacientes com idade de 20 a 35 anos, sem uso de medicamentos hormonais nos últimos três meses, com diagnóstico clínico (Índice de Ferrimann≥8) e/ou laboratorial compatível com SOP.

Grupo Controle - Mulheres com idade de 20 a 35 anos e ciclos menstruais regulares sem comorbidades.

#### 3.2.2. Critérios não inclusão

1) Uso prévio de qualquer tratamento hormonal nos últimos 3 meses;

2) Outras causas de anovulação evidenciada por meio de dosagens anormais de prolactina, cortisol, S-DHEA, 17OHP, androstenediona, TSH e T4livre entre o 2º e o 5º dia do ciclo ou em qualquer época nas pacientes em

amenorreia;

3) Afecções ginecológicas ou outras associadas (endometriose, hipertensão ou diabete melito);

4) FSH > 15 UI/L (2º ao 5º dia do ciclo);

5) β-HCG positivo.

3.3.3. Algoritmo do estudo

As pacientes, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, elaborado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, foram incluídas no estudo e seguiram o seguinte fluxograma de visitas:

**Visita 1 (pré-seleção)** – Realização da história clínica e dos exames físico geral e ginecológico. Em seguida, o peso corporal foi aferido usando-se balança, marca Filizola®, modelo PL-150 com capacidade para 150 kg. A estatura foi medida com o uso de estadiômetro de metal acoplado na balança. Os valores de circunferência abdominal foram mensurados com o uso de fita métrica. A circunferência abdominal foi medida na menor região localizada entre o último arco costal e a crista ilíaca. O índice de massa corporal foi calculado dividindo-se a massa corporal (Kg) pela estatura ($m^2$). A pressão arterial (PA) foi aferida por esfigmomanômetro e realizada após a paciente permanecer dois minutos de repouso (sentada), tendo o braço direito apoiado na altura da região mamária. O início dos ruídos auscultatórios foi considerado

como PA sistólica e a extinção dos mesmos, como PA diastólica. O hirsutismo foi classificado de acordo com o índice proposto por Ferriman e Gallwey, em 1961. Pacientes com índice superior a oito foram consideradas hirsutas.

O ciclo menstrual foi considerado como normal quando o intervalo situou-se entre 21 e 35 dias, com fluxo de até 7 dias. Caracterizou-se como ciclo anovulatório (espaniomenorreia), quando o fluxo ocorria em intervalos superiores há 60 dias. A amenorreia foi definida como ausência de fluxo menstrual por um período de tempo correspondente ao dos três últimos ciclos prévios ou por 180 dias (Rodrigues de Lima et al., 1995; Murno, 2012).

Durante esta visita, foi orientado às participantes que mantivessem jejum nas 12 horas anteriores à coleta de sangue venoso para a determinação dos seguintes exames, realizados no Laboratório do Hospital das Clínicas: dosagens séricas de LH, FSH, prolactina, estradiol, TSH, T4 livre, testosterona total e fração livre, androstenediona, sulfato de deidroepiandrosterona (S-DHEA), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), globulina carreadora dos hormônios sexuais (SHBG), insulina, glicemia, teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e β-HCG. A ultrassonografia pélvica endovaginal foi efetuada em todas as pacientes (Figura 2).

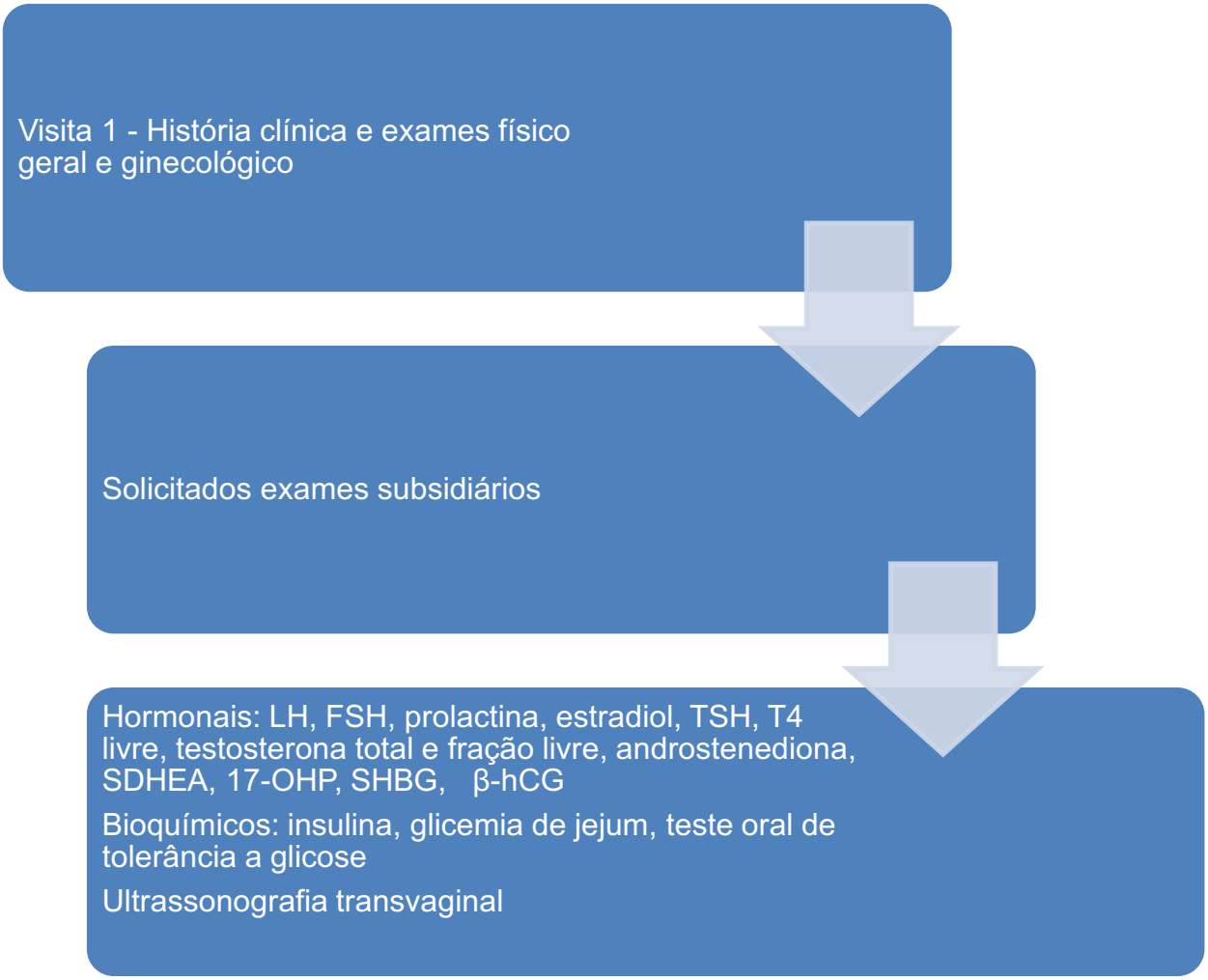



Figura 2 - Fluxograma do estudo (Visita 1)

**Visita 2**: Efetuou-se a análise dos exames complementares solicitados na "Visita 1", segundo os critérios de inclusão e exclusão. Realizaram-se biópsias de endométrio nos dois grupos foi feitas. As pacientes com SOP por apresentarem ciclos espaniomenorreicos ou amenorreicos, receberam por 10 dias progesterona micronizada na dose de 400 mg por via vaginal, e após catorze dias do sangramento, foram submetidas a novo ciclo de progesterona natural, na dose de 400mg/dia, por via vaginal, por 10 dias. Posteriormente,

efetuou-se a biópsia de endométrio entre o 20º e o 24º dia do ciclo. No grupo controle, a biópsia foi feita entre o 20º e o 24º dia (Figura 3). Foram coletadas biópsias de mulheres com SOP depois do 9º dia após o termino da progesterona natural. Este subgrupo constitui um controle da ação da progesterona.

Houve ainda biópsia de mulheres com SOP durante a fase proliferativa (n=10).

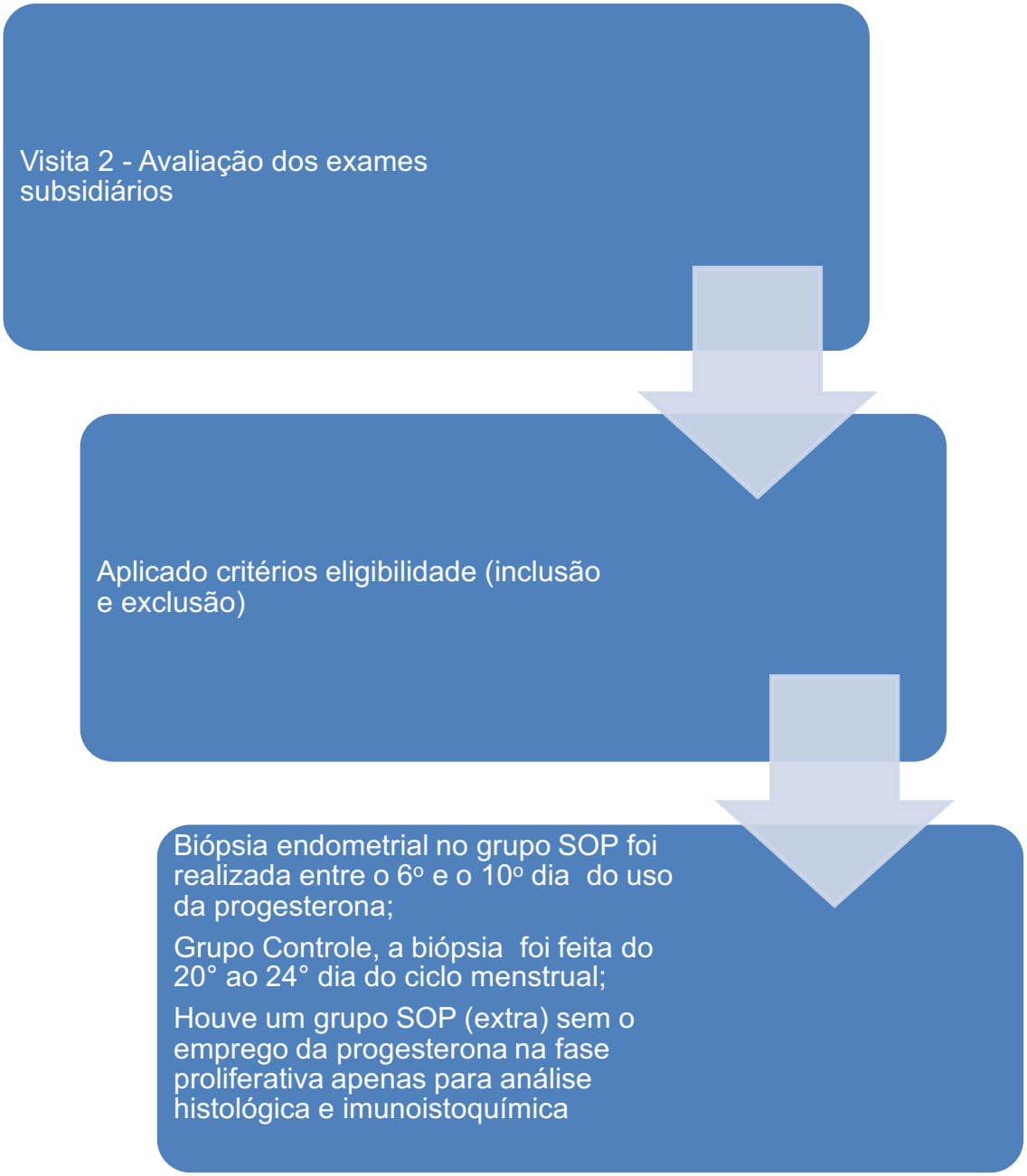



Figura 3 - Fluxograma do estudo (Visita 2)

### 3.4. Biópsia endometrial

Empregou-se cateter endometrial de Pipelle de Cornier (Cooper Surgical, Trumbull, CT, USA) para a retirada dos fragmentos endometriais. Parte do material foi incluído em parafina para estudos histomorfométricos e imunoistoquímicos e, a outra parte, conservada em RNA *later* para as análises moleculares.

Cada paciente recebeu um cadastro, onde seus dados clínicos e laboratoriais foram registrados.

### 3.5. Processamento histológico

Parte das amostras endometriais de cada paciente foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10%, por 24 horas, em temperatura ambiente. A seguir, foram desidratadas em concentrações graduadas de etanol (70Gl, 80GL, 90GL e 100 GL), diafanizadas em xilol, impregnadas pela parafina líquida, em estufa regulada à temperatura de 60°C por 48 horas e, em seguida, incluídas em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes de 4 µm de espessura em micrótomo do tipo Minot (Leica, RM Modelo 2145), os quais foram submetidos ao método de coloração pela Hematoxilina e Eosina (H.E.), visando à confirmação da fase do ciclo menstrual. Para tanto, foram utilizados os critérios propostos por Noyes e Haman (1953).

### 3.5.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

A Hematoxilina Eosina é a principal técnica de coloração de tecidos em histologia, que permite visualizar e distinguir os diversos componentes das células e da matriz extracelular ao microscópio óptico. A Hematoxilina tem caráter básico e cora em azul-púrpura o núcleo, a região do reticulo endoplasmático granuloso e a matriz extracelular da cartilagem por serem componentes que contêm muitos grupos ácidos. A Eosina é um corante ácido e tem afinidade por estruturas compostas de substâncias básicas, corando em rosa o citoplasma, as mitocôndrias e as fibras colágenas (Bancroft e Stevens, 1996).

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações crescentes de álcool e em água corrente. Em seguida, foram mergulhados em hematoxilina por 5 min, lavados em água destilada e tingidos com solução de eosina por 10 min. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (Entellan®) (Bancroft e Stevens, 1996).

As fotomicrografias dos cortes de ovário foram documentadas por um microscópio de luz (Axio Lab. A1, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxioCam ICc 5, Carl Zeiss) e, posteriormente, submetidas à análise histomorfométrica.

### 3.5.2. Imunoistoquímica para proliferação vascular (VEGF-C)

Para avaliação imunoistoquimica cortes, foram distendidos em banho-maria, coletados em lâminas silanizadas (Starfrost®) e após secagem por 6 a 8

horas em estufa a 60ºC os cortes foram destinados aos métodos descritos a seguir:

Os cortes de endométrio (4 µm de espessura) aderidos em lâminas silanizadas foram desparafinados e reidratados. Após lavagem em água destilada, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com $H_2O_2$, a 3% durante 20 min. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em panela de vapor, submersos em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) durante 60 min. Após esfriar, os cortes foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) 1x e adicionado albumina bovina (BSA) 4% sobre os cortes por 20 min para bloqueio dos sítios proteicos inespecíficos. O anticorpo específico (monoclonal de coelho anti VEGF-C; Santa Cruz, CA) foram diluídos em PBS 1x (1:200) e, então, as lâminas incubadas com os anticorpos primários por um período de 18 horas a 4℃ em câmara úmida. Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1x e incuba-dos com anticorpo secundário streptavidina-biotinada marcada (Dako, Dinamarca) durante 20 min. Após remoção do excesso de anticorpo com três banhos em PBS 1x, os cortes foram incubados com o sistema estreptavidina-peroxidase (Dako, Di-namarca) por 20 min, seguidos por três banhos em PBS 1x. Os sítios antigênicos foram revelados utilizou-se o substrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB) para desenvolvimento da cor acastanhada (Dako, Dinamarca). Retirado o DAB, as lâminas foram deixadas por 5 min em água corrente e então contrastadas com hematoxilina de Carazzi, desidratadas e montadas em meio permanente (Entellan®) (Leong et al., 2010).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Axio Lab. A1, Carl Zeiss), em objetiva de aumento 100X (imersão), acoplado a uma videocâmera de

alta resolução (AxioCam ICc 5, Carl Zeiss). As imunomarcações dos anticorpos VEGF-A e Ki-67 foram analisadas em três cortes por paciente, obtidos em intervalo mínimo de 80 µm entre cada corte. Em cada corte, foram obtidas dez imagens em campos aleatórios de 0,015 mm² e foi adotado como padrão de positividade o aparecimento de coloração marrom acastanhada no estroma endometrial (vasos sanguíneos). Então, foi quantificado o número de estruturas positivas nas dez imagens, nos três cortes, e uma média obtida para cada biopsia nos vários grupos experimentais. Em seguida, foi estimada a densidade numérica dos vasos sanguíneos por mm².

### 3.6. Análise da expressão de RNAs

Os RNAs obtidos a partir de cada amostra foram enviados ao Laboratório de Ginecologia Molecular e Estrutural LIM-58 da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para avaliação do perfil de expressão dos RNAs mensageiros. O RNA total de cada amostra foi isolado do tecido congelado (biopsia) através do método do TRIZOL (Invitrogrm, EUA) e posteriormente purificado em colunas de afinidade associado ao tratamento com DNAse1 (Qiagen), para eliminar possíveis contaminantes (proteínas e DNA genômico). A quantificação e a pureza do RNA extraído foram avaliadas em *bioanalizer* 2100 (Agilent, EUA).

O perfil de expressão dos RNAs foi feito pelo *microarray* utilizando a plataforma 8x15K (Agilent, EUA), que contem 85 genes relacionados com a

ação da progesterona, os mecanismos de implantação e outros relacionados com a Síndrome dos Ovários Policísticos. Assim, o “chip” foi constituído conforme os genes selecionados do estudo “ERA” (Diaz-Gimeno et al., 2011) e que tenham participação da fisiopatogenia da SOP (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Ontologia dos genes selecionados para avaliar a receptividade endometrial em pacientes com SOP.

| | |
|---|---|
| MXRA5 | Matrix-remodelling associated 5 |
| IL1RN | Interleukin 1 receptor antagonist |
| TIMP3 | TIMP metallopeptidase inhibitor 3 |
| MMP2 | Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) |
| MMP9 | Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) |
| COMP | Cartilage oligomeric matrix protein |
| MMP26 | Matrix metallopeptidase 26 |
| POSTN | Periostin, osteoblast specific factor |
| OLFM4 | Olfactomedin 4 |
| SLC2A6 | Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 |
| IGFBP5 | Insulin-like growth factor binding protein 5 |
| RARB | Retinoic acid receptor, beta |
| IGFBP1 | Insulin-like growth factor binding protein 1 |
| COL6A2 | Collagen, type VI, alpha 2 |
| CTHRC1 | Collagen triple helix repeat containing 1 |
| COL1A1 | Collagen, type I, alpha 1 |
| COL6A3 | Collagen, type VI, alpha 3 |
| SFRP4 | Secreted frizzled-related protein 4 |
| MCL1 | Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) |
| CASP8 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase |
| WNT5A | Wingless-type MMTV integration site family, member 5A |
| MUC16 | Mucin 16, cell surface associated |
| THBS2 | Thrombospondin 2 |
| DPP4 | Dipeptidyl-peptidase 4 |
| DUOX1 | Dual oxidase 1 |
| PDGFRB | Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide |
| PLXNA3 | Plexin A3 |
| EFNA1 | Ephrin-A1 |
| LRP4 | Low density lipoprotein receptor-related protein 4 |
| TGFBR3 | Transforming growth factor, beta receptor III |
| CTNNA2 | Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2 |
| HABP2 | Hyaluronan binding protein 2 |
| IFNGR2 | Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1) |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| ERRFI1 | ERBB receptor feedback inhibitor 1 |
| LITAF | Lipopolysaccharide-induced TNF factor |
| CXCL14 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 14 |
| CFD | Complement factor D (adipsin) |

Tabela 4 – Ontologia dos genes selecionados para avaliar a receptividade endometrial em pacientes com SOP

| | |
|---|---|
| KLRC1 | Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 |
| PER2 | Period homolog 2 (Drosophila) |
| CDK6 | Cyclin-dependent kinase 6 |
| ERBB2 | V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) |
| MTNR1A | Melatonin receptor 1ª |
| CCNG1 | Cyclin G1 |
| MTNR1B | Melatonin receptor 1B |
| ACTBL2 | Actin, beta-like 2 |
| UBE2A | Ubiquitin-conjugating enzyme E2A |
| GADD45A | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha |
| FOXC2 | Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1) |
| CENPE | Centromere protein E, 312kDa |
| CSRP2 | Cysteine and glycine-rich protein 2 |
| KISS1R | KISS1 receptor |
| ESR1 | Estrogen receptor 1 |
| ESR2 | Estrogen receptor 2 (ER beta) |
| PRLR | Prolactin receptor |
| TSHR | Thyroid stimulating hormone receptor |
| GAST | Gastrin |
| PAEP | Progestagen-associated endometrial protein |
| CLOCK | Clock homolog (mouse) |
| NR4A2 | Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 |
| LAMB3 | Laminin, beta 3 |
| SLC1A1 | Solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1 |
| SLC15A1 | Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1 |
| TCN1 | Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family) |
| SLC16A6 | Solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) |
| PTGER2 | Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa |
| HPGD | Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) |
| GAB1 | GRB2-associated binding protein 1 |
| SORD | Sorbitol dehydrogenase |
| DHRS3 | Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 |
| C4BPA | Complement component 4 binding protein, alpha |
| CLU | Clusterin |
| PENK | Proenkephalin |
| HLA-DOB | Major histocompatibility complex, class II, DO beta |
| S100P | S100 calcium binding protein P |
| CALB2 | Calbindin 2 |

| | |
|---|---|
| CYP3A5 | Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 |
| SERPING1 | Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1 |
| CRISP3 | Cysteine-rich secretory protein 3 |
| LIF | Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) |
| GPX3 | Glutathione peroxidase 3 (plasma) |
| HOXA10 | Homeobox A10 |
| HOXA11 | Homeobox A11 |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| TFRC | Transferrin receptor (p90, CD71) |
| HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| LDHA | Lactate dehydrogenase A |
| ACTB | Actin, beta |

## 3.7. Método Estatístico

### 3.7.1. Tamanho da amostra

O tamanho mínimo da amostra em cada grupo foi determinado a partir de estudo piloto contendo 10 mulheres por grupo. Como as variáveis de interesse são medidas em cada paciente em dois instantes diferentes, há dependência entre as observações. Dessa forma, foi considerada, no cálculo do tamanho da amostra, a correlação existente entre as medidas obtidas entre os grupos. Considerou-se para os resultados da análise proteica do VEGF, um erro tipo I de 5% e erro tipo II de 20% (poder da amostra de 0,8) para detectar diferença maior de 20% entre os dois grupos.

### 3.7.2. Análise descritiva

Os dados clínicos e demográficos conjuntamente com os dados experimentais foram agrupados em uma planilha do Excel. Foi analisada a distribuição dos dados. Conforme a homogeneidade, os dados quantitativos foram expressos em média ± desvio padrão.

### 3.7.3. Análise inferencial

De acordo com a distribuição dos dados, utilizou o teste “t” de Student ou o Teste “U” de Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em 95% ($\alpha \leq 5\%$). Além disso, foi aplicado o ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis na comparação histológica e imunoistoquímica, quando se incluiu o grupo extra

(SOP durante a fase proliferativa). Após isto, se aplicou o teste de Tukey ou Dunn, conforme a distribuição dos dados.

# IV. RESULTADOS

## 4.1. – Dados demográficos, clínicos e laboratoriais

Participaram no nosso estudo 34 mulheres. Na Tabela 5, estão resumidos os dados idade, menarca, etnia, estado civil, escolaridade, renda familiar, religião, ciclos menstruais por ano, duração do fluxo menstrual, número de gestações e número de partos. A média de idade dos participantes do Grupo SOP e do Grupo Controle foram, respectivamente, 28,3 ± 5,53 anos e 30,31 ± 5,09 (p=0,45). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à menarca, etnia, estado civil, escolaridade, renda familiar, religião, duração do fluxo menstrual e número de partos. Houve diferença significante com relação ao número de menstruações por ano e de gestações. As mulheres do Grupo SOP e do Grupo Controle tiveram, respectivamente, 3,26 ± 1,76 e 11,85 ± 0,38 ($p< 0.01$) menstruações por ano. O número de gestações foi maior no grupo controle (0,62 ± 0,65) do que no Grupo SOP (0,22 ± 0,52, p=0,03).

Tabela 5 – Dados demográficos e clínicos das participantes do estudo

| | Grupo SOP (n=23) | Grupo Controle (n=13) | p |
|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 28,39 ± 5,53 | 30,31 ± 5,09 | 0,30 |
| Menarca (anos) | 12,17 ± 1,70 | 12,01 ± 2,94 | 0,84 |
| Etnia (n,%) * | | | |
| Branca | 9 (39.13%) | 6 (46,15) | 0,68 |
| Afrodescente | 14 (60,87%) | 7 (53,85) | |
| Estado Civil (n,%) * | | | |
| Casada | 17 (73,91%) | 6 (46,15) | 0,21 |
| Solteira | 5 (21,74%) | 5 (38,46) | |
| Outros | 1 (4,35%) | 2 (15,39) | |
| Escolaridade (n,%) * | | | |
| Fundamental | 4 (17,39%) | 5 (38,46) | 0,32 |
| Segundo grau | 14 (60,87%) | 5 (38,46) | |
| Superior | 5 (21,73%) | 3 (23,08) | |
| Renda familiar (n,%) * | | | |
| < 2 salários | 15 (65,22%) | 9 (69,23) | 0,80 |
| >2 salários | 8 (34.78%) | 4 (30,77) | |
| Religião (n,%) * | | | |
| Católica | 5 (21,74%) | 4 (30,77) | 0,47 |
| Evangélica | 8 (34,78%) | 6 (46,15) | |
| Outras | 10 (43,48%) | 3 (23,08) | |
| Número de menstruações por ano | 3,26 ± 1,76 | 11,85 ± 0,38 | <0.01 |
| Duração do fluxo (dias) | 6,48 ± 3,58 | 5,23 ± 1,48 | 0,12 |
| Número de gestações | 0,22 ± 0,52 | 0,62 ± 0,65 | 0,03 |
| Número de partos | 0,18 ± 0,49 | 0,38 ± 0,51 | 0,18 |

*Aplicado o teste de chi-quadrado. O restante foi aplicado o teste “t” de Student.

Na Tabela 6, os dados antropométricos, pressão arterial sistêmica, metabolismo glicêmico e lipídico estão agrupados. Não encontramos diferenças significantes no Índice de Massa Corporea (IMC), na Circunferência Abdominal (CA) e na pressão arterial diastólica entre os grupos. Houve maior circunferência do quadril nas mulheres com SOP do que nas do grupo controle ($p<0.01$). Além disto, a pressão arterial sistêmica do grupo SOP foi significantemente maior do que as do grupo controle ($p=0,04$).

No metabolismo de carboidratos, observamos que o grupo SOP teve valores maiores do que o grupo controle nos seguintes parâmetros: hemoglobina glicada, glicemia após 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos, insulina de jejum, insulina após 60 minutos, 90 minutos e após 120 minutos. Não houve diferenças significantes nos parâmetros do metabolismo dos carboidratos entre os grupos; o mesmo ocorreu com o metabolismo lipídico (Tabela 5).

Tabela 6 – Dados antropométricos, pressão arterial sistêmica, metabolismo glicêmico e lipídico.

| | Grupo SOP (n=23) | Grupo Controle (n=11) | p |
|---|---|---|---|
| IMC (Kg/m$^2$) | 30,55 ± 5,53 | 30,32 ± 5,91 | 0,91 |
| Circunferência do Quadril (cm) | 117,91 ± 11,63 | 98,42 ± 15,55 | <0.01 |
| Circunferência Abdominal (cm) | 103,35 ± 12,65 | 99,33 ± 19,53 | 0,52 |
| PA sistêmica (mmHg) | 118,83 ± 15,27 | 109,15 ± 11,87 | 0,04 |
| PA diastólica (mmHg) | 74,10 ± 12,61 | 77,69 ± 27,88 | 0,68 |
| Metabolismo dos carboidratos | | | |
| Hemoglobina glicada | 5,80 ± 0,48 | 5,025 ± 0,54 | 0,02 |
| Glicemia de jejum (mg/dL) | 90,87 ± 17,33 | 86,58 ± 7,39 | 0,31 |
| Glicemia após 30 min (mg/dL) * | 133,09 ± 22,70 | 112,42 ± 22,54 | 0,017 |
| Glicemia após 60 min (mg/dL) * | 131,57 ± 38,57 | 102,92 ± 21,98 | 0,008 |
| Glicemia após 90 min (mg/dL) * | 129,39 ± 36,78 | 104,83 ± 23,76 | 0,02 |
| Glicemia após 120min (mg/dL) * | 121,22 ± 39,11 | 103,83 ± 22,12 | 0,10 |
| Insulina de jejum (mU/L) | 43,56 ± 48,29 | 16,62 ± 5,86 | 0,02 |
| Insulina após 30 min (mU/L)* | 172,82 ± 98,42 | 116,31 ± 89,72 | 0,13 |
| Insulina após 60 min (mU/L)* | 190,51± 109,10 | 82,91± 68,37 | 0,002 |
| Insulina após 90 min (mU/L)* | 185,82 ± 147,68 | 105,27 ± 59,79 | 0,005 |
| Insulina após 120 min (mU/L)* | 74,10 ± 12,61 | 101,45 ± 62,42 | 0,03 |
| Metabolismo dos Lipídeos | | | |
| Colesterol total (mg/dL) | 175,35 ± 35,89 | 184,92 ± 27,81 | 0,39 |
| HDL- colesterol (mg/dL) | 47,01 ± 17,71 | 56,33 ± 14,27 | 0,10 |
| LDL colesterol (mg/dL) | 109,43 ± 21,56 | 109,92 ± 30,84 | 0,96 |
| Triglicérides (mg/dL) | 140,52 ± 93,53 | 96,75 ±36,53 | 0,06 |

IMC = índice de massa corpórea; PA = pressão arterial; min = minutos; * valores após a sobrecarga glicêmica com 75g de glicose. Aplicado o teste “t” de Student.

A Tabela 7 resume os dados clínicos de hirsutismo pelo índice de Ferriman-Gallwey, bem como os resultados complementares das dosagens hormonais, como os índices de testosterona livre e biodisponível. As mulheres do grupo SOP tiveram aumento significante dos seguintes parâmetros em relação ao grupo controle: Índice Ferriman-Gallwey, testosterona total, fração livre da testosterona, % da fração livre de testosterona, testosterona biodisponível (ng/dL), % de testosterona biodisponível e androstenediona. Em relação ao SHBG (proteína ligadora aos esteróides sexuais), houve o inverso, ou seja, o grupo SOP teve valores menores (29,96 ± 14,15 nmol/L) do que as mulheres do grupo controle (70,63 ± 45,67 nmol/L, $p<0,01$).

Em relação aos hormônios gonadotróficos, as mulheres com SOP tiveram valores maiores e menores, respectivamente, de FSH e LH quando comparadas ao grupo controle ($p<0.01$). Não encontramos diferenças significantes para os seguintes hormônios entre os dois grupos: SDHEA, estradiol, 17-OH progesterona, prolactina, cortisol, TSH e T4 livre.

Tabela 7 – Dados de hirsutismo e hormonais nos dois grupos estudados

| | Grupo SOP (n=23) | Grupo Controle (n=11) | p |
|---|---|---|---|
| Índice Ferriman-Gallwey | 13,35 ± 5,93 | 4,69 ± 1,25 | <0,01 |
| SHBG (nmol/L) | 29,96 ± 14,15 | 70,63 ± 45,67 | <0,01 |
| Testosterona total (ng/dL) | 61,61 ± 30,05 | 28,46 ± 9,28 | <0,01 |
| Fração livre da testosterona (ng/dL) | 2,23 ± 1,06 | 0,57 ± 0,42 | <0,01 |
| % da fraca livre de testosterona | 3,83 ± 1,67 | 1,79 ± 0,82 | <0,01 |
| Testosterona biodisponível (ng/dL) | 7,24 ± 3,45 | 1,84 ± 1,36 | <0,01 |
| % de testosterona biodisponível | 12,45 ± 5,44 | 5,79 ± 2,65 | <0,01 |
| Androstenediona (ng/mL) | 1,81 ± 0,76 | 1,10 ± 0,41 | <0,01 |
| SDHEA (µg/L) | 1909,91 ± 1155,89 | 1475,38 ± 628,74 | 0,15 |
| FSH (mUI/mL) | 4,56 ± 1,59 | 5,73 ± 3,38 | <0,01 |
| LH (mUI/mL) | 10,19 ± 4,54 | 6,14 ± 1,27 | <0,01 |
| Estradiol (pmol/L) | 71,09 ± 46,79 | 58,51 ± 29,39 | 0,35 |
| 17-OHP (ng/dL) | 0,74 ± 0,46 | 1,62 ± 1,41 | 0,39 |
| Prolactina (ng/mL) | 16,01 ± 5,74 | 14,93 ± 4,92 | 0,58 |
| Cortisol (µg/dL) | 10,74 ± 4,74 | 8,39 ± 4,78 | 0,23 |
| TSH (mUI/L) | 4,65 ± 4,86 | 2,43 ± 0,66 | 0,06 |
| T4 livre (ng/dL) | 1,25 ± 0,24 | 1,22 ± 0,15 | 0,65 |

Aplicado o teste “t” de Student.

## 4.2 – Análise histomorfológica

A mucosa uterina das mulheres do grupo controle e pertencentes à segunda fase do ciclo menstrual mostrou endométrio revestido por epitélio cilíndrico simples contendo no polo apical pequenas projeções e na lâmina própria inúmeras glândulas tubulares tortuosas. Nota-se, ainda, que a lâmina própria apresenta células esparsas com inúmeros vasos sanguíneos (Figuras 3 e 4).

No grupo SOP, após o tratamento com progesterona natural (9º ao 12º dia), o endométrio apresentou basicamente as mesmas características das descritas na primeira fase do ciclo menstrual; no entanto, os epitélios superficial e glandular achavam-se mais espessados, e a lamina própria, localizada logo abaixo do epitélio superficial, rica em células e leucócitos. Notamos, ainda, intensa infiltração leucocitária no epitélio superficial, assim como algumas figuras de apoptose (Figuras 5 e 6). No grupo SOP, pela ação da progesterona, o epitélio superficial apresentou-se mais uniforme, com menor infiltração leucocitária, assim como ausência de figuras de apoptose. Na lâmina própria observamos a presença de inúmeros glândulas tubulares ramificadas, assim como grande concentração de células (Figuras 7 e 8). As imagens comparativas dos grupos estão representadas nas Figuras 9 e 10.

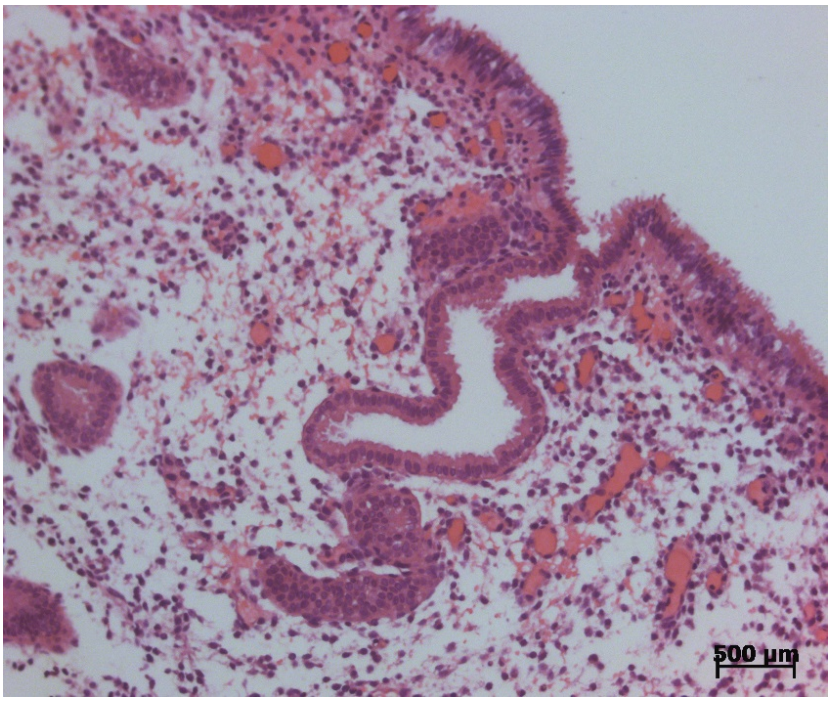



Figura 4 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com ciclo menstrual regular, na segunda fase do ciclo. Notar epitélio superficial do tipo prismático, glândulas endometriais tortuosas e lamina própria rica vasos sanguíneos e em substância intercelular. H.E. 200X

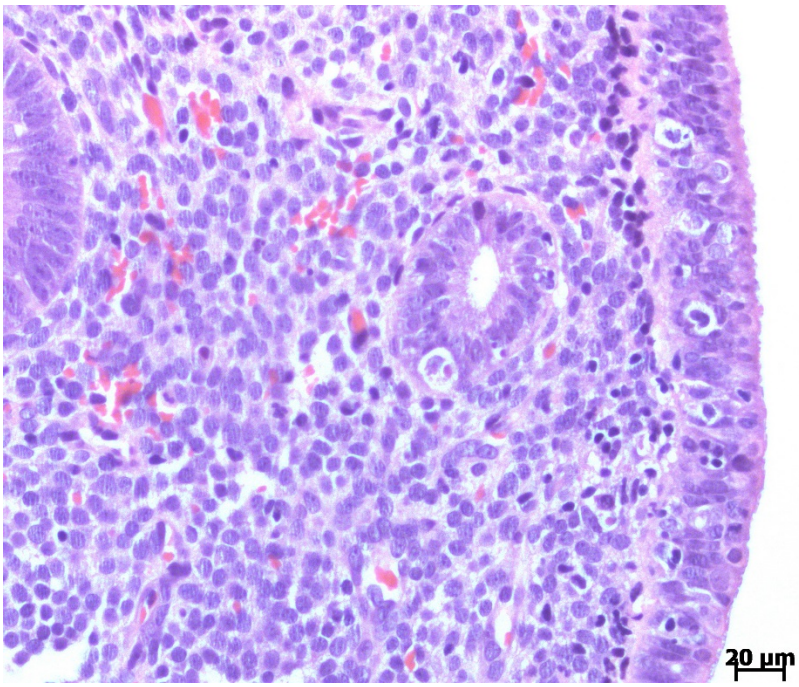



Figura 5 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policísticos. Notar epitélio superficial do tipo prismático infiltrado por leucócitos, algumas figuras de apoptose e lamina própria rica em células. H.E 400X

Figura 6 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policísticos tratada com progesterona natural. Notar lamina própria rica em células. H.E 200X.

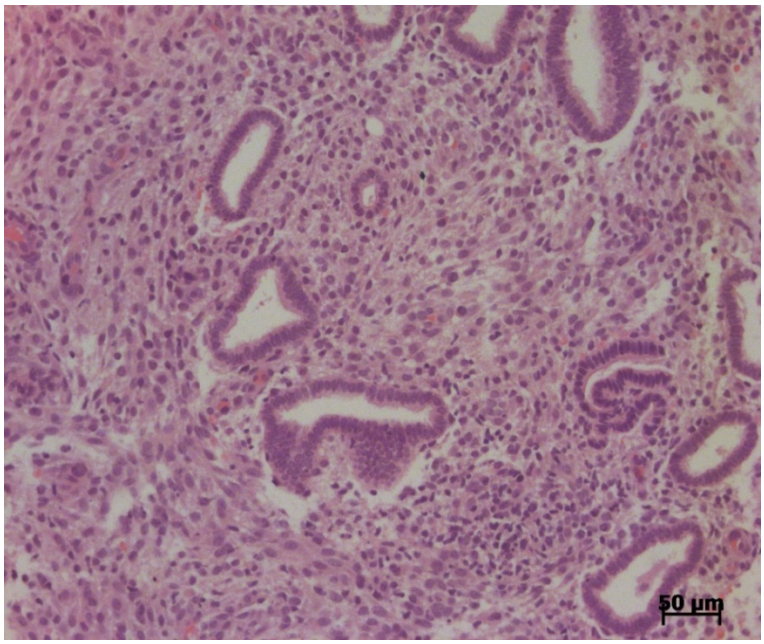



Figura 7 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policísticos tratada com progesterona natural. Notar lamina própria rica em células. H.E 200X.

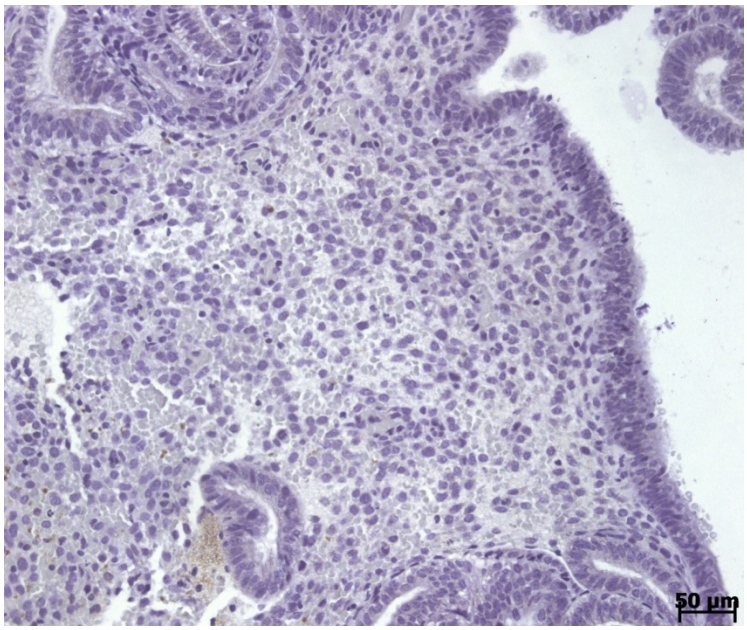



Figura 8 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com síndrome dos ovários policísticos tratada com progesterona natural. Notar lamina própria rica em células e pobre em vasos sanguíneos. Imunoistoquímica para vasos neoformados 200X.

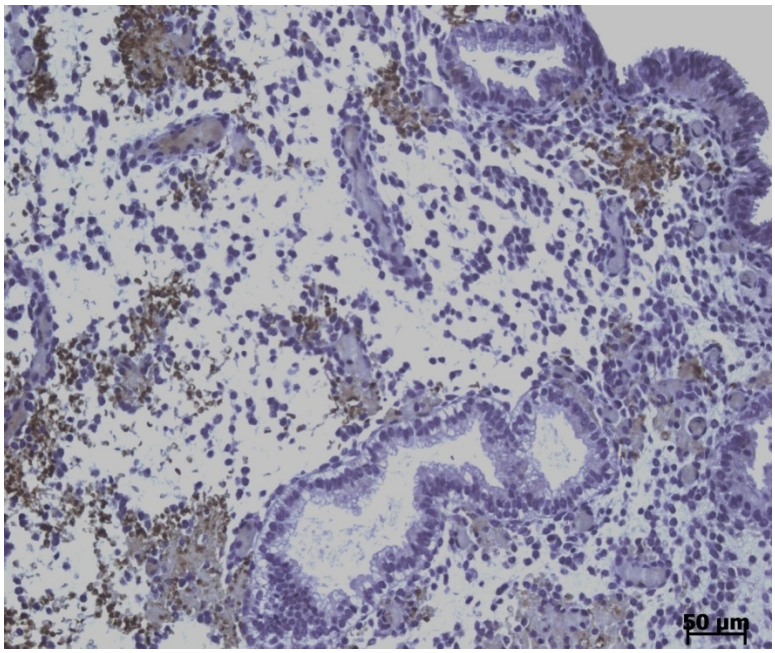
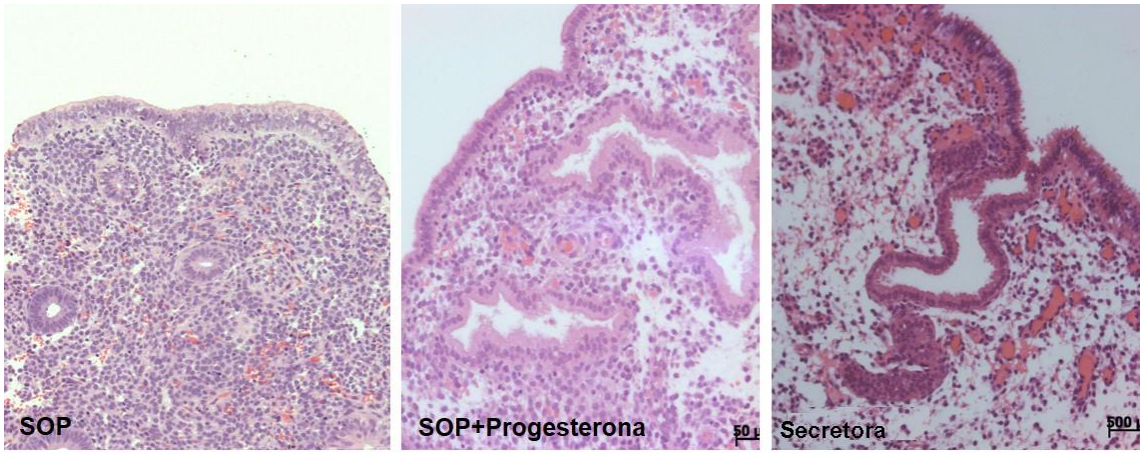
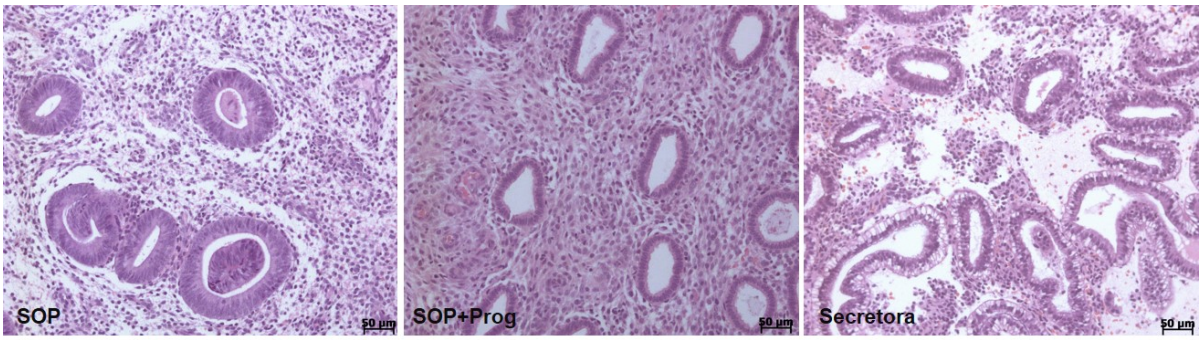



Figura 9 – Fotomicrografia de endométrio de mulher com ciclo menstrual regular, na segunda fase do ciclo. Notar epitélio superficial do tipo prismático simples e na lamina própria inúmeros vasos sanguíneos neoformados. Imunoistoquímica para vasos neoformados. 400X




Figuras 10 – Fotomicrografia do epitélio superficial e da lâmina própria do endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP), na segunda fase do ciclo menstrual, tratadas com progesterona natural. H.E. 200X




Figuras 11 – Fotomicrografia da lâmina própria do endométrio de mulheres com síndrome dos ovários policísticos na segunda fase do ciclo menstrual, tratadas com progesterona natural. H.E. 200X

### 4.3 – Análise histomorfométrica

Os dados das medições (espessura dos epitélios superficial e glandular) e das contagens do número de células na lâmina própria, assim como a de vasos neoformados estão expressos na Tabela 8. Nota-se maior espessura do epitélio superficial nas mulheres com SOP na fase proliferativa do que nas com SOP que receberam progesterona natural. Além disso, as mulheres do grupo controle tiveram espessura do epitélio superficial menor do que o das mulheres com SOP, mesmo as que receberam progesterona natural. Além disto, o numero de células do endométrio das mulheres do grupo controle foi menor do que o do grupo SOP, independente do tratamento com progesterona. Ao inverso, o número de vasos foi maior no grupo controle do que nos outros grupos.

Tabela 8 - Espessuras dos epitélios superficial, glandular número de células e de vasos sanguíneos presentes no estroma endometrial de mulheres pertencentes com síndrome dos ovários policísticos, na segunda fase do ciclo menstrual. tratadas com progesterona natural

| | **Grupos** | | |
|---|---|---|---|
| | **SOP** | **SOP+Prog** | **Grupo Controle** |
| Ep. Superficial (µm) | 25,63 ± 4,41* | 19,67± 2,35** | 16,04 ± 1,11 |
| Ep. Glandular (µm) | 35,58 ± 5,23* | 23,41± 3,12 | 24,81± 3,21 |
| Nº Células/ (0,01mm$^2$) | 66,73 ± 14,01 | 57,89± 19,24 | 32,12 ± 9,1* |
| Nº Vasos/ (0,336mm$^2$) | 4,34 ± 5,23* | 7,8 ± 4,19 | 18,56 ± 7,22* |

*p < 0,05; **p<0,01

Em relação à avaliação por luz polarizada da lâmina própria, as mulheres com SOP, independente do emprego da progesterona, tiram maior concentração de colágeno pelo método “Picrosirius red”. Aplicado o teste de ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 12 – Fotomicrografia da lâmina própria de endométrios de mulheres com síndrome dos ovários policísticos, na segunda fase do ciclo menstrual tratadas com progesterona natural. Notar a distribuição do colágeno mais intensa nos grupos SOP. Picrosirius red.

## 4.4 – Análise imuno-histoquimica

Houve maior reatividade no endométrio de mulheres do grupo controle (na fase secretora do ciclo menstrual) do que nas pacientes com SOP. Salienta-se que esta reação avalia vasos neoformados no endométrio (VEGF-C).

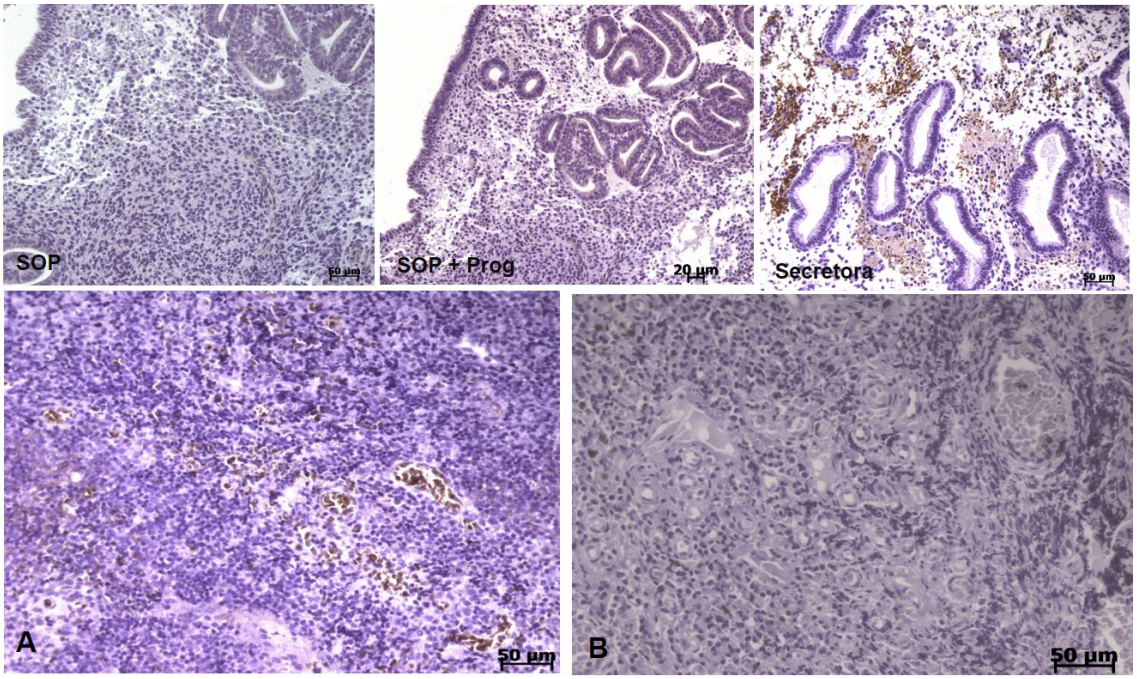



Figura 13 – Fotomicrografia dos endométrios de mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos, na segunda fase do ciclo menstrual tratadas com progesterona natural. Notar intensa reatividade para o VEGF-C na fase proliferativa. Em A controle positivo VEGF-C e em B controle negativo.

## 4.5 – Análise da expressão gênica do “RT² Profiler PCR Array”

### 4.5.1 – Análise do gráfico de dispersão

A Figura 13 mostra o gráfico de dispersão que compara a normalização da expressão de cada gene no “microarray” entre os dois grupos, traçando-os uns contra os outros para visualizar rapidamente grande mudança de expressão gênica. A linha central indica os genes que não mudaram na comparação dos dois grupos. As linhas pontilhadas paralelas mostram o limite de duas vezes da abundância de RNA do grupo SOP em relação ao grupo controle para cima e esquerda (*upregulation*) ou para baixo e direita (*downregulation*). Nota-se que há diferenças entre os dois grupos na abundância de RNA mensageiro.

Considerando dois “fold” de diferença na abundância de RNA mensageiro, a Tabela 9 mostra a expressão dos genes do grupo SOP que tiveram sua expressão aumentada em relação ao grupo controle (“upregulation”): IGFBP1, CTHRC1, PTGER2, PRLR, HABP2, WNT5A, DHRS3, TIMP3, DPP4, GADD45A, CCNG1, C4BPA, GPX3, ESR2, CENPE e CLOCK.

Considerando dois “fold” de diferença na abundância de RNA mensageiro, A Tabela 10 mostra a mostra a expressão dos genes do grupo SOP que tiveram sua expressão diminuída em relação ao grupo controle (“downregulation”): GAST, S100P, IFNGR2, MMP26, CALB2, MMP9, RTC,

CTNNA2, DUOX1, ACTBL2, PAEP, TSHR, PPC, GDC, IL1RN, MTNR1B, HLA-DOB, KISS1R, SLC2A6, THBS2, IGFBP5, PLXNA3 e CRISP3.

As Tabelas 11 e 12 mostram a relação dos genes hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente, com a angiogênse.

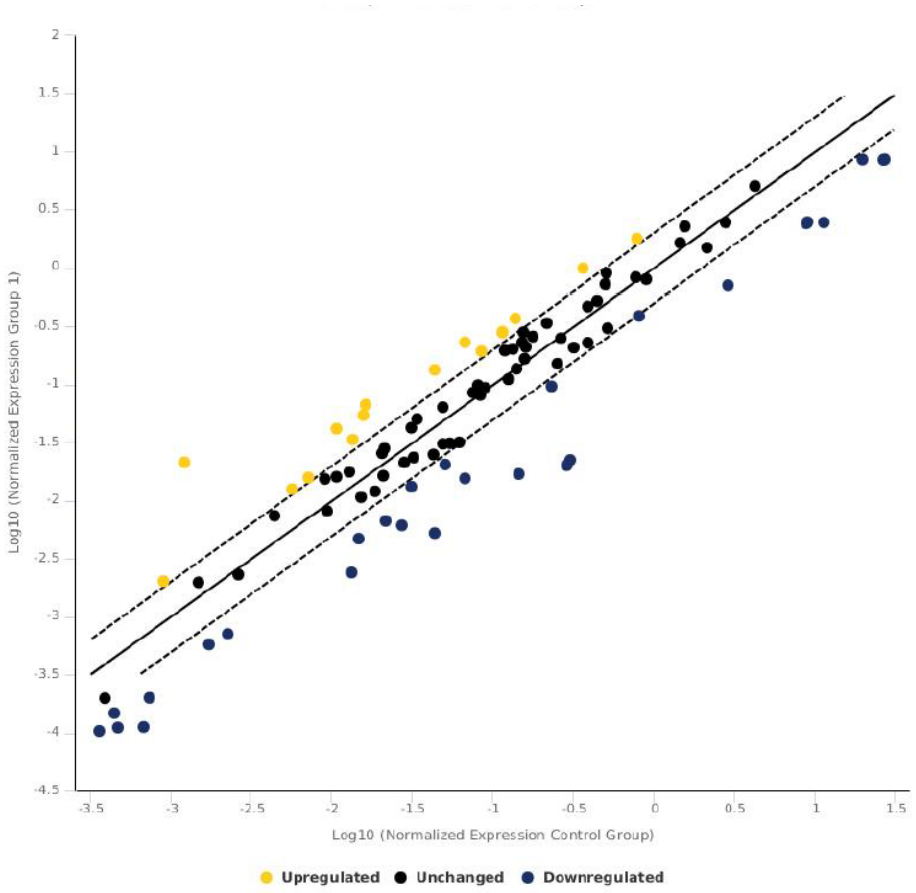



Figura 14 - Representação gráfica da dispersão dos dados na comparação entre os dois grupos, após a normalização da expressão de cada gene no “microarray”, traçando-os uns contra os outros para visualizar rapidamente grande mudança de expressão gênica. A linha central indica os genes que não mudaram na comparação dos dois grupos. As linhas pontilhadas paralelas mostram o limite de duas vezes da abundância de RNA do grupo SOP em

relação ao grupo controle para cima e esquerda (*upregulation*) ou para baixo e direita *(downregulation).*

Tabela 9 – Relação dos genes hiperexpressos do grupo SOP em relação ao grupo controle

| Posição na placa | Símbolo do Gene | Regulação em "fold" |
|---|---|---|
| B02 | IGFBP1 | 17,6547 |
| B04 | CTHRC1 | 4,0949 |
| F07 | PTGER2 | 3,8878 |
| E08 | PRLR | 3,4557 |
| C09 | HABP2 | 3,4515 |
| B10 | WNT5A | 3,0581 |
| F11 | DHRS3 | 2,6972 |
| A04 | TIMP3 | 2,6838 |
| C01 | DPP4 | 2,4684 |
| E01 | GADD45A | 2,4636 |
| D09 | CCNG1 | 2,422 |
| F12 | C4BPA | 2,2885 |
| G10 | GPX3 | 2,2517 |
| E07 | ESR2 | 2,224 |
| E03 | CENPE | 2,2208 |
| E12 | CLOCK | 2,1923 |

Tabela 10 – Relação dos genes hipoexpressos do grupo SOP em relação ao controle

| Posição na placa | Símbolo do Gene | Regulação em "fold" |
|---|---|---|
| E10 | GAST | -14,4146 |
| G04 | S100P | -13,5275 |
| C10 | IFNGR2 | -8,5553 |
| A08 | MMP26 | -8,2849 |
| G05 | CALB2 | -6,022 |
| A06 | MMP9 | -5,5734 |
| H08 | RTC | -4,6898 |
| C08 | CTNNA2 | -4,4413 |
| C02 | DUOX1 | -4,3296 |
| D11 | ACTBL2 | -4,2129 |
| E11 | PAEP | -4,1303 |
| H09 | | -3,6879 |
| E09 | TSHR | -3,681 |
| H07 | PPC | -3,6455 |
| H06 | GDC | -3,476 |
| A03 | IL1RN | -3,2166 |
| H12 | | -3,175 |
| D10 | MTNR1B | -3,1713 |
| G03 | HLA-DOB | -3,151 |
| H10 | | -3,1265 |
| E05 | KISS1R | -3,058 |
| A11 | SLC2A6 | -3,0203 |
| B12 | THBS2 | -2,4672 |
| A12 | IGFBP5 | -2,4044 |
| C04 | PLXNA3 | -2,3701 |
| H11 | | -2,3428 |
| G08 | CRISP3 | -2,0879 |

Tabela 11 – Relação dos principais genes hiperexpressos com a angiogênese endometrial

| Símbolo do gene | Proteína | Função | Possível efeito sobre a angiogênese |
|---|---|---|---|
| IGFBP1 | Proteína ligadora dos fatores de crescimento insulinoides | ↓ ação do IGF-1 e 2 | ↓ |
| CTHRC-1 | Repetição de hélice tripla de colágeno do tipo I | ↑ fosforilzação da ERK e JNK | ↑ |
| PTGER2 | Receptor da PGE2 | ↑ ação prostaglina E2 | ↓ |
| PRLR | Receptor de prolactina | Ativação de MAPK e STAT5 | Variável – dependente das isoformas |
| HABP2 | Proteína ligadora ao hialuronan | Evita a quebra do hialuronan | ↓ |
| WNT5A | Glicoproteina | Ativação por via canônica<br>Ativação por via não canônica | ↑<br>↓ |
| TIMP3 | Inibidor tissular da metaloproteinase | Fatores de degradação aumentam o VEGF | ↓ |
| DPP4 | Peptidase Dipeptidil 4 | Inibe a ativação “High mobility group box 1” | ↓ |
| GADD45A | Proteína induzida pela parada de crescimento e dano ao DNA | Bloqueio da via mTOR/STAT3 | ↓ |
| CCNG1 | Ciclina G1 | Via ação depende da miR-23b | Variável |
| GPX3 | Peroxidase glutationa | Depende da atividade dos macrófagos | ↓ |
| ESR2 | Receptor de estrogênio tipo 2 | Bloqueio das vias VEGF and HIF1α. | ↓ |
| Clock | Proteínas do ritmo circadiano | Via HIF-1α, ARNT e VEG. | ↑ |

Tabela 12 – Relação dos principais genes hipoexpressos com a angiogênese endometrial

| Símbolo do gene | Proteína | Função | Possível efeito na angiogênese |
|---|---|---|---|
| GAST | Gastrina | ↑ angiogênese pela via mTOR | ↓ |
| S100P | Proteína ácida de baixo peso molecular | ↑ angiogênese | ↓ |
| INFNGR2 | Receptor da PGE2 | ↑ via IFN-Y | ↓ |
| MMP26 | Metaloproteinase | Fatores de degradação aumentam o VEGF | ↓ |
| DUOX1 | Oxidase dual | Angiogênese por via do estresse anti-oxidativo | Variável |
| PAEP | Proteina endometrial associada com ação da progesterona | Remodela a matriz extracelular, diminui o processo inflamatório local, diminui o estresse anti-oxidativo e o amadurecimento vascular (angiogenese) | ↑ |
| TSHR | Receptor do TSH | Aumenta VEGF via ERK e AKT | ↓ |
| IL1RN | Antagonista do Receptor de IL1N | Inibe a ação da IL no VEGF | ↑ |
| Kiss1R | Receptor da Kiss peptina | Inibe VEGF pela via ERK1/2 | ↑ |
| THBS2 | Thrombospondina | Inibidor do VEGF | ↑ |
| IGFBP5 | Proteina ligadora dos fatores de crescimento insulinoides | ↓ ação do IGF-1 e 2 | ↑ |
| PLXNA3 | Plexia-3 | angiogênese e está relacionado com a sinalização da progesterona | ↓ |

# V - DISCUSSÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a desordem endócrina mais comum em mulheres durante o período reprodutivo (Savaris et al., 2011; Azziz, 2016). Estima-se afetar de 5% a 10% da população feminina nesta fase. Representa a causa mais frequente de infertilidade anovulatória, disfunção menstrual e hirsutismo (Qiao et al., 2008; King et al., 2010; Azziz, 2016).

Constitui a SOP a principal causa de infertilidade associada à anovulação. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com a indução da ovulação nas pacientes com SOP, os índices de gestação ainda não são satisfatórios. É possível, que alterações endometriais sejam responsáveis pela relação das taxas de implantação. As pacientes que fizeram tratamento com o citrato de clomifeno apresentam resultados desapontadores, com baixas taxas de gravidez e baixo índice de nascidos vivos (Savaris et al., 2011). Esse fato também foi comprovado em mulheres submetidas a fertilização in vitro (FIV), cujas taxas de sucesso também foram baixas (aproximadamente 25%) (Li et al., 2014). Assim, baseados nesses dados, a anovulação não será a única causa de infertilidade em mulheres com SOP (Lopes et al., 2011).

A progesterona é um elemento fundamental no estabelecimento e na manutenção da gravidez. Níveis inadequados deste hormômio na fase secretora estão associados com infertilidade e abortos recorrentes. Muitos estudos examinaram a regulação e os processos moleculares envolvidos na decidualização do endométrio. Entretanto, os mecanismos de ação da progesterona no endométrio das pacientes com SOP podem sofrer interferência hormonal ou até metabólica. Há genes relacionados com a ação

da progesterona que estão reduzidos nas mulheres anovulatórias, mesmo recebendo progesterona.

As pacientes com SOP sofrem os efeitos da resistência à insulina ou intolerância à glicose, bem como da concentração sérica de LH elevada e deficiência parcial de FSH, com consequente hiperandrogenismo, como identificamos também em nossos casos. É capaz que este desequilíbrio hormonal e metabólico tenha também efeito no endométrio e, possivelmente, na fertilidade (Maciel et al., 2004; Giudice, 2006; Quezada et al., 2006; Qiao et al. 2008; Fauser et al., 2012).

Apesar do desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida, as taxas de gravidez, nas pacientes com SOP, ainda são baixas (Cakmak e Taylor, 2011). Portanto, questiona-se qual seria o responsável. Em nosso trabalho, procuramos avaliar se o endométrio seria um dos limitantes para o processo de implantação embrionária e desenvolvimento da gestação, mesmo após preparo prévio com progesterona natural. Assim, nossos dados sugerem que o emprego de progesterona natural em altas doses não seria suficiente para restaurar a morfologia do endométrio que foi submetido por longo tempo à ação estrogênica isolada ou restabelecer a vascularização endometrial que é também importante para ocorrer a gestação. Este dado pode justificar, em parte, alteração da receptividade endometrial e a dificuldade de adesão embrionária. Neste sentido, outros investigadores também estão analisando a disfunção endometrial em mulheres com SOP com o objetivo de desenvolver novas terapias que proporcionem um endométrio mais adequado para

implantação (Lai et al., 2005; Quezada et al., 2006; Foulk et al., 2007; Kilic et al., 2008; Margarit et al., 2010).

Nossos dados evidenciaram aspectos histomorfométricos do endométrio das pacientes com SOP diferentes do grupo controle. Apesar do estroma e a quantidade de glândulas serem semelhantes, a espessura do epitélio luminal e o número de vasos sanguíneos eram menores que no grupo controle. Tal achado poderia ser explicado pelo fato de que as mulheres com SOP, por serem anovulatórias ou oligo-ovulatórias, teriam ação do androgênio e da insulina na expressão de genes e processos bioquímicos endometriais (Apparao et al., 2002; Giudice, 2006; Cakmak e Taylor, 2011). Haveriam, pois, como resultado, proliferação celular endometrial mais acentuada com deficiência na diferenciação tecidual, mesmo com o tratamento prévio com progesterona natural.

Sem o efeito regulatório da progesterona, a ação mitogênica extrínseca junto com as substâncias referidas anteriormente, poderiam levar ao crescimento endometrial desordenado (Simões et al. 2017), podendo surgir hiperplasia e aumentando o risco de câncer endometrial, bem como sangramento uterino mais volumoso (Cheung, 2001; Giudice, 2006). Além disso, os androgênios, no endométrio, teriam ação antagonista ao estrogênio. Este desequilíbrio poderia interferir no efeito da progesterona na transformação endometrial.

Após o uso da progesterona natural, o endométrio apresentou mudanças histológicas compatíveis com as da fase secretora em relação ao

grupo controle, mas sua espessura foi ainda maior do que nas mulheres do grupo controle. Tem sido demonstrado que o endométrio de pacientes com SOP é frequentemente disfuncional em decorrência dos níveis de estrogênios elevados (sem a oposição da progesterona), da hiperinsulinemia e da diminuição da IGFBP-5, resultando em aumento do IGF-I (Giudice, 2006), mantendo o endométrio fora de fase, segundo os critérios de Noyes et al. (1975). Contudo, acreditávamos que o emprego da progesterona (400mg/dia), por 10 dias, seria o suficiente para a transformação adequada do endométrio. Nossos dados histológicos sugerem, porém, que não seriam suficientes, principalmente no epitélio superficial. Adicionalmente, estas mulheres também teriam um déficit parcial do número de glândulas endometriais. Estes aspectos corroboram a hipótese de que, na SOP, devido à ação estrogênica prolongada, há mudanças histológicas importantes que não revertem com a ministração de progesterona.

Alguns autores referem que a ação insatisfatória da progesterona poderia estar relacionada com a infertilidade. Para eles, o problema central seria seu próprio receptor (Laven et al., 2001; Savaris et al., 2011). Contudo, baseados em nossos resultados, haveria outros distúrbios endócrinos na SOP, como incremento da ação de fatores de crescimento (Ghosh et al., 2011), que podem interferir com na ação da progesterona no endométrio (Li et al., 2014). Talvez a dose a ser utilizada, deva ser maior para anular este efeito ou ser usada por mais tempo, pois a progesterona em animais pode diminuir a ação dos fatores de crescimento no endométrio (McCarthy et al., 2012).

Os dados da literatura não estão claros se as mulheres com SOP teriam um endometrial realmente disfuncional, apesar da Anovulação crônica e dos níveis reduzidos de progesterona. Alguns estudos têm indicado que o endométrio estaria inadequado para a implantação na SOP, incluindo distúrbios na proliferação e na diferenciação celular, conjuntamente com resposta celular inadequada, independente da anovulação. Contudo, outros autores, não acreditam que na SOP haveria alterações significantes na receptividade endometrial (Maliqueo et al., 2003; Heijnen et al., 2006; Qiao et al., 2008). Todavia, nossos achados sugerem que há a progesterona seria importante para a transformação secretora do endométrio, tornando-o mais receptivo. Talvez outros fatores devam ser corrigidos para maior sucesso nos programas de reprodução assistida.

Durante a fase secretora, o endométrio completa sua diferenciação para a implantação e o uso de técnicas moleculares e imunoistoquimicas têm conseguido identificar vários biomarcadores na superfície do epitélio luminal do endométrio humano que podem participar no processo de implantação do embrião (Lessey et al., 2002; Lai et al., 2005). Dentre eles, realçamos o VEGF. Esse marcador histológico, quando reduzido, poderia explicar alguns casos de infertilidade sem causa aparente, endometriose, SOP e abortos recorrentes (Lai et al., 2005; Lessey, 2011). Por esta razão, procuramos avaliar este marcador durante a janeira de implantação, onde a progesterona teria sua ação máxima na receptividade endometrial.

A progesterona é conhecida como sendo indispensável para a

diferenciação das células estromais endometriais em humanos, processo crítico à implantação e à placentação (Giudice, 2006). Na nossa amostra, mostramos que mesmo com o tratamento com progesterona natural na SOP, há alterações de genes endometriais, quando comparados com a fase secretora das mulheres com ciclos menstruais regulares. Outros estudos mostraram que estas substâncias podem justificar a infertilidade por interferência na angiogênese e processo inflamatório local (Lai et al., 2005; Lessey, 2011).

A avaliação da fase secretora do endométrio em mulheres anovulatórias é difícil de estudar sem usar medicamentos, como citrato de clomifeno (Savaris et al., 2011), gonadotrofinas ou análogos do GnRH (Lai et al., 2005). Uma crítica a estes trabalhos é que essas substâncias também poderiam modificar a receptividade do endométrio (Lai et al., 2005). Assim, procuramos um modelo que pudesse mimetizar o que ocorreria no endométrio quando fosse reposto o hormônio que está muito deficiente, no caso, a progesterona. Portanto, a progesterona oral micronizada (400mg/dia) por 10 dias foi empregada em mulheres com SOP para transformar esse endométrio proliferativo em secretor. Com isso, estaríamos neutralizando a ação estrogênica persistente e prolongada e, repetido após o fluxo menstrual, sua segunda fase poderíamos ter um endométrio próximo do normal durante a janela de implantação embrionária (fase secretora média). Contudo, nossos dados mostraram que o endométrio se assemelha ao do grupo controle, mas apresenta tanto alterações da histomorfologia que pode prejudicar a implantação e a invasão trofoblástica.

A αvβ3-Integrina é vista como preditora de sucesso da FIV, mas somente um número limitado de pesquisas foi publicado (Thomas et al., 2003; Revel et al., 2005; Casals et al., 2010; Lessey, 2011). Estudos têm demonstrado haver variações dinâmicas e distribuições cíclicas da αvβ3-Integrina no endométrio. Essas mudanças seriam induzidas como resultado de tratamentos com gonadotrofinas e clomifeno (Quezada et al., 2006), enquanto outros examinando as células endometriais *in vitro* sugerem que as integrinas podem ser reguladas por citocinas e fatores de crescimento insulinoides, sendo que a formação da decídua é regulada por hormônios esteróides (Sillem et al., 1997). O IGF-1 estaria aumentado na SOP, bem como o excesso de androgênios e/ou de insulina responsáveis por essas alterações (Apparao et al., 2002; Giudice, 2006). Este dado também poderia justificar o motivo da maior abundância de RNA mensageiro relacionado com o IGFBP-1 encontrado em nosso estudo. Seria, pois, uma tentativa do organismo em amenizar os efeitos proliferativos do IGF-1 (Tochigi et al., 2017). É possível que efeito semelhante poderia ocorrer com outros fatores de crescimento.

A quantidade do receptor do fator de crescimento do tipo 1 tipo insulina (IGF1R) está aumentada no epitélio endometrial durante a fase secretora na janela de implantação. Tochigi et al. (2017) concluíram, após revisão da literatura, que a supressão da expressão gênica do IGFBP-1 determina inibição da decidualização das células do estroma endometrial, bem como da angiogênese. Por outro lado, a progesterona induz à expressão do microRNA (miR-125b) e seu aumento inibiu o movimento celular e impediu a implantação, suprimindo a expressão de MMP26, um membro da família de

metaloproteinases da matriz que está envolvido na degradação da matriz extracelular. Estes resultados são compatíveis com os nossos achados.

Tochigi et al. (2017) também evidenciaram que a expressão de alguns genes está relacionada com a decidualização das células do estroma endometrial humano bem como IGFBP-1 e TIMP3 que induzem a transformação morfológica do endometrio e sua deficiência pode diminuir a diferenciação secretora e a angiogênese, o que teria efeito negativo na implantação embrionária.

Diaz-Gimeno et al. (2017) analisaram vinte e dois genes escolhidos como os principais genes desregulados associados a gravidezes bioquímicas e falha de implantação por apresentarem-se hipo ou hiper – expressos. Os genes S100P e GAST foram relacionados ao desenvolvimento vascular e diferenciação celular e o HSPE à remodelação da matriz extracelular. Eles alteraram o microambiente endometrial pela desregulação do canal de potássio e da proteína de ligação de cálcio à proteína S100P. Assim, a redução destas proteínas podem tornar o endométrio inapropriado.

O endométrio humano é um tecido dinâmico que sofre ciclos regulares de menstruação, reparação menstrual, proliferação e diferenciação secretora. As alterações fisiológicas no endométrio durante o ciclo menstrual estão associadas à angiogênese profunda em resposta à hipóxia e aos hormônios sexuais femininos. A hipóxia local é um importante regulador da angiogênese e remodelação durante a menstruação. O E2 desempenha papel importante na reconstrução de uma rede vascular e crescimento rápido de vasos no

endométrio, e sabe-se que a maturação vascular ocorre durante a fase secretora do ciclo menstrual regulado pela progesterona. A angiogênese é controlada por diversos fatores angiogênicos e antiangiogênicos. A angiogênese endometrial humana é regulada por vários mediadores, incluindo fator endotelial de crescimento vascular (VEGF), receptor solúvel de VEGF 1 (sVEGFR-1), angiopoietina (ANGPT), fator 1 derivado de célula estromal (SDF-1 / CXCL12), IL-8 e angiogenina. A hipóxia e os hormônios sexuais femininos estão envolvidos na regulação desses fatores de forma independente nas células do estroma endometrial (Okada et al., 2014).

O fator de crescimento endotelial vascular é um importante regulador da angiogênese e da função vascular. E estudos demonstraram a expressão de VEGF no endométrio humano. Estimula a proliferação de células endoteliais, permeabilidade, migração e montagem em tubos capilares. Pesquisas recentes relataram que o papel do VEGF nos processos angiogênicos iniciais está associado à regeneração pós-menstrual do endométrio. O VEGF é essencial para a rápida explosão da angiogênese que ocorre durante a correção pós-menstrual e nas fases iniciais da proliferação no endométrio primata. Desempenha, ainda, papel na reepitelização do endométrio. O E2 faz com que haja aumento do VEGF e queda da produção de sVEGFR-1, antagonista do VEGF. Haveria, consequentemente aumento da relação VEGF / sVEGFR-1, o que promove o crescimento e desenvolvimento do endométrio durante os estágios avançados do ciclo menstrual em nível local. Já a progesterona tem efeito inibitório nos níveis de VEGF induzidos pelo E2 no estroma endometrial. Sabe-se, ainda, que os progestagênios iniciam a regulação negativa do RE no

endométrio humano *in vivo* bem como *in vitro* e, portanto, a inibição do VEGF pode ser devido a diminuição dos níveis de ER.

Nossos dados sugerem que o tratamento com progesterona natural nas pacientes com SOP não reestabelecem a angiogênese endometrial, de grande importância para a implantação embrionária. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar se este fator estaria relacionado com o processo de falha de implantação ou de abortamento nas mulheres com SOP.

Assim, nossos resultados desvelam que o endométrio das mulheres com SOP, mesmo após tratamento com progesterona natural, mostra-se inadequado para a implantação endometrial, possivelmente, devido à redução da angiogênese local.

# VI- CONCLUSÕES

Nossos dados permitem concluir que:

1 – As mulheres com SOP apresentaram alterações do metabolismo de carboidratos, hiperinsulinemia e hiperandrogenismo;

2 – Após o uso de progesterona natural, o endométrio revelou, na janela de implantação, modificações secretoras, assemelhando-se ao das mulheres com ciclos menstruais regulares;

3– Os dados imunoistoquímicos mostraram haver redução da expressão do VEGF nas mulheres com SOP tratadas com progesterona natural em relação às com ciclo menstrual regular;

4 - Após a análise gênica, registrou-se predomínio de genes que podem interferir negativamente com a angiogênese no endométrio das pacientes com SOP tratadas com progesterona natural;

5- O endométrio das mulheres com SOP, mesmo após tratamento com progesterona natural, mostra-se inadequado para a implantação endometrial devido à redução da angiogênese local.

# VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalmageed OS, Farghaly TA, Abdelaleem AA, Abdelmagied, AE, Ali MK, Abbas A M. Impact of Metformin on IVF Outcomes in Overweight and Obese Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. Reproductive Sciences. 2018

Apparao KB, Lovely LP, GUI Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. Biol Reprod. 2002;66(2):297-304.

Azziz R, Carmina E, Dewailly, D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale, HF, Futterweit W, Witchel SF. Position statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An androgen excess society guideline. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2006.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF, The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report, Fertil Steril. 2009;91(2):456-88.

Azziz R, Introduction: Determinants of polycystic ovary syndrome Fertil Steril. 2018 (*in press*)

Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JSE, Legro RS, Yildiz BO.

Polycystic ovary syndrome. Nature Reviews. Disease Primers. 2006.

Bancroft, JD, Stevens, A.Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition, Churchill Livingstone, New York. 1996.

Baracat EC, Soares-Junior JM. Ovários policísticos, resistência insulínica e síndrome metabólica. Rev Bras Ginecol Obstet. 2007;29(3):117-9

Baracat MC, Serafine PC, Simões R dos S, Maciel GA, Soares JM Jr, Baracat EC. Systematic review of cell adhesion molecules and estrogen receptor expression in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. Int J Gynaecol Obstet. 2015;129(1):1-4.

Berisha B, Schams D, Rodler D, Pfaffl, MW. Angiogenesis in The Ovary - The Most Important Regulatory Event for Follicle and Corpus Luteum Development and Function in Cow - An Overview. Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia. 2016.

Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: Molecular mechanisms and clinical treatment. Human Reproduction Update. 2011.

Casals, G, Ordi, J, Creus, M, Fábregues, F, Carmona, F, Casamitjana, R, Balasch, J. Osteopontin and αvβ3 integrin as markers of endometrial receptivity: The effect of different hormone therapies. Reproductive BioMedicine

Online. 2010.

Cheung, A. P. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. Obstetrics and Gynecology. 2001.

Christin-Maitre S. History of oral contraceptive drugs and their use worldwide. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. 2013.

Concha C F, Sir PT, Recabarren, SE, Pérez BF. Epigenetics of polycystic ovary syndrome. Revista Medica de Chile. 2017.

Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: An update on mechanisms and implications. Endocrine Reviews. 2012.

Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C.A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. Fertil Steril. 2011, 50-60

Díaz-Gimeno, P Ruiz-Alonso, M Sebastian-Leon P, Pellicer A, Valbuena D, Simón C. Window of implantation transcriptomic stratification reveals different endometrial subsignatures associated with live birth and biochemical pregnancy. Fertility and Sterility. 2017.

Davidson LM, Coward K. Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. Birth Defects Res C Embryo Today. 2016;108(1):19-32.

Dignam WJ, Pion RJ, Lamb EJ, Simmer HH. Plasma androgens in women. ii. patients with polycystic ovaries and hirsutism. Acta Endocrinol (Copenh). 1964 Feb;45:254-71

Falany JL & Falany CN. Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone. Endocrinology. 1996; 137(4): 1395-401.

Fauser, BCJM, Tarlatzis, BC, Rebar, RW, Legro, R S, Balen, AH, Lobo, R, Barnhart, K. Consensus on womens health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS). Human Reproduction. 2012.

Foulk, RA, Zdravkovic, T, Genbacev, O, Prakobphol, A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2007)

Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update. 2008;14(4): 367-78.

Fraser HM, Duncan WC. SRB Reproduction, Fertility and Development Award Lecture 2008: Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and

endometrium. Reproduction, Fertility and Development. 2009.

Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. Human Reproduction Update. 2003;9: 223-35.

Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006;20(2):235-44.

Ghosh D, Najwa AR, Khan MA, Sengupta J. IGF2, IGF binding protein 1, and matrix metalloproteinases 2 and 9 in implantation-stage endometrium following immunoneutralization of vascular endothelial growth factor in the rhesus monkey. Reproduction. 2011.

Guastella E, Longo RA, Carmina E. Clinical and endrocrine characteristics of the main polycystics ovary syndrome phenotypes. Fertility and Sterility. 2010;94(6):2197-201.

Gregory CW, Wilson EM, Apparao KB, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, Fritz MA, Lessey BA. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(6):2960-6.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary

syndrome. Hum Reprod Update. 2006 Jan-Feb;12(1):13-21

Kilic S, Tasdemir, N Lortlar, N Yuksel, B Budak, G Batioglu, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoreactivities in rat ovaries and uterine tubes after tubal ligation: A controlled immunohistochemical study. European Journal of Contraception and Reproductive Health Care. 2008.

King AE, Critchley HO. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;120(2-3):116-26.

Lai, TH, Zhao, Y, Shih, IM, Ho, C L, Bankowski, B, Vlahos, N. Expression of L-selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. Fertility and Sterility. 2006.

Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Fauser BC. Absent biologically relevant associations between serum inhibin B concentrations and characteristics of polycystic ovary syndrome in normogonadotrophic anovulatory infertility. Hum Reprod. 2001 Jul;16(7):1359-64

Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. J Reprod Immunol. 2002 May-Jun;55(1-2):101-12. Review

Lessey, B. A. Assessment of endometrial receptivity. Fertility and Sterility. 2011.

Li HW, Lee VC, Lau EY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Cumulative live-birth rate in women with polycystic ovary syndrome or isolated polycysticovaries undergoing in-vitro fertilization treatment.J Assist Reprod Genet. 2014;31(2):205-11.

Lizneva D, Kirubakaran R, Mykhalchenko K, Suturina L, Galina C, Diamond MP,Azziz R. Phenotypes and body mass in women with polycystic ovary syndrome identified in referralversus unselected populations: systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2016 (in press)

Lopes IMRS, Baracat MCPB, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC, Junior JMS. Endométrio na janela de implantação em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. Revista  Associação Médica Brasileira. 2011; 57(6): 702-709.

Maciel GAR., Soares JM, Alves Da Motta EL, Haidar MA, Rodrigues De Lima G, Baracat  EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. Fertility and Sterility. 2004

Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir-Petermann T, Vega M. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility. 2003.

Margarit L, Taylor A, Roberts M H, Hopkins L, Davies,C, Brenton AG, Gonzalez D. MUC1 as a discriminator between endometrium from fertile and infertile patients with PCOS and endometriosis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2010.

McCarthy SD, Roche JF, Forde N. Temporal changes in endometrial gene expression and protein localization of members of the IGF family in cattle: effects of progesterone and pregnancy. Physiological Genomics. 2012. Molis TM, Spriggs LL, Jupiter Y, Hill SM. Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. J Pineal Res. 1995;18(2):93-103.

Munro MG. Classification of menstrual bleeding disorders. Rev Endocr Metab Disord. 2012;13(4):225-34.

Noyes RW, Haman JO. Accuracy of endometrial dating; correlation of endometrial dating with basal body temperature and menses. Fertil Steril. 1953;4(6):504-17.

Okada H[1], Tsuzuki T, Shindoh H, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H. Regulation of decidualization and angiogenesis in
the human endometrium: mini review. J Obstet Gynaecol Res. 2014 May;40(5):1180-7. doi: 10.1111/jog.12392.

Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. Hippokratia. 2009 Oct;13(4):216-23

Piltonen TT, Chen JC, Khatuan M, Kangasniemi M, Liakka A, Spitzer T, Tran N, Huddleston H, Irwin JC, Giudice LC. Endometrial stromal fibroblasts from women with polycystic ovary syndrome have impaired progesterone-mediated decidualization, aberrant cytokine profiles and promote enhanced immune cell migration in vitro. Hum. Reprod. 2015;30(5):1203-15.

Qiao J, Wang L, LI R, Zhang X. Microarray evaluation of endometrial receptivity in chinese women with polycystic ovary syndrome. Reprod Biomed Online. 2008;17(3):425-35.

Quezada S, Avellaira C, Johnson M C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility. 2006. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.053

Revel A, Helman A, Koler M , Shushan A, Goldshmidt O, Zcharia E, Vlodavsky I. Heparanase improves mouse embryo implantation. Fertility and Sterility. 2005. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.008

Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simón C. The genomics of the human endometrium. Biochim Biophys Acta. 2012 Dec;1822(12):1931-42

Salamonsen, L.A., Nie, G, Hannan, NJ, Dimitriadis, E. Society for reproductive biology founders lecture Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. Reproduction, Fertility and Development. 2009.

Savaris RF, Groll JM, Young SL, Demayo FJ, Jeong JW, Hamilton AE, Guidice LC, Lessey BA. Progesterone Resistance in PCOS Endometrium: A Microarray Analysis in Clomiphene Citrate-Treated and Artificial Menstrual Cycles. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2011;96(6): 1737-46.

Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2003 Apr;17(2):289-307

Sillem M, Prifti S, Schmidt M, Rabe T, Runnebaum B. Endometrial integrin expression is independent of estrogen or progestin treatment in vitro. Sillem M, Prifti S, Schmidt M, Rabe T, Runnebaum B. Fertil Steril. 1997 May;67(5):877-82

Simões RS, Soares JM Jr, Simões MJ, Nader HB, Baracat MCP, Maciel GAR, Serafini PC, Azziz R, Baracat EC. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in the endometrium of polycystic ovary syndrome women: a pilot study.
J Ovarian Res. 2017 Aug 8;10(1):54

Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HO, Baird DT, Brenner RM. Progesterone antagonists increase androgen receptor

expression in the rhesus macaque and human endometrium. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2001;86: 2668-79.

Sjaarda LA, Mumford SL, Kuhr DL, Holland TL, Silver, RM Plowden, TC Schisterman EF. Association of testosterone and antimüllerian hormone with time to pregnancy and pregnancy loss in fecund women attempting pregnancy. Fertility and Sterility. 2018.

Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005.

Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. Journal of Clinical Ultrasound.1981.

Song X, Sun X, Ma G, Sun Y, Shi Y, Du Y, Chen ZJ. Family association study between melatonin receptor gene polymorphisms and polycystic ovary syndrome in Han Chinese. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015;195:108-12.

Szydlarska D, Machaj M, Jakimiuk, A History of discovery of polycystic ovary syndrome. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2017.

Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, Piltonen T, Norman RJ; Recommendations from the international evidence-based guideline

for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. International PCOS Network . Hum Reprod. 2018 Sep 1;33(9):1602-1618

Thomas K, Thomson AJ, Wood SJ, Kingsland CR, Vince G, Lewis-Jones DI. Endometrial integrin expression in women undergoing IVF and ICSI: A comparison of the two groups and fertile controls. Human Reproduction. 2003.

Tochigi H, Kajihara T, Mizuno Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kamei Y, Okazaki Y, Brosens JJ, Ishihara O. Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. Sci Rep. 2017 Jan 4;7:40001

Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. Clin Obstet Gynecol. 2007 Mar;50(1):168-77.

# VIII- ANEXOS

# ANEXO I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Expressão gênica e protéica dos marcadores de receptividade endometrial de mulheres com síndrome dos ovários policísticos

**Pesquisador:** Edmund Chada Baracat

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 21253613.6.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 492.692

**Data da Relatoria:** 11/12/2013

**Apresentação do Projeto:**

Adequada

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste estudo é analisar a receptividade endometrial em pacientes com síndrome dos ovários policísticos em comparação com a de mulheres com ciclos menstruais regulares, utilizando espectrometria de massa e array para testar o estado de receptividade endometrial.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Há riscos normais de um procedimento diagnóstico invasivo e o projeto propõe seguro e acompanhamento o que é considerado adequado, não há benefícios diretos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa é relevante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequados

**Recomendações:**

não há

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

**ANEXO II**

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

**2**.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

---

### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **"Expressão gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial de mulheres com síndrome dos ovários policísticos"**

PESQUISADORA: Maria Cândida Pinheiro Baracat

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora executante INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 145615

UNIDADE DO HCFMUSP: .....Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

**3**. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

**4**.DURAÇÃO DA PESQUISA : .....3 anos.

Rubrica da paciente _____

Rubrica do Investigador

_____

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Você está sendo convidada a participar, voluntariamente, de um estudo de pesquisa que será realizado no ambulatório da Disciplina de Ginecologia. Esse formulário de consentimento explicará a finalidade e os detalhes deste estudo. Explicará também as suas responsabilidades e seus direitos como participante do estudo.

É importante que você leia e compreenda todos os procedimentos e certifique-se que todas as suas perguntas foram respondidas antes de assinar este documento.

**Justificativa e objetivos da pesquisa**: O objetivo deste estudo é analisar a receptividade endometrial em pacientes com síndrome dos ovários policísticos em comparação com a de mulheres com ciclos menstruais regulares.

O endométrio é a camada interna do útero, e a avaliação que será realizada neste estudo, vai possibilitar o aprimoramento de conhecimentos necessários para novos tratamentos e técnicas, principalmente em pacientes inférteis, que apresentam a síndrome de ovários policísticos.

Juntamente com você ,caso você aceite, participarão 80 mulheres entre 20 e 35 anos, que serão divididas em 2 grupos, ou seja, 40 mulheres inférteis com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos e 40 mulheres com ciclo menstrual regular, férteis, que não desejam mais filhos e vão se submeter a esterilização tubária. ou ainda, mulheres cuja infertilidade é devida a fator masculino.

**Procedimentos:** Você deverá informar ao seu médico sobre todas as doenças atuais e passadas, sobre todas as medicações que está utilizando no momento, e também, se usar alguma medicação durante o estudo, mesmo que seja um medicamento simples.

Todas as participantes serão submetidas a exame físico geral ,medidas de altura e peso,sinais vitais , exame ginecológico completo com coleta de citologia cérvico vaginal ( papanicolau) e ultra-sonografia transvaginal.

Durante o estudo, 2 coletas de sangue (realizadas após 12 h de jejum) e 2 biópsia de endométrio serão realizadas em períodos determinados por seu médico.

**Desconfortos e riscos esperados:** Isto diz respeito aos procedimentos e exames que você irá realizar:

Rubrica da paciente _____

Rubrica do Investigador _____

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- Biópsia de endométrio: amostras endometriais serão coletadas por meio de uma sonda flexível com 3 mm de diâmetro que será colocada no útero, após correta assepsia do local. O material endometrial será retirado via aspiração. Cólica do tipo menstrual pode ocorrer, mas é de breve duração no momento da retirada do material . Pequeno sangramento por um ou dois dias é raro, mas pode ocorrer.

- Coleta de sangue: a coleta de sangue será realizada através de punção venosa de membro superior, para retirada de 5 ml de sangue (mais ou menos 1 colher de sopa).Este procedimento poderá causar um pouco de dor na punção e a formação de equimose ou hematoma no local, embora isto não seja frequente.

- Ultra-sonografia ; não há relatos de efeitos adversos confirmados e documentados em estudos realizados

**Benefícios:** Seu médico não pode garantir que você se beneficiará pessoalmente do estudo, porém, estudos como esse podem ajudar na consolidação de futuros tratamentos e melhor conhecimento da receptividade endometrial.

**Seguro:** Não esperamos que você possa ter problemas de saúde devido sua participação nesse estudo. Entretanto, essa pesquisa garante tratamento para todos os problemas médicos que possam surgir em relação à sua participação. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos nesta pesquisa, (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição.

**Garantia de acesso:** Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Maria

Cândida Baracat que pode ser encontrada à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 Instituto Central do Hospital das Clínicas 10º andar – São Paulo, CEP:05403-000 Telefone: 55-11-2661-7621. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CapPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: 2661-7585 ou pelo e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

**Confidencialidade:** Seu médico e as pessoas que trabalham com ele saberão que você está participando desse estudo. Se você tiver um médico de família, esse também poderá ser informado. Seus registros (fichas e documentos relacionados a esse estudo) serão mantidos por seu médico e seus dados particulares serão respeitados rigorosamente. Uma cópia desses dados também será retida no centro de estudo da pesquisa. Os resultados finais do estudo poderão ser publicados em jornais científicos, mas seus dados pessoais nunca serão revelados.

Rubrica da paciente _____

Rubrica do Investigador

_____

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

**Despesas e compensações:** Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

Sua participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de se retirar do estudo, não prejudicará nem afetará seu atendimento médico atual ou futuro, nesta Instituição.

Entretanto, se decidir não participar mais, você deverá notificar imediatamente o seu médico. Isto é para sua própria segurança.

Você deverá compreender também que sua participação poderá ser encerrada, por

seu médico, a qualquer tempo, se ele julgar ser o melhor para você. Você também será informado de toda e qualquer nova informação que possa influenciar a sua intenção de continuar ou não a participar deste estudo.

**CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO**

Li e compreendi essas informações, e todos os detalhes para esse estudo me foram explicados por meu médico. Tive a oportunidade de fazer perguntas e elas foram respondidas. Tive tempo suficiente para analisar minha participação. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Expressão gênica e proteica dos marcadores de receptividade endometrial de mulheres com síndrome dos ovários policísticos"**

Rubrica da paciente _____

Rubrica do Investigador

_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Voluntariamente aceito participar desse estudo e concordo em seguir as instruções de meu médico. Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso afete meu tratamento futuro. Recebi uma cópia desse documento com todas as informações

necessárias para minha participação.
Ao assinar este formulário, dou o meu consentimento para participar desse estudo clínico.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____
___/_____/___
Nome do Paciente Assinatura do Paciente Data

_____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____